



PgPNSB

Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA - UFPB
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - CCS

Catarina Alves de Lima Serafim

**EFEITO GASTROPROTETOR DO MONOTERPENO
(-)-CARVEOL EM MODELOS ANIMAIS**

João Pessoa – PB

2021

Catarina Alves de Lima Serafim

**EFEITO GASTROPROTETOR DO MONOTERPENO
(-)-CARVEOL EM MODELOS ANIMAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração de Farmacologia.

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Leônia Maria Batista

João Pessoa – PB

2021

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

S481e Serafim, Catarina Alves de Lima.

Efeito gastroprotetor do monoterpeno (-)-carveol em
modelos animais / Catarina Alves de Lima Serafim. -
João Pessoa, 2021.

165 f. : il.

Orientação: Leônia Maria Batista.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Produtos Naturais. 2. (-)-carveol. 3. Monoterpeno.
4. Úlcera péptica. 5. Gastroproteção. I. Batista,
Leônia Maria. II. Título.

UFPB/BC

CDU 547.9 (043)

Elaborado por ANNA REGINA DA SILVA RIBEIRO - CRB-15/024

CATARINA ALVES DE LIMA SERAFIM

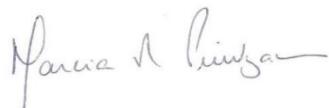
**EFEITO GASTROPROTETOR DO MONOTERPENO
(-)-CARVEOL EM MODELOS ANIMAIS**

APROVADA EM: 10/03/2021

BANCA EXAMINADORA:



Prof.^a Dr.^a Leônia Maria Batista
Orientador(a)



Prof.^a Dr.^a Márcia Regina Piuvezam – UFPB
Avaliador(a) Interno(a)



Prof.^a Dr.^a Caroline Addison Carvalho Xavier de Medeiros – UFRN
Avaliador(a) Externo(a)

João Pessoa – PB
2021

Dedicatória

Com muito amor dedico esta dissertação...

*À toda minha família, em especial, minha querida mãe,
Maria Amélia Alves de Lima.*

*Que sempre abdicou de si para dar o melhor aos seus filhos e
que me dá segurança em saber que estará sempre ao meu lado.*

Não há palavras suficientes para agradecer tudo que fez e faz por mim!

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

Para realizar este trabalho recebi a ajuda e o apoio de muitas pessoas especiais, dentre as quais quero agradecer neste momento:

À minha orientadora Profª. Drª. Leônia Maria Batista, pela confiança, incentivo e por ter proporcionado todo o suporte necessário para conclusão deste trabalho. Obrigada por sua amizade e pelos ensinamentos que me fizeram amadurecer profissionalmente ao longo desses anos. Esses seis anos de convivência, entre PET, PIBIC, TCC e Mestrado, fizeram aumentar o respeito e a admiração pela senhora.

Ao Profº. Drº. Adriano Francisco Alves, pela disponibilidade e compromisso em realizar a análise histopatológica deste trabalho.

Aos amigos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) pela colaboração, especialmente, a Profª. Drª. Aurigena Antunes de Araújo, pela confiança e pela oportunidade de executar os experimentos in vitro deste trabalho nos laboratórios de farmacologia da UFRN.

Ao Profº. Drº Marcelo Sobral da Silva, que cedeu a substância objeto de estudo.

Aos professores participantes da banca examinadora, Profª. Drª. Márcia Regina Piuvezam e Profª. Drª. Caroline Addison Carvalho Xavier de Medeiros por terem atendido prontamente ao convite para desempenhar este papel, dispondo de seu tempo e conhecimento para analisar este trabalho e pelas contribuições importantes na melhoria desta dissertação.

Aos professores do Curso de Farmácia e da Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), pela dedicação ao ofício de ensinar. Obrigada pelos ensinamentos e pela doce convivência durante as disciplinas.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Farmacologia do Trato Gastrintestinal (LTGI), com quem tenho o prazer de conviver e que sem o auxílio esta pesquisa não teria acontecido, com carinho especial, aos doutorandos Maria Elaine Araruna e Edvaldo Alves Júnior. Nossa convivência no laboratório proporcionaram bons frutos científicos e pessoais, pois uma grande amizade foi construída. Compartilhar com vocês a conclusão deste trabalho é muito gratificante.

Gostaria também de agradecer, as estudantes da iniciação científica, Alessa Oliveira e Leiliane Macena, que compartilharam a bancada do laboratório comigo.

Aos colegas dos demais laboratórios da PgPNSB os quais tive contato durante esse período, especialmente, o ONCOFAR por terem me recebido cordialmente todas as vezes que precisei utilizar algum equipamento.

Às minhas turmas de graduação, mestrado e agregados, pelos bons momentos que passamos juntos ao longo dessa trajetória. Sempre lembrei de vocês com carinho.

À equipe da Unidade de Produção Animal (UPA), especialmente, a veterinária Dr^a. Roberta Nunes Parentoni e o bioterista José Crispim Duarte, por terem gentilmente selecionado e cuidado dos animais até o momento de serem utilizados nesta pesquisa.

Ao Sr. Josué, auxiliar de serviços gerais, funcionário competente, sempre simpático e disponível para ajudar.

À Carol e Nilmar, secretárias da PgPNSB, que me atenderam com atenção e competência sempre que precisei.

À PgPNSB, CCS, IPeFARM e CNPq pelo apoio institucional, técnico e financeiro.

À UFPB, minha “segunda casa” ao longo desses anos. Tive o prazer de fazer a graduação e o mestrado nesta instituição. Cada cantinho desse lugar me traz boas recordações de momentos felizes que passei aqui. Universidade que tanto amo e me orgulho!

Aos animais que “doaram” suas vidas em prol da nobre tentativa de obter novos medicamentos que amenizem e curem as mazelas da humanidade.

Aos cidadãos brasileiros que por meio dos seus impostos me possibilitaram uma formação em uma instituição PÚBLICA e de QUALIDADE.

E todos que não citei o nome, mas que também foram essenciais para conquista do meu mestrado. Minha Eterna Gratidão!

Agradecimentos Especiais

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Só tenho a agradecer a todos que passaram pelo meu caminho e que, com certeza, deixaram um pouco de si. As alegrias serviram para me dar esperança e me permitir acreditar na beleza da vida e as tristezas contribuíram para um crescimento pessoal único. É difícil transformar sentimentos em palavras, mas serei eternamente grata a cada um de vocês.

A Deus, essência da minha vida, por ter permitido a concretização deste sonho e por todas oportunidades maravilhosas que me proporciona diariamente. Sua graça e bondade me sustentaram até aqui!

À toda minha Família, que além de dedicar este trabalho eu também agradeço. Vocês são o meu porto seguro e força motriz para me tornar um ser humano melhor a cada dia. Minha mãe Maria Amélia, meu irmão José Neto, meu padrasto José Nildo, minhas tias Kelly, Cleide, Joseci e Diene (in memorian), meus avós Ceci e Severino (Biró) (in memoriam) e todos os demais tios e primos, especialmente, Brígida e Bruninha (afilhada). Essa conquista também é de vocês. Amo cada um de vocês com o meu coração!

Ao meu tio Josivan e sua família, por terem aberto as portas de sua casa para mim nos momentos em que mais precisei.

Ao meu namorado Miguel, por todo amor, carinho, cuidado, companheirismo e confiança a mim dedicados nessa importante fase. Por entender minhas ausências e por me encorajar a lutar pelos meus sonhos. Obrigada por fazer parte da minha história. Mil beijos!

Aos amigos e colegas que fiz em João Pessoa ao longo desses anos, que por diversos momentos foram a minha família nessa cidade. Em especial, Francisco de Assis, Valdeíse Lemos, Thais Almeida, Gabriel Rodrigues, Carlos Maia, Joyce Nascimento, Camylla Andrade, Jociano Lins, Severino Neto, Grasiela Costa, Isabelle Farias e Laís Letícia. Todos vocês me ajudaram a vencer esta etapa. Levarei sempre a lembrança de vocês, com muito carinho, guardada em meu coração. Também não posso deixar de mencionar minha nova companheira de apartamento, Géssica Vicente, que em tão pouco tempo, já se tornou especial.

*"Não te mandei eu? Seja forte e corajoso;
não temas, nem te espantes, porque o
SENHOR, teu Deus, é contigo por onde
quer que andares." Josué 1:9*

*Não é sobre ter todas pessoas do mundo pra si
É sobre saber que em algum lugar alguém zela por ti
É sobre cantar e poder escutar mais do que a própria voz
É sobre dançar na chuva de vida que cai sobre nós
É saber se sentir infinito
Num universo tão vasto e bonito é saber sonhar
Então, fazer valer a pena cada verso
Daquele poema sobre acreditar
Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu
É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu
É sobre ser abrigo e também ter morada em outros corações
E assim ter amigos contigo em todas as situações
A gente não pode ter tudo
Qual seria a graça do mundo se fosse assim?
Por isso, eu prefiro sorrisos
E os presentes que a vida trouxe pra perto de mim
Não é sobre tudo que o seu dinheiro é capaz de comprar
E sim sobre cada momento sorriso a se compartilhar
Também não é sobre correr contra o tempo pra ter sempre mais
Porque quando menos se espera a vida já ficou pra trás
Segura teu filho no colo
Sorria e abrace teus pais enquanto estão aqui
Que a vida é trem-bala, parceiro
E a gente é só passageiro prestes a partir
Laiá, laiá, laiá, laiá, laiá
Laiá, laiá, laiá, laiá, laiá
(Trem-bala)*

Resumo

SERAFIM, C. A. L. EFEITO GASTROPROTETOR DO MONOTERPENO (-)-CARVEOL EM MODELOS ANIMAIS. 2021. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, CCS/UFPB.

RESUMO

O (-)-carveol (*p*-menta-6,8-dien-2-ol) é um álcool monoterpênico monocíclico, encontrado nos óleos essenciais de espécies vegetais como cominho (*Carum carvi*), laranja (*Citrus reticulata*), groselha e chá preto. Estudos farmacológicos mostram que o (-)-carveol apresenta atividade antitumoral, antimicrobiana, neuroprotetora, antioxidante e anti-inflamatória. Entretanto, não existem estudos na literatura sobre sua atividade gastroprotetora, motivando a escolha dessa substância para conduzir esse estudo. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar a toxicidade aguda não clínica e o efeito gastroprotetor do pré-tratamento com o (-)-carveol em modelos animais. Para alcançar esse objetivo, foi realizada uma avaliação comportamental, estimativa da dose letal 50% (DL₅₀), análise do efeito gastroprotetor com diferentes modelos de indução aguda pelos agentes lesivos (etanol, estresse, AINEs e ligadura do piloro) e os mecanismos envolvidos nesse efeito (antisecretórios, citoprotetores, antioxidantes e imunomoduladores). Os resultados obtidos sugerem que o (-)-carveol possui baixa toxicidade, com DL₅₀ igual ou superior a 2.500 mg/kg conforme o guia nº 423 da OECD. No protocolo de úlcera induzida com etanol, o (-)-carveol (25, 50, 100 e 200 mg/kg, v.o.) apresentou efeito gastroprotetor com 46%, 70%, 91% e 93%, respectivamente, de inibição da lesão ulcerativa em comparação ao grupo controle negativo (tween 80 5%). Além disso, o (-)-carveol (100 mg/kg) restaurou os parâmetros histológicos avaliados. Nas lesões induzidas pelo estresse por contensão e frio, o (-)-carveol (25, 50, 100 e 200 mg/kg, v.o.) reduziu o índice de lesão ulcerativa (ILU) em 18%, 43%, 61% e 62%, respectivamente, em comparação com o controle negativo. Na indução com AINEs (piroxicam), o (-)-carveol (25, 50, 100 e 200 mg/kg, v.o.) reduziu o ILU em 14%, 30%, 59% e 60%, respectivamente, quando comparado ao controle negativo. No protocolo experimental de ligadura do piloro (contenção do suco gástrico), o (-)-carveol (100 mg/kg) reduziu o ILU em ambas as vias de administração (oral e intraduodenal), não alterou o pH e a [H⁺], mas diminuiu o volume de secreção gástrica. A administração prévia dos bloqueadores N-Etilmaleimida (NEM - bloqueador dos grupamentos sulfidrílicos), Nω-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME - inibidor da síntese de NO), glibenclamida (bloqueador do canal de potássio ATP dependente - K_{ATP}) e indometacina (inibidor da ciclo-oxigenase), reduziu de forma significativa a gastroproteção exercida pelo (-)-carveol, podendo-se inferir a participação dessas vias na sua atividade gastroprotetora. O (-)-carveol também aumentou o muco gástrico no tecido estomacal e apresentou efeitos antioxidantes ao aumentar a concentração de glutationa reduzida (GSH) e a atividade da superóxido dismutase (SOD) e reduzir os níveis de malondialdeído (MDA) e a atividade da mieloperoxidase (MPO), como também, demonstrou efeito imunomodulador ao reduzir as citocinas inflamatórias interleucina 1 beta (IL-1β) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e manter os níveis basais da citocina anti-inflamatória interleucina 10 (IL-10).

PALAVRAS CHAVE: (-)-carveol; monoterpeno; úlcera péptica; toxicidade; gastroproteção.

Abstract

ABSTRACT

(-)-carveol (*p*-mentha-6,8-dien-2-ol) is a monocyclic monoterpenic alcohol, found in essential oils of vegetable species such as cumin (*Carum carvi*), orange (*Citrus reticulata*), currant and black tea. Pharmacological studies show that (-)-carveol has antitumor, antimicrobial, neuroprotective, antioxidant and anti-inflammatory activity. However, there are no studies in the literature on its gastroprotective activity, motivating the choice of this substance to conduct this study. Thus, the objective of this study was to verify the acute non-clinical toxicity and the gastroprotective effect of pre-treatment with (-)-carveol in animal models. To achieve this goal, a behavioral assessment was performed, an estimated 50% lethal dose (LD_{50}), analysis of the gastroprotective effect with different models of acute induction by harmful agents (ethanol, stress, NSAIDs and pyloric ligation) and the mechanisms involved effect (antisecretory, cytoprotective, antioxidant and immunomodulators). The results obtained suggest that (-)-carveol has low toxicity, with an LD_{50} equal to or greater than 2.500 mg/kg according to OECD guide n° 423. In the ethanol-induced ulcer protocol, (-)-carveol (25, 50, 100 and 200 mg/kg, p.o) showed a gastroprotective effect with 46%, 70%, 91% and 93%, respectively, of injury inhibition ulcerative compared to the negative control group (tween 80 5%). In addition, (-)-carveol (100 mg/kg) restored the evaluated histological parameters. In injuries induced by stress due to contention and cold, (-)-carveol (25, 50, 100 and 200 mg/kg, p.o) reduced the ulcerative injury rate (ILU) by 18%, 43%, 61% and 62 %, respectively, compared to the negative control. In induction with NSAIDs (piroxicam), (-)-carveol (25, 50, 100 and 200 mg/kg, p.o) reduced the ILU by 14%, 30%, 59% and 60%, respectively, when compared to the control negative. In the experimental pylorus ligation protocol (containment of gastric juice), (-)-carveol (100 mg/kg) reduced the ILU in both routes of administration (oral and intraduodenal), did not change the pH and [H +], but decreased the volume of gastric secretion. Prior administration of N-Ethmalemaleimide blockers (NEM - sulphydryl group blocker), N ω -Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME - NO synthesis inhibitor), glibenclamide (ATP-dependent potassium channel blocker - K_{ATP}) and indomethacin (cyclooxygenase inhibitor), significantly reduced the gastroprotection exerted by (-)-carveol, being able to infer the participation of these pathways in its gastroprotective activity. (-)-carveol also increased gastric mucus in the stomach tissue and showed antioxidant effects by increasing the concentration of reduced glutathione (GSH) and the activity of superoxide dismutase (SOD) and reducing the levels of malondialdehyde (MDA) and the activity of myeloperoxidase (MPO), but also demonstrated an immunomodulatory effect by reducing the inflammatory cytokines interleukin 1 beta (IL-1 β) and the tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and maintaining the basal levels of the anti-inflammatory cytokine interleukin 10 (IL-10).

KEY WORDS: (-)-carveol; monoterpenes; peptic ulcer; toxicity; gastroprotection.

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regiões anatômicas do trato gastrintestinal acometidas pelas úlceras e sua etiologia	41
Figura 2. Etiologia e patogênese das úlceras pépticas.....	42
Figura 3. Anatomia do trato gastrintestinal humano	45
Figura 4. Divisões anatômicas do estômago	46
Figura 5. Diferentes camadas e células do TGI.....	47
Figura 6. Célula parietal no estado basal (A) e secretor (B)	49
Figura 7. Transporte de íons H ⁺ , K ⁺ Cl ⁻ e HCO ₃ na célula parietal.....	50
Figura 8. Vias de ativação da célula parietal	51
Figura 9. Mecanismos de ação moleculares relacionados à secreção ácida gástrica	53
Figura 10. Mecanismos de controle da secreção ácida gástrica	54
Figura 11. Mecanismos de defesa da mucosa gástrica	56
Figura 12. Processos de reepitelização, migração celular, restauração das glândulas gástricas, formação do tecido de granulação e angiogênese	58
Figura 13. Ação enzimática do sistema de defesa antioxidante	64
Figura 14. Classes terapêuticas das úlceras pépticas	73
Figura 15. Estrutura básica da unidade de isopreno.....	74
Figura 16. Estrutura química do <i>trans</i> (-)-carveol e <i>cis</i> (-)-carveol	76
Figura 17. Estrutura química do limoneno e seus derivados	77
Figura 18.Animais utilizados em ensaios farmacológicos: (A) camundongo Swiss (<i>Mus musculus</i>) e (B) rato Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>).	82

Figura 19. Fluxograma experimental do estudo com o (-)-carveol	84
Figura 20. Fluxograma para determinação da DL ₅₀	85
Figura 21. Lupa OLYMPUS Optical TL3-SZ40 (A) e estômago ulcerado de rato com etanol (B) para determinação do ALU.....	86
Figura 22. Estômago ulcerado de rato com etanol (A) e determinação da ALU (B) com o programa AVSoft Bioview Spectra 4.0®.....	87
Figura 23. Esquema da estimativa da DL ₅₀ do (-)-carveol	98
Figura 24. Aspectos macroscópicos da mucosa gástrica de ratos Wistar pré-tratados (v.o.) com tween 80 5% (A); carbenoxolona 100 mg/kg (B); (-)-carveol 25 mg/kg (C), 50 mg/kg (D), 100 mg/kg (E) e 200 mg/kg (F) no modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol	100
Figura 25. Efeitos microscópicos da mucosa gástrica de ratos submetidos à lesões gástricas induzidas por etanol e pré-tratados ou não com (-)-carveol	102
Figura 26. Estômagos de ratos pré-tratados com solução salina 0,9% e tratados com Tween 80 5% (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B) e (-)-carveol 100 mg/kg (C) ou pré-tratados com NEM e tratados com Tween 80 5% (D), carbenoxolona 100 mg/kg (E) e (-)-carveol 100 mg/kg (F) no modelo de úlceras induzidas por etanol para avaliação da participação dos grupamentos sulfidrilas	108
Figura 27. Estômagos de ratos pré-tratados com solução salina 0,9% e tratados com Tween 80 5% (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B) e (-)-carveol 100 mg/kg (C) ou pré-tratados com L-NAME e tratados com Tween 80 5% (D), carbenoxolona 100 mg/kg (E) e (-)-carveol 100 mg/kg (F) no modelo de úlceras induzidas por etanol para avaliação da participação do óxido nítrico	109
Figura 28. Estômagos de ratos pré-tratados com solução salina 0,9% e tratados com Tween 80 5% (A), diazóxido 3 mg/kg (B) e (-)-carveol 100 mg/kg (C) ou pré-tratados com glibenclamida e tratados com Tween 80 5%, diazóxido 3 mg/kg (E) e (-)-carveol 100 mg/kg (F) no modelo de úlceras induzidas por etanol para avaliação da participação dos canais de potássio sensíveis a ATP.....	111

Figura 29. Estômagos de ratos pré-tratados com solução salina 0,9% e tratados com Tween 80 5% (A), misoprostol 50 μ g/kg (B) e (-)-carveol 100 mg/kg (C) ou pré-tratados com indometacina e tratados com Tween 80 5% (D), misoprostol 50 μ g/kg (E) e (-)-carveol 100 mg/kg (F) no modelo de úlceras induzidas por etanol para avaliação da participação das prostaglandinas 113

Figura 30. Representação esquemática das atividades farmacológicas encontradas para o (-)-carveol em modelos animais com ratos ou camundongos 137

Lista de tabelas

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Efeito da administração oral do (-)-carveol na evolução ponderal, índice de órgãos, consumo de água e ração de camundongos	99
Tabela 2. Efeito da administração oral e intraduodenal da ranitidina e (-)-carveol em úlceras gástricas induzidas por ligadura do piloro em ratos	105
Tabela 3. Efeito da administração oral e intraduodenal da ranitidina e (-)-carveol nos parâmetros do conteúdo gástrico após ligadura do piloro.....	106

Lista de gráficos

LISTAS DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Efeito da administração oral da carbenoxolona e (-)-carveol em úlceras gástricas induzidas pelo etanol em ratos	100
Gráfico 2. Efeito da administração oral da carbenoxolona e (-)-carveol sobre o número de mastócitos (A), matriz extracelular (B) e mucinas (C) na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol.....	103
Gráfico 3. Efeito da administração oral da ranitidina e (-)-carveol em úlceras gástricas induzidas pelo estresse (imobilização e frio) em camundongos	104
Gráfico 4. Efeito da administração oral da ranitidina e (-)-carveol em úlceras gástricas induzidas por anti-inflamatório não esteroidal (Piroxicam) em camundongos	105
Gráfico 5. Efeito da administração oral da carbenoxolona e (-)-carveol após pré-tratamento com salina e NEM (i.p.) em úlcera gástrica induzida por etanol em ratos.....	107
Gráfico 6. Efeito da administração oral da carbenoxolona e (-)-carveol após pré-tratamento com salina e L-NAME (i.p.) em úlcera gástrica induzida por etanol em ratos	109
Gráfico 7. Efeito da administração oral do diazóxido e (-)-carveol após pré-tratamento com salina e glibenclamida (i.p.) em úlcera gástrica induzida por etanol em ratos	110
Gráfico 8. Efeito da administração oral da carbenoxolona e (-)-carveol na concentração de muco aderido à mucosa gástrica após ligadura do piloro.....	112
Gráfico 9. Efeito da administração oral de misoprostol e (-)-carveol após pré-tratamento com salina e indometacina em úlcera gástrica induzida por etanol em ratos	113
Gráfico 10. Efeito da administração oral da carbenoxolona e (-)-carveol nos níveis de GSH a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos	114
Gráfico 11. Efeito da administração oral da carbenoxolona e (-)-carveol nos níveis de MDA a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos	115
Gráfico 12. Efeito da administração oral da carbenoxolona e (-)-carveol nos níveis de MPO a	

partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos	115
Gráfico 13. Efeito da carbenoxolona e do (-)-carveol sobre a atividade da enzima superóxido dismutase a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos.....	116
Gráfico 14. Efeito da administração oral da carbenoxolona e (-)-carveol nos níveis de IL-1 β (A), TNF- α (B) e IL-10 (C) a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos	117

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AA	Ácido araquidônico
Ach	Acetylcolina
AINE	Anti-inflamatório não esteroidal
ALU	Área de lesão ulcerativa
ANOVA	Análise de variância de uma via
ATP	Adenosina trifosfato
Cag A	Citotoxina associada ao gene A
cAMP	3',5'-monofosfato cíclico de adenosina
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
CAT	Catalase
CCK	Colecistocinina
CCK-1	Receptor de colecistocinina tipo 1
CCK-2	Receptor de colecistocinina tipo 2
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEUA	Comissão de Ética em Uso Animal
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
Cl⁻	Íon cloreto
CSPP-28	Fosfoproteína sensível a concentração de Ca ²⁺
COX	Ciclo-oxigenase
COX-1	Ciclo-oxigenase tipo 1
COX-2	Ciclo-oxigenase tipo 2
DAG	Diacilglicerol
DL₅₀	Dose Letal 50%
DNA	Ácido desoxirribonucleico
d.p.	Desvio padrão da média
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
ECL	Células semelhantes às enterocromafins
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGF	Fator de crescimento epidérmico
eNOS	Sintase de óxido nítrico endotelial
EP	Receptor da prostaglandina E
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
GCs	Ciclase de guanilil solúvel
G_i	Proteína G inibitória
G_s	Proteína G estimulatória
G_{q/11}	Proteína Gq ou proteína G ₁₁
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSSH	Glutationa oxidada
H⁺	Íon hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HCO₃⁻	Íon bicarbonato
H⁺-K⁺ATPase	ATPase trocadora de Hidrogênio-Potássio (Bomba de prótons)
H₂	Receptores de histamina do tipo 2
HE	Hematoxilina e eosina
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
HSP	Proteína de choque térmico
IBP	Inibidor da bomba de prótons
ICAM-1	Molécula de adesão do tipo1
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IP₃	1,4,5-trifosfato de inositol
IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
i.p.	Via intraperitoneal
i.d.	Via intraduodenal
ILU	Indice de Lesão Ulcerativa
iNOS	Sintase de óxido nítrico induzível

KATP	Canais de potássio ATP-dependentes
L-NAME	N-nitro-L-arginina metil éster
M₃	Receptor muscarínico tipo 3
MDA	Malondialdeído
MPO	Mieloperoxidase
Na⁺	Íon sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NEM	N-etilmaleimida
nNOS	Sintase de óxido nítrico neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintase de óxido nítrico
O₂	Oxigênio molecular
O²⁻	Ânion superóxido
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
OH·	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAS	Ácido periódico de Schiff
PG	Prostaglandina
PGE₂	Prostaglandina da série E ₂
PGD₂	Prostaglandina da série D ₂
PGF_{2α}	Prostaglandina da série F _{2α}
PGI₂	Prostaciclina
pH	Potencial hidrogeniônico
PKA	Proteína quinase dependente de cAMP
PKG	Proteína quinase dependente de cGMP
PLA₂	Fosfolipase A ₂
PLC-β1	Fosfolipase C beta 1
PPgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
RL	Radical livre
ROS	Espécies reativas de oxigênio
s.c.	Via Subcutânea
SHs	Grupamentos sulfidrilas
SNA	Sistema nervoso autônomo

SNAP	Sistema nervoso autônomo parassimpático
SNAS	Sistema nervoso autônomo simpático
SNC	Sistema nervoso central
SNE	Sistema nervoso entérico
SOD	Superóxido dismutase
SSTR2	Receptor de somatostatina tipo 2
TFF	Peptídeos da Família do Fator Trifólio
TGI	Trato gastrintestinal
TGF-α	Fator de crescimento transformador alfa
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRPV-1	Transient Receptor Potential Vanilloid 1
TXA₂	Tromboxano A ₂
Vac A	Citotoxina vacuolizante A
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UP	Úlcera péptica
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
v.o.	Via oral

As abreviaturas, siglas e símbolos usados nesse trabalho e que não constam nessa lista, encontram-se descritas no corpo texto ou são convenções adotadas universalmente.

Sumário

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

1. INTRODUÇÃO	37
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	40
2.1 Úlcera péptica	41
2.1.1 Etiologia da úlcera péptica.....	41
2.1.2 Epidemiologia.....	43
2.2 Anatomofisiologia gastrintestinal	44
2.3 Mecanismos de defesa da mucosa gástrica.....	55
2.3.1 Defesa pré-epitelial.....	56
2.3.2 Defesa epitelial	57
2.3.3 Defesa pós-epitelial	59
2.3.3.1 Fluxo sanguíneo e ineração sensorial.....	59
2.3.3.2 Óxido nítrico e canais de potássio ATP-dependentes	60
2.3.3.3 Prostaglandinas	61
2.3.3.4 Grupamentos sulfidrilas	62
2.3.3.5 Sistema antioxidante	62
2.3.3.6 Citocinas.....	64
2.4 Fatores agressores da mucosa gástrica	66
2.4.1 Etanol.....	66
2.4.2 Estresse	67
2.4.3 AINEs	68
2.4.4 <i>H. pylori</i>	69
2.5 Terapêutica das úlceras pépticas	70
2.6 Produtos naturais.....	74
2.7 (-)-Carveol.....	76

3.0 OBJETIVOS	79
3.1 Objetivo geral.....	80
3.2 Objetivos específicos	80
4.0 MATERIAL E MÉTODOS	81
4.1 Material	82
4.1.1 Local da pesquisa.....	82
4.1.2 Substância teste.....	82
4.1.3 Animais.....	82
4.1.4 Substâncias utilizadas.....	83
4.2 Métodos	84
4.2.1 Ensaio toxicológico não-clínico oral agudo (OECD, 2001)	84
4.2.2 Investigação da atividade gastroprotetora.....	86
4.2.2.1 Modelos de indução aguda de úlcera gástrica	87
4.2.2.1.1 Úlceras gástricas induzidas por etanol	87
4.2.2.1.2 Análise histológica.....	87
A) HE	87
B) PAS	88
C) T. Masson.....	88
D) Azul de toluidina	88
4.2.2.1.2.1. Análise morfométrica	89
4.2.2.1.3 Úlcera gástrica induzida por estresse (imobilização e frio).....	89
4.2.2.1.4 Úlcera gástrica induzida por anti-inflamatório não esteroidal (piroxicam)	89
4.2.2.1.5 Úlcera gástrica induzida por contensão do suco gástrico (ligadura do piloro).....	90
4.2.3 Investigação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora.....	90
4.2.3.1 Mecanismo antissecratório ou neutralizante	91
4.3.3.1.1 Avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico após ligadura do piloro ..	91
4.2.3.2 Mecanismos citoprotetores	91
4.2.3.2.1 Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrilas na gastroproteção	91
4.2.3.2.2 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) na gastroproteção	92
4.2.3.2.3 Avaliação da participação dos canais de potássio ATP-dependentes.....	92
4.2.3.2.4 Determinação da concentração de muco aderido à parede gástrica	92
4.2.3.2.5 Avaliação das prostaglandinas na gastroproteção	93
4.2.3.3 Atividade antioxidante.....	93
4.2.3.3.1 Determinação dos níveis de GSH.....	93

4.2.3.3.2 Determinação dos níveis de MDA.....	94
4.2.3.3.3 Determinação da atividade da MPO	94
4.2.3.3.4 Determinação da atividade da SOD.....	95
4.2.3.4 Mecanismos imunorregulatórios	95
4.2.3.4.1 Determinação das interleucinas	95
4.3 Análise estatística	96
5.0 RESULTADOS.....	97
5.1 Ensaio toxicológico não-clínico oral agudo.....	98
5.2 Avaliação da atividade gastroprotetora.....	99
5.2.1 Úlceras gástricas induzidas por etanol	99
5.2.2 Efeito do (-)-carveol sobre as alterações histopatológicas em ratos com lesão gástrica induzida por etanol	101
5.2.2.1 Efeito do (-)-carveol sobre o número de mastócitos, matriz extracelular e mucinas em ratos submetidos às lesões gástricas induzida por etanol	102
5.2.3 Úlceras gástricas induzidas pelo estresse (imobilização e frio).....	103
5.2.4 Úlceras gástricas induzidas por anti-inflamatórios não esteroidais	104
5.2.5 Úlceras gástricas induzidas por contensão do suco gástrico.....	105
5.3 Elucidação dos mecanismos de ação envolvidos no efeito gastroprotetor.....	106
5.3.1 Mecanismo antissecratório ou neutralizante.....	106
5.3.1.1 Avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico	106
5.3.2 Mecanismos citoprotetores	106
5.3.2.1 Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrilas na gastroproteção	106
5.3.2.2 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) na gastroproteção.....	108
5.3.2.3 Avaliação da participação dos canais de potássio ATP-dependentes na gastroproteção	110
5.3.2.4 Quantificação do muco aderido à mucosa gástrica	111
5.3.2.5 Avaliação da participação das prostaglandinas na gastroproteção	112
5.3.3 Atividade antioxidante.....	114
5.3.3.1 Determinação dos níveis de glutationa reduzida (GSH).....	114
5.3.3.2 Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA)	114
5.3.3.3 Determinação dos níveis de mieloperoxidase (MPO)	115
5.3.3.4 Determinação dos níveis de superóxido dismutase (SOD)	116
5.3.4 Investigaçāo da atividade imunorregulatória.....	116
5.3.4.1 Quantificação das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-10 teciduais.....	116

6.0 DISCUSSÃO	118
7.0 CONCLUSÃO	135
8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	138
9.0 ANEXOS	158

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A úlcera péptica (UP) é uma doença comum de incidência e prevalência global, acometendo milhões de pessoas no mundo todo e apresentando altas taxas de recidiva (LANAS; CHAN, 2017). No Brasil, as taxas de letalidade estimadas são de três para cada cem mil (3:100.000) habitantes (OLIVEIRA et al., 2015).

Essa doença é de origem complexa e multifatorial e desenvolve-se com a perda do equilíbrio entre os agentes agressores e protetores da mucosa do trato gastrintestinal (TGI) (YANDRAPU; SAROSIEK, 2015). Estresse, tabagismo, excesso de álcool, uso crônico de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), deficiências nutricionais e a infecção por *Helicobacter pylori* são alguns fatores externos que podem aumentar a incidência das úlceras (MALFERTHEINER; SCHULZ, 2020).

Dentre as opções terapêuticas disponíveis para essa afecção estão os antiácidos, citoprotetores, antagonistas do receptor H₂ de histamina, inibidores da bomba de prótons (IBPs) e nos casos em que há infecção por *H. pylori*, faz-se necessário utilizar medicamentos antimicrobianos (SAŁAGA; MOSIŃSKA, 2017).

No entanto, esses medicamentos estão associados a uma diversidade de efeitos colaterais e adversos e a uma cicatrização deficiente das úlceras, favorecendo a recorrência das ulcerações e gerando um impacto financeiro para os usuários e sistemas públicos de saúde (BYRNE et al., 2018; KAVITT et al., 2019).

Os produtos naturais, incluindo plantas, animais, micro-organismos e minerais, comprovaram historicamente seu valor como uma fonte de moléculas com potencial terapêutico (RAO et al., 2019). Além disso, muitos produtos naturais estão servindo de inspiração e pontos de partida para a química medicinal e desenvolvimento de novas moléculas e medicamentos (BARREIRO, 2019).

A investigação científica de produtos naturais, especialmente aqueles obtidos de espécies vegetais, tem atraído cada vez mais a atenção de pesquisadores e da indústria farmacêutica, sobretudo, devido à grande variedade química e estrutural de seus fitoconstituintes e a diversidade de efeitos biológicos, exercendo um impacto marcante no desenvolvimento de medicamentos (PRIETO-MARTÍNEZ et al., 2019).

Atualmente, aproximadamente 35% dos medicamentos lançados no mercado são oriundos de produtos naturais. Além disso, a maioria das moléculas envolvidas em ensaios clínicos também são de origem natural (NEWMAN; CRAGG, 2016). Estima-se que o mercado global desses medicamentos gira em torno de 1,1 trilhão de dólares (CALIXTO, 2019).

Nessa perspectiva, o Brasil se destaca, por apresentar a maior biodiversidade do mundo, com mais de 50.000 espécies de plantas existentes nos vários biomas (Caatinga, Cerrado, Pantanal,

Mata Atlântica, Amazônia e Pampa), correspondendo a 20-22% do total do planeta (DUTRA et al., 2016). Essas características favorecem o desenvolvimento da ciência e tecnologia na produção dos medicamentos de origem vegetal no país, o que tem sido evidenciado com o crescente número de artigos científicos publicados internacionalmente por pesquisadores brasileiros (DAVID et al., 2015; BARREIRO, 2019; CALIXTO, 2019).

Vários extratos de plantas medicinais e seus constituintes isolados como alcaloides, flavonoides, fenilpropanóides e terpenos (DUTRA et al., 2016) já evidenciaram muitas atividades biológicas e têm sido explorados na prevenção e tratamento das mais diversas afecções humanas (TETALI, 2019).

Os terpenos, também chamados de terpenóides ou isoprenoides, compreendem a classe de metabólitos secundários com maior diversidade química (CHRISTIANSON, 2017). As atividades biológicas das várias classes de terpenos (monoterpenos, sesqui-, di-, tri- e tetraterpenos e seus glicosídeos) foram evidenciadas em estudos *in vitro* e *in vivo* e incluem efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, analgésicos, antitumorais, antimicrobianos, gastroprotetores, entre outros (WOJTUNIK-KULESZA et al., 2019).

É nesse contexto, que o presente trabalho se propõe avaliar o efeito gastroprotetor do monoterpeno levógiro (-)-carveol frente a diversos agentes indutores que mimetizam a úlcera gástrica no homem e elucidar os mecanismos de ação relacionados a esse efeito.

Revisão da Literatura

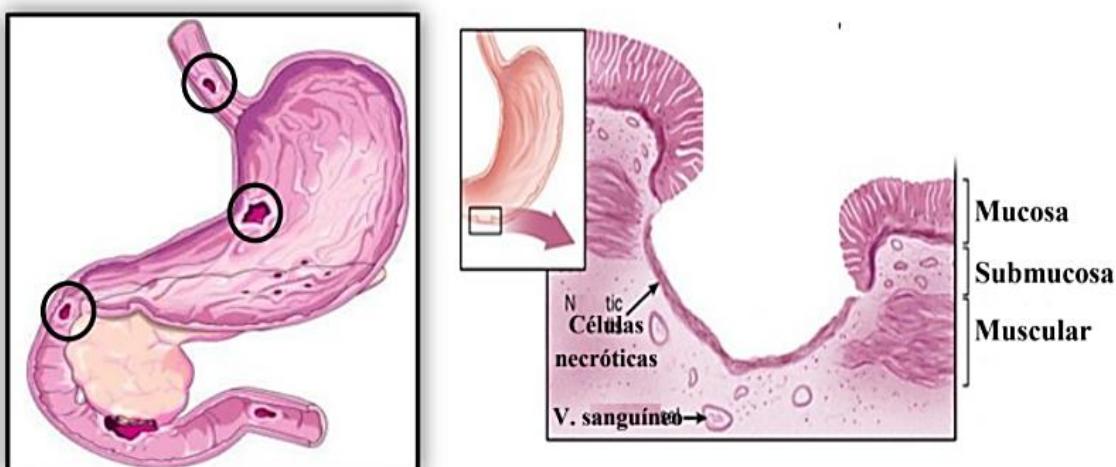
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Úlcera péptica

2.1.1 Etiologia da úlcera péptica

O termo úlcera péptica é utilizado para se referir a ruptura da barreira protetora da camada mucosa do esôfago, estômago ou duodeno sendo caracterizada por um processo inflamatório e oxidativo com presença de necrose e hemorragia (LANAS; CHAN, 2017) (Figura 1).

Figura 1 - Regiões anatômicas do trato gastrintestinal acometidas pelas úlceras e sua etiologia
(Adaptado de: <http://www.buzzle.com/articles>)

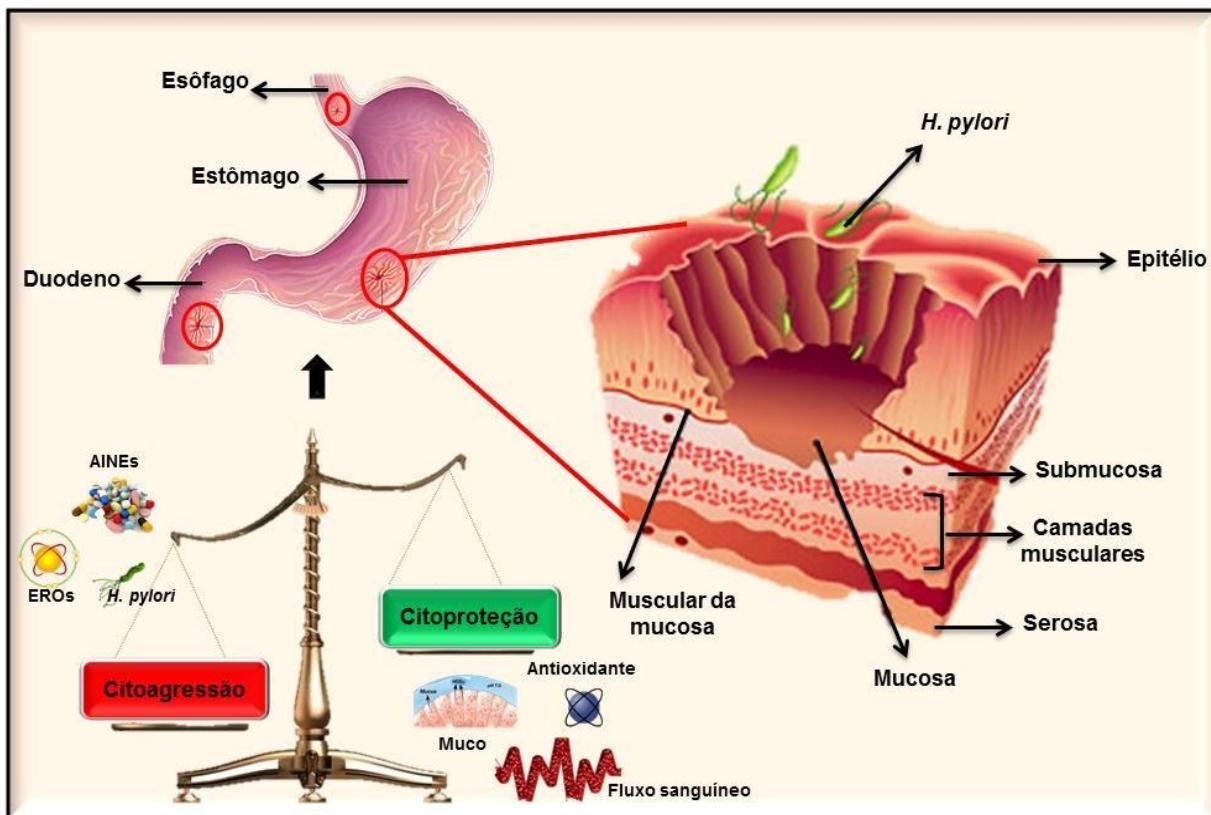


Legenda: As úlceras pépticas são lesões epiteliais caracterizadas por pontos hemorrágicos que acometem a mucosa do esôfago, estômago ou duodeno. Além disso, podem se estender pelas camadas superficiais da mucosa, a exemplo da camada mucosa e submucosa, bem como, progredir às camadas tissulares mais profundas, muscular e serosa.

As úlceras pépticas tendem a agravar de acordo com o grau de comprometimento do tecido lesionado, podendo acometer desde as camadas mais superficiais como a mucosa até as camadas tissulares mais profundas como as camadas musculares, com comprometimento de vasos e ramificações nervosas e a perda da integridade e funcionalidade das células (RAU et al., 2019).

A etiologia dessa doença é complexa e heterogênea e uma das principais hipóteses aceita trata da perda do equilíbrio entre os agentes protetores da mucosa como a camada de muco e bicarbonto, prostaglandinas, óxido nítrico, fluxo sanguíneo, regeneração celular e o sistema antioxidante (YANDRAPU; SAROSIEK, 2015) e dos agentes agressores como a secreção ácida gástrica e a atividade proteolítica da pepsina, refluxo biliar, alterações na motilidade, redução do aporte de fluxo sanguíneo, ativação de neutrófilos e leucotrienos (MALFERTHEINER; SCHULZ, 2020). Além disso, o estresse oxidativo, apoptose das células epiteliais e inflamação na mucosa estão associados com a patogênese desta doença (YANG et al., 2017) (Figura 2).

Figura 2 – Etiologia e patogênese das úlceras pépticas (Fonte: Arquivo LFTGI)



Legenda: Um desequilíbrio entre fatores agressores e protetores iniciam o processo ulcerogênico. A infecção por *Helicobacter pylori* e o uso de AINEs são importantes na perturbação da camada protetora da mucosa. Expor o epitélio gástrico ao álcool, cigarro e AINEs podem aumentar o processo ulcerogênico, que leva à erosão e eventualmente ocorre perfuração.

Durante muito tempo, acreditava-se que o principal fator implicado no desenvolvimento e progressão da úlcera péptica fosse o ambiente ácido hipersecretório. Mas a descoberta da infecção por *Helicobacter pylori* e o uso generalizado de AINEs na segunda metade do século XX mudou essa percepção (KEMPENICH; SIRINEK, 2018; LANAS; CHAN, 2017).

Atualmente sabe-se que o desenvolvimento das ulcerações está relacionado a alguns fatores exógenos associados ao estilo de vida da maioria dos indivíduos, como hábitos dietéticos inadequados (consumo excessivo de café, refrigerantes e condimentos), estresse e ingestão de agentes químicos a exemplo do álcool e o tabagismo (MALFERTHEINER; SCHULZ, 2020).

Ao progredir a lesão, já na úlcera em atividade, há quatro camadas bem reconhecidas, embora nem sempre bem individualizadas: 1) tecido necrótico, geralmente do tipo fibrinoide, presente no fundo da lesão decorrente da digestão ácido péptica; 2) exsudato inflamatório com predomínio de neutrófilos; 3) camada constituída principalmente por tecido de granulação; e 4) tecido fibroso cicatricial (BRAGA et al., 2016).

Os sintomas da úlcera péptica são variáveis e inespecíficos incluindo dor epigástrica, náuseas, vômitos, eructações, sensação de plenitude, refluxo e azia. Além disso, têm sido relatados muitos casos assintomáticos de úlceras (NARAYANAN et al., 2018; VOULGARIS et al., 2019).

Classicamente, as pessoas acometidas com úlcera gástrica apresentam dor epigástrica pós-prandial, associada a falta de apetite e perda peso. Por outro lado, nas úlceras duodenais ocorre piora da dor epigástrica principalmente em jejum ou a noite (LANAS; CHAN, 2017).

Quando não há um tratamento efetivo geralmente ocorrem sintomas recorrentes devido a cicatrização espontânea e recidiva das ulcerações enquanto o fator etiológico persistir. Estimam-se taxas de recidivas em 60% dos casos (STEPHEN et al., 2016). Como também, podem ocorrer complicações como sangramentos, perfuração, obstrução e malignidade (KAVITT et al., 2019).

As complicações ocorrem em cerca de 10 a 20% dos indivíduos com úlceras pépticas (THORSEN et al., 2013). Estudos apontam que os usuários de AINEs têm quatro vezes mais risco de desenvolver complicações em comparação com os não usuários (LANAS; CHAN, 2017).

O sangramento é a complicação mais comum, geralmente se manifesta como melena ou hematêmese e ocorre em 1/1000 indivíduos a cada ano. É uma das causas mais frequente de hospitalização devido doença gastrintestinal nos Estados Unidos, sendo responsável por mais de 507.000 hospitalizações e US\$ 4,85 bilhões em custos anual (LOREN, 2016) e é frequentemente associado ao *H. pylori* e AINEs (FAGUNDES et al., 2020; MINOZZO et al., 2016). A perfuração é uma emergência cirúrgica e está associada à mortalidade média de 20% (BYRNE et al., 2018).

Além disso, a úlcera péptica é classificada como uma doença pré-cancerosa e de preocupação global pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Estima-se que cerca de 1% dos casos de úlceras podem se deteriorar em câncer (LIU et al., 2017).

Apesar dos sinais e sintomas da úlcera péptica serem pouco específicos, seu diagnóstico ocorre a partir da observação das apresentações clínicas e testes definitivos como a endoscopia digestiva alta (AHMAD et al., 2019).

2.1.2 Epidemiologia

A epidemiologia da úlcera péptica apresenta caráter dinâmico com variações consideráveis ao longo do tempo, sendo difícil mensurar suas reais taxas de prevalência e incidência, sobretudo, devido a heterogeneidade da doença, a subjetividade dos sintomas e a semelhança clínica com outras afecções que acometem o TGI (GREENWOOD-VAN MEERVELD et al., 2017).

Estima-se que a úlcera péptica se desenvolve em cerca de 5% a 10% da população mundial pelo menos uma vez durante a vida, chegando a acometer 4 milhões de pessoas no mundo anualmente e com taxas de incidência de 0,1% a 0,3% (LANAS; CHAN, 2017).

É considerada uma doença dos tempos modernos, estando associada ao estilo de vida agitado da maioria dos indivíduos, com altos níveis de estresse, dieta desequilibrada, utilização de substâncias químicas como o álcool, tabagismo e o uso prolongado de AINEs (YEGEN, 2018).

Os AINEs e o *H. pylori* são considerados os mais importantes fatores predisponentes para o desenvolvimento das úlceras pépticas (SARRI et al., 2019). Estudos apontam que os AINEs são responsáveis por 50% das lesões ulcerativas (LANAS, 2016) e cerca de 70% das úlceras gástricas (UG) e 90% das úlceras duodenais (UD) estão associadas ao *H. pylori* (SVERDÉN et al., 2018).

A úlcera péptica é uma doença progressiva e embora acometa pessoas mais jovens e adultos de meia-idade, tende a aumentar com o processo de envelhecimento, sendo observada uma maior incidência nessa população (DUMIC et al., 2019).

Em relação ao sexo, os homens são frequentemente mais acometidos do que as mulheres, na proporção de 3,5:1 e 2,5:1, para úlceras gástricas e duodenais respectivamente. No que tange o tipo de úlcera, as lesões duodenais são mais prevalentes que as gástricas. Entretanto, têm-se observado uma redução gradual na incidência de úlceras duodenais nos últimos anos, enquanto que, a incidência das úlceras gástricas permanece quase que inalterada (LANAS; CHAN, 2017).

No Brasil, apesar de ser uma doença bastante frequente, sua real prevalência ainda é desconhecida, pois são poucos os estudos de base populacional que quantificam sua magnitude. Um estudo conduzido em âmbito nacional revelou uma prevalência de 0,2% em homens e 0,1% em mulheres, com taxa de mortalidade de 3,0/100 mil habitantes (3,6/100 mil em homens; 2,3/100 mil em mulheres). Esse estudo também demonstrou que a região Nordeste apresenta valores superiores à média nacional, 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).

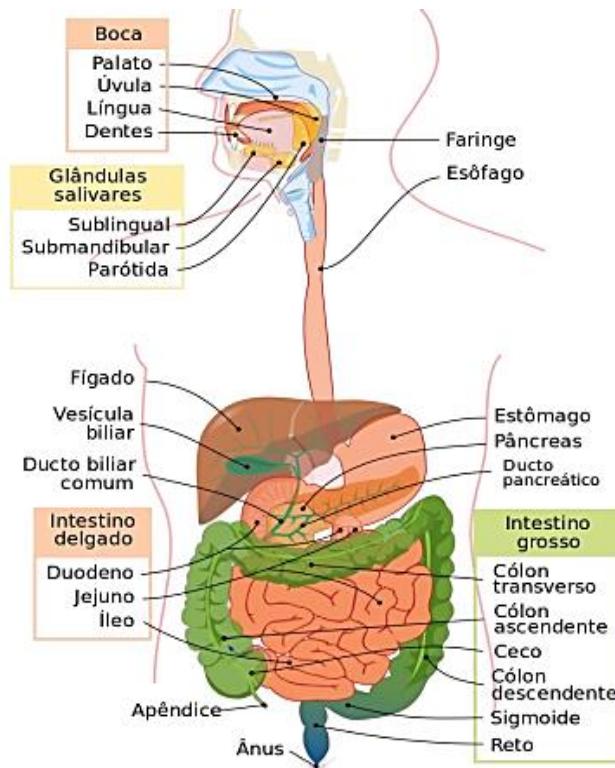
Entretanto, devido às subnotificações, há ausência de dados epidemiológicos que reportem verdadeiramente os casos de úlcera péptica no país, evidenciando-se a necessidade de pesquisas para estimativas mais precisas de sua ocorrência.

2.2 Anatomofisiologia gastrintestinal

O trato gastrintestinal (TGI) é um tubo alimentar longo e oco que se inicia na cavidade oral (boca) e se estende até a cavidade pélvica (ânus), medindo cerca de 6-9 metros de comprimento e com diâmetro variável em suas diferentes seções (ASHFORD, 2017).

É formado pela cavidade oral, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), intestino grosso (ceco, cólon e reto) e ânus associados com órgãos glandulares e anexos (dentes, língua, glândulas salivares, fígado, pâncreas exócrino e vesícula biliar) que atuam em conjunto para realizar importantes processos fisiológicos como ingerir e digerir os alimentos, absorver nutrientes e eliminar os resíduos do que não foi absorvido. O TGI contém um dos maiores reservatórios de tecido linfóide do organismo (GALT) e um sistema nervoso entérico (SNE) com mais neurônios que a medula espinhal (PEATE, 2018) (Figura 3).

Figura 3 - Anatomia do trato gastrintestinal humano (Fonte: Digestive System, 2016)



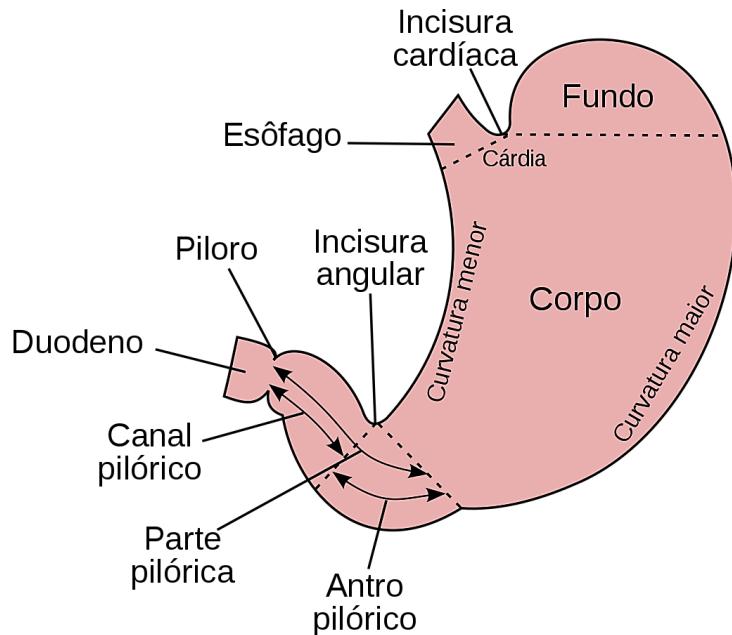
Legenda: O TGI é um sistema integrado de órgãos responsáveis pela ingestão de alimentos, digestão, absorção de nutrientes e eliminação de resíduos não absorvíveis. É dividido em estruturas superiores e inferiores, formando os órgãos digestivos e acessórios. As principais estruturas incluem: boca, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), intestino grosso (ceco, cólon e reto) e ânus. Os órgãos acessórios contribuem para a função do TGI. Esses órgãos são: glândulas salivares, fígado, vesícula biliar e pâncreas.

O estômago consiste na porção mais dilatada do TGI, correspondendo a um compartimento em formato de “J”, semelhante a uma bolsa, que se inicia após o esôfago limitando-se inferiormente com o duodeno, com sua maior porção localizada à esquerda do plano mediano corpóreo. É o local de armazenamento temporário do alimento ingerido durante a refeição, podendo comportar até 1,5-2L de conteúdo alimentar em um indivíduo adulto, para que seja fracionado e misturado as secreções gástricas. O produto resultante desse processo é chamado de quimo que passa do estômago para o duodeno na forma de um líquido viscoso (ASHFORD, 2017).

É um órgão oco e curvo, com a borda direita denominada de curvatura menor e a borda esquerda de curvatura maior. A região entre o estômago e o esôfago é chamada de cárdia e a região entre o estômago e o duodeno é marcada pelo piloro (SCHNEIDER; FEUSSNER, 2017).

O estômago pode ser dividido em quatro regiões anatômicas: cárdia, fundo, corpo e antro, sendo limitado em suas extremidades pelos esfíncteres esofágiano (na parte superior) e pilórico (na parte inferior), que controlam a passagem dos alimentos (LANDA et al., 2019) (Figura 4).

Figura 4 - Divisões anatômicas do estômago (Fonte: Adaptado de Shen; Fox, 2013)



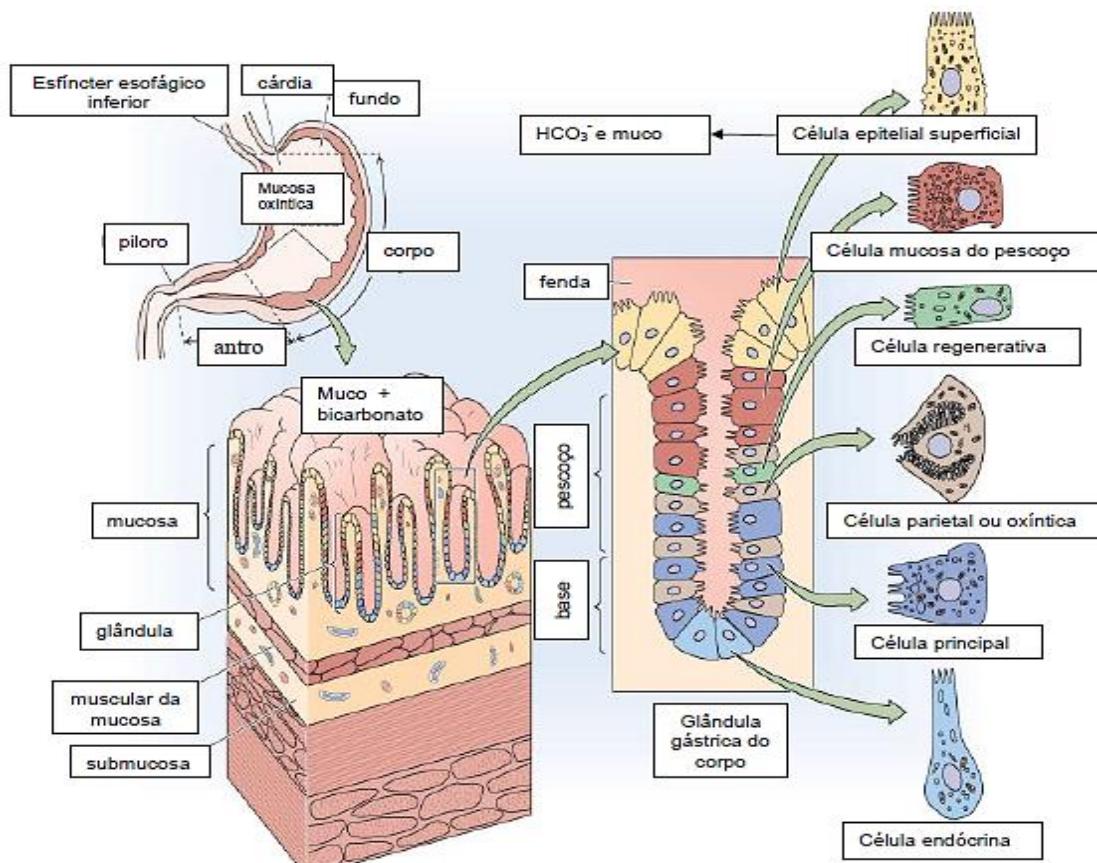
Legenda: Regiões anatômicas do estômago (cárda, fundo, corpo e antro); curvatura menor e maior.

A cárda é a região pela qual o estômago se une ao esôfago. O fundo está localizado na porção superior do estômago se estendendo acima da junção gastroesofágica. O corpo é a parte mediana do estômago, fica entre o fundo e o antro, correspondendo à maior parte do órgão. O último segmento é o antro, que se estende do corpo até a região do esfíncter pilórico, uma válvula muscular espessa que separa o antro do duodeno (LANDA et al., 2019).

O estômago também pode ser subdividido em mais duas regiões segundo a sua funcionalidade: 1) região proximal (composta pela cárda, fundo e aproximadamente 1/3 do corpo), cuja função principal é o armazenamento dos alimentos e 2) a região distal (2/3 do corpo, antro e piloro) cuja função está associada à atividade contrátil da musculatura do estômago, o auxílio na homogeneização dos alimentos com as enzimas digestivas e a propulsão do bolo alimentar ao longo do TGI (CAMPBELL, 2015; MCDONALD; MACFARLANE, 2018).

O estômago pode ser compartimentado em quatro camadas distintas: mucosa, submucosa, muscular e serosa ou adventícia, sendo diferenciadas pelo tipo de tecido que as compõe, os quais vão determinar a funcionalidade de cada camada (Figura 5) (KIM; SHIVDASANI, 2016).

Figura 5 - Diferentes camadas e células do TGI (Fonte: Boron; Boupaep, 2012)



Legenda: Revestimento da mucosa gástrica (mucosa, muscular da mucosa, submucosa, muscular e serosa); fenda; glândula gástrica do corpo; célula mucosa do pescoço; célula regenerativa; célula parietal ou oxíntica; célula principal; célula endócrina.

A camada mucosa está voltada para a região do lúmen e realiza todo o revestimento interno desse órgão. É constituída por uma única camada de epitélio colunar simples que secreta fatores protetores para a mucosa, como muco e bicarbonato, lâmina própria coberta de tecido conjuntivo subepitelial que sustenta e mantém o epitélio no lugar e uma camada fina de músculo liso (muscular da mucosa). Na submucosa, camada de tecido conjuntivo, rica em vasos sanguíneos e linfáticos, encontra-se o plexo submucoso (Meissner) que modula os processos de secreção e fluxo sanguíneo gastrintestinal (SAUER; MERCHANT, 2018).

A região muscular é formada por três camadas: oblíqua interna, circular média e longitudinal externa. O plexo mioentérico (Auerbach) fica entre a camada circular média e longitudinal externa, sendo responsável pelas contrações segmentares e movimentos peristálticos ao longo do TGI e o músculo liso circular sofre modificações em algumas regiões do TGI para formar os esfíncteres. A camada serosa é a camada mais externa da parede do tubo digestivo e se estende continuamente com o peritônio (PEATE, 2018; LANDA et al., 2019).

O epitélio da mucosa emite projeções em direção à lâmina própria formando estruturas invaginadas denominadas fossetas, também conhecidas como criptas gástricas. A partir destas

fossetas se formam diversas glândulas tubulares: oxínticas ou gástricas e pilóricas que podem ser diferenciadas quanto a distribuição, constituição e funcionalidade (THOMPSON et al., 2018).

As glândulas oxínticas se localizam no corpo e fundo do estômago, correspondem ao tipo glandular mais abundante, ocupando cerca de 80% da mucosa desse órgão. Já as glândulas pilóricas estão presentes no antro ou na região pilórica e correspondem aos outros 20% restantes do estômago. Ambas as glândulas oxínticas e pilóricas possuem células mucosas (produtoras de muco), células D (produtoras de somatostatina) e células enterocromafins (ECL - liberam histamina). Além disso, as glândulas oxínticas possuem células parietais (produtoras de fator intrínseco e HCl) e células principais (produtoras de pepsinogênio), já as glândulas pilóricas possuem células G (produtoras de gastrina) (SAUER; MERCHANT, 2018).

O suco gástrico é constituído principalmente por ácido clorídrico (HCl), pepsina, íons bicarbonato (HCO_3^-), muco livre, eletrólitos (Na^+ , Cl^- e K^+) e fator intrínseco. Acredita-se que sejam secretados de 1-3L de secreção ácida gástrica diariamente, com pH aproximadamente 1 (MCDONALD; MACFARLANE, 2018).

O ácido gástrico participa da digestão de proteínas por meio da ativação enzimática do pepsinogênio em pepsina, atua na absorção do ferro, cálcio, vitamina B₁₂ e alguns medicamentos (tiroxina e cetoconazol). Ele funciona também como um mecanismo protetor contra patógenos, dificultando o crescimento da maioria dos micro-organismos nessa região (LANDA et al., 2019).

A secreção gástrica é tradicionalmente dividida em três fases: cefálica, gástrica e intestinal. Na fase cefálica se inicia a secreção gástrica através da liberação do neurotransmissor acetilcolina (Ach) pelas fibras eferentes vagais, em resposta aos sinais sensoriais como os estímulos visuais, olfatórios e gustativos, associados à antecipação do alimento no lúmen do estômago (SAUER; MERCHANT, 2018). A face cefálica é responsável por aproximadamente um terço (1/3) da produção total de ácido (WILSON; STEVENSON, 2017; LANDA et al., 2019).

A fase gástrica é considerada a fase mais importante da digestão. Nessa etapa, a secreção gástrica é amplificada por estímulos químicos e mecânicos desencadeados pela chegada do alimento no estômago. Os alimentos, particularmente peptídeos e aminoácidos são os principais fatores estimulantes para a secreção da gastrina. A distensão da parede do estômago promovida pela entrada do alimento no lúmen, ativa receptores sensíveis ao estiramento, resultando na maior liberação da acetilcolina, histamina e gastrina nas proximidades das células parietais. Há também um aumento no aporte sanguíneo dessa região para suprir as necessidades metabólicas das células secretoras de ácido (SAUER; MERCHANT, 2018). Essa fase é responsável por pelo menos metade da secreção estimulada (WILSON; STEVENSON, 2017; LANDA et al., 2019).

Na fase intestinal ocorre uma diminuição na secreção gástrica em decorrência da chegada do quimo ao duodeno (SCHUBERT, 2016), resultando na ativação de quimiorreceptores e liberação neural do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), levando a liberação de

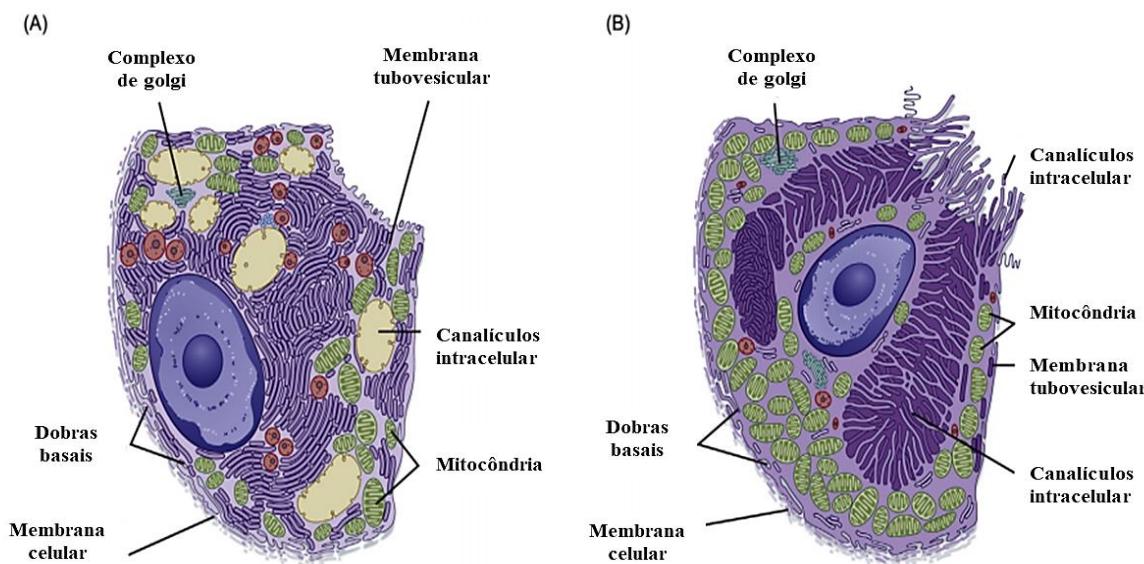
somatostatina. A gastrina liberada durante as fases anteriores exerce uma regulação negativa sob a secreção ácida gástrica por estimular as células D a liberarem somatostatina, com a inibição subsequente da liberação da gastrina. O duodeno também envia sinais para o estômago (via SNE) e medula que atuam inibindo os núcleos vagais, exercendo uma resposta inibitória no estômago. A presença do quimo na porção inicial do intestino delgado estimula ainda a liberação de secretina e colecistoquinina, que modulam a secreção ácida gástrica (WILSON; STEVENSON, 2017).

Além disso, as células parietais também mantêm a liberação de H^+ de forma contínua e independente, ou seja, mesmo sem que ocorram estímulos externos, caracterizando a fase basal da secreção (SCHUBERT, 2016).

As células parietais localizam-se predominantemente na parte média das glândulas gástricas e secretam fator intrínseco e HCl. Morfologicamente são arredondadas, com núcleo esférico e central, citoplasma eosinofílico e apresentam características estruturais típicas como uma grande incidência de mitocôndrias (cerca de 35% do volume celular total), tubulovesículas (TVs – onde se encontram as H^+ -K⁺-ATPases) e canalículos secretórios (WILSON; STEVENSON, 2017).

A morfologia das células parietais se diferenciam de acordo com o seu grau de atividade em estado basal (estado de repouso) e estado secretor (no qual ocorre secreção de HCl) (SAUER; MERCHANT, 2018), conforme está representado na Figura 6.

Figura 6 – Célula parietal no estado basal (A) e secretor (B) (Adaptado de Sauer; Merchant, 2018)



Legenda: Alterações na morfologia das células parietais nos estados (A) basal e (B) secretor. Pode-se observar alterações como o aumento da atividade mitocondrial e a exposição dos canalículos secretórios.

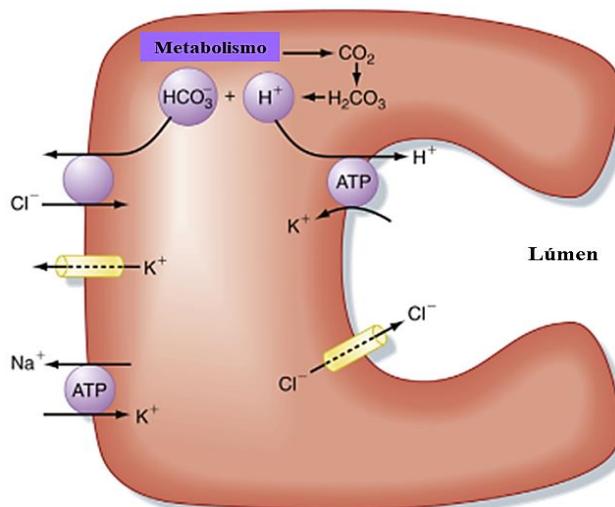
No estado de repouso, as H^+ -K⁺-ATPases estão localizadas em TVs citoplasmáticas na célula parietal. Quando essa célula recebe o estímulo secretor ocorrem algumas alterações morfológicas, como o remodelamento da membrana de forma dependente de proteínas SNAREs e a reorganização do citoesqueleto dependente de actina. As TVs se movem ao longo dos

filamentos de actina para se fundirem com canalículos secretores na membrana apical, resultando em uma superfície invaginada com grande capacidade secretora (10 x mais) (SAHOO et al., 2018).

A bomba de prótons é uma proteína de membrana heterodimérica contendo uma subunidade α e uma subunidade β . A subunidade α contém o sítio catalítico e é responsável pela troca de íons K^+ luminal por íons H^+ citoplasmáticos (proporção 1:1). Esse transporte é do tipo ativo, dependente de energia, conduzido pela hidrólise do trifosfato de adenosina (ATP) em difosfato de adenosina (ADP) proveniente das numerosas mitocôndrias presentes na célula parietal. A subunidade β é altamente glicosilada e atua protegendo a bomba de prótons da degradação e é necessária para o deslocamento da bomba nas TVs até a região apical (SCHUBERT, 2016). A meia-vida da bomba de prótons é cerca de 50 horas (HAN et al., 2016).

Os íons H^+ são obtidos por meio da enzima anidrase carbônica II presente no citoplasma das células parietais. Essa enzima catalisa a reação do dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O) para formar o ácido carbônico (H_2CO_3) que é rapidamente dissociado em suas espécies iônicas, dando origem aos íons H^+ e bicarbonato (HCO_3^-). O bicarbonato formado a partir desta reação é transportado para fora desta célula em troca de íons Cl^- , por meio do trocador Cl^-/HCO_3^- presente na membrana basolateral. Os íons cloreto são direcionados da corrente sanguínea para o citoplasma das células parietais, de onde são transportados por difusão facilitada para o lúmen gástrico se associando com o H^+ para formar o HCl (MCDONALD; MACFARLANE, 2018; SAUER; MERCHANT, 2018; WILSON; STEVENSON, 2017). A representação da fisiologia da secreção de HCl pela célula parietal pode ser visualizada na Figura 7.

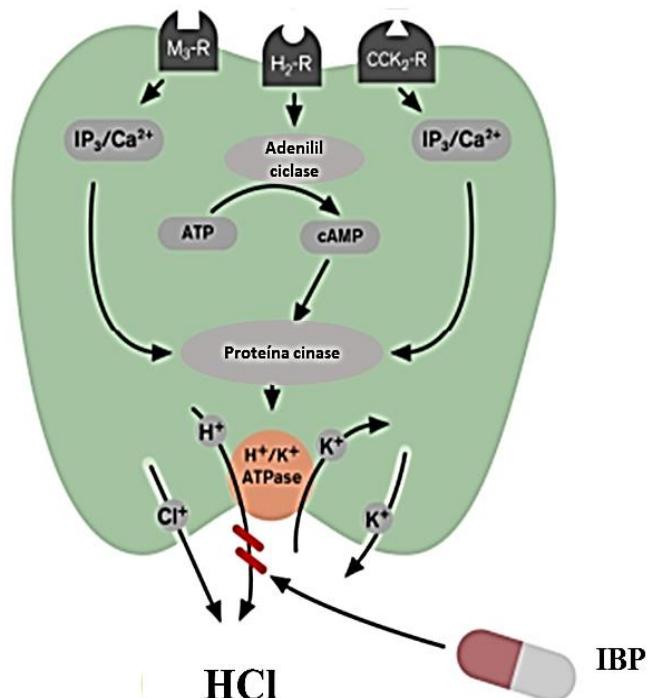
Figura 7 - Transporte de íons H^+ , K^+ , Cl^- e HCO_3^- na célula parietal (Adaptado de Sauer; Merchant, 2018)



Legenda: Formação do HCl pela ação da enzima anidrase carbônica II a partir do ácido carbônico. O H^+ oriundo da dissociação do ácido carbônico se junta aos íons Cl^- provenientes do trocador Cl^-/HCO_3^- no lúmen gástrico, formando o HCl.

A célula parietal é regulada por estímulos neurais, hormonais e parácrinos, que atuam estimulando a secreção diretamente ou indiretamente. A acetilcolina, histamina e gastrina são considerados os secretagogos mais importantes no estímulo da secreção ácida gástrica (LANDA et al., 2019) (Figura 8).

Figura 8 – Vias de ativação da célula parietal (Adaptado de Helgadottir; Bjornsson, 2019)



Legenda: Interação dos secretagogos acetilcolina e gastrina nos receptores M_3 e $CCK-2$ levam a ativação do sistema efetor fosfolipase C com aumento de IP_3 e Ca^{2+} e a interação da histamina com o receptor H_2 leva a ativação da via da adenilil ciclase com aumento de cAMP. Ambas as vias culminam na ativação da bomba de prótons e liberação de HCl.

A gastrina, liberada pelas células G do antro, é o principal hormônio envolvido no estímulo da secreção ácida gástrica, agindo diretamente na célula parietal ao se ligar ao receptor de colecistocinina do tipo 2 ($CCK-2$) e indiretamente, por estimular a liberação de histamina via $CCK-2$ presente nas ECL (WALDUM et al., 2019).

A acetilcolina (Ach) é um neurotransmissor liberado pelas fibras pós-sinápticas de neurônios do sistema nervo central (SNC) e entérico (SNE) responsável pela mediação das diversas funções do TGI, quando se liga aos receptores muscarínicos, especialmente o receptor M_3 , por ser o mais expresso e distribuído no estômago. A Ach atua no estímulo da secreção de ácido ao agir diretamente na célula parietal via receptor M_3 e indiretamente nas ECL via receptor M_1 , resultando no aumento da secreção de histamina (LANDA et al., 2019), além de ativar os receptores M_2 e M_4 das células D inibindo a liberação de somatostatina (SCHUBERT, 2016).

Os receptores M₃ da acetilcolina e CCK-2 para ligação de gastrina são receptores do tipo metabotrópicos ou acoplados a proteína G (GPCR) e ancoram a proteína heterotrimérica G_{q/11} em sua região intracelular, compartilhando a mesma via de sinalização (SCHUBERT, 2016).

Em seu estado de repouso, a proteína G encontra-se como um trímero, composta por uma subunidade α (alfa), β (beta) e γ (gama), com o nucleotídeo difosfato de guanosina (GDP) ligado na subunidade α, formando o complexo α-GDP ligado. Quando há a interação desses receptores com seus respectivos ligantes e sua consequente ativação, ocorrem alterações conformacionais, que resultam na troca do difosfato de guanosina pelo trifosfato de guanosina (GDP/GTP) no sítio da subunidade α da proteína G. Dessa forma, por impedimento estérico ocorre a dissociação da subunidade α-GTP do dímero βγ. A subunidade α-GTP fosforila e ativa a fosfolipase C-β1 (PLC-β1), enzima responsável por hidrolisar o fosfolipídio de membrana 4-5 bisfosfato de fosfatidil inositol (PIP₂) gerando como produto dois segundos mensageiros: 1-4-5 trifosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O DAG devido ao seu caráter lipofílico permanece retido na membrana, enquanto que o IP₃ por ser hidrossolúvel se difunde pelo citosol, até chegar ao retículo endoplasmático, onde interage com canais de liberação de íons Ca²⁺ (cálcio) sensíveis ao IP₃, resultando na mobilização desses íons dos estoques intracelulares, aumentando rapidamente sua concentração citosólica. O aumento das concentrações de Ca²⁺ citosólico é o principal estímulo para a translocação e fusão de tubulovesículas contendo a H⁺-K⁺-ATPase para a região apical das células parietais. O DAG atua como um cofator junto com o Ca²⁺ para ativação da proteína cinase dependente de cálcio (PKC), resultando na fosforilação de alvos intracelulares como a fosfoproteína sensível ao Ca²⁺ de 28 kDa (CSPP-28) e a consequente ativação da bomba de prótons e secreção de HCl (BERRIDGE, 2014).

A histamina é a principal substância parácrina estimuladora da secreção ácida gástrica (LANDA et al., 2019). A histamina é uma amina biogênica biossintetizada a partir da L-histidina pela ação enzimática da histidina descarboxilase (SCHUBERT, 2016). Essa amina fica armazenada em vesículas secretoras no citoplasma das células enterochromafins e quando liberadas atuam diretamente em células parietais adjacentes por meio da interação com receptores H₂ presentes na membrana basolateral destas células (WALDUM et al., 2019) e indiretamente através dos receptores H₃ inibindo a somatostatina (SCHUBERT, 2016).

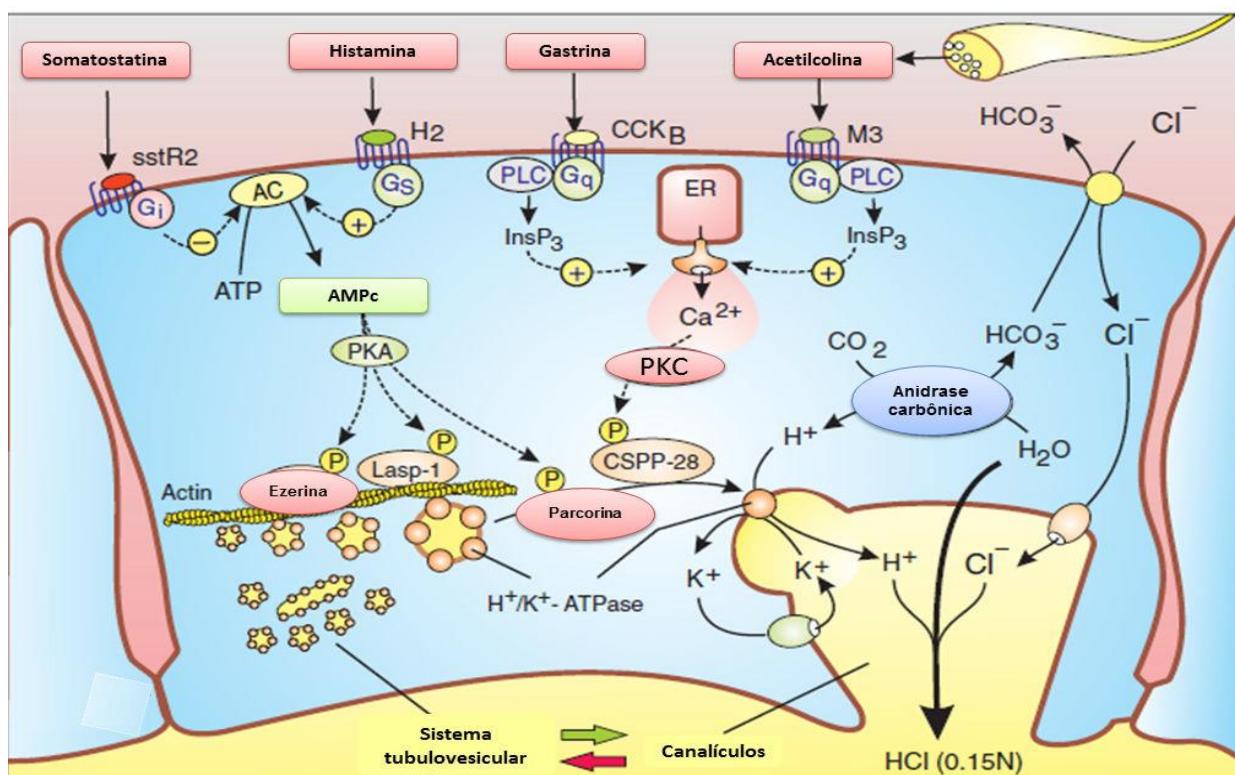
Os receptores H₂ de histamina também são receptores do tipo GPCRs e estão acoplados a proteína G estimulatória (Gs). A ativação desse receptor leva a estimulação da enzima adenilil ciclase (AC), que catalisa a conversão do trifosfato de adenosina (ATP) em 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (cAMP). O aumento das concentrações intracelulares desse segundo mensageiro, ativa a proteína cinase dependente de cAMP (PKA) que fosforila diversos alvos protéicos como a ezerina, parcorina e Lasp-1 desencadeando uma cascata de sinalização

intracelular que culmina em mudanças morfológicas da célula parietal e aumento na atividade da bomba de prótons (BERRIDGE, 2014).

A ezerina (proteína de ligação a actina) está localizada na membrana canalicular da célula parietal 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⁺-K⁺-ATPase à membrana apical com redução da secreção gástrica. 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 cAMP, com sítios de fosforilação dependentes de PKA localizados nos aminoácidos serina (Ser99 e Ser146). A parcorina, uma vez fosforilada pela PKA, transloca-se para membrana apical, onde ativa diretamente a bomba de prótons e modula positivamente sua atividade (SCHUBERT, 2016)

Até pouco tempo se sabia que a ACh e gastrina levavam ao estímulo das células parietais formando o Ca²⁺ como segundo mensageiro e que histamina levaria respostas mediadas pelo cAMP. Entretanto, recentemente foi identificado canais para cálcio nas tubulovesículas das células parietais ativados pela interação da histamina com o receptor H₂ (SAHOO et al., 2018).

Figura 9 - Mecanismos de ação moleculares relacionados à secreção ácida gástrica (Fonte: Adaptado de Berridge, 2014)

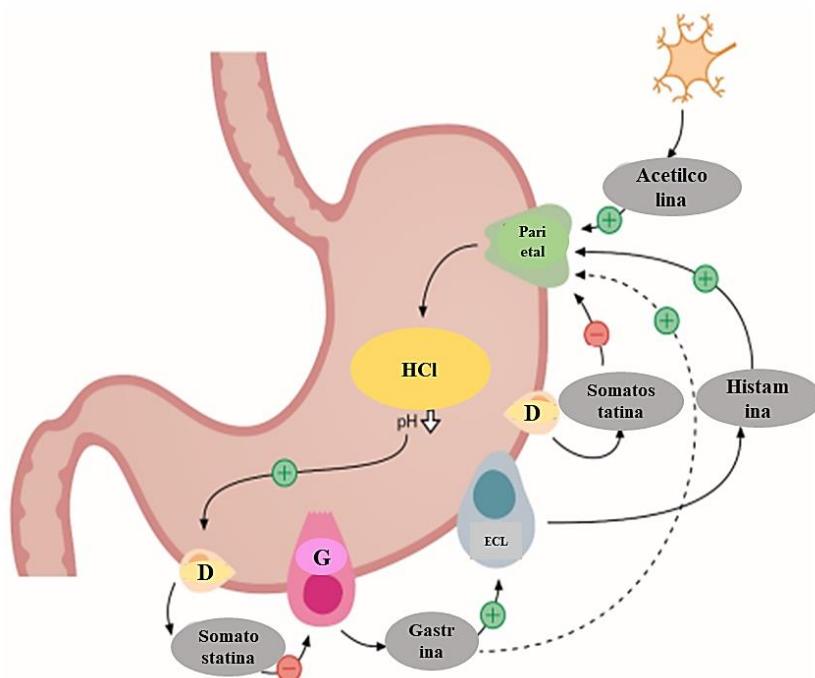


Legenda: sstR2- receptor de somatostatina tipo 2; Gi-Proteína G inibitória; Gs-Proteína G estimulatória; AC-ciclase de adenilic; Gq-Proteína Gq ou Proteína 11; PLC-fosfolipase C; M3-receptor muscarínico tipo 3; CCKB Receptor de colecistocinina tipo B; PKA- Proteína quinase A; ER-retículo endoplasmático; CSPP-28- Fosfoproteína sensível a concentração de Ca²⁺; CO₂ -dióxido de carbono; ATP-trifosfato de adenosina; H⁺-iónhidrogênio; HCO₃⁻ - íon bicarbonato; Cl⁻ - íon cloreto; IP₃ - 1,4,5 trisfosfato de inositol; cAMP - monofosfato cíclico de adenosina; Ca²⁺ íon cálcio; PKC- proteína quinase C; H+/K+-ATPase - bomba de prótons; HCl - ácido clorídrico.

Os mecanismos envolvidos no controle da secreção gástrica são essenciais para manutenção da homeostase, já que, o aumento excessivo da acidez estomacal pode suplantar as barreiras protetoras e levar ao desenvolvimento de danos teciduais e funcionais (SCHUBERT, 2016).

A somatostatina liberada pelas células D é considerada um dos mais potentes inibidores endógenos da secreção ácida gástrica. Embora exista cinco subtipos de receptores de somatostatina (SST₁₋₅), sua ação sobre o subtipo 2 (SST₂), acoplado a proteína G inibitória (G_i) resulta na redução dos níveis de cAMP e consequentemente da secreção gástrica (GONKOWSKI; RYTEL, 2019). O SSTR₂ está localizado principalmente em células G e parietais (SCHUBERT, 2016) (Figura 10).

Figura 10 – Mecanismos de controle da secreção ácida gástrica (Adaptado de Helgadottir; Bjornsson, 2019)



Legenda: O baixo pH é o estímulo para liberação de somatostatina pelas células D que atua reduzindo a secreção ácida gástrica diretamente por agir nas células parietais e indiretamente pela sua ação nas células G (liberadoras de gastrina).

O principal estímulo para liberação de somatostatina é o baixo pH (cerca de 3), ainda que vários hormônios, neurotransmissores (como as catecolaminas), nutrientes e a própria distensão do estômago possam exercer controle sobre a sua liberação. Entretanto, possui uma meia-vida de cerca de 2 minutos, sendo rapidamente degradada por proteases. Dessa forma, seu modo de ação é basicamente parácrino, sendo liberada no meio intersticial próximo à célula-alvo (SAUER; MERCHANT, 2018).

A compreensão desse mecanismo é fundamental para entender a ocorrência de hipergastrinemia em indivíduos que utilizam de forma crônica os IBPs e em menor instância os antagonistas de receptores H₂. Como o principal estímulo para a liberação de somatostatina é o

ácido luminal, quando este está atenuado pelo uso de IBPs ou antagonistas H₂, a secreção da somatostatina é também suprimida. Devido à diminuição da produção de somatostatina, ocorre um bloqueio no mecanismo de *feedback* negativo exercido pela gastrina, fazendo com que a liberação da gastrina seja exacerbada, levando à hipergastrinemia (DACHA et al., 2015).

Também é importante salientar que a ação da gastrina não é exclusiva sobre a secreção gástrica, mas, ela também exerce efeito trófico nas células da mucosa gástrica, intestinal e colônica. Devido a esse efeito trófico sobre as células ECL, a exposição prolongada destas células à gastrina pode iniciar um quadro de hiperplasia, por isso, se tem dado bastante atenção ao potencial neoplásico da hipergastrinemia (WALDUM; REHFELD, 2019).

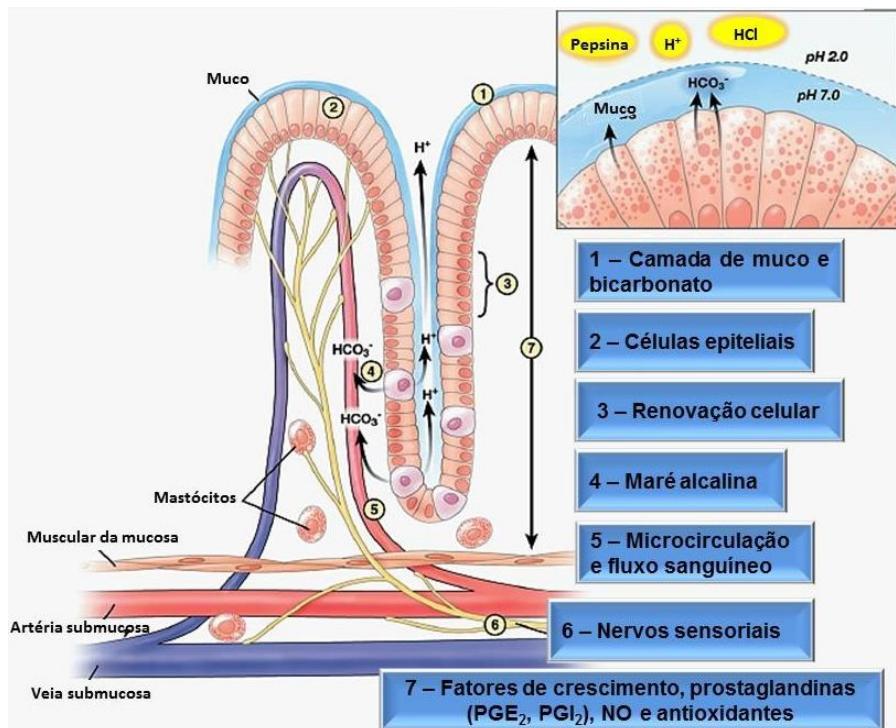
As prostaglandinas das séries E (PGE₂) e I (PGI₂) também inibem a secreção gástrica, por meio da inibição da atividade da enzima adenilil ciclase e consequentemente a redução das concentrações intracelulares de cAMP (TAKEUCHI; AMAGASE, 2018).

Nesse contexto, é de fundamental importância a manutenção da regulação fisiológica da secreção ácida gástrica, a fim de evitar possíveis distúrbios desse sistema. Para isso, o organismo possui mecanismos que atuam estimulando vias compensatórias e fatores de proteção responsáveis pela integridade da mucosa gástrica.

2.3 Mecanismos de defesa da mucosa gástrica

Os mecanismos de defesa se dividem em: fatores pré-epiteliais, epiteliais e subepiteliais. Os fatores pré-epiteliais consistem na primeira linha de defesa e incluem o muco, bicarbonato e fosfolipídios. A defesa epitelial compreende as próprias células epiteliais conectadas por junções estreitas e os fatores de crescimento e renovação celular. O componente sub-epitelial, constitui o fluxo sanguíneo, inervação sensorial e os moduladores da barreira gástrica como as prostaglandinas citoprotectoras, os níveis óxido nítrico e o sistema antioxidante (Figura 11) (TARNAWSKI et al., 2012).

Figura 11 – Mecanismos de defesa da mucosa gástrica (Fonte: Adaptado de Tarnawski & Ahluwalia, 2012; Yandrapu & Sarosiek, 2015)



Legenda: Os fatores de defesa pré-epiteliais são formados pelo muco e bicarbonato. A defesa epitelial é constituída das células epiteliais e fatores de crescimento e renovação celular. Os fatores sub-epiteliais compreendem a microcirculação, nervos sensoriais, óxido nítrico, prostaglandinas e antioxidantes.

2.3.1 Defesa pré-epitelial

A primeira linha de defesa é formada pelo muco, íons bicarbonato e fosfolipídios de membrana que conferem uma barreira protetora entre as células epiteliais da mucosa e o lúmen gástrico (TARNAWSKI et al., 2012).

O muco é um gel transparente, viscoso e aderente, composto por aproximadamente 95% de água e 5% de mucinas que são glicoproteínas de alto peso molecular e altamente glicosiladas, o que confere a propriedade de serem protegidas da degradação por proteases, além de favorecer a atração de água e assim gerar a típica propriedade de gel (BIRCHENOUGH et al., 2015).

Diferentemente de outras porções do TGI, o estômago possui duas camadas de muco, uma camada interna firmemente aderida à mucosa e uma camada externa, frouxamente aderida, que fica em contato direto com o lúmen (YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

As mucinas são provenientes de vários genes (MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC5AB e MUC6), sendo os genes MUC2, MUC5AC e MUC6 das mucinas mais expressas no estômago, que diferem em seus tamanhos, grau de glicosilação e distribuição (NAMULEMA et al., 2018).

No estômago, a citoproteção desempenhada pelo muco está intimamente ligada à capacidade de formar uma barreira física que protege a mucosa das forças mecânicas da digestão, da secreção de ácido clorídrico e da ação proteolítica da pepsina. Além disso, o muco retém os íons

bicarbonato secretados pelo epitélio na superfície mucosa, formando uma barreira química, mantendo um microambiente com um pH (6-7) próximo da neutralidade frente ao pH (1-2) extremamente ácido do lúmen (JIN et al., 2017).

O aumento das concentrações de cálcio e do monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), são os eventos moleculares responsáveis pela secreção de bicarbonato. Essa reação inicial é realizada pela PGE₂ gerada a partir da prostaglandina E sintase (YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

O bicarbonato é secretado simultaneamente ao ácido clorídrico no interstício da mucosa, formando a corrente ou maré alcalina. Dessa forma, a camada muco-bicarbonato colabora na manutenção de um pH favorável na superfície do epitélio, além de dificultar a atividade proteolítica da pepsina. A secreção do muco e bicarbonato ocorre ao longo do TGI em resposta aos diferentes estímulos, sendo a PGE₂ a principal estimuladora da secreção (YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

Além disso, o gel mucoso pode desempenhar efeitos antioxidantes, minimizando a ação prejudicial dos radicais livres na mucosa gástrica. Também, comporta-se como um ambiente favorável para a retenção de moléculas antimicrobianas, como as β -defensinas, que atuam na resposta imune em superfícies mucosas, evitando a colonização bacteriana (NIV, 2016).

Os fosfolipídios de membrana formam uma espécie de película na superfície luminal do muco e devido à presença de grupos hidrofóbicos em sua estrutura dificultam a difusão de íons H⁺ do lúmen para as células epiteliais e outros agentes agressores solúveis em água (MCDONALD; MACFARLANE, 2018).

O ácido clorídrico é importante para a digestão de proteínas, absorção de cálcio, ferro e vitamina B₁₂, além de atuar na inativação de toxinas e eliminação de muitos micro-organismos ingeridos junto com os alimentos. No entanto, o excesso de sua produção é considerado um agente agressor endógeno para a mucosa do estômago (SCHUBERT, 2016).

2.3.2 Defesa epitelial

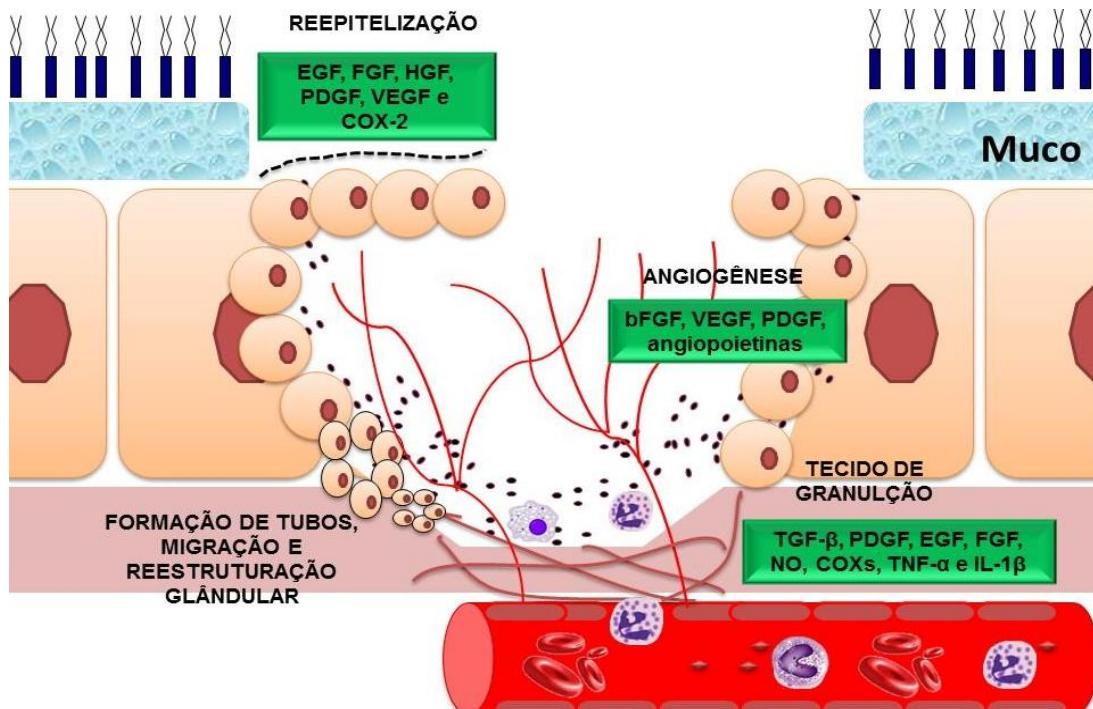
A segunda linha de defesa é formada por uma camada contínua de células epiteliais unidas fortemente por *gap junctions*. Os complexos juncionais intercelulares exercem um importante papel na manutenção da arquitetura do epitélio gastrintestinal e englobam a zona de oclusão, zona de adesão e desmossomos. Dessa maneira, as células que constituem a mucosa gástrica estão firmemente aderidas entre si por junções oclusivas e aderentes que têm funções de manter a adesão célula-a-célula, impossibilitando o transporte de substâncias pelo espaço intercelular e assim contribuindo contra a difusão dos íons H⁺ (GUPTA et al., 2017).

Diversos compostos que provocam danos na mucosa gástrica, como etanol e AINEs, atuam aumentando a permeabilidade desta barreira e favorecendo com que haja uma maior difusão de H⁺, com consequente desenvolvimento de hemorragia e erosão da mucosa (BJARNASON et al., 2018).

Além disso, as células secretam elementos citoprotetores como o muco, íons bicarbonato, prostaglandinas, β -defensinas, “*Heat Shock Protein*” (HSP - proteínas de choque térmico) e peptídeos da família do fator trefoil (TFFs) (YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

A integridade estrutural e funcional do epitélio da mucosa é mantida pela constante renovação celular. O epitélio é renovado por uma proliferação bem coordenada e controlada de células progenitoras. Esse processo se dá pela troca de células envelhecidas ou danificadas por meio da translocação de células jovens presentes na região das glândulas gástricas a cada 3-7 dias. As células-mãe se encontram em constante proliferação e recebem influência de diferentes fatores de crescimento: fator de crescimento transformador alfa (TGF- α), fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-I), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), entre outros. Esses fatores produzidos localmente protegem a mucosa contra agentes injuriantes, estimulam a proliferação e migração de células epiteliais, exercendo uma ação trófica sobre a mucosa, proliferação de fibroblastos e angiogênese, sendo importantes ainda na cicatrização das úlceras (ROOSTAEE et al., 2016; FAGUNDES et al., 2020).

Figura 12 - Processos de reepitelização, migração celular, restauração das glândulas gástricas, formação do tecido de granulação e angiogênese (Fonte: Arquivo LFTGI)



Legenda – EGF: fator de crescimento epidérmico; FGF: fator de crescimento de fibroblastos; HGF: fator de crescimento de hepatócitos; PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas; VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular; TGF: fator transformador do crescimento; NO: óxido nítrico; COX: ciclo-oxigenase; IL: interleucina; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa.

Os Peptídeos da Família de Fatores Trefoil (TFFs) estão presentes nas vesículas que secretam mucina e envolvem a montagem intracelular e o empacotamento das mucinas. São

expressos no estômago três desses peptídeos: 1) TFF1 que é co-secretado com a mucina MUC5AC em células epiteliais gástricas; 2) TFF2 com a mucina MUC6 nas glândulas do estômago e duodeno e 3) TFF3 com a mucina MUC2 em células caliciformes (CLYNE; MAY, 2019; HOFFMANN, 2015; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015). Esses fatores atuam aumentando a viscosidade do muco e estabilizando a camada de muco-gel (AZIZ et al., 2019).

As proteínas de choque térmico (HSPs) compreendem um grupo de proteínas que reprimem a desnaturação de moléculas frente a diversos estímulos estressantes como exercício físico intenso, gravidade, pH baixo, temperatura elevada, EROs e Ca^{2+} . Estas proteínas são classificadas segundo sua massa molecular em seis famílias cujos membros variam de 10 a 170 kDa (JEE, 2016).

As HSPs, especialmente a chaperona HSP₇₀, têm como principal função impedir os eventos apoptóticos de morte celular, por meio da prevenção da desnaturação proteica, estabilização dos filamentos de actina e inibição de enzimas-chaves envolvidas nos processos de apoptose. Alterações nesse metabolismo pode induzir injúrias na mucosa (GUPTA et al., 2017).

2.3.3 Defesa pós-epitelial

A defesa pós-epitelial é dada principalmente por dois componentes que trabalham em sintonia: 1) a microcirculação sanguínea, fundamental para o fornecimento de nutrientes, oxigênio, bicarbonato, NO e remoção de substâncias tóxicas e 2) a inervação sensitiva da mucosa contribuindo com a liberação de neurotransmissores que promovem a vasodilatação e o aumento do fluxo de sangue na camada submucosa. A defesa gástrica também envolve mecanismos de neutralização de espécies reativas de oxigênio, liberação de citocinas, respostas imunes inatas e adaptativas e inibição da apoptose (YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

2.3.3.1 Fluxo sanguíneo e inervação sensorial

O fluxo de sangue adequado é um agente determinante para manter a integridade das células epiteliais da mucosa gástrica. O fluxo sanguíneo exerce seu efeito protetor da mucosa do estômago por meio do fornecimento de oxigênio, nutrientes e bicarbonato e pela remoção de íons H^+ e metabólitos tóxicos que se difundem do lúmen para mucosa. O fluxo de sangue aumenta quando há o estímulo da secreção ácida pelos secretagogos gástricos, por meio dos mediadores vasodilatadores como o NO, PGEs, prostaciclinas (PGIs), sulfeto de hidrogênio e monóxido de carbono (CO) produzidos por células epiteliais da mucosa e células endoteliais que revestem os microvasos, que se opõem à agentes vasoconstritores como leucotrienos C4, tromboxano A₂ (TXA₂) e endotelina, levando à hiperemia gástrica. Desta maneira, pode-se afirmar que a redução do fluxo de sangue predispõe a instalação de danos na mucosa (YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

Os vasos sanguíneos das camadas mucosa e submucosa são inervados por neurônios sensoriais aferentes e nervos, formando um plexo denso na base da mucosa. Esses neurônios quando ativados desempenham um papel protetor local na mucosa, ao sinalizar reações vasculares, secretoras e motoras visando a manutenção da integridade, motilidade e reparo da mucosa gástrica. Tal efeito ocorre através de neuropeptídios, como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e as taquicininas (substância P e neurocinina A) que são liberados das terminações periféricas dos neurônios sensoriais após o estímulo nocivo por meio da vasodilatação mediada pelo NO. Dessa forma, o estímulo das terminações nervosas sensoriais aumenta o fluxo sanguíneo e a permeabilidade vascular. Este processo é conhecido como inflamação neurogênica e acredita-se em sua capacidade de reparar o tecido lesado (HOLZER, 2015).

A definição de inflamação neurogênica conduziu novas pesquisas que buscassem a possibilidade de mecanismos protetores semelhantes. Assim, testou-se a capsaicina (responsável pelo ardor das pimentas), uma substância que excita agudamente os neurônios aferentes nociceptivos, atuando de forma específica no receptor transiente do tipo 1 vaniloide (TRPV-1). No entanto, quando administrada em doses crônicas provoca uma ablação funcional desses neurônios, prejudicando a resposta hiperêmica e tornando a mucosa vulnerável a lesões (HOLZER, 2015).

2.3.3.2 Óxido nítrico (NO) e canais de potássio ATP-dependentes (K_{ATP})

O óxido nítrico é considerado um dos mais importantes mediadores intracelulares. Trata-se de um gás incolor, lipossolúvel e muito instável, com meia vida de 5 segundos, originado a partir da L-arginina e O₂ pela ação enzimática da sintase de óxido nítrico (NOS) (KITAY et al., 2017).

Existem diferentes subtipos de NOS, que variam quanto a sua expressão, distribuição e função: eNOS (NOS-3) é expressa no endotélio e participa da regulação da pressão arterial e angiogênese; nNOS (NOS-1) é expressa em neurônios e está envolvida na neurotransmissão, nos processos de aprendizagem e na plasticidade sináptica e a iNOS (NOS-2), uma forma induzível, é expressa em macrófagos e monócitos, exercendo um importante papel nas respostas imunes durante infecções (vírus e bactérias) e no desenvolvimento tumoral (BRUNEL et al., 2016).

O NO também é considerado um importante agente na defesa da mucosa do estômago. Ele não somente melhora o fluxo sanguíneo gástrico e estimula a angiogênese, mas também aumenta a secreção do muco e íons bicarbonato, potencializa a ação da maré alcalina e exibe ação antioxidante devido à rápida reatividade com várias espécies radicalares (WALLACE, 2019).

Após sua produção pelas células endoteliais (e-NOS), o NO se difunde para a camada muscular estimulando a enzima ciclase de guanilil solúvel (CGs). A CGs é um receptor heterodimérico com duas subunidades (α e β) e quatro isoformas (α_1 , α_2 , β_1 e β_2). Esses receptores são ativados pelo NO, convertendo o trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato cíclico de

guanosina (cGMP), que ativa a proteína cinase dependente de cGMP (PKG), fosfodiesterases (PDEs) e canais iônicos para obter respostas celulares (como vasodilatação, regulação da apoptose e angiogênese) que irão contribuir para a manutenção da homeostase (BERRIDGE, 2014).

Essa sinalização NO/cGMP pode ativar diferentes alvos proteicos, como os canais de potássio ATP-dependentes (K_{ATP}). Os K_{ATP} são funcionalmente expressos em células do músculo liso e o aumento citosólico de cGMP promove a abertura desses canais favorecendo o efluxo de íons K^+ , alterando o potencial elétrico da membrana, reduzindo a entrada de Ca^{2+} pelos canais de cálcio dependentes de voltagem (Cav), culminando na hiperpolarização da membrana celular, promovendo vasodilatação e aumento da microcirculação gástrica (WALLACE, 2019).

Tem sido discutido o papel bifásico que o NO pode desempenhar, protegendo ou agredindo a mucosa do estômago, de acordo com seus níveis de produção e o tipo de enzima envolvida na sua síntese (BRUNEL et al., 2016; SIES; JONES, 2020).

2.3.3.3 Prostaglandinas

As prostaglandinas são mediadores lipídicos oriundos do ácido araquidônico (AA), um ácido graxo insaturado de 20 átomos de carbonos, liberado da membrana plasmática pela ação enzimática da fosfolipase A₂ (PLA₂) e metabolizado pelas enzimas ciclo-oxigenases (COX) dando origem à quatro tipos de prostaglandinas: PGD₂, PGE₂, PGF_{2α} e PGI₂ (BERRIDGE, 2014).

Existem duas isoformas da ciclo-oxigenase: COX-1, constitutiva, envolvida com a homeostase de diversos tecidos e a COX-2, induzida, expressa principalmente em certas condições patofisiológicas como nos processos inflamatórios e de dano tecidual (AMAGASE et al., 2014). Alguns trabalhos sugerem a existência de uma terceira isoforma (COX-3 ou COX-1b), estando envolvida em processos de dor e febre, mas ainda não existem dados conclusivos sobre suas funções fisiológicas (OKSUZ et al., 2016).

As prostaglandinas provenientes da COX-1 exercem um papel protetor na mucosa gástrica por atuarem inibindo a secreção ácida gástrica e estimularem a produção de muco e bicarbonato. Além disso, aumentam o fluxo de sangue local e regulam a motilidade (AMAGASE et al., 2014).

Já as PGs formadas sob a ação da COX-2, embora contribuam com os processos inflamatórios, também participam do processo de angiogênese e regeneração epitelial por meio dos fatores de crescimento na região das margens das úlceras, acelerando a cicatrização. Dessa forma, ambas as enzimas COX exercem efeitos benéficos para a mucosa (MORAES et al., 2013).

Os receptores para PGE₂ são acoplados a proteína G e estão classificados em 4 subtipos específicos (EP₁-EP₄). Os receptores EP₁ estão acoplados ao sistema efetor fosfolipase C-β1, aumentando os níveis de IP₃ e a concentração de Ca^{2+} intracelular (estimula a motilidade). Enquanto que os receptores EP₂ e EP₄ são acoplados a proteína Gs e sua ativação conduz ao

aumento dos níveis intracelulares de cAMP (aumento da secreção de muco e bicarbonato). Os receptores EP₃ são acoplados à proteína Gi, levando à diminuição dos níveis intracelulares de cAMP (inibição da secreção de HCl). As PGI₂ interagem com receptores IP, acoplados a proteína Gs, levando a produção de cAMP e regulação do tônus vascular (TAKEUCHI; AMAGASE, 2018).

Além disso, a PGE₂ atua acelerando a cicatrização das úlceras por meio do estímulo da angiogênese via aumento da expressão do fator de crescimento do endotélio vascular ao atuar nos receptores EP₄ (TAKEUCHI; AMAGASE, 2018).

2.3.3.4 Grupamentos sulfidrilas (SHs)

Os grupamentos sulfidrilas são formados por grupos químicos tióis que contém um átomo de enxofre em sua estrutura e estão presentes no muco e em diversas enzimas do sistema antioxidante. Podem ser classificados em não-proteicos (glutationa) e proteicos (enzimas) (OUYANG et al., 2018).

Estes compostos participam da proteção da mucosa gástrica por meio da formação de pontes dissulfeto entre as células do epitélio da mucosa, fortalecendo a barreira muco-bicarbonato e mantendo consequentemente a integridade do epitélio. Além disso, sua ação citoprotetora envolve efeitos antioxidantes pela redução dos radicais livres (OUYANG et al., 2018).

Os compostos SHs são considerados as moléculas antioxidantes não enzimáticas mais abundantes encontrada nos tecidos. Dentre eles pode-se destacar a glutationa reduzida (GSH), que atua como substrato da enzima glutationa peroxidase (GPx), que remove o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radicais livres das células (NARAYANANKUTTY et al., 2019).

Em relação ao potencial antioxidante e sequestrador de radicais livres, a GSH se comporta como um nucleófilo, doando elétrons a outros compostos, o que a torna um excelente redutor. Dessa forma, a diminuição da disponibilidade deste composto piora o quadro de estresse oxidativo e favorece o desenvolvimento dos danos oxidativos na mucosa (PÉREZ et al., 2017).

2.3.3.5 Sistema antioxidant

As espécies reativas de oxigênio (EROs) consistem em átomos ou moléculas produzidas durante o metabolismo aeróbio e atuam como moléculas sinalizadoras, participando de diversos processos celulares importantes para o metabolismo normal (SIES, 2015).

As EROs são classificadas em dois tipos diferentes: 1) as espécies radicalares como o radical superóxido (O₂^{•-}), radical hidroxila (OH[•]), hidroperoxila (HOO[•]), peroxila (ROO[•]) e alcoxila (RO[•]) e 2) as espécies que não apresentam radicais a exemplo do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), oxigênio singlet (¹O₂), ozônio (O₃) e ácido hipocloroso (HOCl) (SIES; JONES, 2020).

A produção das EROs é um processo contínuo, cumprindo com funções fisiológicas importantes como no processo de respiração celular, que ocorre nas mitocôndrias a fim de gerar ATP e os radicais produzidos pelos macrófagos e neutrófilos que são usados contra micro-organismos patogênicos, atuando como um mecanismo de defesa. Além disso, diversos fatores externos desencadeiam a produção das EROs a exemplo do tabagismo, poluentes ambientais, radiação ultravioleta (UV), pesticidas e solventes industriais (KOUNTOURAS et al., 2017).

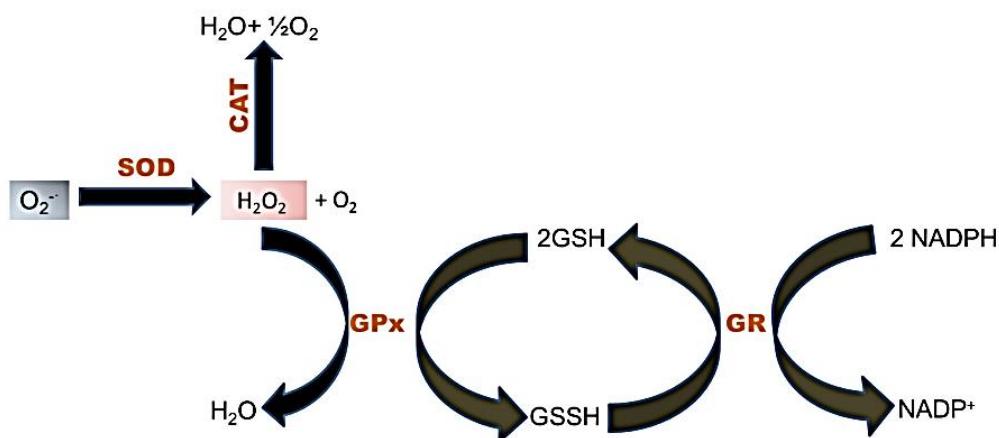
Assim, o equilíbrio entre os processos de produção e eliminação das EROs é de extrema importância, pois o desequilíbrio entre esses processos causa o estresse oxidativo, levando ao desenvolvimento de danos oxidativos em diversas macromoléculas como nas membranas biológicas produzindo peróxidos lipídicos, em proteínas com desnaturação de sua estrutura tridimensional e modificações oxidativas em aminoácidos e ácidos nucleicos (DNA/RNA) conduzindo processos de modificações cromossômicas e mutações (PISOSCHI; POP, 2015).

Para evitar, controlar ou remover a capacidade oxidativa das EROs, o organismo desenvolveu um sistema de defesa antioxidante, que é comumente dividido em enzimático e não-enzimático. O sistema antioxidante enzimático compreende as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx) que têm como função a manutenção das concentrações de EROs dentro dos limites fisiológicos. Já o sistema não-enzimático é composto por várias substâncias antioxidantes, como vitaminas lipossolúveis (vitamina A, vitamina E, betacaroteno), vitaminas hidrossolúveis (vitamina C e vitaminas do complexo B) e oligoelementos (zinco, cobre, selênio, magnésio) (PISOSCHI; POP, 2015).

A SOD catalisa a dismutação do radical superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (PÉREZ et al., 2017). A principal função da CAT é a decomposição e redução dos níveis de peróxido de hidrogênio, gerado na reação catalisada pela SOD, formando água e oxigênio. Existe ainda uma segunda via do metabolismo do peróxido de hidrogênio que depende da GPx (SIES; JONES, 2020).

A GPx é uma enzima dependente de selênio (Se) que necessita de cofatores para desempenhar suas funções como a glutationa reduzida (GSH), glutationa redutase (GR) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH). Dessa forma, a GPx catalisa a degradação do H₂O₂ em água por meio da conversão da GSH para a forma oxidada (GSSH), que pode ser reconvertida em GSH pela ação da GR, utilizando o NADPH como doador de elétrons (KOUNTOURAS et al., 2017) (Figura 13).

Figura 13 - Ação enzimática do sistema de defesa antioxidante (Fonte: Viana, 2017)



Legenda: Superóxido (O_2^-), superóxido dismutase (SOD), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx), glutationa reduzida (GSH), glutationa oxidada (GSSH), glutationa redutase (GR), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada (NADP⁺).

O estresse oxidativo exerce um papel significativo na indução e desenvolvimento da ulceração gástrica. O fator nuclear relacionado ao eritróide 2 (Nrf2) atua na proteção do TGI frente aos danos teciduais ocasionados pelo estresse oxidativo (BADR et al., 2019).

O Nrf2 é um fator de transcrição responsável pelo controle do balanço redox celular, regulando a expressão de genes que possuem elementos de resposta antioxidante, como ferritina e heme oxigenase-1 (HO-1). Na presença de NADPH, a HO-1 catalisa a etapa de quebra do grupo heme em bilirrubina, liberando Fe^{2+} e CO_2 , juntamente com a biliverdina, que é metabolizada pela biliverdina redutase liberando a bilirrubina (BADR et al., 2019). O efeito antioxidante do HO-1 está ligado a essa capacidade de gerar bilirrubina, que é conhecida por remover EROS (CHOI et al., 2018; FRANCISQUETI-FERRON et al., 2019). Dessa forma, a via Nrf2/HO-1 possui um papel chave no controle das respostas antioxidantes (XIONG et al., 2017).

2.3.3.6 Citocinas

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular (15 a 20 kDa) que estão envolvidas na sinalização autócrina, parácrina e endócrina, coordenando processos fisiológicos como a atividade do sistema imune e a resposta inflamatória. Dentro dessa grande classe de proteínas estão inseridas as interleucinas, os fatores de necrose tumorais, interferons e quimiocinas (ROSE-JOHN, 2018).

As citocinas estão intrinsecamente envolvidas em todas as reações imunes, podendo ter efeitos pró-inflamatórios ou imunossupressores. Diversas citocinas estão envolvidas na modulação das respostas inflamatórias agudas como a IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-11, fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

(GM-CSF), entre outras. Dentre essas citocinas, a IL-1 β e o TNF- α se destacam como as moléculas mais potentes em estimular o processo inflamatório (GUAN; ZHANG, 2017).

A IL-1 β e o TNF- α são consideradas as primeiras citocinas liberadas em resposta a infecção ou danos na mucosa gástrica. Essas citocinas são sintetizadas por células do sistema imune como os monócitos, macrófagos e neutrófilos, além de células endoteliais e fibroblastos. Em situações de injúria tecidual ocorre o aumento da expressão de genes pró-inflamatórios que codificam essas citocinas e outras moléculas efetoras (como as moléculas de adesão) que iniciam, sustentam e propagam o processo inflamatório (GUAN; ZHANG, 2017; MANTOVANI et al., 2020).

Os mecanismos pró-inflamatórios mediados pela IL-1 β ocorrem em resposta da interação com seu receptor IL-1R, promovendo a ativação da via do NF- κ B e a ativação das proteínas cinases ativadas por mitogênio (MAPKs), JNK e p38 (YAZDI; GHORESCHI, 2016). Esses eventos moleculares levam a indução da expressão de genes pró-inflamatórios (CHO et al., 2016).

O TNF- α é uma citocina pleiotrópica que exerce controle sob os mais variados eventos celulares sendo produzida principalmente por macrófagos ativados e outros tipos de células imunes, como linfócitos T, células NK e neutrófilos. De acordo com o microambiente e o contexto celular, pode induzir efeitos tão variados como atividade promotora ou inibitória de crescimento celular, necrose ou angiogênese, podendo sustentar ou prevenir a diferenciação e migração celular (BOSHTAM et al., 2017; GUAN; ZHANG, 2017).

Essa citocina pode ativar macrófagos nos tecidos inflamados, induzindo a liberação de outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e o próprio TNF- α , que exacerbam o processo inflamatório. A atividade do TNF- α nas células epiteliais gástricas prejudica a função de barreira e favorece o aumento da permeabilidade às bactérias comensais. Nos fibroblastos, o TNF- α leva à expressão de metaloproteinases da matriz (MMPs). Nas células endoteliais, o TNF- α atua no aumento das moléculas de adesão nos vasos sanguíneos, levando ao aumento subsequente da infiltração de leucócitos e pode ainda induzir a apoptose das células (BERRAONDO et al., 2019).

Nas úlceras gástricas, a expressão e a atividade dessas citocinas encontram-se desreguladas, contribuindo para o estado inflamatório crônico. Estudos experimentais demonstraram que essas moléculas desempenham um papel significativo na formação das ulcerações por atuarem induzindo um aumento na expressão de moléculas de adesão em leucócitos e células endoteliais e promoverem a infiltração neutrofílica na mucosa inflamada. Esses fatores são cruciais para geração de lesões gastrintestinais e a recorrência das ulcerações (MOUSA et al., 2019).

O NF- κ B atua na regulação dos genes que governam o início da reação inflamatória aguda nas células epiteliais gástricas. No estado inativado, o NF- κ B é retido dentro do citoplasma e vinculado à proteína I κ B. Após a exposição aos estímulos inflamatórios, a enzima I κ B quinase causa fosforilação da proteína I κ B e posterior degradação do complexo I κ B. Esses eventos levam

à ativação do NF-κB que se transloca para o núcleo e causa a ativação transcricional de outras citocinas pró-inflamatórias como TNF-α e IL-6 (AZIZ et al., 2019).

O processo inflamatório é modulado negativamente pela ação da interleucina-10 (IL-10), produzida por células da imunidade inata e adaptativa, incluindo células dendríticas, macrófagos, mastócitos, células NK, eosinófilos, neutrófilos, células B e subtipos de células T, especialmente as Treg (MOLLAZADEH et al., 2019).

A resposta anti-inflamatória mediada pela IL-10 representa um mecanismo homeostático importante que controla o ínicio, o grau e a duração da inflamação gastrintestinal. A IL-10 desempenha um papel protetor devido a suas propriedades imunomoduladoras, regulando o sistema imunológico da mucosa gástrica, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, inibindo a infiltração neutrofílica e a apresentação抗igenética (BOSHTAM et al., 2017).

Além da IL-10, o fator transformador do crescimento beta (TGF-β) é um produto das células Treg que tem como principal função a modulação da resposta inflamatória por meio da regulação das respostas inata e adaptativa. Além de participar do processo de cicatrização das úlceras (MOLLAZADEH et al., 2019).

2.4 Fatores agressores da mucosa gástrica

2.4.1 Álcool (Etanol)

O consumo excessivo de álcool ainda é considerado um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento das lesões ulcerativas no homem. O álcool é um dos agentes agressores exógenos mais irritantes da mucosa, devido a sua ação multifatorial, causando danos em todos os sistemas de defesa da mucosa do estômago (BADR et al., 2019).

O álcool penetra rapidamente na mucosa e leva a desestabilização da camada de muco-bicarbonato-fosfolipídios. A diminuição das defesas pré-epiteliais deixa as células da superfície do estômago vulneráveis a ação do ácido gástrico favorecendo a redifusão de H⁺. Além disso, causa distúrbios no endotélio vascular, levando à redução da permeabilidade, que por sua vez causa a supressão do fluxo adequado de sangue para mucosa e redução do suprimento de oxigênio e nutrientes. Esses eventos são seguidos por hipoxia e necrose hemorrágica e são atribuídos à diminuição dos níveis de NO (LI et al., 2018; MOUSA et al., 2019).

Esse quadro isquêmico gera grandes quantidades de EROs que reduzem as defesas antioxidantes (como os grupamentos sulfidrílicos não-proteicos) e aumentam os níveis de malondialdeído, um marcador da peroxidação lipídica, resultando em alterações em nível celular como danos às membranas, erosão epitelial e morte celular (BRITO et al., 2018).

As lesões necróticas induzidas pelo etanol são consequência da ativação de uma resposta inflamatória aguda que envolve degranulação de mastócitos e liberação da histamina, recrutamento

de neutrófilos e liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α), aumento da expressão do NF- κ B e *down-regulation* da citocina anti-inflamatória IL-10 (LI et al., 2018; AZIZ et al., 2019).

Após ser absorvido no estômago e duodeno, o álcool é metabolizado pela enzima álcool desidrogenase no fígado gerando o acetaldeído, um metabólito citotóxico que induz disfunção mitocondrial, mudança no estado redox da célula e redução de GSH, agravando o estresse oxidativo e a ocorrência de mais danos teciduais (LIJU et al., 2015).

2.4.2 Estresse

O estresse é considerado um importante agente predisponente para o desenvolvimento das ulcerações no homem. Existem diversos agentes estressores físicos e psicológicos que favorecem a lesão na mucosa gástrica (HUANG et al., 2018).

As lesões causadas pelo estresse podem ser agudas, erosivas e inflamatórias, normalmente acometendo a porção superior do TGI. Essas lesões são geralmente superficiais e assintomáticas, mas podem se estender para a camada submucosa e muscular, atingindo vasos sanguíneos e causando sangramentos evidentes e clinicamente significativos. Esse fato confirma que, os principais danos causados pelo estresse na mucosa gástrica estão associados a mudanças na microcirculação e hipóxia (XIE et al., 2019).

O estresse estimula a ativação do eixo hipotalâmico-pituitário adrenal (HPA) e a liberação de grandes quantidades de catecolaminas e cortisol, o que influencia o sistema imunológico e, consequentemente, a resposta inflamatória por meio da produção de citocinas pelos macrófagos. Além de causar redução do fluxo sanguíneo, levando à hipóxia e isquemia local. Esses efeitos contribuem para formação de erosão hemorrágica e necrose epitelial (SZABO et al., 2017).

Ocorre ainda uma desregulação em nível de SNA. A estimulação simpática acarreta em vasoconstrição, por meio da ação da noradrenalina em seus receptores α_1 -adrenérgicos presentes nos vasos que irrigam a mucosa gástrica, o que favorece um quadro isquêmico e hipóxia. Paralelamente há um grande aumento de EROs, peroxidação lipídica e redução dos níveis de GSH. O dano nas células da mucosa leva a uma diminuição das PGE₂ e PGI₂ e da camada de muco e aumento da síntese das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6, que induzem o aumento na expressão da ICAM-1, responsável pela migração e infiltração neutrofílica na mucosa gástrica. Já as ações mediadas pela ativação do SNP envolvem o aumento da motilidade e secreção ácida por meio da ligação da ACh ao receptor M₃ (ELSHAZLY et al., 2018).

2.4.3 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) têm sido amplamente utilizados na prática clínica para o manejo da dor (aguda e crônica), processos inflamatórios e febre. São classificados em dois tipos: inibidores não-seletivos da ciclo-oxigenase (COX-1 e COX-2) e inibidores seletivos COX-2 (KHAN et al., 2016). Exemplos desses agentes incluem o ácido acetilsalicílico (AAS), diclofenaco, indometacina, naproxeno e cetoprofeno (CHENG et al., 2016).

O TGI é o principal órgão alvo da toxicidade induzida pelos AINEs. Estima-se que cerca de 30 milhões de indivíduos fazem uso de AINEs diariamente no mundo e aproximadamente 50% desses usuários desenvolvem algum problema gástrico. Acredita-se que a utilização de AINEs aumenta em 4 vezes a ocorrência de complicações gastrintestinais (BJARNASON et al., 2018).

O uso de AINEs aumentou bastante nos últimos anos, tanto pela facilidade de acesso a esses medicamentos como pelo envelhecimento populacional, o que levou ao aumento da incidência de doenças inflamatórias crônicas. A utilização a longo prazo dos AINEs tornou essa classe farmacológica um dos agentes etiológicos mais comuns das úlceras pépticas (DUMIC et al., 2019).

Os AINEs, principalmente os não-seletivos ou tradicionais, causam erosão na mucosa do estômago por meio de efeitos local e sistêmico. Esse efeito local está associado com as características químicas da estrutura dessas moléculas, que em geral são ácidos fracos. A propriedade ácida em conjunto com a baixa polaridade desses compostos confere uma ação detergente, que quando em contato com a mucosa gástrica, leva a desestabilização da camada de fosfolipídeos e danos à camada de muco, afetando as células epiteliais levando à morte celular (BJARNASON et al., 2018).

De forma sistêmica, levam à redução da síntese de prostaglandinas, como PGE₂ e PGI₂, pela inibição da atividade da COX comprometendo os eventos citoprotetores dessas moléculas. Com a inibição da atividade da COX, o seu substrato AA, é desviado para a via da lipoxigenase (LOX) que resulta na formação de leucotrienos B4 e fatores quimiotáticos para neutrófilos que são importantes agentes liberadores de EROs e interleucinas pró-inflamatórias (BRUNTON, 2018).

Além disso, os AINEs exercem um efeito direto nas mitocôndrias, induzindo estresse oxidativo, ativação da cascata intrínseca da apoptose e morte celular (Bindu et al., 2020). Dessa forma, os avanços mais recentes na química farmacêutica dos AINEs incluem a modificação estrutural dessas moléculas com a incorporação de grupos doadores de gases vasoativos como NO e H₂S que reduzem os efeitos colaterais desses medicamentos (KWIECIEŃ et al., 2015).

2.4.4 *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori é uma bactéria gram-negativa, microaerofílica, flagelada e em forma de espiral que coloniza o estômago humano (DIACONU et al., 2017). A infecção por *H. pylori* é cosmopolita sendo considerada uma das principais infecções crônicas no mundo (PANDYA et al., 2017).

Estima-se que a prevalência da infecção por *H. pylori* seja de 40 a 50% em países desenvolvidos e entre 70 a 90% em países em desenvolvimento, onde as condições de saneamento básico são insatisfatórias (PANDYA et al., 2017). Essa infecção é geralmente adquirida na infância e pode persistir por toda vida na ausência de tratamento (COELHO et al., 2018).

A infecção por *H. pylori* está associada ao desenvolvimento de distúrbios do TGI, incluindo dispepsias, gastrite crônica e úlcera péptica (FERNANDES et al., 2016), além de ser um importante fator na patogênese do câncer gástrico (MCCLAIN et al., 2017).

Estudos epidemiológicos apontam que aproximadamente 15% dos indivíduos colonizados por *H. pylori* poderão desenvolver lesões na mucosa gástrica, já as outras parcelas que apresentam cepas da bactéria são assintomáticas e podem permanecer assim ao longo de suas vidas. O desenvolvimento das lesões gástricas vai depender de alguns fatores, como a vulnerabilidade individual de cada hospedeiro e a virulência das cepas (OPPONG et al., 2015).

Os mecanismos envolvidos na adaptação, sobrevivência e proliferação de *H. pylori* no estômago já foram amplamente descritos: (1) atividade enzimática da urease, que metaboliza a ureia presente no suco gástrico em dióxido de carbono e amônia (NH_3), a difusão de NH_3 no periplasma cria um ambiente com pH mais alto, essencial para a sobrevivência dessa bactéria; (2) capacidade de penetração através da camada de muco (forma espiral, presença de flagelos e enzimas mucolíticas) e (3) ligação a receptores presentes nas células epiteliais gástricas. Essa interação com esses receptores pode explicar por que *H. pylori* coloniza exclusivamente o epitélio gástrico. Além disso, as cepas de *H. pylori* também possuem diversas variações genômicas que codificam fatores de virulência relacionados à sua permanência e ao aumento da sua capacidade invasora e destrutiva, como a citotoxina associada ao gene A (Cag A) e a citotoxina vacuolante (Vac A) (CAMILO et al., 2017; PANDYA et al., 2017; BRITO et al., 2019).

Essa bactéria produz hipergastrinemia por meio da produção de amônia no antro gástrico, interferindo na sensibilidade das células D aos níveis reais de acidez na mucosa antral do estômago, resultando na inibição da produção de somatostatina e consequente aumento da liberação de gastrina, levando a hipersecreção ácida e formação das lesões (WALDUM; REHFELD, 2019).

2.5 Terapêutica das úlceras pépticas

No inicio do século XX o único tratamento disponível para a úlcera péptica era cirúrgico. Procedimentos como a remoção do nervo vago, remoção da porção antral do estômago e gastrotomias parciais eram realizados frequentemente, porém, com altas taxas de morbimortalidade. Os procedimentos cirúrgicos agora são amplamente restritos ao cenário de emergência para manejo das complicações da úlcera péptica (BYRNE et al., 2018).

Dentre as opções terapêuticas estão os antiácidos, citoprotetores, antagonistas do receptor H₂ de histamina, inibidores da bomba de prótons e nos casos em que há infecção por *Helicobacter pylori*, se faz necessário utilizar antimicrobianos (SAŁAGA; MOSIŃSKA, 2017).

Os antiácidos foram os primeiros medicamentos utilizados no tratamento da úlcera. Esses agentes fornecem um alívio rápido dos sintomas da doença, porém, não são eficazes na cicatrização da lesão. Isso ocorre porque não atuam alterando a secreção de ácido clorídrico, mas alterando o pH do estômago, por neutralizar o HCl, reduzindo a acidez. Entretanto, esses medicamentos apresentam efeitos indesejáveis como o curto período de duração de seu efeito, diarreia, constipação, alcalose metabólica e formação de complexos quelatos insolúveis que alteram a biodisponibilidade de alguns medicamentos (tetraciclinas e fluoroquinolonas). Exemplos desses agentes são bicarbonato de cálcio (NaH₂CO₃), carbonato de cálcio (CaCO₃), hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) e de magnésio (Mg(OH)₂) ou associações (SAŁAGA; MOSIŃSKA, 2017).

Os medicamentos citoprotetores (sucralfato e bismuto) estimulam os mecanismos de defesa da mucosa. O sucralfato (sal complexo de sulfato de sacarose e hidróxido de alumínio) quando em contato com o ambiente ácido do estômago forma um polímero viscoso e pegajoso que adere às células epiteliais, atuando como um agente de revestimento, levando a redução da degradação da camada de muco pela pepsina e H⁺. A constipação e a interação com alguns medicamentos como antimicrobianos, fenitoína e varfarina, são os seus principais efeitos colaterais (SIERRA et al., 2018). Outro agente de revestimento são os compostos a base de bismuto, frequentemente utilizados em combinações no tratamento da erradicação do *H. pylori* (ALKIM et al., 2017).

O misoprostol (análogo da prostaglandina E₁) após ser administrado se desesterifica à forma ativa, ácido misoprostólico, que atua diretamente nos receptores EP₂ e EP₃ expressos na célula parietal. Seu efeito citoprotetor se dá pela inibição da secreção gástrica, estímulo da liberação de muco e bicarbonato e a melhora do fluxo de sangue, fortalecendo a integridade da mucosa e cicatrização. Mas, pode levar a efeitos colaterais como dor abdominal e diarreia. Além disso, devido sua propriedade de estimulação da contratilidade uterina tem sido relacionado a casos de aborto, o que restringiu seu uso (SAŁAGA; MOSIŃSKA, 2017).

A carbenoxolona é um produto semissintético derivado do ácido glicirrícico encontrado nas raízes de *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz), tradicionalmente utilizada pelos indígenas no tratamento

de úlceras gástricas. É considerado um agente citoprotetor, atuando na manutenção da camada de muco pela inibição de enzimas que degradam as PGs (15-hidróxiprostaglandina-desidrogenase). No entanto, possui efeitos colaterais como hipertensão, retenção de sódio e líquidos e supressão do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Além disso, necessita de altas doses para conseguir o efeito terapêutico, sendo utilizada apenas como ferramenta farmacológica (SHARMA et al., 2018).

Os anticolinérgicos (atropina, pirenzepina e telenzepina) atuam antagonizando os receptores M₃ da ACh, presentes na célula parietal que modulam diretamente a secreção ácida gástrica. Esses medicamentos apresentam efeitos indesejáveis que limitam seu uso, como a baixa efetividade (30-40% de inibição da secreção ácida) e os efeitos colaterais extragastrintestinais pela interação com receptores M₁ em diferentes locais (boca seca, visão turva, arritmias cardíacas e retenção urinária). Dessa forma, assim como os antagonistas dos receptores de colecistocinina 2 (CCK-2) esses agentes tiveram seu desenvolvimento descontinuado (SCHUBERT, 2016).

Os antagonistas dos receptores de histamina (H₂) (ranitidina, cimetidina, famotidina, nizatidina e roxatidina), exercem seus efeitos anti-secretórios por inibir de forma competitiva e reversível a ligação da histamina ao seu receptor na célula parietal, além de reduzir indiretamente a secreção induzida pela gastrina e acetilcolina (TAKAHASHI; KATAYAMA, 2010).

O grau e duração da supressão ácida é dose dependente, variando de 50-70% durante 6-12 horas e seus efeitos colaterais incluem diarreia, cefaleia, tontura, fadiga, dor muscular, constipação, náuseas, erupções cutâneas, sonolência, alterações hematológicas e na função do sistema imunológico, bem como podem desenvolver ginecomastia (homens) e galactorréia (mulheres) devido a seus efeitos androgênicos. Sua principal vantagem é a inibição da secreção de ácido basal noturna, entretanto, na úlcera crônica e recorrente sua eficácia é limitada, sendo assim, cada vez mais substituídos pelos IBPs (SIERRA et al., 2018).

Uma limitação adicional a esses medicamentos é a redução dos seus efeitos supressores pela ingestão de alimentos e o desenvolvimento de tolerância, que pode aparecer após alguns dias de uso contínuo desses agentes terapêuticos. Essa sensibilidade reduzida a esses fármacos pode ser resultado do efeito da hipergastrinemia secundária, que estimula a liberação de histamina pelas células enterocromafins (TAKAHASHI; KATAYAMA, 2010).

O desenvolvimento dos IBPs representou um avanço terapêutico pelo fato da H⁺-K⁺-ATPase ser o alvo final da via de secreção ácida gástrica. Os IBPs foram introduzidos na clínica no final da década de 1980 e atualmente estão entre os 10 medicamentos mais utilizados no mundo. São indicados no tratamento de diversas condições associadas ao ácido, como úlceras pépticas, síndrome de Zollinger-Ellison e doença do refluxo gastroesofágico. Também são indicados para profilaxia de úlceras em UTI, em indivíduos em uso de polifarmácia e na erradicação de *H. pylori* (HELGADOTTIR; BJORNSSON, 2019).

Atualmente, as diretrizes clínicas recomendam os IBPs como os medicamentos de primeira escolha para o tratamento da úlcera, apoiados em revisões sistemáticas e metanálises em contextos clínicos específicos (SCALLY et al., 2018).

Os IBPs, omeprazol, esomeprazol (isômero do omeprazol), lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol e tenatoprazol, aliviam os sintomas e ajudam na cicatrização das lesões gástricas de maneira mais eficaz que os antagonistas dos receptores H₂, pois inibem a bomba de prótons independente da natureza do estímulo que gera a secreção (XIE et al., 2019).

Esses medicamentos são precursores inativos que na presença do ambiente ácido dos canalículos secretores da célula parietal são rapidamente protonados e convertidos em sua forma ativa (sulfenamida tetracíclica), que se liga aos resíduos de cisteína, por ligação dissulfeto covalente e irreversível na subunidade α da bomba de prótons. Essa ligação impede a ativação da bomba, permitindo a inibição prolongada da secreção ácida, mesmo depois que a concentração da droga no sangue diminui, sendo necessário a síntese de novas bombas para que retorne a atividade secretória (SCHUBERT, 2016).

Embora seja a classe terapêutica mais utilizada atualmente no tratamento das úlceras, esses medicamentos apresentam consideráveis efeitos colaterais principalmente quando utilizados por longos períodos. Entre os efeitos indesejáveis estão as deficiências nutricionais como a diminuição da absorção de cálcio, podendo levar ao surgimento de osteoporose e aumento do risco de fraturas ósseas e deficiência na absorção de ferro, favorecendo quadros de anemia ferropriva. Além disso, a redução da vitamina B₁₂ pode manifestar-se como anormalidades hematológicas e neurológicas. Essas manifestações podem ser mais comuns na população idosa pelo fato de já apresentarem risco acrescido dessas condições (GOMM et al., 2016).

Evidências apontam que o uso de IBPs podem causar hiperplasia (WALDUM et al., 2016) e formação de pólipos gástricos (TRAN-DUY et al., 2016) devido à hipergastrinemia secundária em indivíduos em terapia mais prolongada (HELGADÓTTIR et al., 2020). Além disso, a elevação do pH no conteúdo luminal gástrico pode causar um quadro de disbiose (BRUNO et al., 2019), favorecendo infecções entéricas como por *C. difficile* (YU et al., 2017).

Atualmente, um novo IBP (vonoprazan) tem sido avaliado em uma série de estudos no tratamento de doenças relacionadas à acidez gástrica, apresentando um início mais rápido de ação e um controle mais prolongado da acidez intragástrica do que os IBPs convencionais (YANG et al., 2018). O vonoprazan não requer um ambiente ácido para sua ativação e exerce uma inibição da bomba de prótons de maneira reversível e competitiva com o potássio (KUNA et al., 2019).

O vonoprazan (Takecab®) foi aprovado no Japão em 2015 para o tratamento de pacientes adultos com doenças relacionadas à secreção de ácido gástrico, incluindo úlcera gástrica ou duodenal, bem como adjuvante no tratamento da erradicação de *H. pylori*. Esse medicamento

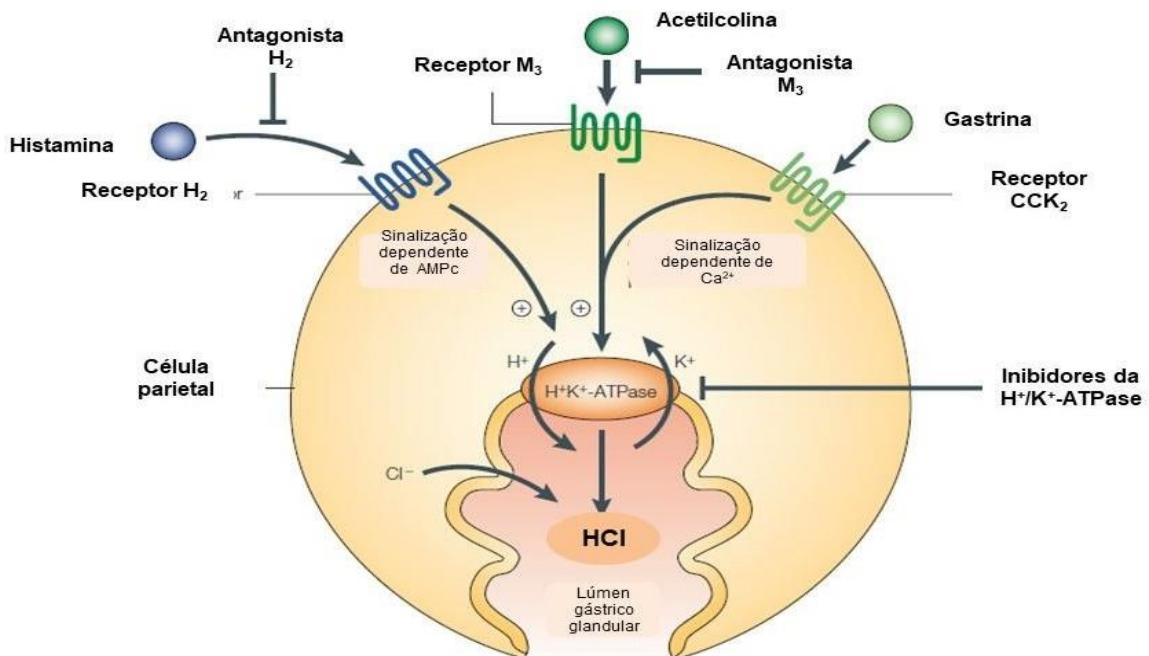
apresentou alguns efeitos adversos semelhantes aos IBPs convencionais, mas geralmente é bem tolerado nas triagens clínicas (GARNOCK-JONES, 2015).

Além disso, os IBPs trabalham sinergicamente com os antimicrobianos para erradicar *H. pylori*. Quando a úlcera está associada ao *H. pylori* são utilizados esquemas terapêuticos com a combinação de agentes antissecrétórios e antimicrobianos (MALFERTHEINER et al., 2017).

A terapia tripla é a primeira linha para erradicação de *H. pylori* e inclui um IBP e dois antimicrobianos como a claritromicina e amoxicilina (ou metronidazol para alérgicos à penicilina). Em situações de resistência à claritromicina, recomenda-se a terapia quádrupla que inclui IBP + metronidazol + subsalicilato de bismuto + tetraciclina. Todos os regimes terapêuticos devem ser administrados durante 14 dias (MALFERTHEINER et al., 2017).

Entretanto, devido ao aumento da resistência aos antimicrobianos nos últimos anos, o tratamento tornou-se mais difícil e a eficácia da terapia tripla caiu abaixo de 70% em muitos países (CHACÓN et al., 2017). Atualmente, uma vacina para prevenção primária contra *H. pylori* está em desenvolvimento (LEHOURS; FERRERO, 2019).

Figura 14 – Classes terapêuticas das úlceras pépticas (Fonte: Adaptado de Olbe et al., 2003)



Legenda: Dentre as classes terapêuticas para as úlceras pépticas têm-se os antissecrétórios como os antagonistas dos receptores M_3 da acetilcolina, antagonistas dos receptores H_2 da histamina e os inibidores da bomba de prótons.

Dessa forma, torna-se evidente a necessidade de pesquisas que visem buscar moléculas cada vez mais específicas para o tratamento das ulcerações gástricas, visto que os medicamentos disponíveis atualmente na prática clínica não são capazes de promover totalmente a cura da doença, apresentando alto índice de recidiva, uma variedade de efeitos adversos e colaterais, interações medicamentosas e alto custo (BOEING et al., 2016).

Diversas plantas possuem efeito gastroprotetor como a *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz) que contém a glicirrizina (ácido glicirrídico), uma saponina triterpênica, que inibe uma enzima inativadora de prostaglandinas (15-hidróxiprostaglandina-desidrogenase), aumentando assim os níveis das prostaglandinas endógenas. Esse constituinte é comercializado como carbenoxolona, a primeira droga de origem natural efetiva contra úlceras (MOUSTAFA et al., 2013).

2.6 Produtos naturais como alternativa terapêutica

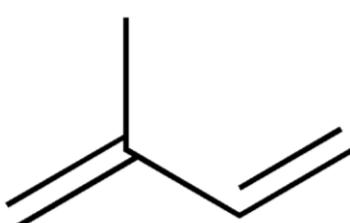
Os produtos naturais são substâncias químicas oriundas de vegetais, animais, minerais e micro-organismos, os quais possuem atividades biológicas, sendo uma das fontes mais importantes de novas substâncias utilizadas como agentes medicinais (NEWMAN; CRAGG, 2016).

O interesse pelos produtos naturais, especialmente as espécies vegetais, é datado de milhares de anos e vem demonstrando cada vez mais um papel de destaque como fonte de substâncias utilizadas diretamente como agentes medicinais (substâncias puras ou fitoterápicos). Além disso, atuam como marcadores taxonômicos para descoberta de novos medicamentos (CALIXTO et al., 2019) e fornecem protótipos base que atuam como modelos para modificações estruturais, visando otimização das propriedades farmacológicas, bioquímicas e seletivas das moléculas, servindo de inspiração para a química medicinal e estimulando a síntese de novas substâncias tendo como base os produtos naturais (BARREIRO, 2019).

A grande utilização das plantas medicinais se dá, sobretudo, devido à vasta diversidade de compostos sintetizados como flavonoides, alcaloides, fenilpropanoides e terpenos. Assim, nas últimas décadas tem aumentado os estudos dos metabólitos vegetais (DUTRA et al., 2016).

Os terpenos constituem a maior classe de metabólitos secundários existentes na natureza, constituídos das combinações de várias unidades de 5 átomos de carbono (isopreno), sendo biossintetizados nos organismos vegetais a partir da via do ácido mevalônico, que tem como precursor a acetil co-enzima A (Acetil Co A) (FRANK; GROLL, 2017) (Figura 15).

Figura 15 – Estrutura básica da unidade de isopreno (Fonte: Joca et al., 2012)



Legenda: Esqueleto básico da unidade de isopreno, apresentando 5 átomos de carbono em sua estrutura, que se combinam para formar os subtipos de terpenos (mono, sesqui, di, tri e tetraterpenos).

Esses metabólitos podem ser classificados quanto ao número de unidades isoprénicas presentes na sua estrutura em: monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos ou carotenóides (C_{40}). Além disso, os monoterpenos também são classificados em compostos acíclicos, como mirceno e geraniol; compostos cíclicos, tais como timol e carvacrol e compostos bicíclicos, como borneol e eucaliptol (BERGMAN et al., 2019).

Os monoterpenos são um grupo bastante diverso de compostos químicos e podem ser classificados ainda de acordo com o grupo funcional que apresentam. Alguns compostos incluem hidrocarbonetos (limoneno, felandreno, *p*-cimeno, α -pineno e α -terpineno) e monoterpenos oxigenados, como álcoois (linalol, geraniol, citronelol, terpineol, mentol, borneol, bisabolol e carveol), aldeídos (citral e citronelal), fenol (timol e carvacrol), cetona (carvona e grupos cânfora) e éter (eucaliptol). Um terpeno com oxigênio é chamado de terpenóide (CLOMBURG et al., 2019).

Os terpenos são encontrados na maioria das espécies de vegetais e são importantes para diversas funções relacionadas ao desenvolvimento das plantas. Eles estão presentes nas estruturas de membranas (esteróis C_{30}), funcionam como pigmentos fotossintéticos (carotenóides C_{40}) e atuam como fitohormônios (giberelinas C_{20}). Muitos terpenos são conhecidos por desempenharem importantes funções nas interações planta-ambiente e planta-planta (BERGMAN et al., 2019).

A diversidade química dos terpenos é especialmente alta em plantas e reflete uma história natural marcada pelo estresse e outras pressões seletivas imposta pelos animais, resultando em uma ampla variedade de constituintes no reino vegetal com alta afinidade por proteínas animais e potentes efeitos biológicos. Assim, metabólitos secundários vegetais com atividade biológica para animais podem ter uma base evolutiva e bioquímica (BERGMAN et al., 2019).

Aproximadamente 40.000 terpenos já foram identificados, sendo uma grande parte comercialmente importantes para a indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia (Dutra et al., 2016). Dentre os produtos farmacêuticos a base de terpenos tem-se o Artezine® (antimalárico), Taxol® (antitumoral) e Salonpas® (analgésico local) (GUIMARÃES et al., 2014).

Entre todos os terpenos, os monoterpenos e sesquiterpenos são as classes mais estudadas, devido sua extensa distribuição no reino vegetal, seu papel central nas funções essenciais das plantas e sua potencial atividade farmacológica em modelos experimentais (DUTRA et al., 2016).

Os monoterpenos e monoterpenóides, são os componentes majoritários dos óleos essenciais aromáticos, chegando a constituir cerca de 90% desses óleos, com grande variedade de estruturas químicas e atividades biológicas (ASBAHANI et al., 2015; GUIMARÃES et al., 2019). Algumas dessas substâncias já demonstraram efeitos gastroprotetores e essa atividade tem sido atribuída a efeitos antisecretores, citoprotetores e/ou propriedades antioxidantes (PÉRICO et al., 2020).

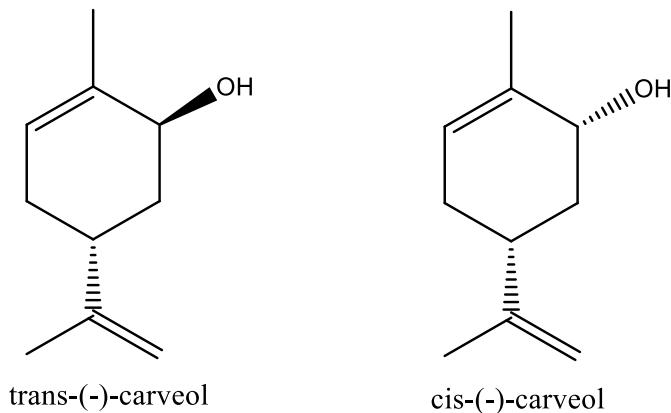
Vários estudos já investigaram a correlação entre a estrutura química dos monoterpenos e a atividade farmacológica. Sabe-se que a presença e a posição de grupos funcionais, como hidroxila, pode influenciar a potência e a eficácia farmacológica (CARDOSO-TEIXEIRA et al., 2018).

Em geral, os monoterpenos são extraídos de espécies vegetais e o isolamento destes compostos com alto grau de pureza é difícil e dispendioso devido à obtenção de baixas quantidades. Além disso, a disponibilidade do material vegetal é limitada, principalmente devido as variações sazonais e pragas que acometem as plantações. Assim, uma forma de obter monoterpenos de interesse farmacêutico com maiores rendimentos é pela síntese química, além de evitar consequências danosas na natureza pelo extrativismo vegetal (BARREIRO, 2019).

2.7 Substância teste: (-)-Carveol

O (-)-carveol é um álcool monoterpênico monocíclico insaturado natural, com fórmula molecular $C_{10}H_{16}O$ e sinonímia *p*-menta-6,8-dien-2-ol, podendo ser encontrado na natureza na forma de dois diastereoisômeros o *cis* e o *trans* (HRITCU et al., 2020). Alguns monoterpenos são encontrados na natureza como misturas de isômeros *cis* e *trans*, como o (\pm)-citronelol.

Figura 16 – Estrutura química do *trans*(-)-carveol e *cis*(-)-carveol (Fonte: Elaborada pelo autor. Programa de desenho químico - ChemDraw)



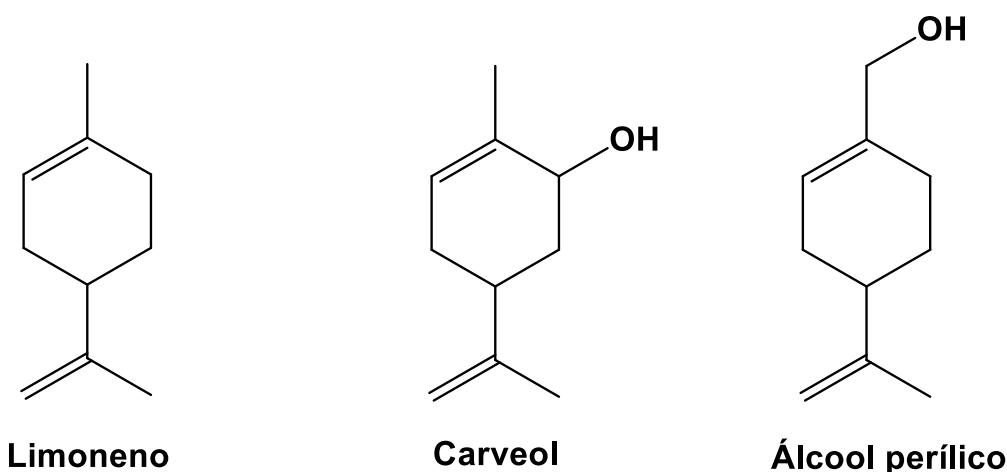
Esse constituinte é encontrado em óleos essenciais de muitas plantas da família *Lamiaceae*, que inclui os gêneros *Thymbra*, *Origanum*, *Corydotherymus* e *Saturejae Thymus* (RAHMAN et al., 2021). Além disso, está presente abundantemente no óleo essencial das sementes de cominho (*Carum carvi*) (FANG et al., 2010), cascas da laranja (*Citrus reticulata*), frutos de groselha e chá preto (MALIK et al., 2020) e é utilizado como agente aromatizante na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia (BHATIA et al., 2008).

Outro monoterpeno importante correlacionado estruturalmente ao (-)-carveol é o limoneno, em que, a distinção estrutural consiste na presença de um grupamento hidroxila no (-)-carveol. Assim, o (-)-carveol é um derivado hidroxilado do limoneno (CARDOSO-TEIXEIRA et al., 2018).

O limoneno é um monoterpeno monocíclico constituinte de vários óleos essenciais cítricos (CARDOSO-TEIXEIRA et al., 2018), com propriedades anti-inflamatórias (HIROTA et al., 2010) e gastroprotetoras na úlcera induzida por etanol e indometacina (ROZZA et al., 2011) (Figura 17).

Além disso, o (-)-carveol apresenta estrutura química similar ao álcool perílico que já demonstrou efeito benéfico na prevenção da toxicidade hepática induzida pelo etanol pela inibição de citocinas inflamatórias e inibição da peroxidação lipídica (KHAN et al., 2011).

Figura 17 – Estrutura química do limoneno e seus derivados (Fonte: Elaborada pelo autor. Programa de desenho químico - ChemDraw).



Para garantir a segurança do (-)-carveol nas formulações da indústria cosmética foi realizado um estudo de toxicidade aguda. Este estudo mostrou que a dose letal do (-)-carveol, capaz de matar 50% dos animais em experimentação (DL₅₀), administrado oralmente é 3.000 mg/kg em ratos (BHATIA et al., 2008). Entretanto, ainda não existem resultados na literatura científica da avaliação da toxicidade aguda do (-)-carveol em camundongos.

As plantas medicinais à base de (-)-carveol têm sido úteis no manejo de diversas doenças (ALEKSUNES et al., 2008; MAHBOUBI, 2019). *Carum carvi*, que possui o (-)-carveol como um dos principais constituintes químicos, tem sido relatada há muito tempo na medicina tradicional chinesa como antiespasmódica, carminativa e adstringente (SACHAN; DAS; KUMAR, 2016) e foi avaliada no tratamento da indigestão e dispepsia (GUO; WHITE, 2016).

Estudos conduzidos com animais de laboratórios utilizando o extrato de *Carum carvi* tem evidenciado atividade gastroprotetora nas doses de 100 e 300 mg/kg, com 81 e 88% de inibição das lesões ulcerativas respectivamente (BAANANOU et al., 2013).

O fitoconstituente (-)-carveol apresentou algumas atividades farmacológicas *in vivo* e *in vitro*, como repelente contra *Anopheles gambiae* (OMOLO et al., 2004), nematicida contra *Meloidogyne incognita* (ECHEVERRIGARAY et al., 2010) e antitumoral quando administrada na dieta de ratos com câncer de mama (WAGNER; ELMADFA, 2003). Também apresentou efeito

anticolinérgico (LOZON et al., 2016) e relaxante de músculos lisos (CARDOSO-TEIXEIRA et al., 2018), antibacteriano (GUIMARÃES et al., 2019), antifúngico frente a cepas de *C. albicans* (MONTENEGRO et al., 2019), neuroprotetor (HRITCU et al., 2020) e hepatoprotetor em modelo de toxicidade induzida por tetraclorito de carbono em camundongos (PATTERSON et al., 2013) e por acetaminofeno em ratos (RAHMAN et al., 2021).

O (-)-carveol possui atividade antioxidante por diminuir a produção do íon superóxido (O_2^-) (KAUR et al., 2019) e estimular mecanismos antioxidantes endógenos, como a translocação nuclear do gene Nrf2 (MALIK et al., 2020) e efeito anti-inflamatório por suprimir a atividade do NF-κB (MARQUES et al., 2019). Além disso, estudos apontam que o carveol inibe a ativação da COX-2 e seus efeitos anti-inflamatórios são comparáveis ao da aspirina (KAWATA; KAMEDA; MIYAZAWA, 2008). Entretanto, não existem estudos sobre sua atividade gastroprotetora, motivando sua escolha para conduzir este trabalho.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo investigar o efeito gastroprotetor do monoterpeno levórgido (-)-carveol em modelos animais e elucidar os mecanismos de ação envolvidos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a toxicidade oral aguda não-clínica e estimar a dose letal 50% (DL_{50}) do (-)-carveol em camundongos;
- Identificar o efeito do (-)-carveol no peso corpóreo, peso dos órgãos e no consumo de água e ração;
- Averiguar o efeito do (-)-carveol frente aos parâmetros comportamentais e possíveis alterações no sistema nervoso central (SNC) e autônomo (SNA);
- Determinar o efeito do (-)-carveol frente a protocolos clássicos de indução aguda de úlceras gástricas (etanol, estresse, AINEs e ligadura do piloro) em roedores;
- Demonstrar o efeito do (-)-carveol nas alterações histopatológicas do tecido gástrico após lesão promovida pelo etanol;
- Avaliar o efeito do (-)-carveol na contagem de mastócitos teciduais, matriz extracelular e mucinas em tecido gástrico após lesão induzida pelo etanol;
- Mensurar o efeito da administração do (-)-carveol (v.o. e i.d.) sobre os parâmetros bioquímicos da secreção ácida gástrica (pH, concentração de H^+ e volume gástrico), utilizando o modelo de ligadura do piloro;
- Elucidar os mecanismos de ação envolvidos com o efeito gastroprotetor do (-)-carveol: efeitos citoprotetores (SHs, NO, K_{ATP} , muco e PGs), antioxidantes (SOD, GSH, MPO e MDA) e imunomodulador (IL-1 β , TNF- α e IL-10).

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Local da pesquisa

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Farmacologia do Trato Gastrintestinal - LFTGI/IPeFarM/UFPB em parceira com o Laboratório de Farmacologia Experimental e Cultivo Celular - LAFECC/CCS/UFPB e com o Laboratório de Farmacologia Molecular do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - FARMOL/UFRN.

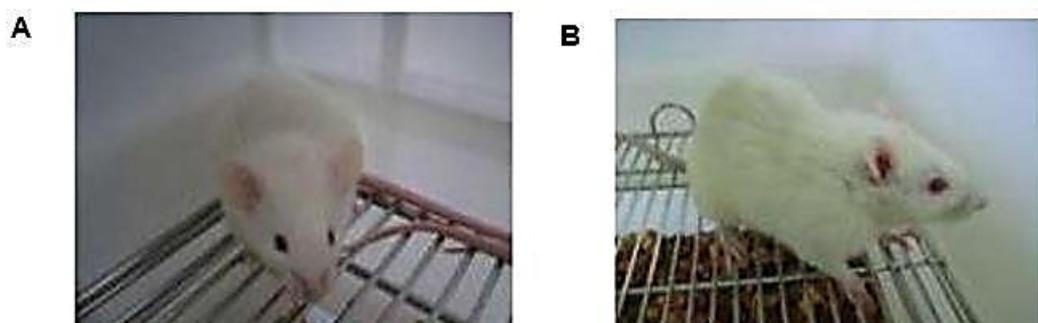
4.1.2 Substância teste

O (-)-carveol (*p*-menta-6,8-dien-2-ol) (mistura de isômeros) utilizado nesse estudo foi adquirido da Sigma-Aldrich Chemical Co, U.S.A. sob as seguintes especificações: pureza \geq 97%, fórmula molecular C₁₀H₁₆O, massa molar de 152,23 g/mol, ponto de ebulação 226 - 227 °C, densidade relativa 0.958 gr/cm³ e número de CAS 99-48-9. Se configura como um líquido incolor a temperatura ambiente.

4.1.3 Animais

Para realização desses experimentos foram utilizados camundongos *Mus musculus*, linhagem Swiss, albinos machos (**Figura 18A**), com 6-8 semanas, pesando 25-35g e ratos *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, albinos machos (**Figura 18B**), com 7-8 semanas, pesando 180-250g, ambos provenientes da Unidade de Produção Animal – UPA/IPeFarM/UFPB.

Figura 18 - Animais utilizados em ensaios farmacológicos: (A) camundongo Swiss (*Mus musculus*) e (B) rato Wistar (*Rattus norvegicus*) - Fonte: Arquivo LFTGI



Os animais foram aclimatados a temperatura de 23 \pm 2°C e ciclo claro-escuro de 12 h, alimentados com ração industrial do tipo *pellets* e água *ad libitum*, submetidos a restrição alimentar, com variação de 4 à 24 h, segundo cada metodologia em que a via oral foi utilizada

para a absorção do fármaco ou ação da droga. Esses animais foram distribuídos (n= 3-10) ao acaso nos diferentes grupos experimentais: grupo normal ou sadio (animais que não foram submetidos à lesão gástrica), controle negativo (tween 80 5% - veículo que solubiliza a substância teste), controle positivo (droga padrão ou ferramenta farmacológica) ou grupos testes (-)-carveol em doses crescentes ou dose mais efetiva, por via oral – gavagem e acomodados em caixas de plástico com fundo falso para evitar coprofagia (n= 5 animais por caixa), com livre acesso a água até 1 hora antes dos experimentos.

Todos os procedimentos experimentais tiveram início pela manhã, seguiram os princípios internacionais para o estudo com animais de laboratório (Zimmermann, 1983) e foram submetidos a apreciação e aprovação pela Comissão de Ética em Uso Animal Institucional (UFPB) sob o seguinte nº: 4881190619 (**Anexo A**). Todos os esforços foram realizados no sentido de reduzir o número de animais utilizados, a dor, o sofrimento e o estresse dos mesmos.

4.1.4 Substâncias utilizadas

Foram utilizadas as seguintes substâncias e reagentes: acetonitrila (SIGMA-ALDRICH), ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) (SIGMA-ALDRICH), ácido clorídrico (MERCK, Germany), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (SIGMA-ALDRICH), ácido periódico de Schiff (LEICA), ácido sulfúrico (SIGMA-ALDRICH), albumina sérica bovina (BSA) (SIGMA-ALDRICH), alcian blue (SIGMA-ALDRICH), anticorpo de captura -IL-1 β , IL-10 e TNF- α (R & D SYSTEMS), anticorpo secundário biotinilado (R & D SYSTEMS), carbenoxolona (SIGMA-ALDRICH), carbonato de sódio (SIGMA-ALDRICH), cloreto de magnésio (SIGMA-ALDRICH), cloreto de potássio (SIGMA-ALDRICH), cloreto de sódio P.A. (QUIMEX - MERCK, Brasil), corante eosina (LEICA), corante hematoxilina (LEICA), estreptavidina (SIGMA-ALDRICH), etanol absoluto (MERCK, Germany), éter etílico (SIGMA-ALDRICH), fenolftaleína (RIEDEL-DE HAËN, Germany), fosfato de sódio bibásico (SIGMA-ALDRICH), fosfato de sódio monobásico (SIGMA-ALDRICH), glibenclamida (SIGMA-ALDRICH), hidróxido de sódio (QUIMEX-MERCK, Brasil), indometacina (SIGMA-ALDRICH), L-glutatona reduzida (SIGMA-ALDRICH), misoprostol (PROSTOKOS), N-etilmaleimida (SIGMA-ALDRICH), ranitidina (SIGMA-ALDRICH), N-nitro-L-arginina-metil-éster (SIGMA-ALDRICH), piroxicam 20 mg (HEXAL, Brasil), quetamina 5% (VETANARCOL), sacarose (SIGMA-ALDRICH), solução glicosada (EUROFARMA), tampão TRIS (VETEC), trizma (SIGMA-ALDRICH), tween 80 (MERCK, Germany), xilazina 2% (DORCIPEC) e xilol (LEICA).

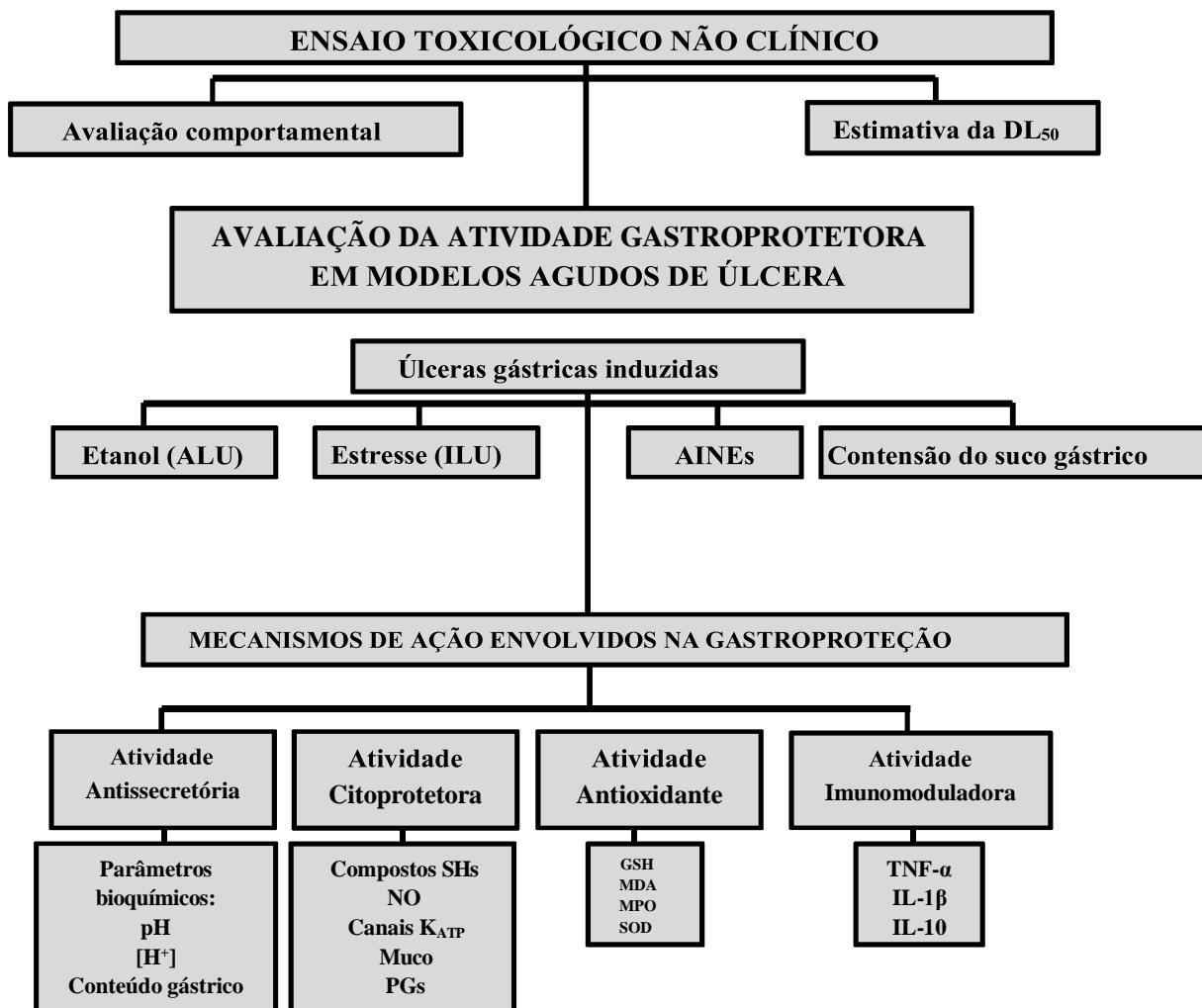
O (-)-carveol foi solubilizado em solução tween 80 5%. As drogas padrão carbenoxolona, ranitidina, misoprostol, N-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) e N-

etilmaleimida (NEM) foram solubilizadas em solução salina 0,9%. A indometacina foi solubilizada em carbonato de sódio 0,5% e a glibenclamida em solução de NaOH 0,02N em solução glicosada 4%.

4.2 MÉTODOS

Todas as metodologias utilizadas no presente trabalho estão representadas no fluxograma abaixo (**Figura 19**).

Figura 19 - Fluxograma experimental do estudo com o (-)-carveol. Arquivo LFTGI



4.2.1 Ensaio toxicológico não-clínico oral agudo

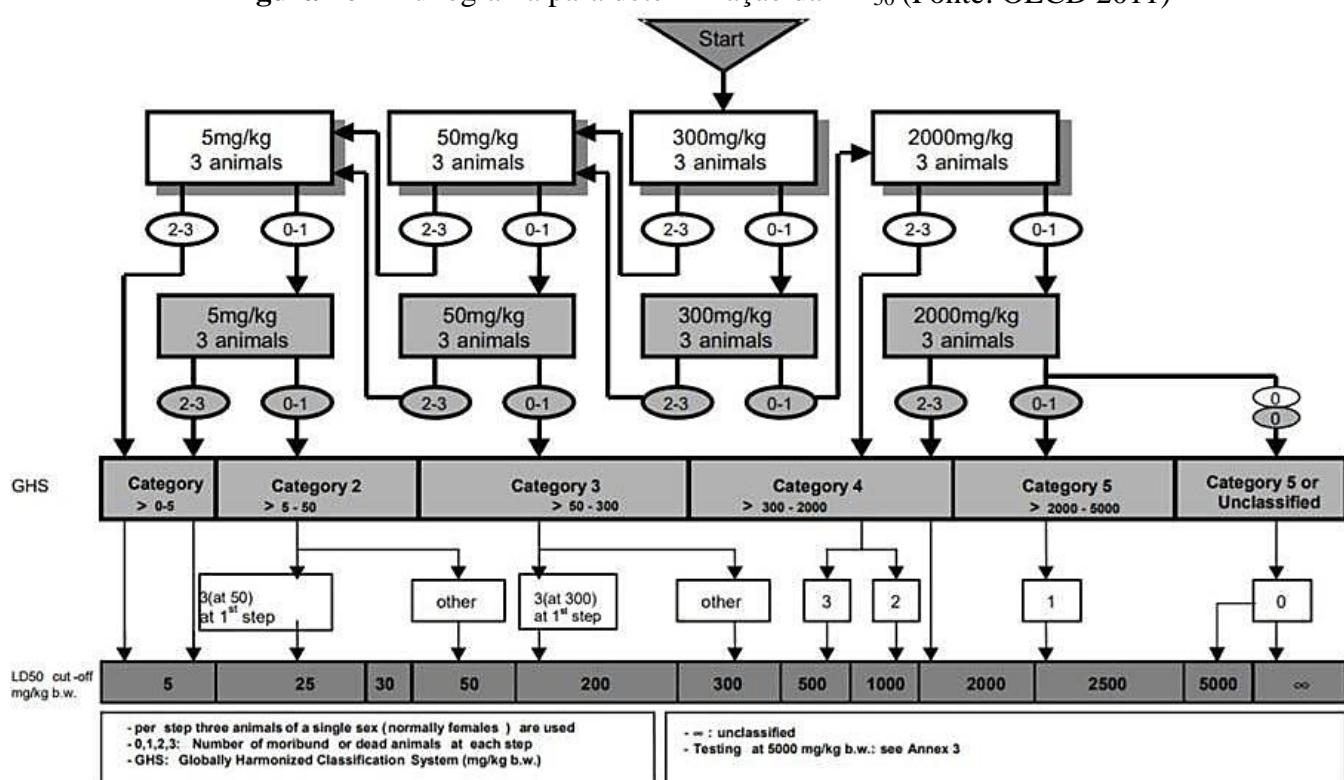
O (-)-carveol foi submetido ao ensaio de toxicidade oral aguda com o intuito de identificar possíveis sinais de toxicidade e avaliar alterações comportamentais frente ao sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso autônomo (SNA), utilizando como protocolo experimental o modelo descrito por Almeida et al (1999) (**Anexo B**), além de mensurar o consumo de ração e a

ingesta de água, o peso e alterações nos órgãos e estimar a dose letal 50% (DL_{50}) de acordo com o preconizado pelo guia da OECD nº 423 (OECD, 2001).

Os camundongos submetidos a jejum de 4 h foram distribuídos em 2 grupos de 3 animais: solução tween 80 5% (controle negativo) ou (-)-carveol (substância teste) nas doses de 300 mg/kg e 2000 mg/kg por via oral (gavagem). Após a administração das substâncias foram avaliados os efeitos gerais nas primeiras quatro horas, no tempo de 30 minutos, 1, 2, 3 e 4 horas no primeiro dia, e uma vez ao dia, durante 14 dias de experimentação, comparado ao seu respectivo grupo controle negativo (Tween 80 5%).

Parâmetros como consumo de ração e ingestão de água também foram avaliados, durante 14 dias, após a administração do (-)-carveol. A ração foi colocada diariamente e, no dia seguinte foi avaliado o consumo (em gramas com o auxílio de uma balança analítica). A ingestão de água também foi avaliada da mesma forma (em mL com uma proveta). O peso dos animais foi verificado antes da administração do (-)-carveol e no 14º dia após a sua administração. Ao final desse período os animais foram eutanasiados e retirado os principais órgãos (coração, fígado, baço e rins) os quais foram pesados em balança analítica para o cálculo do índice de órgãos que é mensurado por meio do peso do órgão em miligrama (mg) pelo peso do animal em grama (g). Também foi realizada a avaliação macroscópica desses órgãos em busca de sinais de toxicidade como coloração atípica e presença de tumores. O número de morte dos animais durante o período experimental foi utilizado para estimar a DL_{50} .

Figura 20 - Fluxograma para determinação da DL_{50} (Fonte: OECD 2011)



4.2.2 Avaliação da atividade gastroprotetora

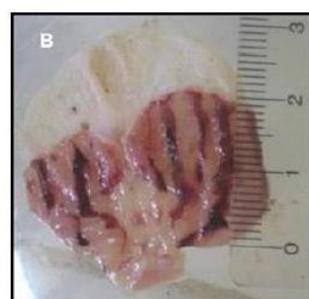
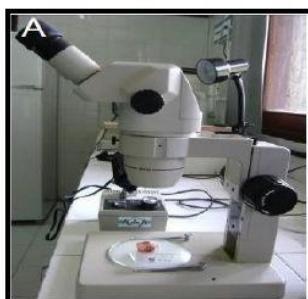
Para avaliar o potencial efeito gastroprotetor do monoterpeno (-)-carveol foram utilizados diferentes protocolos de indução aguda de úlceras gástricas: etanol, estresse, anti-inflamatório não esteroidal e ligadura do piloro. Para isso, foram administradas por via oral quatro doses crescentes (25, 50, 100 ou 200 mg/kg) da substância teste. Após a eutanásia dos animais, os estômagos foram retirados e abertos ao longo da grande curvatura para realizar a avaliação das ulcerações na mucosa gástrica.

No modelo experimental com camundongos, as lesões ulcerativas foram quantificadas com auxílio de uma lupa (OLYMPUS Optical TL3 – SZ4) e expressas como Índice de Lesão Ulcerativa (ILU). O cálculo do ILU foi realizado a partir do número de lesões e sua severidade (SZELENYI; THIEMER, 1978), conforme a fórmula a seguir:

- **Nível 1: pontos hemorrágicos e ulcerações até 1 mm;**
- **Nível 2: ulcerações com 2 mm;**
- **Nível 3: ulcerações profundas a partir de 3 mm.**

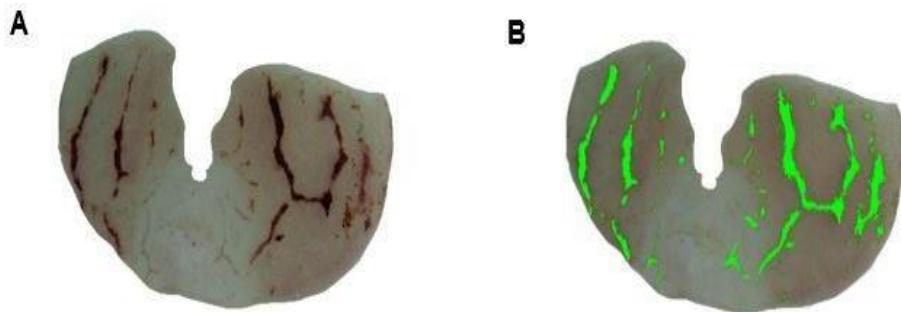
$$\text{ILU} = \Sigma (\text{nº de lesões nível 1} \times 1) + (\text{nº de lesões nível 2} \times 2) + (\text{nº de lesões nível 3} \times 3)$$

Figura 21 – Lupa OLYMPUS Optical TL3-SZ40 (A) e estômago ulcerado de rato com etanol (B) para determinação do ALU - Fonte: Arquivo LFTGI



Nos modelos experimentais realizados com ratos, as lesões gástricas foram expressas como Área de Lesão Ulcerativa (ALU). Para determinar a ALU, os estômagos foram fotografados (dimensão de 12 mega pixels) e a área da lesão avaliada com auxílio do programa AVSoft Bioview Spectra 4.0® (Figura 22).

Figura 22 - Estômago ulcerado de rato com etanol (A) e quantificação da área de lesão ulcerativa (B) com o prorama AVSoft Bioview Spectra 4.0® - Fonte: Arquivo LFTGI



4.2.2.1 Protocolos de indução aguda de úlcera gástrica

4.2.2.1.1 Úlcera gástrica induzida por etanol

O primeiro modelo experimental realizado para avaliar a atividade gastroprotetora do monoterpeno (-)-carveol foi o de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto, conforme preconizado por Morimoto et al., 1991. Para isso, ratos Wistar ($n = 7$), submetidos a um jejum de 24 horas foram pré-tratados (v.o.) com solução de tween 80 5% (10 mL/kg - controle negativo); carbenoxolona (100 mg/kg - controle positivo) ou (-)-carveol (25, 50, 100 ou 200 mg/kg), acrescido de um grupo normal que não recebeu tratamento. Após 60 minutos, foi realizada a indução da lesão ulcerativa pela administração do agente lesivo (etanol absoluto – 4 mL/kg – v.o.). Decorridos 60 minutos, os animais foram eutanasiados, os estômagos retirados e abertos ao longo da grande curvatura para determinação da área de lesão ulcerativa (ALU). Além disso, fragmentos do material biológico foram coletados, imersos imediatamente em nitrogênio líquido e congelados (- 80 °C) para posterior avaliação dos mecanismos antioxidantes e imunorregulatórios. Outra porção do tecido gástrico foi acondicionada em frascos contendo solução de formol tamponado a 10% e utilizada nos estudos morfológicos.

4.2.2.1.2 Análise histológica dos estômagos submetidos ao modelo de úlceras induzidas por etanol

A) Técnica da Hematoxilina e Eosina – H&E

Para análise geral da histoarquitetura, as amostras de fragmentos de estômago incluídos em parafina foram cortadas em micrótomo na espessura de 4 μ m, montadas em laminas histológicas e desparafinadas em xiloglutaraldeído durante 30 minutos, hidratadas em álcoois em concentrações decrescentes por 25 minutos e lavadas em água corrente por 5 minutos, e após, lavadas em água destilada. As

amostras então foram tratadas pela hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavadas novamente em água destilada por 5 minutos e novamente coradas pela eosina por 3 minutos e posteriormente também lavadas em água corrente durante mais 30 segundos. Finalmente as lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcoois, diafanizadas em xitol e montadas com Entellan.

B) Técnica do PAS - Perodic Acid Schiff

Para avaliação da distribuição, localização e presença das mucinas básicas, as amostras de fragmentos de estômago incluídos em parafina foram cortadas em micrótomo na espessura de 4 μ m, desparafinadas em xitol durante 30 minutos, hidratadas em álcoois em concentrações decrescentes por 25 minutos e lavadas em água corrente por 5 minutos, e após, lavadas em água destilada. As amostras então foram tratadas pelo ácido periódico por cinco minutos, lavadas novamente em água destilada e tratadas pelo reativo de Schiff por 10 minutos, posteriormente foram lavadas em água corrente durante mais cinco minutos, contra coradas com Hematoxilina de Harris, lavando-as por mais 5 minutos em água corrente, sendo agora desidratadas em concentrações crescentes de álcoois, diafanizadas em xitol e montadas com Entellan.

C) Técnica do Tricrômico de Masson

Para avaliar a presença de matriz extracelular na mucosa gástrica, as amostras de fragmentos de estômago incluídos em parafina foram cortadas em micrótomo na espessura de 4 μ m, desparafinadas em xitol durante 30 minutos, hidratadas em álcoois em concentrações decrescentes por 25 minutos e lavadas em água corrente por 5 minutos, e após, lavadas em água destilada. As amostras então foram tratadas pela hematoxilina de Harris por 1 minuto e lavadas em água destilada por 5 minutos. Seguiu-se agora o tratamento pela solução do Tricrômio de Masson por 12 minutos com posterior banho em água corrente durante 2 segundos. As lâminas foram desidratadas utilizando solução única de álcool absoluto por 15 minutos, diafanizadas em xitol e montadas com Entellan.

D) Azul de Toluidina

Para avaliar a distribuição, localização e presença de mastócitos, as amostras de fragmentos de estômagos incluídos em parafina foram cortadas em micrótomo na espessura de 4 μ m, desparafinadas em xitol durante 30 minutos, hidratadas em álcoois em concentrações decrescentes por 25 minutos e lavadas em água corrente por 5 minutos, e após, lavadas em água destilada. As

amostras então foram tratadas pelo azul de toluidina por 1 minuto, sendo após isso lavadas em água destilada pelo mesmo tempo. As lâminas foram desidratadas utilizando solução única de álcool absoluto por 15 minutos, diafanizadas em xanol e montadas com Entellan.

4.2.2.1.2.1 Análise morfométrica

Os cortes histológicos corados pelo tricrômico de Masson e PAS foram visualizados pela objetiva de 40X do microscópio Olympus (Toquio, Japão) e digitalizadas 20 imagens aleatórias através do mesmo microscópio e microcâmera Q-Color3, perfazendo uma área total de 281.872 μm^2 de mucosa gástrica analisado em cada tipo de reação histoquímica. A área de matriz extracelular ou de mucinas foram calculada através de algoritmos construídos no software KS300 contido no analisador de imagens Carl Zeiss (Oberkochen, Germany). Em cada imagem foram selecionados todos os pixels com tons de azul (tricrômico de Masson) ou bonina (PAS) para a criação de uma imagem binária, processamento digital e cálculo da área em μm^2 . Para o cálculo do número de mastócitos, um corte histológico de estômago corado pelo azul de toluidina de cada caso foi visualizado através da objetiva de 40X para a digitalização de 20 áreas aleatórias através da microcâmera. Utilizando as mesmas imagens, todas as células foram contadas interativamente utilizando o mesmo programa.

4.2.2.1.3 Úlcera gástrica induzida por estresse (imobilização e frio)

Esse modelo foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Levine (1971), em que, camundongos Swiss ($n = 7$) foram submetidos a um jejum de 24 horas e pré-tratados (v.o.) com solução tween 80 5% (10 mL/kg - controle negativo), ranitidina (50 mg/kg - controle positivo) ou (-)-carveol (25, 50, 100 ou 200 mg/kg). Após 30 minutos, os camundongos foram imobilizados pelas patas dianteiras e traseiras, colocados em contenedores de policloreto de vinila (PVC) (9 cm de comprimento x 3,5 cm de diâmetro) e submetidos a uma temperatura de $4 \pm 1^\circ\text{C}$ durante um período de 3 horas para indução das úlceras gástricas. Decorrido esse tempo, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, os estômagos retirados e abertos para determinação do ILU.

4.2.2.1.4 Úlcera gástrica induzida por anti-inflamatório não esteroidal (piroxicam)

Esse protocolo experimental foi conduzido de acordo com o modelo proposto por Puscas (1997). Para isso, camundongos Swiss ($n = 7$) submetidos a um jejum de 24 horas foram pré-tratados (v.o.) com solução tween 80 5% (10 mL/kg - controle negativo), ranitidina (50 mg/kg -

controle positivo) ou (-)-carveol (25, 50, 100 ou 200 mg/kg). Após 30 minutos, a úlcera gástrica foi induzida pela administração do agente lesivo piroxicam (30 mg/kg) por via subcutânea (s.c.) e decorrido 4 horas, os camundongos foram eutanasiados, os estômagos retirados e abertos para determinação do ILU.

4.2.2.1.5 Úlcera gástrica induzida por contensão do suco gástrico (ligadura do piloro) – v.o./i.d.

Esse modelo foi realizado conforme descrito por Shay et al. (1945). Após jejum de 24 horas, ratos ($n = 10$) foram pré-tratados (v.o.) com solução tween 80 5% (10 mL/kg - controle negativo), ranitidina (50 mg/kg - controle positivo) ou a melhor dose do (-)-carveol (100 mg/kg). Após 30 minutos, foram anestesiados (i.m.) com quetamina 5% (anestésico) e xilazina 2% (relaxante muscular) e submetidos a uma incisão longitudinal abaixo da apófise xifóide para ligadura (amarração) do piloro. Em seguida, os órgãos foram internalizados e as incisões dos animais suturadas. No modelo de ligadura do piloro pela via de administração intraduodenal (i.d.), foram realizados os mesmos tratamentos descritos para a via de administração oral, logo após o procedimento cirúrgico de ligadura. Decorridas 4 horas da ligadura do piloro, os ratos foram eutanasiados, os estômagos retirados e abertos para determinação da lesão ulcerativa.

4.2.3 Investigação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora

Após comprovar o efeito gastroprotetor do (-)-carveol nos diferentes modelos agudos de indução de úlceras gástricas, o próximo passo, foi avaliar os mecanismos de ação subjacentes a esse efeito. A avaliação dos mecanismos de ação foi iniciada com a investigação da atividade antisecretória ou neutralizante da secreção ácida gástrica, utilizando como critérios os parâmetros bioquímicos do suco gástrico (pH, concentração de íons H⁺ e volume do suco gástrico), a partir do modelo de ligadura de piloro. Para avaliação de uma possível atividade citoprotetora foi verificada a participação dos grupamentos sulfidrílicos, NO, K_{ATP}, muco e prostaglandinas utilizando bloqueadores específicos. O efeito antioxidante foi avaliado por meio da atividade da mieloperoxidase (MPO), dos níveis de malonaldeído (MDA), glutatona reduzida (GSH) e pela atividade da superóxido dismutase (SOD) e os mecanismos imunomoduladores foram determinados medindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-1 β (IL-1 β) e a citocina anti-inflamatória interleucina-10 (IL-10) por ELISA a partir das amostras de tecido gástrico.

4.2.3.1 Mecanismo antissecratório ou neutralizante

4.3.3.1.1 Avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico após ligadura do piloro (v.o./i.d.) (SHAY, 1945)

Após a eutanásia dos animais, os estômagos foram abertos, o conteúdo gástrico coletado e determinado os seguintes parâmetros bioquímicos: potencial hidrogeniônico (pH), concentração de íons hidrogênio (H^+) e volume do suco gástrico (medido indiretamente pela diferença do peso do estômago cheio e vazio). O estômago foi pinçado de forma a evitar perdas de conteúdo gástrico e pesado em balança analítica, em seguida, foi aberto ao longo da grande curvatura e recolhido o conteúdo em um tubo Falcon. O estômago vazio foi novamente pesado e ao conteúdo gástrico foram adicionados 10 mL de água destilada e realizada a centrifugação a 3.000 rpm durante 10 minutos em temperatura ambiente. A partir do sobrenadante, o pH foi verificado com o auxílio de um pHmetro digital PG 2000 (GEHAKA, Brasil) e 10 mL desse conteúdo foi retirado, distribuído em alíquotas de 5 mL em dois *erlenmeyers*, para a realização da titulação do suco gástrico (em duplicata) e determinar a concentração de H^+ . A titulação foi realizada com uma bureta de vidro graduada utilizando o hidróxido de sódio (NaOH) 0,01N como agente titulante e a fenolftaleína como solução indicadora. A concentração de H^+ foi calculada conforme equação a seguir:

$$[H^+] = (1,825 \times V_{NaOH} \text{ médio da titulação} \times 2) / \text{peso do conteúdo}$$

4.2.3.2 Mecanismos citoprotetores

4.2.3.2.1 Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrilas (SHs) na gastroproteção (MATSUDA et al., 1999)

Para esse modelo foram utilizados ratos Wistar ($n = 7$), em jejum de 24 horas, distribuídos em 6 diferentes grupos: 3 grupos receberam previamente solução salina 0,9% (10 mL/kg - i.p.) e os 3 grupos restantes receberam N-etilmaleimida (NEM) (10 mg/kg - i.p.), um bloqueador dos grupamentos sulfidrilas. Após 30 minutos desse pré-tratamento, os animais foram tratados (v.o.) com solução tween 80 5% (10 mL/kg - controle negativo), carbenoxolona (100 mg/kg - controle positivo) ou com a dose mais efetiva do (-)-carveol (100 mg/kg). Decorridos 60 minutos, as lesões gástricas foram induzidas pela administração do agente lesivo etanol absoluto (4 mL/kg – v.o.) e com mais 60 minutos, os animais foram eutanasiados, os estômagos retirados, abertos e fotografados para a determinação da ALU.

4.2.3.2.2 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) na gastroproteção (SIKIRIĆ et al., 1997)

Nesse experimento foram utilizados ratos Wistar ($n = 7$), em jejum de 24 horas, distribuídos em 6 diferentes grupos: 3 grupos receberam previamente solução salina 0,9% (10 mL/kg - i.p.) e os 3 grupos restantes receberam L-arginina metil éster (L-NAME) (70 mg/kg - i.p.), um inibidor não seletivo da enzima sintase de óxido nítrico. Após 30 minutos desse pré-tratamento, os animais foram tratados (v.o.) com solução tween 80 5% (10 mL/kg - controle negativo), carbenoxolona (100 mg/kg - controle positivo) ou com a dose mais efetiva do (-)-carveol (100 mg/kg). Decorridos 60 minutos, as lesões gástricas foram induzidas pela administração do agente lesivo etanol absoluto (4 mL/kg – v.o.) e com mais 60 minutos, os animais foram eutanasiados, os estômagos retirados, abertos e fotografados para a determinação da ALU.

4.2.3.2.3 Avaliação da participação dos canais de potássio ATP-dependentes (K_{ATP}) na gastroproteção (OLINDA et al., 2008)

Nesse modelo, ratos Wistar ($n = 7$) com jejum de 24 horas foram divididos em 6 grupos distintos: 3 grupos receberam previamente solução salina 0,9% (10 mL/kg - i.p.) e os outros 3 grupos receberam glibenclamida (5 mg/kg - i.p.), um agente bloqueador dos K_{ATP}. Decorrido 30 minutos, os animais foram tratados com solução tween 80 5% (10 mL/kg - v.o. - controle negativo), diazóxido (3mg/kg - i.p. - um ativador de K_{ATP}) ou com a dose mais efetiva do isômero (-)-carveol (100 mg/kg - v.o.). Após 60 minutos, foram induzidas as lesões ulcerativas pela administração (v.o.) de etanol absoluto (4 mL/kg) e após mais 60 minutos, os animais foram eutanasiados, os estômagos retirados, abertos e fotografados para a determinação da ALU.

4.2.3.2.4 Determinação da concentração de muco aderido à parede gástrica (RAFATULLAH et al., 1990) com modificações

Após jejum de 24 h, ratos Wistar ($n = 10$), foram distribuídos em três grupos e tratados (v.o.) com solução tween 80 5% (10 mL/kg - controle negativo), carbenoxolona (200 mg/kg - controle positivo) ou a dose mais efetiva do (-)-carveol (100 mg/kg). Após 1 hora, os animais foram anestesiados (quetamina 5% e xilazina 2% - i.m.) e submetidos a um procedimento cirúrgico abaixo da apófise xifoide para realização da ligadura do piloro. Decorrido 4 horas, os animais foram eutanasiados, o estômago pinçado e retirado, lavado em água gelada e aberto ao longo da grande curvatura. A porção glandular do estômago foi separada, pesada e imersa, por

duas horas, em 10 mL de solução tampão de *alcian blue* (0,1%), corante que atua complexando-se ao muco. O excesso de *alcian blue* foi removido pelas lavagens do estômago (2 x) com 7 mL de solução sacarose (0,25 mol/L), sendo a primeira lavagem por 15 minutos e a segunda por 45 minutos. O corante complexado ao muco aderido à parede do estômago foi extraído com 10 mL de cloreto de magnésio (0,5 mol/L), agitando-se intermitentemente por 1 minuto, a cada 30 min, durante 2 horas com auxílio de um vórtex. 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, retirada uma alíquota de 4 mL da solução, adicionado a mais 4 mL de éter etílico (P.A.) e agitado por 2 minutos em vórtex. A emulsão obtida foi centrifugada por 10 min a 3.600 rpm e o sobrenadante foi descartado juntamente com o anel de muco. Aliquotas de 200 µL do branco, solução padrão e dos grupos testes foi transferida para placas de 96 poços e as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 590 nm (modelo MULTISCA, MARCA LABSYSTEMS®). A determinação da concentração de *alcian blue* das amostras foi feita por interpolação em uma curva padrão com várias concentrações conhecidas de *alcian blue*. Os resultados foram expressos em µg de *alcian blue*/g de tecido.

4.2.3.2.5 Avaliação da participação das prostaglandinas na gastroproteção (RODRIGUES et al., 2010)

Ratos Wistar ($n = 7$) foram submetidos a um jejum de 24 horas e divididos em 6 grupos tratados (v.o.) com solução tween 80 5% (10 mL/kg - controle negativo), misoprostol (50 µg/kg, análogo das prostaglandinas) e a melhor dose do (-)-carveol (100 mg/kg). Uma hora antes dessa administração, 3 grupos de animais foram pré-tratados com indometacina (30 mg/kg, inibidor inespecífico da ciclo-oxigenase) e os outros 3 grupos receberam o veículo (solução salina 0,9%). Após 1 hora do tratamento, todos os animais receberam (v.o.) etanol absoluto (agente lesivo). Decorrido mais 1 h, os animais foram eutanasiados, os estômagos retirados, abertos e fotografados para a determinação da ALU.

4.2.3.3 Atividade antioxidante

4.2.3.3.1 Determinação dos níveis de glutationa reduzida (GSH) (FAURE; LAFOND, 1995)

Os níveis de GSH foram determinados 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 arrefecida com gelo. A suspensão resultante foi homogeneizada durante 2 minutos por meio de um homogeneizador (Politron). A partir deste homogenato, foram retirados 400 µL e adicionou-se 320 µL de água destilada e 80

μ L de ácido tricloroacético 50%, sendo centrifugado a 3.000 rpm a 4 °C por 15 minutos. Em seguida, foram pipetados 100 μ L do sobrenadante resultante em microplaca de 96 poços e adicionados 200 μ L de Tris e 25 μ L de DTNB. Esta microplaca foi encubada a temperatura ambiente e após 15 minutos foi realizada a leitura em espectofotômetro (*Polaris*) no comprimento de onda de 412 nm. A curva de calibração foi feita com L-glutationa 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) (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990) - adaptado

A determinação do MDA foi realizada por meio de um método de detecção colorimétrica por espectroscopia UV/VIS. As amostras foram suspensas em tampão Trizma® (Tris HCl) 1:5 (p/v) e picotadas com tesoura durante 15 segundos sobre uma placa arrefecida com gelo. A suspensão resultante foi homogeneizada durante 2 minutos por meio de um homogeneizador (Politron) e foi centrifugada a 11.000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Logo após foram transferidos 300 μ L dos sobrenadantes para tubos *eppendorfes* e adicionado 750 μ L do composto cromogênico (10,3 mM de 1-metil-2-fenilindol) e 225 μ L de ácido clorídrico (37%) sendo incubados a temperatura de 45 °C em banho maria por 40 minutos e novamente centrifugados a 11.000 rpm a 4 °C por 5 minutos. Em seguida, foram transferidos 300 μ L do sobrenadante para uma microplaca de 96 poços e determinada a absorbância por meio da colorimetria (586 nm), utilizando um leitor de placa (espectrofotômetro - *Polaris*). Os dados foram interpolados com a curva padrão. Ao considerar que a cada 300 μ L do sobrenadante tem-se 0,06 g de tecido, foi necessário realizar um ajuste na concentração (dividindo por 0,06) para expressar os resultados como nmol de MDA/g de tecido.

4.2.3.3.3 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) (KRAWISZ et al., 1984)

Os fragmentos de tecido foram homogeneizados no tampão de brometo de hexadeciltrimetilâmônio (HTAB) que tem função de detergente, lisando os grânulos dos neutrófilos que contém a enzima mieloperoxidase. Após a homogeneização, o material foi submetido a ação de um sonicador por 5 minutos. Em seguida, a amostra foi submetida a um duplo processo de congelação e descongelamento para facilitar o rompimento das estruturas celulares e consequentemente a liberação da enzima. O homogenato foi centrifugado a 5.000 rpm a 4 °C por 20 minutos e congelados por 24 horas. No dia seguinte, foram coletados 7 μ L do sobrenadante, ao qual adicionou-se 200 μ L da solução de leitura (cloridrato de o-dianisidina, tampão fosfato de

potássio e H₂O₂ 1%). A leitura foi realizada utilizando espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm, nos tempos 0 e 1 minuto. Os resultados foram expressos como unidades de mieloperoxidase por grama de tecido.

4.2.3.3.4 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD) (SUN; OBERLEY; LI, 1988).

A quantidade da enzima SOD foi medida por meio da capacidade de inibir a redução fotoquímica do azul de nitro-tetrazólio (NBT). Nesse método experimental, a riboflavina reduzida fotoquimicamente gera o O²⁻ que reduz o NBT e produz o formazan que absorve no comprimento de onda de 546-630 nm. Na presença da SOD a redução do NBT é inibida. Os resultados foram expressos em unidades da enzima por grama de proteína, que é a quantidade de SOD necessária para inibir a taxa de redução do NBT em 50%. Para isso, as amostras de tecido foram homegeinizadas em tampão fosfato (0,4 M, pH 7,0) e centrifugadas durante 15 minutos a 10.000 rpm em 4 °C. O sobrenadante foi retirado e utilizado no ensaio. As placas contendo o meio de reação (tampão fosfato 10 mM), L-metionina (1,79 mg/mL, pH 7,8), riboflavina (0,2 mg/mL, pH 7,8), NBT (1,5 mg/mL, pH 7,8) e 10 µL do sobrenadante da amostra foram expostos a lâmpada fluorescente (15 W) durante 10 minutos. Após esse período, levou-se o material ao espectrofotômetro 630 nm.

4.2.3.4 Mecanismos imunomoduladores

4.2.3.4.1 Determinação das interleucinas (KENDALL et al., 1983)

Os níveis de interleucinas foram determinados por meio do ensaio imunoenzimático de ELISA (tipo sanduíche). Os anticorpos de captura de cada interleucina foram sensibilizados em microplaca de 96 poços (fundo chato). Após 18 h, a placa foi lavada com solução de tween 20 0,05% (tampão de lavagem), 3 vezes, bloqueada com uma solução de albumina sérica bovina 1% e lavada novamente por mais 3 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 4.000 rpm por 10 minutos a 4° C. Os sobrenadantes (100 µL) foram pipetados em placa de 96 poços, realizada a curva padrão, incubada por 2 h e lavada com tampão de lavagem por 3 vezes. O anticorpo secundário biotinilado (100 µL) foi adicionado em cada poço, seguido de incubação por 2 horas e 3 lavagens. A placa foi incubada com estreptavidina durante 20 minutos, lavada 3 vezes, adicionado o substrato para revelação (Kit DuoSet® – R & D Systems Catalog – DY999) e incubada por 20 minutos. Decorrido esse tempo, a reação foi interrompida adicionando 50 µL da solução de parada e a leitura foi realizada em

espectrofotômetro a 450 nm. Os resultados foram obtidos pela interpolação com a curva padrão e expressos em pg de interleucina/mL.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média (d.p.). Para análise dos dados obtidos nos ensaios de toxicidade aguda foi realizado o teste “t” de *Student* não pareado para comparação de 2 grupos. Para os demais protocolos experimentais foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelos pós testes de Dunnett e Tukey para múltiplas comparações. O nível de significância mínimo foi $p < 0,05$. Os dados foram digitados em planilha eletrônica Excel (*Microsoft Office 2010®*) e posteriormente exportados para o programa *GraphPad Prism* versão 5.0 (San Diego, CA, EUA), onde foram analisados.

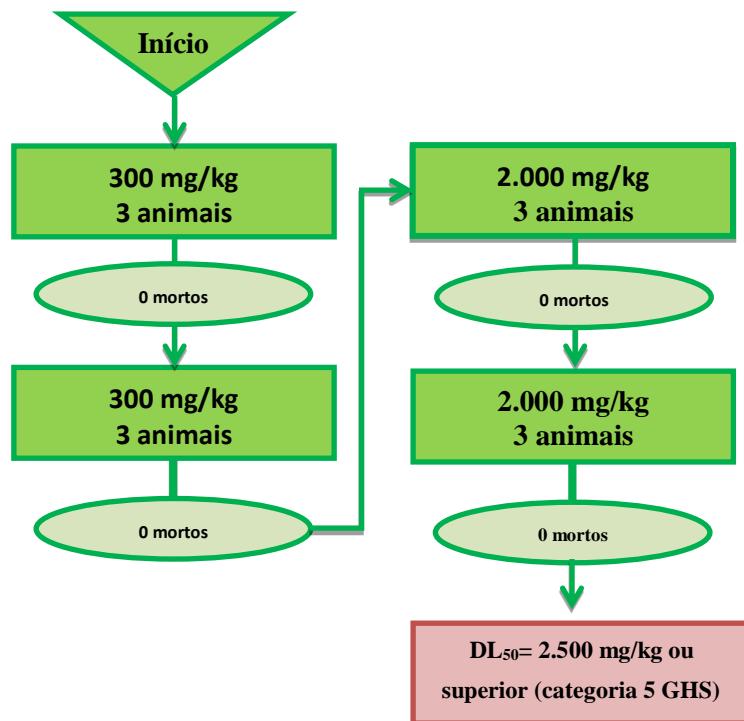
Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Ensaio toxicológico não-clínico oral agudo

Inicialmente o (-)-carveol foi administrado por via oral na dose de 300 mg/kg e não foi verificada morte de animais. Esse resultado se reproduziu ao repetirmos esse tratamento em um outro grupo. Dando continuidade, um novo grupo de animais foi submetido a administração por via oral de 2.000 mg/kg do (-)-carveol e não houve morte de animais. Essa dose foi repetida em um novo grupo e mais uma vez não foi constatada morte durante os 14 dias de experimento. Com isso, pode-se estimar a DL₅₀ do (-)-carveol em ≥ 2.500 mg/kg conforme o guia nº 423 da OECD, sendo classificada na categoria 5 do Sistema de Classificação Harmonizada Global (GHS). Essas etapas estão ilustradas na Figura 23.

Figura 23 – Esquema da estimativa da DL₅₀ do (-)-carveol



Os animais submetidos a administração do (-)-carveol (300 ou 2.000 mg/kg v.o.) não apresentaram alterações comportamentais em comparação ao seu respectivo grupo controle negativo (véículo - solução de tween 80 5%).

Em relação à evolução ponderal, índice dos órgãos, consumo de água e ração, também não foram constatadas alterações significativas nos animais que receberam o (-)-carveol (300 e 2.000 mg/kg) em comparação ao controle negativo (tween 80 5%) (Tabela 1).

Tabela 1 - Efeito da administração oral do (-)-carveol na evolução ponderal, índice de órgãos, consumo de água e ração de camundongos machos, durante 14 dias

Parâmetros		Tratamentos	
Evolução ponderal (g)	Tween 80 5%	(-)-Carveol 300 mg/kg	(-)-Carveol 2.000 mg/kg
Inicial	26,3 ± 1,7	27,7 ± 1,4	26,8 ± 1,9
Final	30,8 ± 1,1	32,0 ± 1,4	31,8 ± 2,8
Índice de órgãos			
Fígado	55,0 ± 3,2	56,1 ± 2,2	56,8 ± 2,5
Coração	5,1 ± 1,0	5,4 ± 1,0	5,2 ± 0,8
Rins	15,2 ± 2,0	14,3 ± 1,8	14,5 ± 2,1
Baço	4,7 ± 0,9	4,9 ± 1,3	5,5 ± 1,7
Consumo de água (mL)			
	25,3 ± 2,0	26,5 ± 1,4	26,1 ± 2,7
Consumo de ração (g)			
	22,9 ± 1,9	23,1 ± 1,9	23,1 ± 2,4

Os resultados estão expressos como média ± d.p. (n=6). Teste “t” de Student não-pareado comparado ao grupo controle (tween 80 5%). 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 Avaliação da atividade gastroprotetora do (-)-Carveol

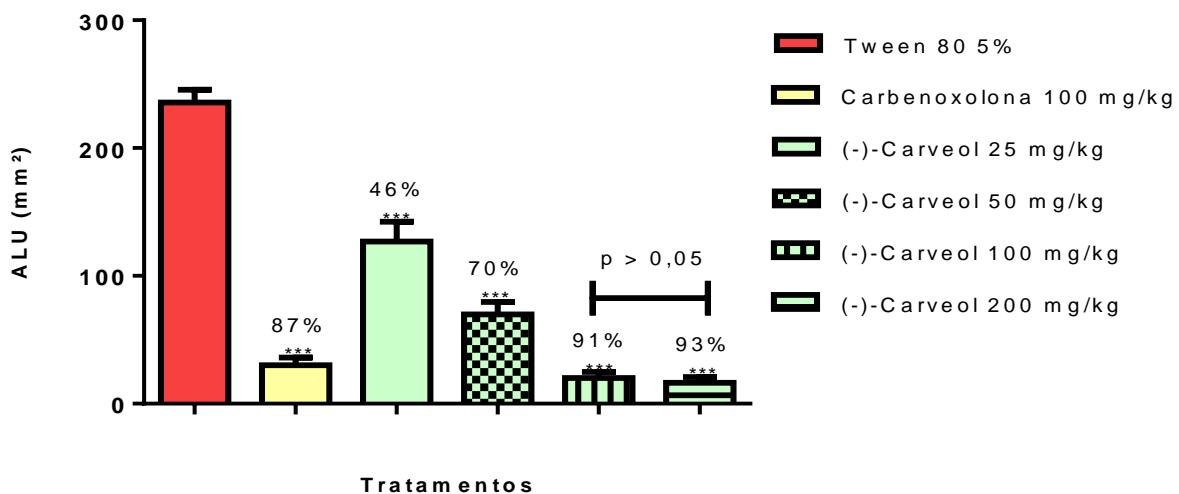
5.2.1 Úlceras gástricas induzidas por etanol

O etanol produziu lesões gástricas significativas ($235,7 \pm 9,9 \text{ mm}^2$) na mucosa dos animais do grupo controle negativo (tween 80 5%). Os animais tratados previamente (v.o.) com a carbenoxolona (100 mg/kg – controle positivo), substância citoprotetora de referência, apresentaram redução significativa ($p<0,001$) da área lesionada ($30,0 \pm 6,0 \text{ mm}^2$) em comparação ao controle negativo, com um percentual de inibição da lesão ulcerativa de 87%. De forma semelhante, o (-)-carveol em todas as doses avaliadas (25, 50, 100 ou 200 mg/kg v.o.), apresentou redução significativa ($p<0,001$) da ALU quando comparado ao grupo controle negativo, com um percentual de inibição da lesão ulcerativa de 46% ($126,9 \pm 15,3 \text{ mm}^2$), 70% ($69,9 \pm 9,5 \text{ mm}^2$), 91% ($20,2 \pm 4,7 \text{ mm}^2$) e 93% ($16,4 \pm 4,5 \text{ mm}^2$) respectivamente.

Esses resultados estão expressos no Gráfico 1 e ilustrados na Figura 24, em que pode-se observar que o pré-tratamento com o (-)-carveol reduziu a distribuição e intensidade das lesões ulcerativas em comparação ao controle negativo.

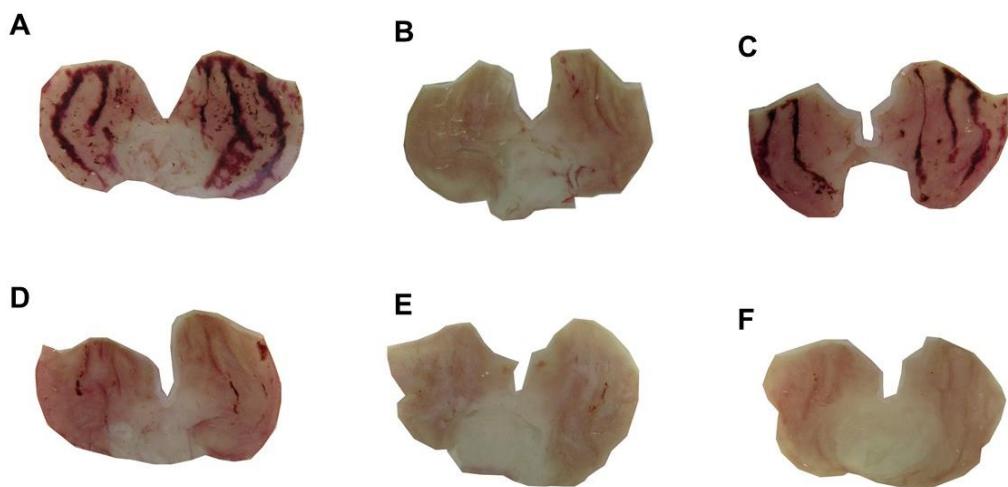
Embora o (-)-carveol tenha apresentado efeito gastroprotetor significativo em todas as doses testadas, a dose de 100 mg/kg foi selecionada como a mais efetiva, já que não diferiu estatisticamente da dose de 200 mg/kg, mas diferiu das demais doses quando avaliadas pelo teste de Tukey de múltiplas comparações.

Gráfico 1 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e (-)-carveol em úlceras gástricas induzidas pelo etanol em ratos



Os resultados estão expressos como média \pm d.p. ANOVA seguido do teste de Dunnett e Tukey. *** $p<0,001$, comparado com o grupo controle (Tween 80%) ($n=6-7$). As barras acima das doses de 100 e 200 mg/kg indicam a existência ou não de diferenças estatísticas no teste de Tukey. ALU= Área de Lesão Ulcerativa.

Figura 24 - Aspectos macroscópicos da mucosa gástrica de ratos pré-tratados (v.o.) com tween 80 5% (A); carbenoxolona 100 mg/kg (B); (-)-carveol 25 mg/kg (C), 50 mg/kg (D), 100 mg/kg (E) e 200 mg/kg (F) no modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol



5.2.2 Efeito do (-)-carveol sobre as alterações histopatológicas em ratos com lesão gástrica induzida por etanol

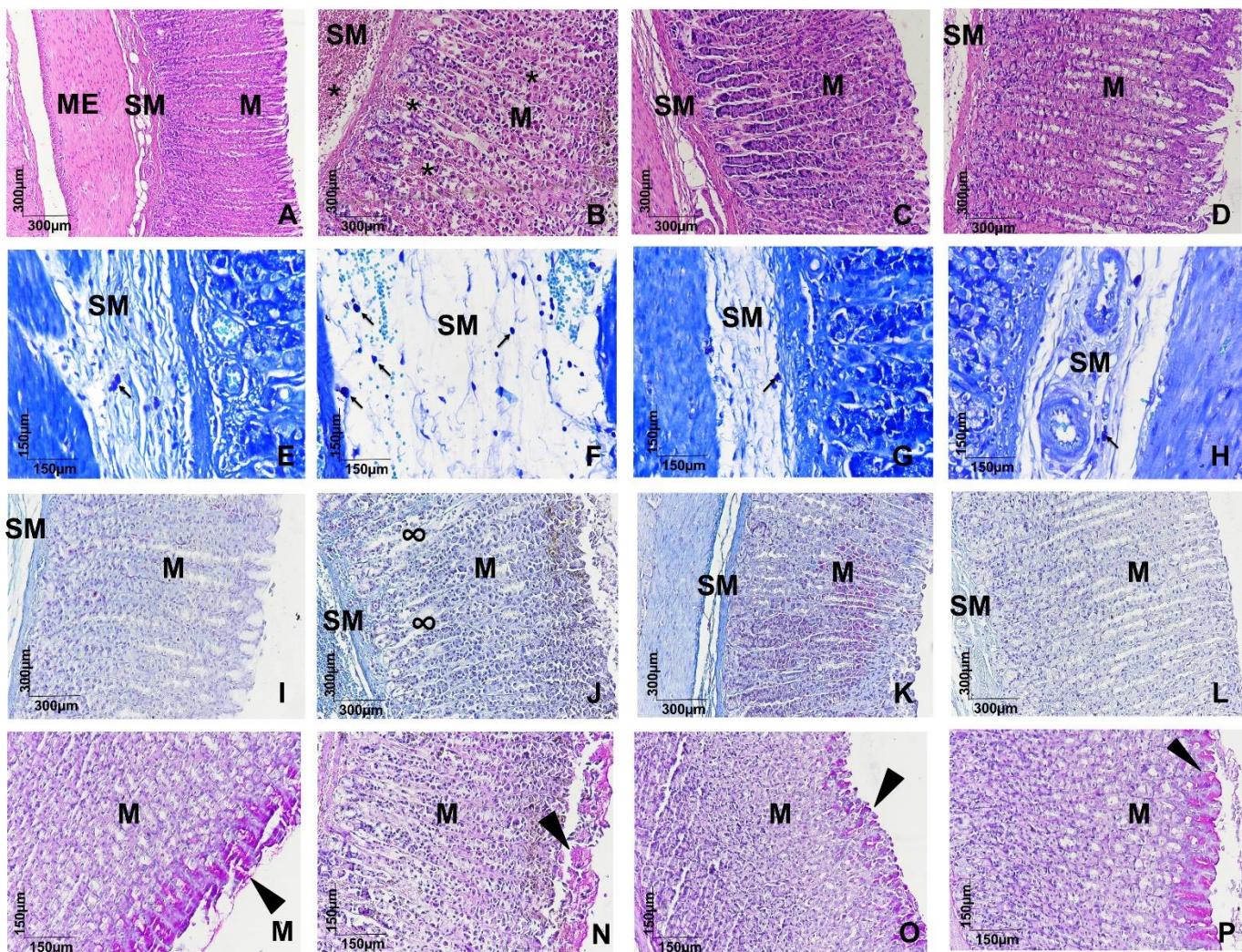
Os fragmentos de estômagos corados em hematoxilina e eosina (HE) pertencentes aos grupos normal, controle positivo (carbenoxolona) e (-)-carveol (Figura 25 A, C e D), apresentaram mucosa (M) íntegra, caracterizada pela presença de células parietais e principais sem alterações citoestruturais compatíveis com tecido saudável, o que se estendeu também para a submucosa (SM) e muscular externa (ME). Diferente do grupo controle negativo (tween 80 5%) (Figura 25 B), o qual apresenta mucosa com células parietais mortas em aspecto "solto" dos demais componentes glandulares as quais estão envoltas por hemorragia (*), lesão essa que se estende até a submucosa.

Quando avaliado a presença de mastócitos, observa-se que nos grupos normal, controle positivo e (-)-carveol (Figura 25 E, G, H) essas células encontram-se distribuídas discretamente em regiões próximas a vasos sanguíneos (setas negras), diferente do que ocorre nos animais do controle negativo (Figura 25 F), onde essas células são numerosas e distribuídas ao longo de toda submucosa que encontra-se edemaciada.

Ao analisar a matriz extracelular, observou-se que essas proteínas apresentam-se escassas na região da mucosa nos grupos normal, controle positivo e (-)-carveol (Figura 25 I, K e L), diferente do que ocorre no grupo controle negativo (Figura 25 J), que apresenta um aumento moderado dessas proteínas (∞) quando comparado aos demais grupos.

Por fim, a presença das mucinas de caráter básico também foram analisadas e sua marcação ocorre por meio da detecção da cor bonina na superfície das glândulas gástricas (cabeça de seta), onde foi observado que nos grupos normal, controle positivo e (-)-carveol (Figura 25 M, O, P) essas proteínas encontram-se distribuídas regularmente na superfície das glândulas gástricas conferindo, em alguns casos, o aspecto de ácino nessas regiões. Já no grupo controle negativo (Figura 25 N) observou-se uma distribuição irregular e mais discreta dessas proteínas.

Figura 25 – Efeitos microscópicos da mucosa gástrica de ratos submetidos à lesões gástricas induzidas por etanol e pré-tratados ou não com (-)-carveol



Fotomicrografias representativas do estômago dos animais dos grupos experimentais: Normal (A, E, I, M), controle negativo (B, F, J, N), controle positivo (C, G, K, O) e (-)-carveol 100 mg/kg (D, H, L, P). Coloração HE (A, B, C, D), azul de toluidina (E, F, G, H), tricômio de Masson (I, J, K, L) e PAS (M, N, O, P). Camada mucosa (M), camada submucosa (SM), muscular externa (ME), hemorragia (*), mastócitos (setas pretas), matriz extracelular (∞) e mucinas (cabeça de seta).

5.2.2.1 Efeito do (-)-carveol sobre o número de mastócitos, matriz extracelular e mucinas na mucosa gástrica de ratos submetidos às lesões gástricas induzida por etanol

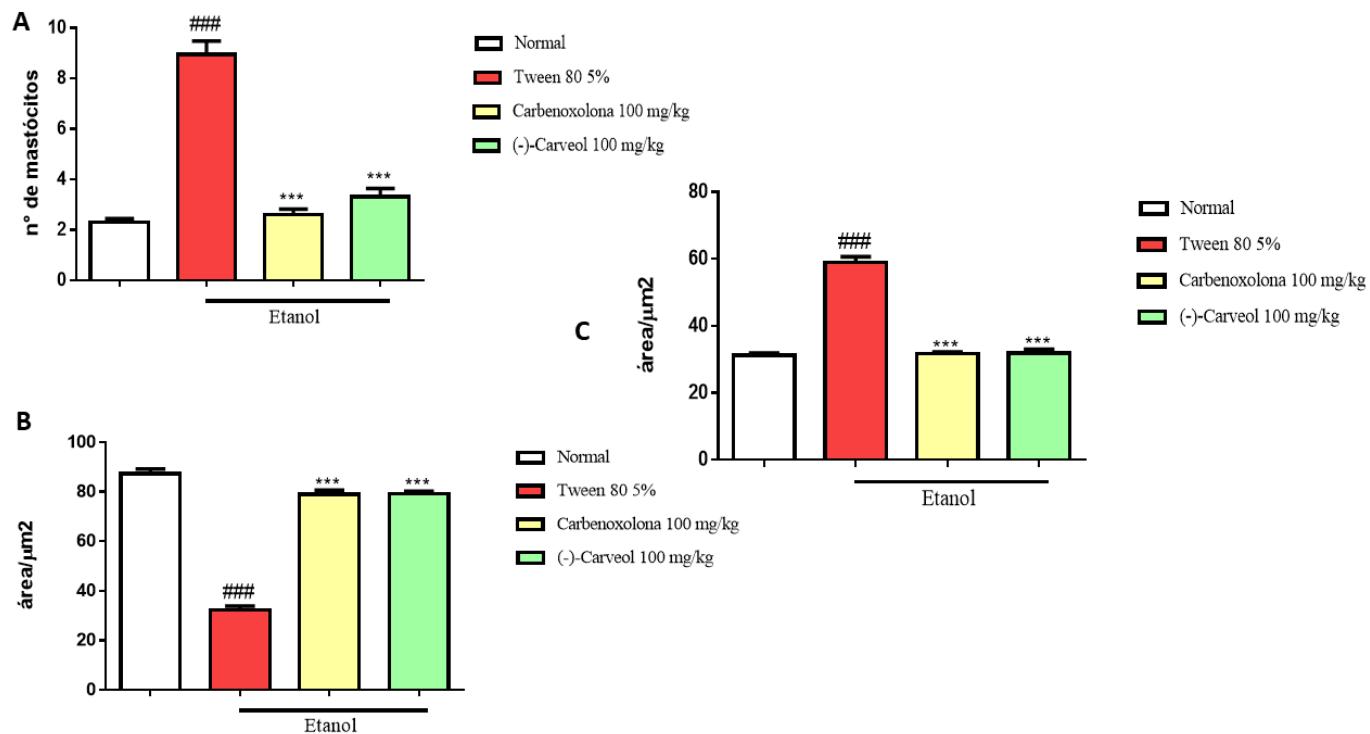
O grupo controle negativo (tween 80 5%) apresentou um aumento significativo no número de mastócitos na mucosa gástrica para $8,9 \pm 3,4$ em relação ao grupo normal ($2,3 \pm 0,6$). Em contrapartida, a carbenoxolona (100 mg/kg) e o (-)-carveol (100 mg/kg) exibiram uma redução no número de mastócitos para $2,6 \pm 0,9$ e $3,3 \pm 1,0$, respectivamente, em comparação ao controle negativo (Gráfico 2 A).

Em relação as proteínas de matriz extracelular, foi observado que no grupo controle

negativo (Tween 80 5%) houve um aumento significativo dessas proteínas para $58,9 \pm 7,4 \mu\text{m}^2$ quando comparado ao grupo normal ($31,2 \pm 3,2 \mu\text{m}^2$). No entanto, a quantidade dessas proteínas foi reduzida de forma significativa com a administração prévia da carbenoxolona (100 mg/kg) ($31,7 \pm 2,3 \mu\text{m}^2$) e do (-)-carveol (100 mg/kg) ($31,7 \pm 5,5 \mu\text{m}^2$) em comparação ao controle negativo (Gráfico 2 B).

Na avaliação das mucinas de caráter básico na mucosa gástrica, observou-se uma redução significativa no grupo controle negativo (Tween 80 5%) para $32,4 \pm 6,4 \mu\text{m}^2$ em relação ao grupo normal ($87,2 \pm 8,9 \mu\text{m}^2$). Entretanto, a carbenoxolona (100 mg/kg) e o (-)-carveol (100 mg/kg) aumentaram significativamente as mucinas na região da mucosa gástrica para $79,1 \pm 7,0 \mu\text{m}^2$ e $79,2 \pm 4,6 \mu\text{m}^2$, respectivamente, quando comparado ao controle negativo (Gráfico 2 C).

Gráfico 2 – Efeito da administração oral da carbenoxolona e (-)-carveol sobre o número de mastócitos (A), matriz extracelular (B) e mucinas (C) na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol



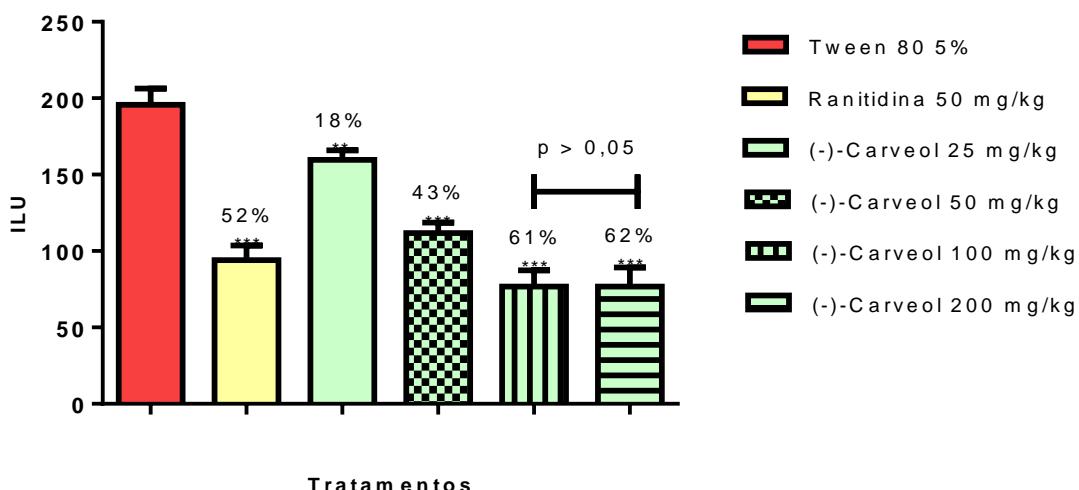
Os valores representam a média \pm D.P. Para análise estatística, foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey, onde ***p<0,001 vs. controle negativo; ###p<0,001 vs. normal.

5.2.3 Úlceras gástricas induzidas pelo estresse (imobilização e frio)

No modelo experimental de úlcera gástrica induzida por estresse, a ranitidina (50 mg/kg) e o (-)-carveol (25, 50, 100 e 200 mg/kg) administrados oralmente reduziram significativamente

($p<0,001$) o ILU em 52% ($94,0 \pm 9,5$), 18% ($159,7 \pm 6,1$), 43% ($117,7 \pm 7,0$), 61% ($76,7 \pm 10,7$) e 62% ($76,0 \pm 12,4$), respectivamente, quando comparado ao controle negativo (tween 80 5%) ($195,7 \pm 10,6$). Esses resultados são melhor expressos no Gráfico 3.

Gráfico 3 - Efeito da administração oral da ranitidina e (-)-carveol em úlceras gástricas induzidas pelo estresse (imobilização e frio) em camundongos

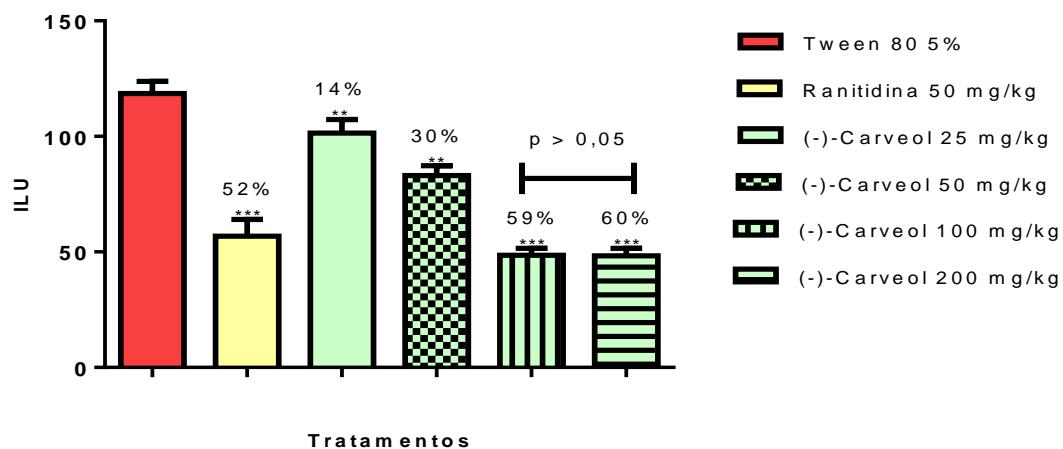


Os resultados estão expressos como média \pm d.p. ANOVA seguido do teste de Dunnett e Tukey. ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$, comparado com o grupo controle (Tween 80 5%) ($n=6-7$). As barras acima das doses de 100 e 200 mg/kg indicam a existência ou não de diferenças estatísticas no teste de Tukey. ILU= Índice de Lesão Ulcerativa.

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

A ranitidina (50 mg/kg) e o (-)-carveol (25, 50, 100 e 200 mg/kg) apresentaram redução significativa ($p<0,001$) do ILU em 52% ($56,8 \pm 7,3$), 14% ($101,4 \pm 5,9$), 30% ($83,0 \pm 4,3$), 59% ($48,6 \pm 2,9$) e 60% ($47,2 \pm 3,2$), respectivamente, em comparação ao grupo controle negativo (tween 80 5%) ($118,6 \pm 5,2$). Esses resultados são melhor visualizados no Gráfico 4.

Gráfico 4 - Efeito da administração oral da ranitidina e (-)-carveol em úlceras gástricas induzidas por anti-inflamatório não esteroidal (Piroxicam) em camundongos



Os resultados estão expressos como média \pm d.p. ANOVA seguido do teste de Dunnett e Tukey. **p<0,01 e ***p<0,001, comparado com o grupo controle (Tween 80 5%) (n= 6-7). As barras acima das doses de 100 e 200 mg/kg indicam a existência ou não de diferenças estatísticas no teste de Tukey. ILU= Índice de Lesão Ulcerativa.

5.2.5 Úlceras gástricas induzidas por contensão do suco gástrico (ligadura do piloro)

De acordo com os dados obtidos nesse modelo foi possível verificar que a ranitidina (50 mg/kg) e o (-)-carveol (100 mg/kg) administrados oralmente reduziram o ILU em 55% e 60%, respectivamente, em comparação ao grupo controle negativo (Tween 80 5%). Quando administrados intraduodenalmente, a ranitidina e o (-)-carveol reduziram o ILU em 47% e 61%, respectivamente, em comparação ao grupo tween 80 5%. Esses resultados estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2 - Efeito da administração oral e intraduodenal da ranitidina e (-)-carveol em úlceras gástricas induzidas por ligadura do piloro em ratos

Tratamento	Via de administração	Dose (mg/kg)	ILU	Inibição (%)
Tween 80 5%	Oral	-	$366,6 \pm 20,0$	-
Ranitidina	Oral	50	$162,7 \pm 24,1^{***}$	55
(-)-Carveol	Oral	100	$143,8 \pm 14,8^{***}$	60
Tween 80 5%	Intraduodenal	-	$340,2 \pm 16,9$	-
Ranitidina	Intraduodenal	50	$179,1 \pm 25,3^{###}$	47
(-)-Carveol	Intraduodenal	100	$132,4 \pm 15,6^{###}$	61

Os resultados estão expressos como média \pm d.p. ANOVA 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= 8-10). ILU= Índice de Lesão Ulcerativa.

5.3 Elucidação dos mecanismos de ação envolvidos no efeito gastroprotetor do (-)-Carveol

5.3.1 Mecanismo antissecratório ou neutralizante

5.3.1.1 Avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico após ligadura do piloro

A partir do modelo de ligadura do piloro foram determinados os parâmetros bioquímicos do conteúdo estomacal de ratos: pH, $[H^+]$ e volume do suco gástrico após administração de tween 80 5%, ranitidina (50 mg/kg) e (-)-carveol (100 mg/kg) pelas vias oral e intraduodenal.

Com os resultados obtidos nesse protocolo em ambas as vias de administração (v.o. e i.d.), foi possível observar que o (-)-carveol não alterou o pH ou a $[H^+]$ quando comparado ao grupo controle negativo (Tween 80 5%), entretanto, diminuiu o volume do suco gástrico. Os animais pré-tratados com o padrão ranitidina (50 mg/kg) independente da via, apresentaram aumento de pH, diminuição da $[H^+]$ e do volume gástrico quando comparado com os respectivos controles. Os resultados estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3 - Efeito da administração oral e intraduodenal da ranitidina e (-)-carveol nos parâmetros do conteúdo gástrico após ligadura do piloro em ratos

Tratamento	Via de administração	Dose (mg/kg)	pH	$[H^+]$ (mEq/mL/4)	Volume (mL)
Tween 80 5%	Oral	-	$3,44 \pm 0,29$	$8,42 \pm 0,94$	$1,53 \pm 0,10$
Ranitidina	Oral	50	$7,09 \pm 0,43^{***}$	$2,23 \pm 0,93^{***}$	$1,10 \pm 0,07^{***}$
(-)-Carveol	Oral	100	$3,21 \pm 0,36$	$7,28 \pm 0,89$	$1,17 \pm 0,04^{**}$
Tween 80 5%	Intraduodenal	-	$2,83 \pm 0,28$	$7,62 \pm 0,86$	$1,33 \pm 0,04$
Ranitidina	Intraduodenal	50	$5,30 \pm 0,38^{###}$	$3,59 \pm 0,53^{###}$	$0,74 \pm 0,05^{###}$
(-)-Carveol	Intraduodenal	100	$3,07 \pm 0,22$	$7,70 \pm 0,63$	$1,00 \pm 0,02^{###}$

Os resultados estão expressos como média \pm d.p. ANOVA seguido do teste de Dunnett: **p<0,01 e ***p<0,001 comparado com o grupo Tween 80 5% via oral e ### p<0,001 comparado com o grupo Tween 80 5% via intraduodenal (n=8-10).

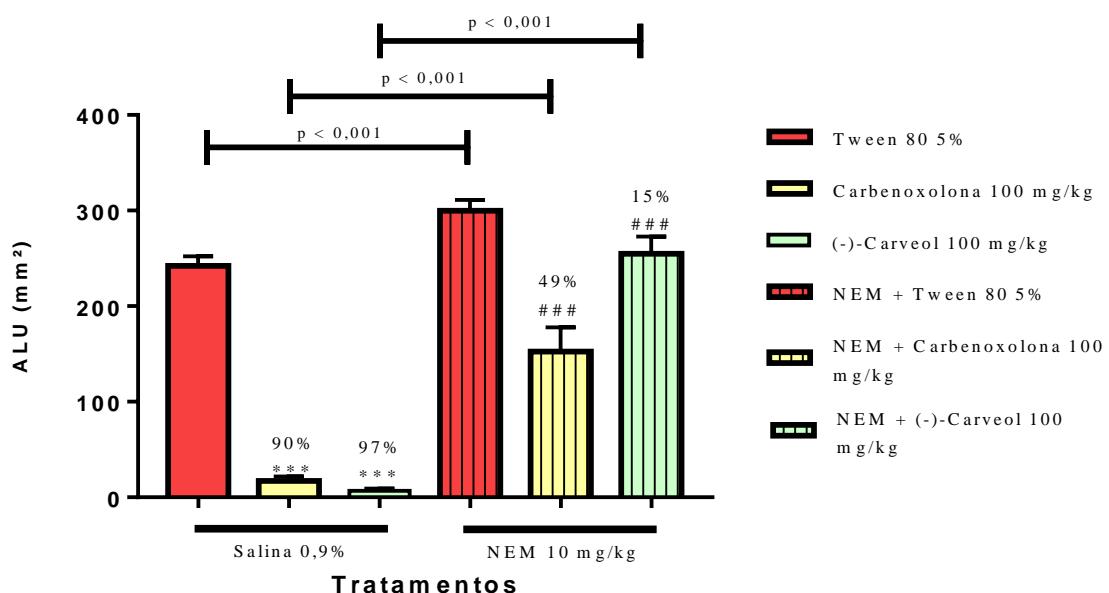
5.3.2 Mecanismos citoprotetores

5.3.2.1 Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrilas (SH) na atividade gastroprotetora do (-)-Carveol

Os grupos previamente tratados com o padrão carbenoxolona (100 mg/kg) e o (-)-carveol (100 mg/kg) apresentaram uma redução significativa (p<0,001) da ALU em 90% ($17,2 \pm 4,6 \text{ mm}^2$)

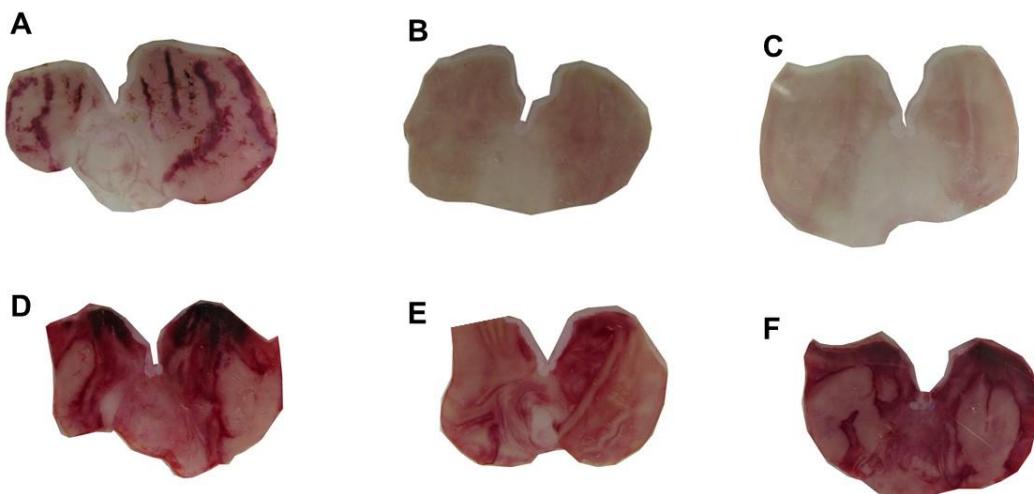
e 97% ($6,8 \pm 2,3 \text{ mm}^2$), respectivamente, quando comparado ao grupo controle negativo (Tween 80 5%) ($242,3 \pm 9,7 \text{ mm}^2$). Entretanto, quando administrado o NEM (10 mg/kg), um inibidor dos grupamentos sulfidrilas, houve uma exacerbação da ALU ($299,7 \pm 11,5 \text{ mm}^2$) com redução do efeito gastroprotetor da carbenoxolona (100 mg/kg) e do (-)-carveol (100 mg/kg) para 49% (152,5 $\pm 25,1 \text{ mm}^2$) e 15% (254,7 $\pm 18,2 \text{ mm}^2$), respectivamente, em comparação aos grupos em que não foram administrados o bloqueador. Os resultados estão expressos no Gráfico 5 e ilustrados na Figura 26.

Gráfico 5 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e (-)-carveol 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. ANOVA seguido do teste de Dunnett. ***p<0,001, comparado com o grupo controle (Tween 80 5%) (n= 6-7). 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.

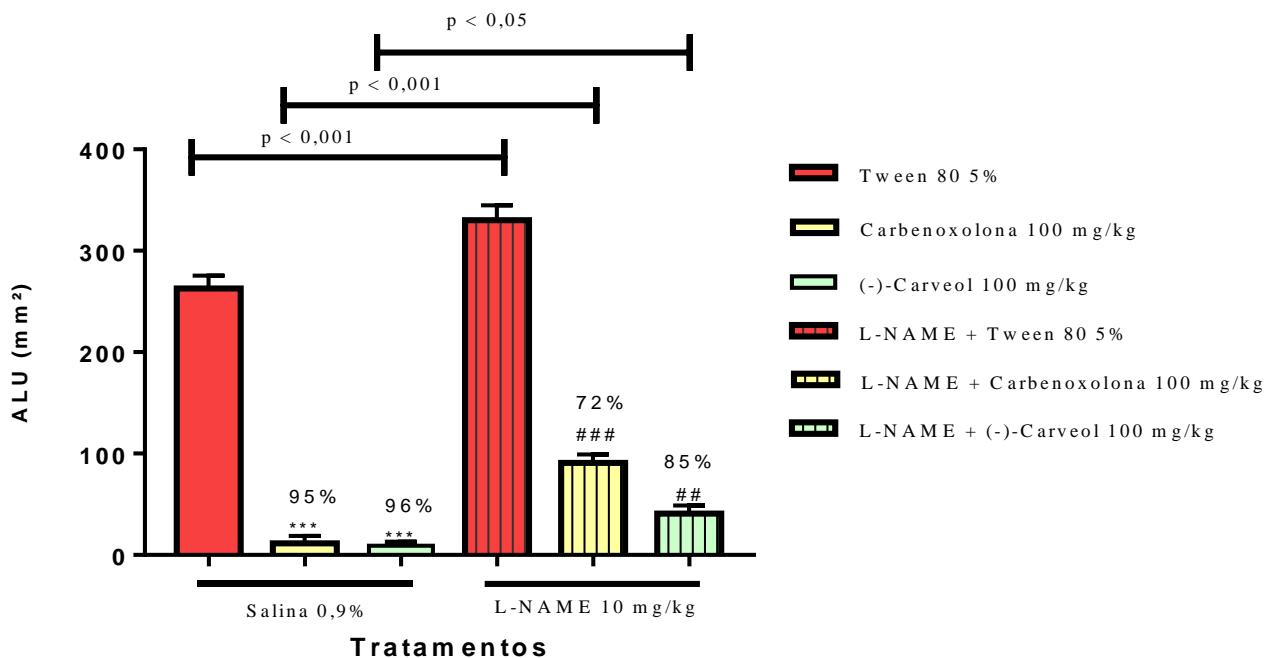
Figura 26 - Estômagos de ratos pré-tratados com solução salina 0,9% e tratados com Tween 80 5% (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B) e (-)-carveol 100 mg/kg (C) ou pré-tratados com NEM e tratados com Tween 80 5% (D), carbenoxolona 100 mg/kg (E) e (-)-carveol 100 mg/kg (F) no modelo de úlceras induzidas por etanol para avaliação da participação dos grupamentos sulfidrilas



5.3.2.2 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) na atividade gastroprotetora do (-)-Carveol

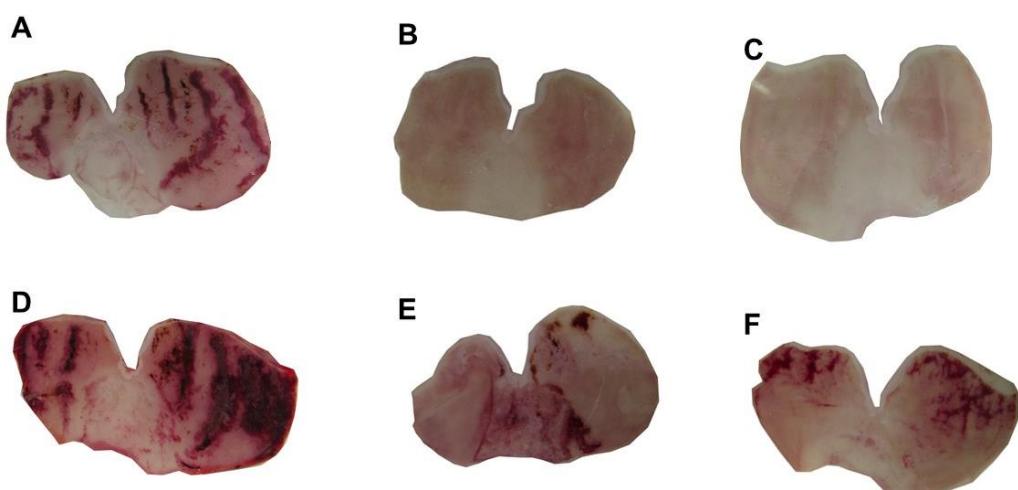
A carbenoxolona (100 mg/kg) e o (-)-carveol (100 mg/kg) apresentaram uma redução significativa ($p<0,001$) da ALU em 95% ($11,4 \pm 7,5 \text{ mm}^2$) e 96% ($9,1 \pm 3,0 \text{ mm}^2$), respectivamente, quando comparado ao grupo controle negativo (Tween 80 5%) ($263,0 \pm 12,5 \text{ mm}^2$). No entanto, a administração prévia do L-NAME, um bloqueador da síntese do NO, reduziu a gastroproteção exercida pela carbenoxolona e pelo (-)-carveol para 72% ($90,8 \pm 8,3 \text{ mm}^2$) e 85% ($40,9 \pm 7,7 \text{ mm}^2$), respectivamente, quando comparado aos grupos que não receberam o bloqueador. Os resultados estão expressos no Gráfico 6 e ilustrados na Figura 27.

Gráfico 6 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e (-)-carveol 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. ANOVA seguido do teste de Dunnett. *** $p<0,001$, comparado com o grupo controle (Tween 80 5%) ($n=6-7$). 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.

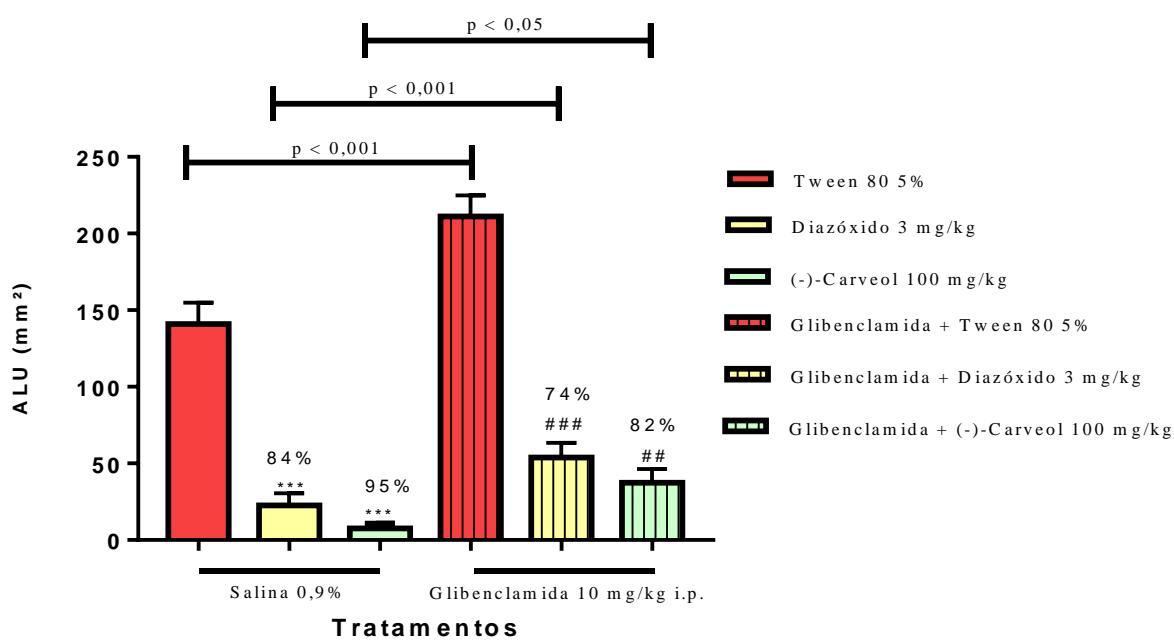
Figura 27 - Estômagos de ratos pré-tratados com solução salina 0,9% e tratados com Tween 80 5% (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B) e (-)-carveol 100 mg/kg (C) ou pré-tratados com L-NAME e tratados com Tween 80 5% (D), carbenoxolona 100 mg/kg (E) e (-)-carveol 100 mg/kg (F) no modelo de úlceras induzidas 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 (-)-Carveol

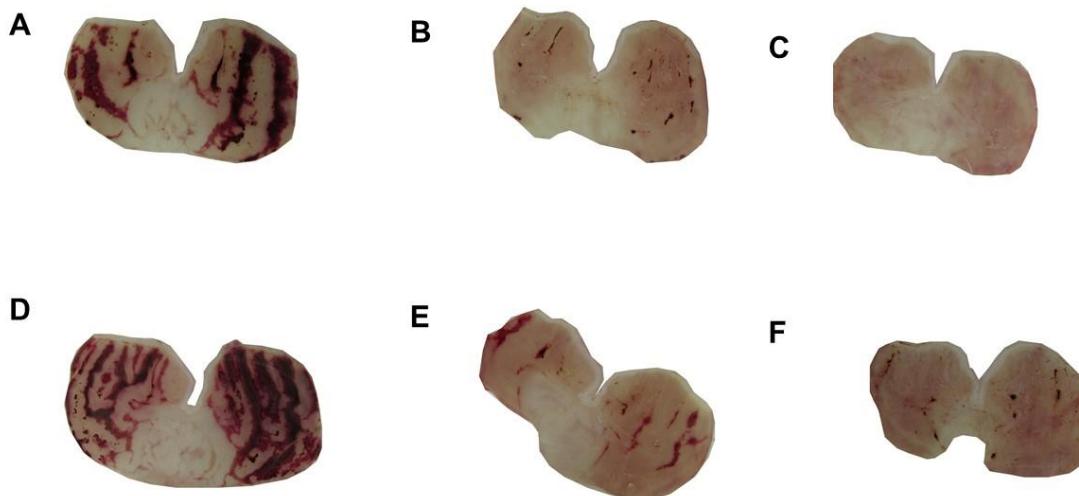
O (-)-carveol (100 mg/kg) e o diazóxido (3 mg/kg), um agonista dos canais K_{ATP}, reduziram significativamente ($p<0,001$) a área de lesão ulcerativa induzida pelo etanol em 95% ($7,5 \pm 2,6 \text{ mm}^2$) e 84% ($22,6 \pm 7,9 \text{ mm}^2$), respectivamente, quando comparado ao grupo controle negativo (Tween 80 5%) ($140,9 \pm 14,0 \text{ mm}^2$). A glibenclamida, um antagonista dos canais K_{ATP}, reduziu o efeito gastroprotetor do (-)-carveol e do diazóxido para 82% ($37,3 \pm 8,9 \text{ mm}^2$) e 74% ($53,9 \pm 9,6 \text{ mm}^2$), respectivamente, ambos comparados aos grupos não bloqueados. Os resultados estão expressos no Gráfico 7 e ilustrados na Figura 28.

Gráfico 7 - Efeito da administração oral do diazóxido e (-)-carveol 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. ANOVA seguido do teste de Dunnett. *** $p<0,001$, comparado com o grupo controle (Tween 80 5%) ($n= 6-7$). 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.

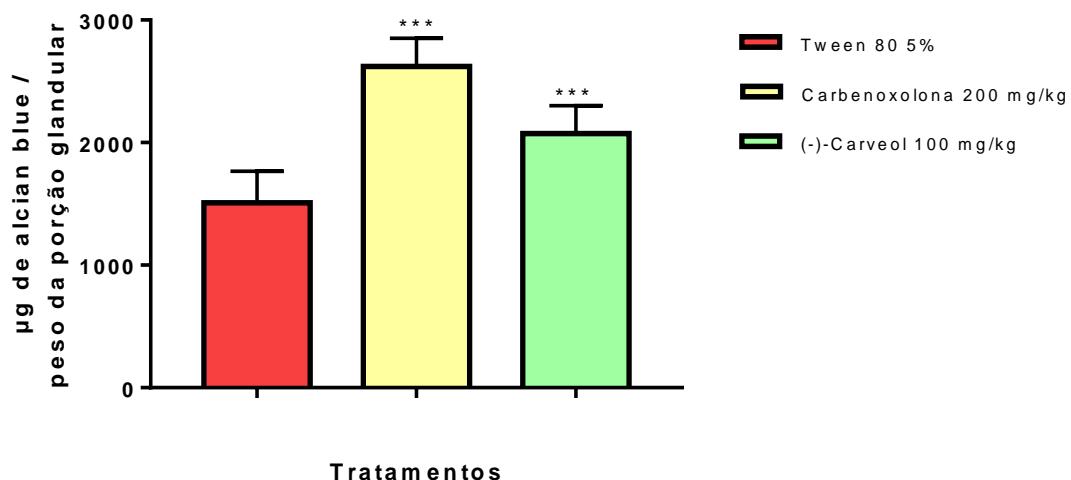
Figura 28 - Estômagos de ratos pré-tratados com solução salina 0,9% e tratados com Tween 80 5% (A), diazóxido 3 mg/kg (B) e (-)-carveol 100 mg/kg (C) ou pré-tratados com glibenclamida e tratados com Tween 80 5%, diazóxido 3 mg/kg (E) e (-)-carveol 100 mg/kg (F) no modelo de úlceras induzidas por etanol para avaliação da participação dos canais de potássio sensíveis a ATP



5.3.2.4 Quantificação do muco aderido à mucosa gástrica após ligadura do piloro

O muco aderido à mucosa gástrica foi quantificado indiretamente pela quantidade do *alcian blue* na porção glandular estomacal. Nesse modelo, a carbenoxolona (200 mg/kg) e o (-)-carveol (100 mg/kg) aumentaram o muco aderido à parede estomacal em 2621 ± 230 e 2074 ± 227 μg de *alcian blue/peso* da porção glandular (g), respectivamente, quando comparado ao grupo controle negativo - tween 80 5% (1510 ± 256 μg de *alcian blue/peso* da porção glandular). Os resultados obtidos nesse modelo estão expressos no Gráfico 8.

Gráfico 8 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e (-)-carveol na concentração de muco aderido à mucosa gástrica após ligadura do piloro

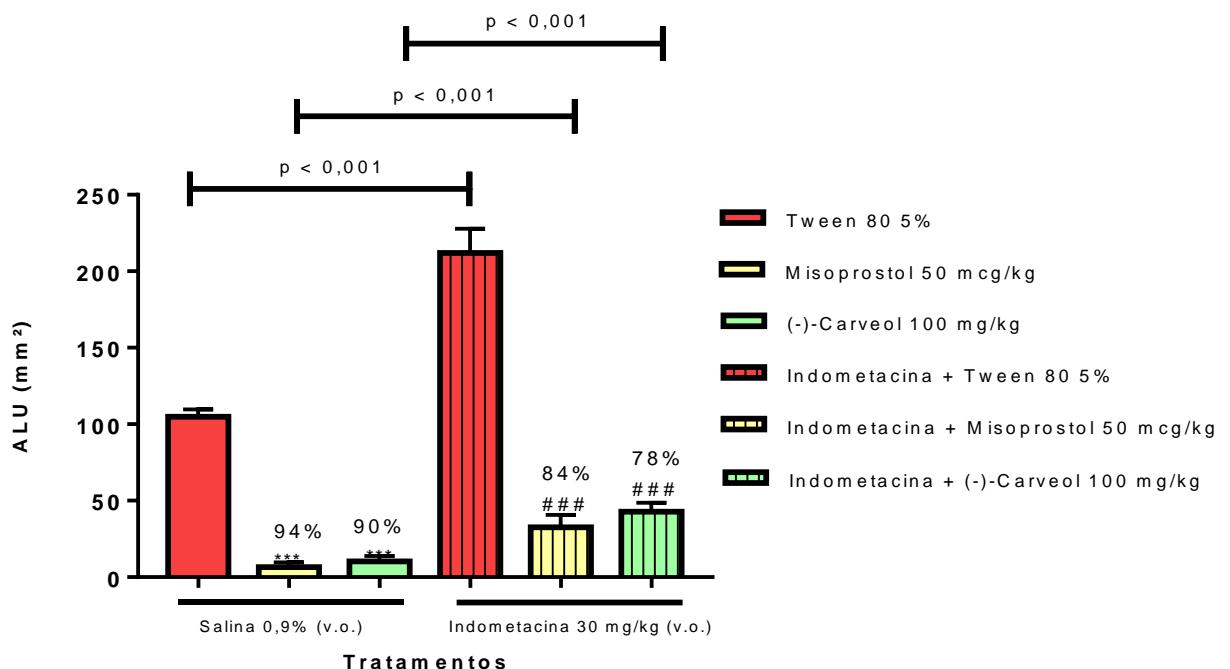


Os resultados estão expressos como média \pm d.p. ANOVA seguido do teste de Dunnett. *** $p<0,001$ comparado com o grupo controle negativo (tween 80 5%) ($n=8-10$).

5.3.2.5 Avaliação da participação das prostaglandinas no efeito gastroprotetor do (-)-Carveol

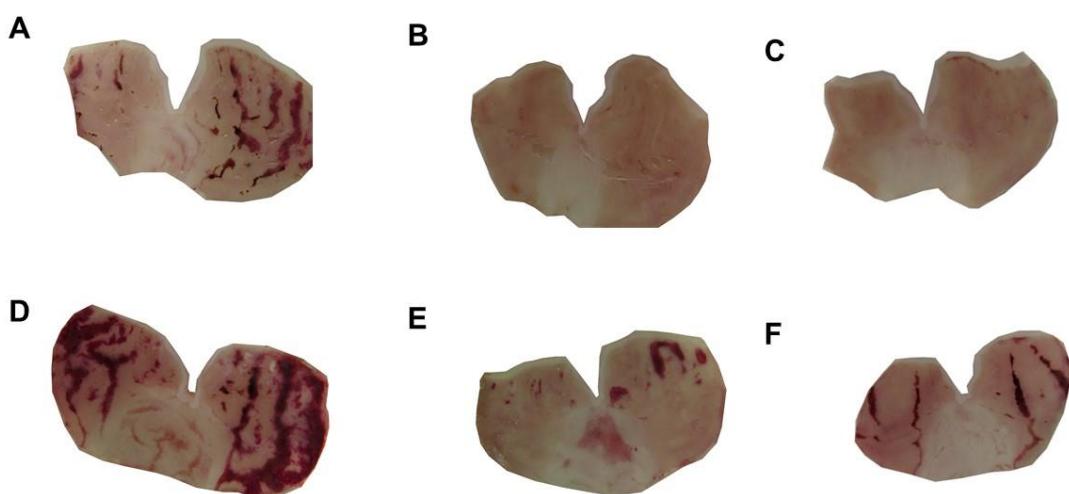
O misoprostol (50 µg/kg) e o (-)-carveol (100 mg/kg) reduziram a ALU em 94% ($6,5 \pm 3,2$ mm 2) e 90% ($10,3 \pm 3,5$ mm 2), respectivamente, quando comparado ao grupo controle negativo - tween 80 5% ($105,1 \pm 4,7$ mm 2). Porém, quando os animais foram submetidos ao tratamento com a indometacina (30 mg/kg), um bloqueador não-seletivo da ciclo-oxigenase (COX), houve uma exacerbação da ALU ($211,9 \pm 15,9$ mm 2) com redução da gastroproteção do misoprostol e do (-)-carveol para 84% ($32,6 \pm 8,0$ mm 2) e 78% ($42,7 \pm 5,9$ mm 2), respectivamente, quando comparado aos grupos não bloqueados. Os resultados estão expressos no Gráfico 9 e ilustrados na Figura 29.

Gráfico 9 - Efeito da administração oral de misoprostol e (-)-carveol após pré-tratamento com salina e indometacina em úlcera gástrica induzida por etanol em ratos



Os resultados estão expressos como média \pm d.p. ANOVA seguido do teste de Dunnett. *** $p<0,001$, comparado com o grupo controle (Tween 80 5%) ($n= 6-7$). 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 29 - Estômagos de ratos pré-tratados com solução salina 0,9% e tratados com Tween 80 5% (A), misoprostol 50 μ g/kg (B) e (-)-carveol 100 mg/kg (C) ou pré-tratados com indometacina e tratados com Tween 80 5% (D), misoprostol 50 μ g/kg (E) e (-)-carveol 100 mg/kg (F) no modelo de úlceras induzidas por etanol para avaliação da participação das prostaglandinas

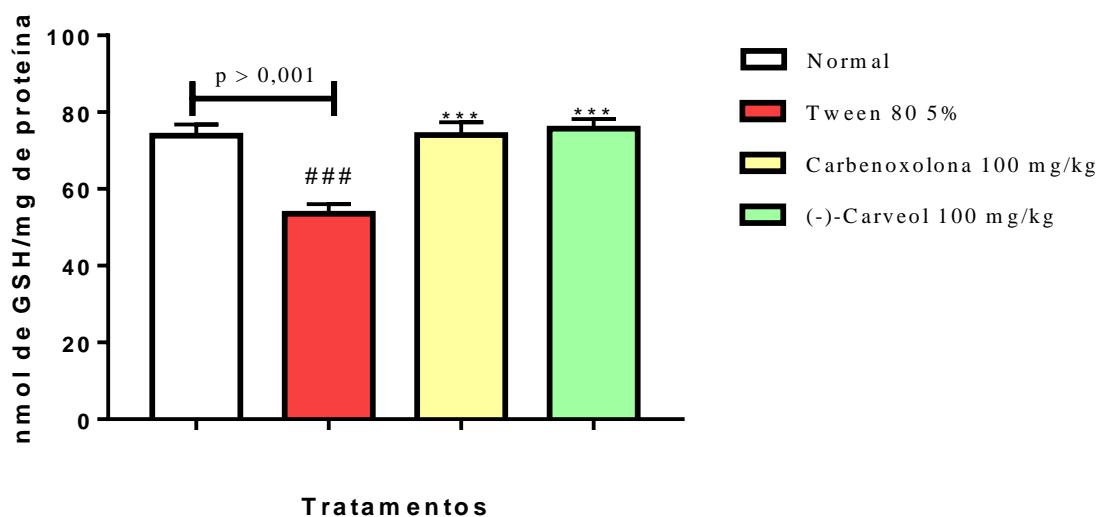


5.3.3 Atividade antioxidante

5.3.3.1 Determinação dos níveis de glutationa reduzida (GSH)

Na determinação da atividade antioxidante do (-)-carveol foi possível verificar que o grupo de animais pré-tratados apenas com o veículo (Tween 80 5%) apresentaram uma redução dos níveis de GSH para $53,5 \pm 2,5$ nmol de GSH/mg de proteínas em comparação ao grupo normal ($73,8 \pm 2,9$ nmol de GSH/mg de proteínas). Entretanto, a administração prévia da carbenoxolona (100 mg/kg) ($74,0 \pm 3,3$ nmol de GSH/mg de proteínas) e do (-)-carveol (100 mg/kg) ($75,6 \pm 2,5$ nmol de GSH/mg de proteínas) manteram os níveis basais de GSH (Gráfico 10).

Gráfico 10 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e (-)-carveol nos níveis de GSH a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos

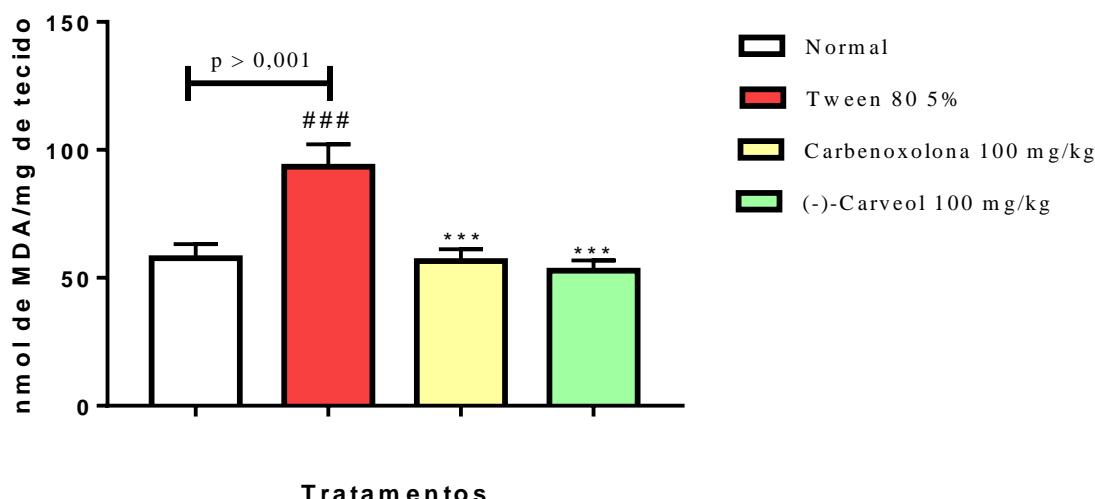


Os resultados estão expressos como média \pm d.p. ANOVA seguido do teste de Dunnett e Tukey. *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle negativo (Tween 80 5%) e ### $p < 0,001$ comparado ao grupo normal ($n=6$).

5.3.3.2 Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA)

O grupo tween 80 5% apresentou um aumento dos níveis de MDA para $93,4 \pm 8,7$ nmol de MDA/g de tecido em comparação ao grupo normal ($57,6 \pm 5,4$ nmol de MDA/g de tecido). Entretanto, a administração da carbenoxolona (100 mg/kg) ($56,5 \pm 4,6$ nmol de MDA/g de tecido) e do (-)-carveol (100 mg/kg) ($52,7 \pm 3,9$ nmol de MDA/g de tecido) manteram os níveis de MDA às condições basais (Gráfico 11).

Gráfico 11 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e (-)-carveol nos níveis de MDA a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos

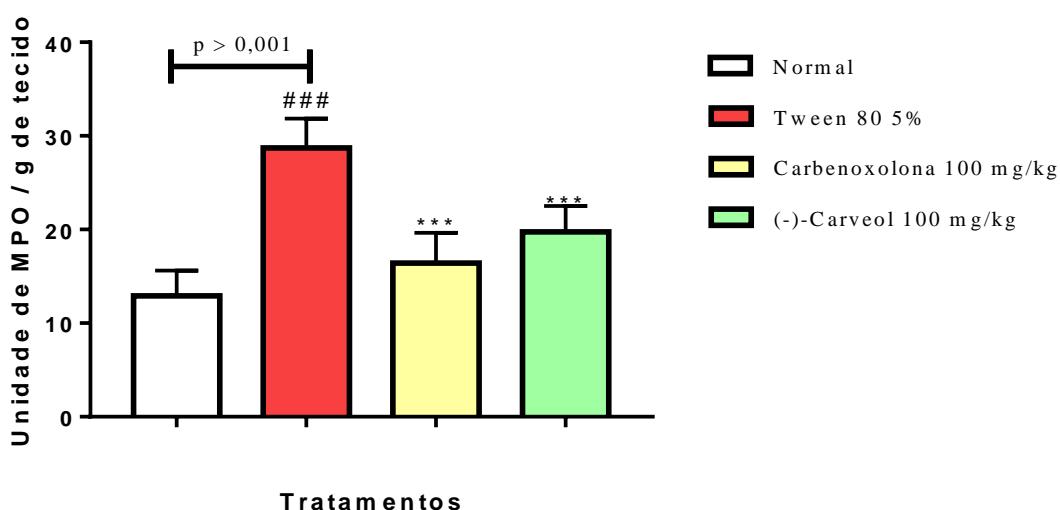


Os resultados estão expressos como média \pm d.p. ANOVA seguido do teste de Dunnett e Tukey. *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle negativo (Tween 80 5%) e ### $p < 0,001$ comparado ao grupo normal ($n=6$).

5.3.3.3 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

Os resultados demonstraram que no grupo controle negativo (tween 80 5%) houve um aumento nos níveis de MPO para $28,7 \pm 3,1$ unidade de MPO/g de tecido quando comparado ao grupo normal ($12,9 \pm 2,7$ unidade de MPO/g de tecido). No entanto, os grupos tratados com a carbenoxolona (100 mg/kg) e o (-)-carveol (100 mg/kg) reduziram significativamente os níveis de MPO para $16,4 \pm 3,2$ e $19,7 \pm 2,7$ unidade de MPO/g de tecido, respectivamente, em relação ao grupo controle negativo (Gráfico 12).

Gráfico 12 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e (-)-carveol nos níveis de MPO a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos

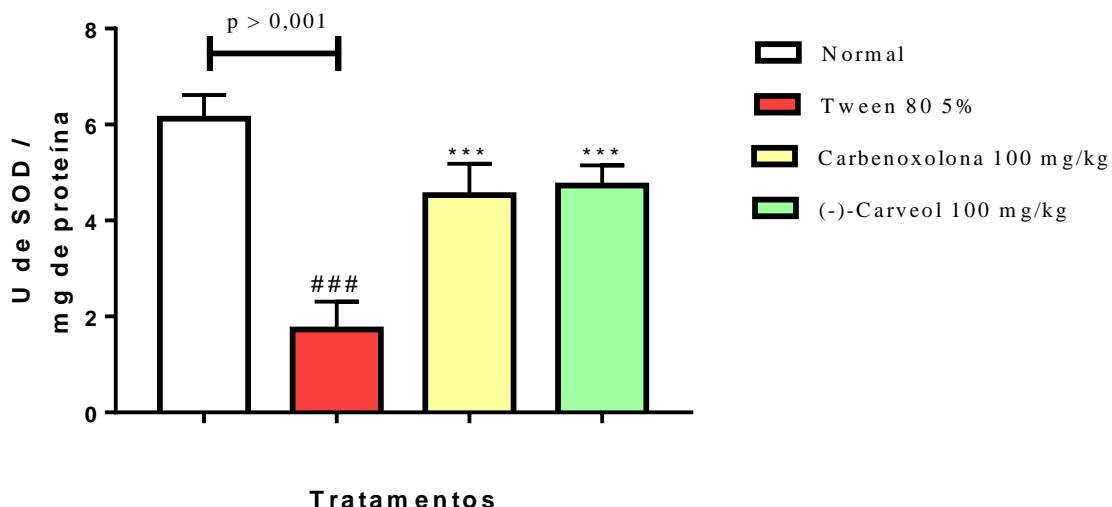


Os resultados estão expressos como média \pm d.p. ANOVA seguido do teste de Dunnett e Tukey. *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle negativo (Tween 80 5%) e ### $p < 0,001$ comparado ao grupo normal ($n=6$).

5.3.3.4 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

Os animais do grupo controle negativo (tween 80 5%) demonstraram uma redução significativa na atividade da enzima SOD para $1,72 \pm 0,55$ U de SOD/mg de proteína em comparação ao grupo normal ($6,12 \pm 0,49$ U de SOD/mg de proteína). Entretanto, a atividade da SOD foi aumentada significativamente ($p < 0,001$) com a administração prévia da carbenoxolona (100 mg/kg) e do (-)-carveol (100 mg/kg) para $4,52 \pm 0,65$ e $4,72 \pm 0,41$ U de SOD/mg de proteína, respectivamente, quando comparado ao controle (tween 80 5%) (Gráfico 13).

Gráfico 13 - Efeito da carbenoxolona e do (-)-carveol sobre a atividade da enzima superóxido dismutase a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos



Os resultados estão expressos como média \pm d.p. ANOVA seguido do teste de Dunnett e Tukey. *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle negativo (Tween 80 5%) e ### $p < 0,001$ comparado ao grupo normal ($n=6$).

5.3.4 Investigação da atividade imunorregulatória

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

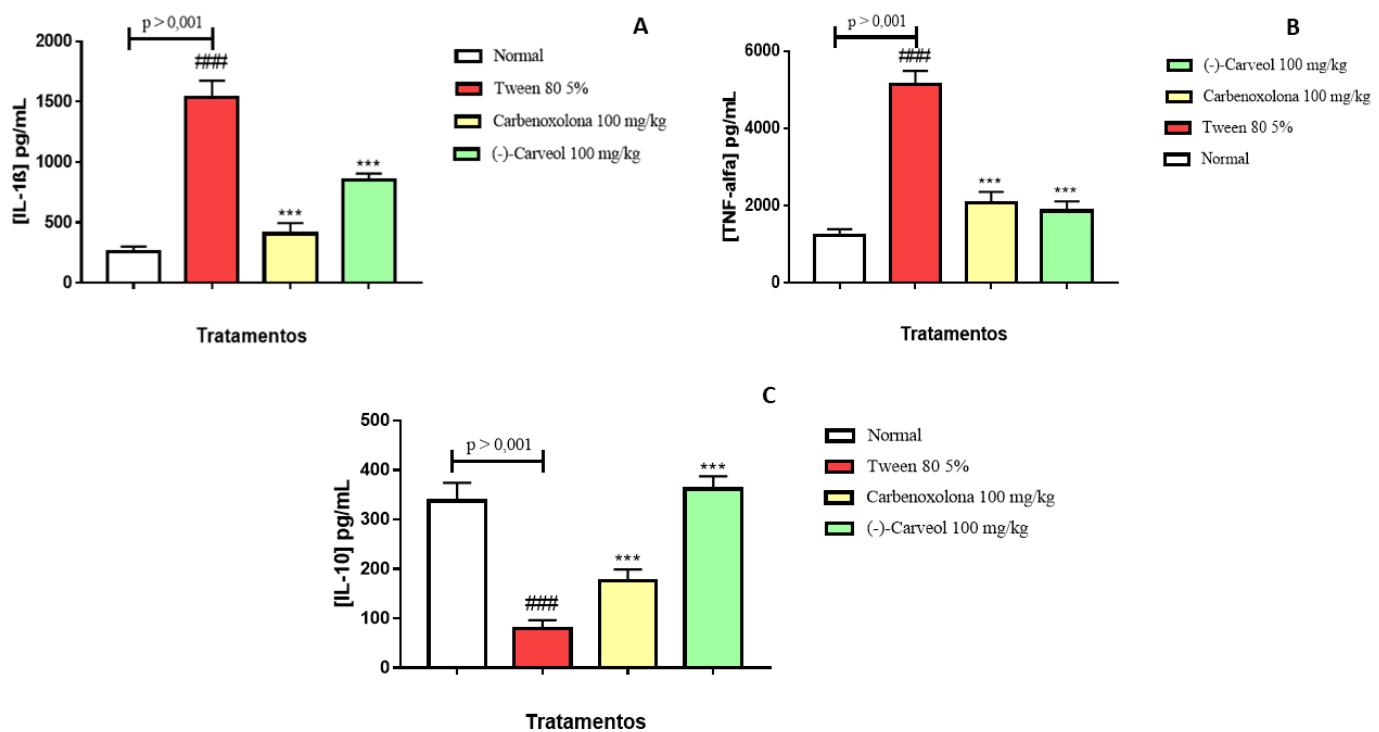
No grupo controle negativo (tween 80 5%) houve aumento nos níveis da interleucina pró-inflamatória IL-1 β para $1538,1 \pm 136,7$ pg/mL em comparação ao grupo normal ($257,8 \pm 42,2$ pg/mL). A administração prévia da carbenoxolona (100 mg/kg) e do (-)-carveol (100 mg/kg) reduziu ($p < 0,001$) os níveis da IL-1 β para $407,8 \pm 88,5$ e $853,0 \pm 52,9$ pg/mL, respectivamente, quando comparado ao grupo tween 80 5% (Gráfico 14 A).

Resultado semelhante foi encontrado para o TNF- α , no qual, o grupo controle negativo (tween 80 5%) apresentou aumento significativo ($5142,1 \pm 347,3$ pg/mL) dos níveis de TNF- α quando comparado ao grupo normal ($1230,2 \pm 164,7$ pg/mL). Os tratamentos com a carbenoxolona e o (-)-carveol reduziram ($p < 0,001$) os níveis de TNF- α para $2074,1 \pm 283,0$ e $1860,1 \pm 253,0$ pg/mL respectivamente, quando comparado ao grupo tratado apenas com o tween 80 5% (Gráfico 14 B).

14 B).

Em relação aos níveis de IL-10, foi observada uma redução significativa no grupo controle negativo (Tween 80 5%) ($79,2 \pm 16,7$ pg/mL) em comparação ao grupo normal ($337,7 \pm 36,4$ pg/mL). O tratamento com a carbenoxolona promoveu aumento significativo ($176,3 \pm 22,6$ pg/mL) nos níveis de IL-10 em comparação com o grupo tratado apenas com Tween 80 5%. Já a administração do (-)-carveol mantém os níveis basais de modulação da IL-10 ($361,9 \pm 25,4$ pg/mL) (Gráfico 14 C).

Grafico 14 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e (-)-carveol nos níveis de IL-1 β (A), TNF- α (B) e IL-10 (C) a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos



Os resultados estão expressos como média \pm d.p. ANOVA seguido do teste de Dunnett e Tukey. ***p < 0,001 comparado ao grupo controle negativo (Tween 80 5%) e ###p < 0,001 comparado ao grupo normal (n= 6).

Discussão

6 DISCUSSÃO

O delineamento experimental de um novo medicamento envolve ensaios não-clínicos *in vitro* e *in vivo* (com células ou animais) e os estudos clínicos (fase I, II, III e IV) realizados em seres humanos. Todas essas etapas de desenvolvimento têm por objetivo estabelecer sua segurança, eficácia e qualidade (KHAN et al., 2018; HULLEY, et al., 2019).

Dentre os ensaios não-clínicos têm-se os testes de toxicidade (agudos, sub-crônicos e crônicos) que tem como objetivo garantir ou certificar o uso clínico de uma nova substância que possui grande potencial farmacológico (VENKATESAN; RAMANATHAN, 2017).

Uma das formas de proceder à avaliação toxicológica não-clínica é por meio da administração de concentrações ou doses conhecidas da substância teste em células ou animais, podendo ser avaliado o efeito em doses agudas, administrações repetidas, efeitos citotóxicos, genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos dependendo do tempo e protocolo de exposição (ANVISA, 2013).

Os ensaios de toxicidade aguda em animais auxiliam na identificação de efeitos indesejados imediatamente ou em um curto intervalo de tempo após administração única ou múltipla da substância no período de 24 horas por uma via específica. O efeito indesejado compreende qualquer efeito que leve a alterações comportamentais, nutricionais (redução na ingestão da água e da ração), nos órgãos e/ou bioquímicas. Os sinais de toxicidade sistêmica também envolvem redução de massa corporal, apatia e má condição da pelagem, como presença de piloereção (SASIDHARAN et al., 2012).

Outro parâmetro de toxicidade também avaliado nos ensaios não-clínicos com animais é a estimativa da dose letal 50% (DL_{50}), que é a quantidade da substância capaz de causar a morte de 50% dos animais em experimentação, durante um período especificado (HAYES, 2014; ADAMSON, 2016).

Neste trabalho foi averiguada com ineditismo a toxicidade oral aguda em camundongos e o efeito gastroprotetor do (-)-carveol em animais e seus mecanismos subjacentes.

Primeiramente, foi realizado o ensaio de toxicidade não-clínica oral aguda e a avaliação de alterações comportamentais para prever possíveis efeitos colaterais e/ou adversos e estabelecer doses seguras a serem utilizadas nos testes farmacológicos *in vivo*.

A avaliação dos sinais de toxicidade foi realizada segundo o “*Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos*”, elaborado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (2013). Esse guia tem como objetivo racionalizar estudos não clínicos, evitando duplicidades e utilização desnecessária de animais. O guia preconiza a execução de métodos alternativos, envolvendo

menos animais para estimar a DL₅₀, sem comprometer a obtenção e a confiabilidade de informações referentes à segurança da substância a ser testada.

Nessa perspectiva, a OECD (*Organisation for Economic Cooperation and Development*) desenvolveu protocolos validados e reproduutíveis que tem respaldo em toda comunidade científica em relação aos ensaios necessários para avaliação da toxicidade aguda das substâncias químicas. O guia da OECD nº 423 (2001) representa um método alternativo para os ensaios de toxicidade aguda convencionais.

O guia nº 423 da OECD, preconiza a realização do ensaio em etapas sequenciais, utilizando três animais por etapa, todos do mesmo sexo e são preestabelecidas cinco diferentes doses (5, 50, 300, 2.000 mg/kg ou 5.000 mg/kg, se necessário). Quando não houver nenhuma informação sobre a toxicidade da substância teste, recomenda-se iniciar os ensaios com 300 mg/kg. Mas se as informações apontam que a mortalidade é improvável utilizando a dose maior inicial, pode-se iniciar com 2.000 mg/kg. Com a administração da primeira dose da substância teste, a presença ou ausência de mortalidade dos animais irá determinar a próxima etapa do ensaio, que pode variar desde não se administrar mais nenhuma dose, repetir a mesma dose ou administrar a próxima dose (maior ou menor) a mais um grupo com três animais. A proporção de mortalidade identificada nas etapas sequenciais é utilizada para estimar uma DL₅₀.

Esse guia trouxe grandes mudanças quanto à condução dos ensaios, visto que os protocolos anteriores à essa padronização utilizavam, geralmente, números grandes de animais (100 animais/grupo) sem um limite de dose máxima. A partir desse guia, a DL₅₀ aproximada para o (-)-carveol é estimada como sendo igual ou superior a 2.500 mg/kg, o que a faz se enquadrar na categoria 5 do Sistema de Classificação Harmonizada Global (GHS). Assim, pode-se afirmar que o (-)-carveol é seguro, quando administrado nas condições experimentais avaliadas. Segundo Kennedy et al., (1986) uma substância com DL₅₀ maior que 2.000 mg/kg (via oral) pode ser considerada de baixa toxicidade.

Dados de toxicidade oral aguda em ratos estimaram uma DL₅₀ de 3.000 mg/kg para o (-)-carveol (BHATIA et al., 2008). Inúmeros trabalhos científicos já demonstram a baixa toxicidade de terpenos (BELSITO, 2008), a exemplo do limoneno que foi considerado um produto químico de baixa toxicidade oral com base em sua DL₅₀ e em estudos de toxicidade de doses repetidas em ratos (KIM et al., 2013).

Para a avaliação comportamental foi utilizada a metodologia descrita por Almeida e colaboradores (1999), em que são avaliadas as alterações comportamentais frente ao SNC e SNA. Com os dados da avaliação comportamental constatou-se que os animais submetidos ao tratamento com o (-)-carveol em ambas as doses (300 ou 2.000 mg/kg – v.o.) não apresentaram alterações comportamentais em comparação ao controle (tween 80 5%).

As alterações no peso corporal são sinais indicadores de efeitos adversos de drogas e substâncias químicas, tanto o aumento quanto a diminuição do peso corporal de um animal, pode indicar alterações fisiológicas relevantes. Segundo dados da literatura, durante o experimento, os animais não podem perder mais de 10% do peso inicial (TAN et al., 2008).

O (-)-carveol não induziu alterações no peso corporal dos animais. Também não foram verificadas alterações induzidas pelo (-)-carveol (300 ou 2000 mg/kg – v.o.) na ingestão da água e da ração, o que reforça o baixo grau de toxicidade dessa substância.

O índice de órgãos é calculado levando em consideração a razão peso do órgão/peso do animal e vem sendo utilizado como uma ferramenta preditiva de toxicidade a um determinado órgão. Essa avaliação em índice é mais sensível que o peso absoluto do órgão. O fígado, rins, coração e baço são considerados órgãos vitais do corpo humano, que por serem extensamente vascularizados, representam os alvos principais dos compostos metabolicamente tóxicos (SALEEM et al., 2016).

Os grupos tratados com (-)-carveol (300 ou 2000 mg/kg – v.o.) não apresentaram alterações no índice de órgãos e nem alterações macroscópicas dos mesmos, sugerindo a ausência de danos funcionais aos órgãos.

Esses resultados indicam que existe uma relativa margem de segurança para o uso do (-)-carveol como possível agente terapêutico, embora estudos toxicológicos adicionais sejam necessários.

Assim, considerando o valor estimado da DL₅₀ do (-)-carveol, foram selecionadas quatro doses crescentes (25, 50, 100 ou 200 mg/kg) para seguir com os testes de atividade farmacológica. Estudos sugerem que, em geral, se a DL₅₀ da substância teste for inferior a 1/3 da dose mínima eficaz, a substância é considerada um bom candidato para estudos posteriores (AULETTA, 1995; AMELO et al., 2014).

O próximo passo foi testar o efeito gastroprotetor do (-)-carveol frente ao protocolo experimental de úlcera gástrica induzida com etanol. Esse protocolo de triagem é frequentemente utilizado para investigar o efeito gastroprotetor de novas substâncias e moléculas por incluir diversos mecanismos ulcerogênicos, apresentar boa reproduzibilidade e por ser um dos principais agentes indutores de úlcera no homem (KARAMPOUR et al., 2019).

As ulcerações induzidas por etanol são caracterizadas pelo extenso edema submucoso, hemorragia, descamação do epitélio e infiltração de células inflamatórias, que são as características típicas da lesão por álcool em humanos (MOUSA et al., 2019).

O etanol é considerado um agente necrotizante de ação direta, que penetra rapidamente na mucosa gástrica através da ruptura da integridade da barreira de muco e bicarbonato, promovendo alterações microvasculares acentuadas dentro de alguns minutos após sua aplicação (AZIZ et al.,

2019). Esses eventos são seguidos por redução de muco, depleção de grupamentos sulfidrilas, hipóxia e necrose hemorrágica (HWA et al., 2019).

Essa injúria tecidual promovida pelo etanol ocorre por meio de diferentes mediadores como citocinas e radicais livres (ABDELFATTAH et al., 2019). As espécies radicalares são estimuladas pelo etanol, sendo responsáveis pela peroxidação lipídica e danos oxidativos teciduais. Além disso, o etanol induz o recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão, como os leucócitos, que estimulam as respostas inflamatórias aumentando os níveis de citocinas como IL-1 β e TNF- α (HWA et al., 2019).

Com os resultados obtidos nesse modelo é possível sugerir que o (-)-carveol exerce função protetora na mucosa gástrica. Esse efeito pode estar relacionado a mecanismos citoprotetores, antissecretórios, antioxidantes e/ou imunomoduladores. Os resultados deste estudo corroboram a outros dados existentes na literatura, em que, monoterpenos levógiros como o (-)-linalol (SILVA et al., 2016) e o (-)-mirtenol (VIANA et al., 2016) também apresentaram atividade gastroprotetora frente ao modelo de indução de úlceras gástricas por etanol, com redução da área de lesão ulcerativa (ALU). Além disso, os monoterpenos carvacrol (OLIVEIRA et al., 2012), mentol (ROZZA et al., 2013), geraniol (CARVALHO et al., 2014), timol (CHAUHAN; KANG, 2015), 1,8-cineol (ROCHA CALDAS et al., 2015), α -pineno (PINHEIRO et al., 2015), citral (VENZON et al., 2018) e limoneno (SOUZA et al., 2019) têm evidenciado redução das lesões gástricas quando avaliados nesse modelo.

Estudos anteriores já descreveram outras atividades farmacológicas para o (-)-carveol, dentre estas, destaca-se a antioxidante e anti-inflamatória (KAUR et al., 2019; MALIK et al., 2020; MARQUES et al., 2019; RAHMAN et al., 2021), que possivelmente possui relação com o efeito gastroprotetor aqui apresentado.

Com relação à análise histológica, foi observado na coloração de hematoxilina e eosina (HE) que os animais tratados apenas com etanol foram marcados por lesões extensas e destruição da arquitetura tecidual, associado a hemorragia grave e edema que se estende até a camada submucosa. Entretanto, o pré-tratamento com o (-)-carveol evidenciou uma redução das lesões promovidas pelo etanol, demonstrando características semelhantes ao grupo normal. Assim, pode-se inferir que o (-)-carveol atua na preservação da arquitetura tecidual da mucosa gástrica.

A lesão gástrica induzida por etanol promove um processo inflamatório envolvendo os mastócitos, os quais, após serem ativados por diferentes estímulos, liberam de seus grânulos citoplasmáticos diversas substâncias pré-formadas como histamina, serotonina, derivados do ácido araquidônico (leucotrienos e prostaglandinas) e fator ativador de plaquetas (PAF). Os mastócitos ativados podem ainda sintetizar novos mediadores como fator estimulador de crescimento de colônias de macrófagos (GM-CSF), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e uma série de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e IFN- γ . Além disso, estas

células são uma rica fonte de enzimas proteolíticas, tais como triptase e quimase que participam do dano tecidual e propagação da resposta inflamatória (AL ASMARI et al., 2016).

A histamina estimula a secreção ácida gástrica via receptor H₂ na mucosa do estômago. Dessa forma, ao ser liberada pelos mastócitos na camada submucosa estimula uma produção adicional de ácido. Além disso, aumenta a permeabilidade vascular, resultando em edema, favorecendo diretamente a migração de células inflamatórias para área da lesão (AL ASMARI et al., 2016).

Outros estudos que avaliaram o papel dos mastócitos na lesão gástrica também revelaram um aumento desse tipo de células causado pela administração do etanol. Esse aumento provavelmente está relacionado com a gravidade da inflamação e da úlcera (DINIZ et al., 2015; SAGUN et al., 2017; YANG et al., 2017). A redução do número de mastócitos no segmento estomacal após o tratamento com o (-)-carveol observado na coloração de azul de toluidina (AT) e na análise morfométrica confirma sua potencial contribuição em reduzir a translocação dos mastócitos ativados para o local da lesão.

Os macrófagos também estão presentes nos sítios da lesão auxiliando os neutrófilos na fagocitose e secretando sinalizadores de fibroblastos os quais são os responsáveis pela síntese do colágeno (GUIDUGLI-NETO, 1992). O colágeno é considerado o principal componente da matriz extracelular e tem sido usado como um marcador bioquímico tecidual (KUMAR et al., 2006).

A administração intragástrica do etanol leva ao dano epitelial e à desestabilização da homeostase vascular gástrica devido ao aumento da atividade endotelial, bem como à desorganização e deposição da matriz extracelular. Esses eventos conduzem ao vazamento de sangue e infiltração de células inflamatórias. Essa infiltração de células inflamatórias da circulação para os tecidos devido ao comprometimento da homeostase vascular também contribui para o desenvolvimento da úlcera gástrica (YAO et al., 2019).

Nesse estudo, a administração do etanol levou a hemorragia grave e aumento do número de mastócitos ao longo de toda a camada submucosa que encontra-se edemaciada. Para determinar se a ocorrência de hemorragia e edema foi devido ao desequilíbrio da homeostase vascular, procuramos avaliar a deposição da matriz extracelular.

Com a coloração Tricrômico de Masson a avaliação estrutural é realizada pela observação dos componentes da matriz extracelular como o colágeno. A análise da matriz extracelular demonstrou que no grupo controle negativo houve uma tendência ao aumento da deposição de matriz extracelular. Esse resultado foi confirmado com a análise morfométrica. Tomariz et. al., (2002) demonstraram que a deposição de colágeno no local da lesão amplia a concentração deste por unidade de área.

Além disso, nossos dados de coloração com Tricrômio de Masson e análise morfométrica demonstram que o tratamento com o (-)-carveol diminuiu a deposição e acúmulo da matriz

extracelular em modelo animal de úlcera gástrica. Esses resultados indicam que o (-)-carveol desempenha um papel importante na regulação da deposição da matriz extracelular e possivelmente na regulação da homeostase vascular gástrica. Assim, pode-se dizer que o (-)-carveol atua aumentando a preservação tecidual, corroborando os achados da coloração de H&E.

Ao analisar as lâminas coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) foi possível visualizar secreção mucóide com maior intensidade no grupo de animais tratados com o (-)-carveol quando comparado ao grupo tratado com o veículo. Esse dado foi confirmado na análise morfométrica, demonstrando o aumento na quantidade de mucinas, o que sugere uma ação citoprotetora.

Diante dos resultados promissores obtidos, o próximo passo foi investigar a atividade gastroprotetora do (-)-carveol a partir do modelo de úlcera gástrica induzida pelo estresse por imobilização e frio.

A indução de úlceras pelo estresse é frequentemente utilizada na pesquisa não-clínica e é relevante, principalmente, devido à reproducibilidade dos resultados e a semelhança morfohistológica com as úlceras humanas induzidas por estresse. Modelos experimentais de imobilização envolvendo a exposição ao frio ou imersão na água, estão bem documentados como indutores de úlcera em roedores (XIE et al., 2019).

A úlcera induzida pelo estresse ocorre principalmente em indivíduos criticamente enfermos, após traumas, sepse, choque, queimaduras graves, falência de múltiplos órgãos ou aqueles submetidos a tratamento cirúrgico prolongado. As lesões induzidas pelo estresse podem ser focais ou difusas, superficiais ou profundas, resultando em ulceração e/ou hemorragia gástrica, que estão associadas a morbidade e mortalidade significativas (KAKAGIA et al., 2020).

Semelhante ao etanol, o mecanismo de ulceração pelo estresse é complexo e multifatorial. O estresse ativa rapidamente o sistema adrenomedular simpático, o que aumenta a secreção gástrica, reduz os níveis das prostaglandinas endógenas e da camada protetora de muco, aumenta a contratilidade muscular e diminui o fluxo de sangue da mucosa, levando a hipoxia e isquemia local, geração de EROs e peroxidação lipídica, aumento de citocinas pró-inflamatórias, degranulação de mastócitos e ativação de leucócitos, necrose epitelial e corrosão hemorrágica da mucosa gástrica (ELSHAZLY et al., 2018).

Desses mecanismos, a microcirculação insuficiente na mucosa gástrica é considerada a principal causa de redução dos mecanismos protetores da mucosa e de formação da úlcera. Além disso, as EROs como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-), aumentam no tecido isquêmico e são mediadores de lesões gastrintestinais induzidas por estresse. As EROs desencadeiam peroxidação lipídica com subsequente perda de fluidez da membrana, enfraquecimento de sua integridade e morte celular (LIN et al., 2020).

Nesse modelo de indução, o (-)-carveol reduziu a lesão ulcerativa, apresentando atividade gastroprotetora possivelmente relacionado a efeitos antissecrétórios, citoprotetores, antioxidantes

e anti-inflamatórios. Dados semelhantes foram vistos nos estudos com o monoterpeno levógiro (-)-mirtenol (VIANA et al., 2016).

Com isso, a próxima etapa desse estudo foi averiguar o efeito gastroprotetor do (-)-carveol nas úlceras gástricas induzidas com anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), utilizando o piroxicam como agente lesivo.

O piroxicam (30 mg/kg) apresenta grande potencial ulcerogênico, sendo amplamente utilizado como ferramenta farmacológica nos protocolos de indução de úlceras em animais. O piroxicam, assim como os outros AINEs, danifica diretamente o epitélio superficial da mucosa (efeito local) e ainda compromete os seus mecanismos de defesa (efeito sistêmico). Devido sua estrutura ácida, exerce uma ação lesiva local por desestabilizar a camada de fosfolipídios de membrana e lesionar a barreira do muco, favorecendo a difusão de H⁺ que lesionam as células superfícias da mucosa. Sistemicamente inibe a enzima ciclo-oxigenase (COX) de forma não seletiva, reduzindo a síntese das prostaglandinas citoprotetoras (PGE₂ e PGI₂), que atuam estimulando a produção do muco e do bicarbonato, fluxo sanguíneo e a regulação negativa da secreção ácida gástrica. Nesse modelo, também ocorre o recrutamento de neutrófilos, perturbação no plexo vascular e peroxidação lipídica (BJARNASON et al., 2018).

O (-)-carveol reduziu as injúrias gástricas induzidas por piroxicam, sugerindo que esse monoterpeno pode atuar por um mecanismo citoprotetor. Esses resultados corroboram a alguns relatos da literatura, em que, os monoterpenos carvacrol (OLIVEIRA et al., 2012), 1,8-cineol (eucaliptol) (ROCHA CALDAS et al., 2015), timol (GEYIKOGLU et al., 2018; KOC et al., 2018; RIBEIRO, DINIZ, et al., 2016) e mentol (ROZZA et al., 2013) exibiram atividade gastroprotetora nesse modelo de indução.

O próximo passo foi verificar o efeito protetor do (-)-carveol frente ao modelo de contensão do suco gástrico pelas vias oral e intraduodenal. Para isso, foi realizado o protocolo de ligadura do piloro, um método bem estabelecido na avaliação das ulcerações após obstrução mecânica.

Esse protocolo experimental está associado com a hipersecreção ácida gástrica. Um dos mecanismos associados é a estimulação vagal reflexa por meio dos receptores de pressão localizados na mucosa antral, provocando a liberação do secretogogo acetilcolina. A distensão gástrica produzida pelo próprio acúmulo de secreção parece influenciar na secreção gástrica deste modelo, possivelmente, pelo aumento da liberação de gastrina, um potente estimulador das células parietais a produzir o HCl (RAJAKRISHNAN et al., 2020).

A ligadura do piloro leva ao acúmulo de HCl e pepsina, favorecendo a autodigestão da mucosa e ulceração. A patogênese da ligadura do piloro também envolve a geração de EROS (RAJAKRISHNAN et al., 2020).

O (-)-carveol reduziu a lesão ulcerativa quando administrado por via oral e intraduodenal, sugerindo que esse fitoconstituinte exerce efeito gastroprotetor tanto por ação local como

sistêmica. Esses resultados corroboram ao estudo conduzido com o óleo essencial de *C. cajucara* constituído de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, principalmente de monoterpenos e sesquiterpenos, que reduziu as lesões gástricas no modelo de contensão do suco gástrico (HIRUMA-LIMA; PELLIZZON, 2011; MARCELLO et al., 2016).

Determinado o efeito gastroprotetor do (-)-carveol frente a diferentes agentes lesivos que mimetizam a úlcera gástrica no homem, a etapa seguinte foi elucidar os mecanismos de ação subjacentes a esse efeito.

Inicialmente foi avaliado o efeito do (-)-carveol 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 intraduodenal (efeito sistêmico). Esse modelo permite que a secreção gástrica seja acumulada no estômago, facilitando desta forma, a análise do conteúdo estomacal.

O (-)-carveol não exerceu alterações no pH e na concentração de H⁺, entretanto, reduziu o volume do suco gástrico em ambas as vias de administração. Dessa forma, pode-se inferir que a gastroproteção promovida pelo (-)-carveol está associada a mecanismos antissecrétórios locais e sistêmicos.

Assim, o (-)-carveol se configura um potencial agente anti-úlcera por reduzir a secreção gástrica sem modular o pH e a [H⁺], que são parâmetros importantes para diversos processos fisiológicos como a ativação de proteínas (pepsina) e absorção de nutrientes essenciais (vitamina B₁₂).

Outros produtos naturais já foram avaliados frente a esses parâmetros como *Cissampelos sympodialis* que não modulou os parâmetros bioquímicos do suco gástrico (pH, volume e [H⁺]) (DE SALES et al., 2018), o ácido rosmariníco (polifenol) que também não apresentou alterações no pH e na concentração de H⁺ (DO NASCIMENTO et al., 2020) e o estragol (fenilpropanóide) que não promoveu alteração no pH, na concentração de H⁺ e no volume do suco gástrico por via oral, mas reduziu o conteúdo gástrico por via intraduodenal (ALVES JÚNIOR et al., 2020). Além disso, os monoterpenos timol não alterou os parâmetros de secreção ácida gástrica (RIBEIRO; DINIZ et al., 2016) e o 1,8-cineol reduziu o volume da secreção gástrica (ROCHA CALDAS et al., 2015) de forma semelhante ao presente trabalho.

Ao considerar os resultados promissores e inéditos apresentados pelo (-)-carveol na gastroproteção, sequencialmente, foi avaliada a participação dos mecanismos citoprotetores envolvidos nesse efeito como os grupamentos sulfidrilas, NO, K_{ATP}, muco e prostaglandinas.

No intuito de avaliar a participação dos grupamentos sulfidrilas presentes na mucosa gástrica no efeito gastroprotetor do (-)-carveol foi utilizado o etanol como agente lesivo e analisado o efeito protetor da substância teste na presença e na ausência do N-etilmaleimida (NEM), um bloqueador específico dos grupamentos sulfidrilas.

Os grupamentos sulfidrilas endógenos desempenham um importante papel na manutenção da integridade da mucosa gastroduodenal e na proteção contra lesões induzidas quimicamente no tecido. Acredita-se que os grupamentos sulfidrilas sejam os principais agentes citoprotetores contra as lesões induzidas pelo etanol (HWA et al., 2019). Esses agentes possuem a propriedade de aderir continuamente à camada de muco, formando uma espécie de barreira protetora estável contra a ação da pepsina e HCl, evitando a digestão proteolítica da mucosa subjacente. Dessa forma, com a redução dos grupamentos sulfidrilas ligados a mucina, o muco torna-se solúvel e facilmente retirado por agente nocivo (LIANG et al., 2018).

Os grupamentos sulfridrilas são responsáveis pelo aumento e pela manutenção da estabilidade da camada de muco, principalmente quando as EROs participam da formação dos danos teciduais. No processo de desenvolvimento das lesões gástricas, as EROs são liberadas e iniciam uma reação de peroxidação lipídica, culminando em morte celular. Os grupamentos sulfidrilas se ligam às EROs e auxiliam na diminuição da gravidade das lesões gástricas, impedindo a morte celular (LIANG et al., 2018).

Esses agentes são mediadores chave na defesa da mucosa gástrica induzida pelo (-)-carveol, já que o NEM, um inibidor dos grupamentos sulfidrilas, conseguiu reverter seu efeito gastroprotetor. Com isso, pode-se inferir que o efeito gastroprotetor desse monoterpeno envolve a participação dos grupamentos sulfidrilas, possivelmente em decorrência de uma atividade antioxidante.

Muitos produtos naturais exercem atividades gastroprotetoras por meio da modulação dos grupamentos sulfidrilas como os monoterpenos mentol (ROZZA et al., 2013), geraniol (DE CARVALHO et al., 2014), 1,8-cineol (eucaliptol) (ROCHA CALDAS et al., 2015) e β-mirceno (BONAMIN et al., 2014). O alcaloide boldina (BOEING et al., 2020) e o flavonoide baicaleina (RIBEIRO et al., 2016) também demonstraram que seu efeito gastroprotetor está relacionado aos grupamentos sulfidrilas.

Nesse estudo também procuramos avaliar o papel do NO no efeito gastroprotetor do (-)-carveol, considerando que esse mediador já está bem descrito como um fator crucial na defesa da mucosa gastrintestinal. Para isso, foi utilizado o modelo experimental de úlcera gástrica induzida por etanol, na ausência ou presença do L-NAME, um bloqueador da enzima óxido-nítrico sintase (NOS).

A gastroproteção mediada pelo NO envolve a inibição da adesão de neutrófilos, o estímulo da secreção de muco e aumento do fluxo de sangue na mucosa. Estudos relatam que doadores de NO e L-arginina exercem um efeito gastroprotetor, acelerando o processo de cicatrização das úlceras, enquanto que a inibição do NO pelo L-NAME em protocolos experimentais de úlcera agrava a lesão (SILVA et al., 2014).

Os dados sugerem que o NO participa do efeito gastroprotetor do (-)-carveol, já que a administração do L-NAME, um inibidor não seletivo da NO-sintase, interferiu parcialmente na sua gastroproteção. Outros monoterpenos também apresentaram esse comportamento em modelos experimentais como o carvacrol (OLIVEIRA et al., 2012), geraniol (DE CARVALHO et al., 2014) e (-)-mirtenol (VIANA et al., 2016). Além disso, também foi demonstrado que o (-)-carveol em combinação com a glibenclamida, um bloqueador dos canais K_{ATP}, teve seu efeito protetor gástrico diminuído, sugerindo que os K_{ATP} estão parcialmente envolvidos na atividade gastroprotetora desse monoterpeno. Esses dados se assemelham aos resultados obtidos com os monoterpenos carvacrol (OLIVEIRA et al., 2012), mentol (ROZZA et al., 2013) e timol (RIBEIRO et al., 2016).

A abertura dos canais K_{ATP} participa da proteção da mucosa gástrica por meio do relaxamento dos vasos que suprem a mucosa, levando ao aumento do fluxo sanguíneo, de forma concomitante à redução da área lesionada. A melhora da microcirculação gástrica resulta na maior disponibilidade de nutrientes e dos fatores de crescimento e renovação celular na camada mucosa, ao mesmo tempo que os H⁺ e as EROS são removidas (ARUNACHALAM et al., 2019). Esse efeito é suprimido pela administração da glibenclamida.

A ação da glibenclamida envolve a redução da permeabilidade das células ao íon K⁺, levando a despolarização e o influxo de íons Ca²⁺, induzindo uma vasoconstrição gástrica e redução do fluxo de sangue na região afetada, favorecendo a formação das úlceras (BENTO et al., 2018).

A investigação do envolvimento dos K_{ATP} como alvos terapêuticos é importante já que agonistas e antagonistas destes canais estão sendo usados em testes clínicos, visto que esta via exerce um papel importante na regulação da motilidade gastrintestinal (LI et al., 2017).

A próxima etapa foi avaliar se o (-)-carveol exerce influência na secreção de muco gástrico medido indiretamente pela concentração de *alcian blue*. O corante *alcian blue* ou azul ciano é um composto catiônico que forma ligações eletrostáticas (iônicas) com determinados grupos polianiônicos carboxil ou sulfato. O *alcian blue* possui grande especificidade em corar mucinas ácidas em azul (KAMEYAMA et al., 2015).

A superfície da mucosa gástrica é recoberta por uma camada formada de gel mucoso, bicarbonato e fosfolipídeos constituindo a primeira linha de defesa da mucosa (YANDRAPU; SAROSIEK, 2015). O gel mucoso possui em sua composição a glicoproteína mucina que forma polímeros essenciais para a formação do gel e por meio da sua ligação ao corante *alcian blue* o muco gástrico pode ser quantificado (KAMEYAMA et al., 2015).

O muco aumenta o tamponamento dos ácidos na secreção gástrica, reduz a fricção da parede do estômago e protege a mucosa contra a difusão reversa de íons H⁺. Portanto, um aumento no conteúdo de muco pode inibir o desenvolvimento das úlceras gástricas (KIM et al., 2019).

A partir dos dados obtidos com esse modelo observou-se que o (-)-carveol aumentou o muco aderido à mucosa gástrica, sugerindo que o efeito desse monoterpeno envolve o estímulo desse agente citoprotetor. Tal achado também é evidenciado na análise histológica de fragmento estomacal corado com PAS. Esses resultados corroboram aos estudos com os monoterpenos carvacrol (OLIVEIRA et al., 2012), mentol (ROZZA et al., 2013), geraniol (DE CARVALHO et al., 2014), timol (RIBEIRO; DINIZ et al., 2016) e 1,8-cineol (ROCHA CALDAS et al., 2015).

Na avaliação das prostaglandinas na gastroproteção mediada pelo (-)-carveol, as úlceras foram induzidas por etanol em ratos pré-tratados ou não com indometacina, um inibidor inespecífico da COX e consequentemente da síntese de prostaglandinas.

A indometacina está entre os AINEs não seletivos comumente prescritos, amplamente utilizado por suas propriedades analgésicas eficazes, particularmente para enxaquecas e várias doenças inflamatórias. Entretanto, os benefícios da indometacina foram limitados devido aos seus efeitos colaterais, que incluem ulcerações e danos à mucosa gástrica (AHMED et al., 2020).

As isoenzimas ciclo-oxigensases (COX-1 e COX-2) são responsáveis pela síntese das prostaglandinas por meio da via do AA e sua produção é inibida pelos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). A COX-1 é expressa constitutivamente no trato gastrintestinal sendo responsável pela manutenção da homeostase desse sistema, enquanto que, a COX-2 é expressa predominantemente no local da inflamação. No entanto, muitos estudos sugerem que ambas as isoformas de COX estão envolvidas na homeostase do TGI (AZIZ et al., 2019).

As prostaglandinas PGE₂ e PGI₂ são produzidas continuamente pelo epitélio gástrico e participam da manutenção da homeostase do estômago e da cicatrização das úlceras por atuarem inibindo a secreção ácida gástrica e aumentarem a secreção de muco e bicarbonato. Além disso, participam da manutenção do fluxo de sangue da mucosa, regulam a motilidade, inibem a ativação de neutrófilos e a liberação de EROS e induzem a angiogênese (TAKEUCHI; AMAGASE, 2018).

Quase todos os mecanismos de gastroproteção são estimulados ou facilitados pelas prostaglandinas. Dessa forma, a inibição de sua síntese pelos AINEs torna a mucosa mais suscetível ao aparecimento de lesões gástricas (TARNAWSKI et al., 2013).

Por este modelo, foi demonstrado que o efeito do (-)-carveol envolve parcialmente a participação das prostaglandinas, considerando que nos grupos tratados previamente com a indometacina houve uma exacerbação da lesão ulcerativa e redução moderada dos efeitos gastroprotetores do (-)-carveol em comparação aos grupos que não receberam a indometacina.

Dados semelhantes foram observados com os monoterpenos carvacrol (OLIVEIRA et al., 2012), mentol (ROZZA et al., 2013), geraniol (DE CARVALHO et al., 2014), (-)-mirtenol (VIANA et al., 2016), timol (GEYIKOGLU et al., 2018; KOC et al., 2018; RIBEIRO et al., 2016) e 1,8-cineol (eucaliptol) também nas doses de 50 e 100 mg/kg (ROCHA CALDAS et al., 2015),

sugerindo que a propriedade gastroprotetora apresentada por esses monoterpenos envolve a modulação das prostaglandinas.

Visando caracterizar o provável efeito antioxidante do (-)-carveol frente aos danos gástricos, avaliou-se marcadores do estresse oxidativo como a glutationa reduzida (GSH), malondialdeído (MDA) e a atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) e superóxido dismutase (SOD) em amostras de tecido gástrico a partir do modelo agudo de úlcera induzida por etanol, já que o estresse oxidativo é considerado um dos mais importantes fatores da fisiopatologia das úlceras induzidas por etanol.

O estresse oxidativo é gerado a partir do desequilíbrio entre a produção e a neutralização de agentes pró-oxidantes e antioxidantes, estando associado a um aumento dos RLs e das EROs. O papel das EROs na indução de lesões ulcerativas e/ou morte celular está sendo cada vez mais reconhecido (ZHANG et al., 2016).

Os danos oxidativos causados pelos RLs têm sido implicados na toxicidade de várias substâncias químicas e na patogênese de diversas doenças, como as doenças de cunho inflamatório, autoimunes, neurodegenerativas e ulcerosas. Além disso, os RLs também desempenham um papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese (MORIS et al., 2017).

O modelo experimental de úlcera gástrica utilizando o etanol como agente lesivo está associado à produção excessiva de EROs no tecido gástrico, perturbando consequentemente a integridade e a permeabilidade das biomembranas, levando à morte celular e favorecendo a formação de úlceras (WANG et al., 2018).

As células da mucosa gástrica possuem um sistema de defesa antioxidante que visa evitar ou minimizar a citotoxicidade promovida pelas EROs. Esse sistema envolve a ação de enzimas como a superóxido dismutase (SOD) e compostos com potencial de sequestrar radicais livres como glutationa reduzida (GSH). Dessa forma, SOD e GSH constituem importantes indicadores de ação antioxidante (DO CARMO et al., 2018).

Um dos antioxidantes mais importante na defesa frente aos danos oxidativos induzidos pelas EROs é a glutationa reduzida, um tripeptídeo (γ -L-glutamil-L-cistenil-glicina), que exerce seu efeito protetor por meio do seu grupo sulfidrila (SH). A GSH é considerada a primeira linha de defesa não enzimática do organismo contra as EROs (LIANG et al., 2018).

A glutationa atua como cofator para enzimas na eliminação das EROs, serve como um reservatório para a cisteína, participa das reações de desintoxicação de xenobióticos e metabolismo de diversos compostos celulares (como o NO). A ação mais importante da glutationa ocorre nas mitocôndrias, sendo extremamente relevante em órgãos expostos a toxinas, como pulmão, rins, fígado e trato gastrintestinal (LIANG et al., 2018).

A glutationa está presente em todas células humanas, sendo produzida em altos níveis pela mucosa gástrica (PÉREZ et al., 2017). O aumento de GSH previne os danos ocasionados pelas

EROs, enquanto que, sua redução está associada a uma grande vulnerabilidade das células aos danos provocados pelas EROs (KOUNTOURAS et al., 2017).

Neste trabalho, o (-)-carveol manteve os níveis basais de GSH nas amostras de tecido gástrico, sugerindo que a atividade gastroprotetora desse monoterpeno está associada a mecanismos antioxidantes. Os monoterpenos mentol (ROZZA et al., 2014) e geraniol (DE CARVALHO et al., 2014) elevaram os níveis de GSH próximos ao estado basal.

Vários estudos já comprovaram que o dano gástrico induzido pelo etanol está relacionado a redução de compostos sulfidrilílicos não-proteícos como a glutationa reduzida. A redução da GSH, a supressão da SOD e o aumento do produto da peroxidação lipídica (malondialdeído – MDA) são fatores que contribuem para as lesões induzidas pelo etanol (LIU et al., 2017).

Um dos principais danos celulares ocasionados pelas EROs é a oxidação dos lípideos das biomembranas. A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação é o nome dado a reação que ocorre entre as EROs com os ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares, resultando na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, a exemplo do MDA, 4-hidroxinonenal e isoprostanos que podem ser detectados em amostras biológicas e são utilizados para avaliar o estresse oxidativo (AGNIESZKA, 2019).

A peroxidação lipídica leva à perda da integridade, fluidez e o aumento da permeabilidade das biomembranas, com a liberação de nutrientes e substâncias tóxicas no espaço extracelular, ruptura e morte. Além de gerar produtos potencialmente tóxicos, com propriedades mutagênicas e cancerígenas (PISOSCHI; POP, 2015).

Os lípideos são substratos facilmente oxidáveis, portanto, a peroxidação lipídica pode ser uma consequência dos danos ocasionados pelas EROs. Essas espécies reativas possuem um tempo de meia vida muito curto, o que dificulta sua detecção direta, assim, a destruição tecidual relacionada as EROs pode ser avaliada pelos produtos finais da lipoperoxidação, tal como o malondialdeído (MDA) (PISOSCHI; POP, 2015).

O malondialdeído é um dos marcadores mais comum do estresse oxidativo e tem sido reconhecido como um importante indicador de peroxidação lipídica em estados patológicos. Por meio desse marcador é possível avaliar os danos em estruturas lipídicas (HWA et al., 2019).

O método mais comum para avaliar as concentrações de MDA é o ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Entretanto, o valor deste método é limitado pela baixa especificidade ao MDA e a possível reação com outras moléculas (interferentes). Assim, um método alternativo de maior especificidade foi desenvolvido para estimar a produção de MDA com a utilização do agente cromogênico 1-metil-2-fenilindol a 45 °C. Neste método, duas moléculas de 1-metil-2-fenilindol reagem com uma molécula de MDA formando um cromóforo estável que tem absorbância máxima a 586 nm (SIDDIQUE; ARA; AFZAL, 2012).

A administração do (-)-carveol impediu a lipoperoxidação induzida pelo etanol, tal fato é evidenciado pela permanência dos níveis basais de MDA no tecido estomacal após administração intragástrica de etanol, sugerindo uma possível propriedade antioxidante desta substância, que representa um importante mecanismo para impedir danos na mucosa gástrica.

De forma semelhante, estudos anteriores também demonstraram o papel crítico do estresse oxidativo observado pelo aumento da peroxidação lipídica no modelo experimental de úlceras gástricas induzidas por etanol e a redução dos níveis de MDA para o estado basal pela ação protetora das substâncias testadas, como os monoterpenos 1,8-cineol (ROCHA CALDAS et al., 2015) e (-)-mirtenol (VIANA et al., 2016).

Nas úlceras gástricas, o estresse oxidativo também é aumentado por meio da infiltração e penetração de neutrófilos ativados, que são importantes produtores de EROs, desempenhando um papel decisivo no desenvolvimento do processo inflamatório e da injúria na mucosa gástrica (WANG et al., 2018).

A ativação de neutrófilos e o acúmulo dessas células no tecido gástrico durante a ulceração, contribui de forma significativa para a manutenção e agravamento do dano tecidual. A infiltração neutrofílica pode ser avaliada por meio da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) (LI et al., 2017).

A mieloperoxidase é expressa principalmente em neutrófilos e em menor grau em monócitos. Um dos efeitos principais da MPO e do seu produto final, o ácido hipocloroso (HOCl), é a formação de espécies reativas, a exemplo das cloroaminas que estão envolvidas na produção de citocinas e ativação de quinases. Além disso, a MPO já demonstrou ser um mediador local de dano tecidual e inflamação, favorecendo o desenvolvimento de doenças inflamatórias (ARATANI, 2018).

Nesse estudo, o (-)-carveol apresentou redução nos níveis de MPO, um biomarcador de infiltração neutrofílica, o que pode sugerir a participação do mecanismo antioxidante na gastroproteção mediada por essa substância. Esses resultados são semelhantes aos achados dos monoterpenos limoneno (DE SOUZA et al., 2019), mentol (ROZZA et al., 2014) e geraniol (DE CARVALHO et al., 2014).

A SOD pertence a um grupo de metaloenzimas que estão presentes nas células aeróbicas e constitui uma das mais importantes enzimas antioxidantes. Essa enzima exerce seu efeito antioxidante por meio da dismutação do ânion radicalar superóxido (O_2^-), gerado pelo metabolismo celular ou por fontes externas, transformando-o em oxigênio molecular (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas do sistema antioxidante como a CAT (LIANG et al., 2018).

A SOD é considerada a enzima antioxidante mais proeminente nos tecidos dos mamíferos, sendo encontrada no citosol de praticamente todas as células eucariontes. A ação da SOD é

importante para o bom funcionamento do metabolismo, da reprodução, da diferenciação celular e da defesa imunológica (PÉREZ et al., 2017).

O etanol está envolvido com o aumento da produção de ânions superóxido e a diminuição da atividade enzimática da SOD. Ambos os fatores contribuem para instalação do dano oxidativo, ao aumentar a produção de um agente lesivo e ao mesmo tempo reduzir a capacidade de eliminação desse agente.

Nesse trabalho, o etanol diminuiu a atividade enzimática da SOD, que foi significativamente aumentada com a administração do (-)-carveol. Dessa forma, o (-)-carveol demonstrou exercer um papel protetor ao aumentar a atividade da SOD e consequentemente potencializar a dismutação do ânion superóxido. A capacidade de aumentar a atividade enzimática da SOD torna o (-)-carveol uma substância gastroprotetora com efeito sobre o sistema antioxidante, constituindo um dos mecanismos de ação desse composto.

Há muitos relatos da importância de compostos naturais com propriedades antioxidantes para reduzir complicações geradas pelo estresse oxidativo nos tecidos gástricos. São exemplos desses compostos o monoterpeno (-)-mirtenol (VIANA et al., 2016), o triterpeno ácido α -boswélico (ZHANG et al., 2016) e os sesquiterpenos (-)- α -bisabolol (ROCHA et al., 2011) e epóxido de patchoulene (LIANG et al., 2018) que apresentaram efeitos antioxidantes pelo aumento dos níveis da enzima superóxido dismutase no tecido gástrico.

Após comprovar o efeito antioxidant do (-)-carveol, o próximo passo, foi avaliar os possíveis efeitos imunomoduladores desse composto.

O etanol induz respostas inflamatórias no tecido gástrico aumentando a expressão do fator nuclear kappa-B (NF- κ B), um fator de transcrição pró-inflamatório, que quando ativado, estimula outros mediadores pró-inflamatórios, como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e as interleucinas IL-6 e IL-1 β . Essas citocinas, particularmente o TNF- α , representa um dos fatores agressivos para o desenvolvimento de inflamação e lesão ulcerativa no TGI (MANTOVANI et al., 2020).

O TNF- α exerce um papel importante no desenvolvimento das lesões ulcerativas ao iniciar uma resposta inflamatória aguda, acompanhada de infiltração neutrofílica na mucosa gástrica. Além disso, modula o processo de apoptose na mucosa do estômago por meio da ativação da via da caspase-3, suprime a microcirculação gástrica, a proliferação celular e a angiogênese na margem da úlcera, atrasando assim o processo de cicatrização. A expressão exacerbada de IL-1 β contribui para a formação de úlcera e estimula a produção de mais TNF- α (BOSHTAM et al., 2017).

A IL-10 exerce um papel de fundamental importância na proteção da mucosa gástrica, através da sinalização de uma resposta anti-inflamatória, reduzindo a resposta imune mediada por células pró-inflamatórias. Esse efeito se dá por meio da inibição da retroalimentação do TNF- α e consequente redução do processo inflamatório (MOLLAZADEH et al., 2019).

Os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β diminuíram, enquanto que, a

citocina anti-inflamatória IL-10 se manteve nos níveis basais no grupo tratado com o (-)-carveol, sugerindo que essa substância possui efeito imunomodulador e esse efeito está associado com a regulação de citocinas pró e anti-inflamatórias.

Os monoterpenos limoneno (DE SOUZA et al., 2019) e timol (ROZZA et al., 2014) também exibiram atividade imunomoduladora reduzindo os níveis de TNF- α e IL-1 β e aumentando os níveis de IL-10.

O (-)-carveol, uma substância inicialmente oriunda de produtos naturais, apresenta uma importante atividade gastroprotetora envolvendo múltiplos mecanismos de ação, a exemplo dos mecanismos citoprotetores (participação dos grupamentos sulfidrilas, óxido nítrico, canais K_{ATP}, secreção de muco e prostaglandinas), antissecrétórios (redução do volume da secreção gástrica), antioxidantes (manutenção dos níveis basais de GSH e aumento de SOD com manutenção dos níveis de MDA e redução de MPO) e imunomoduladores (redução de TNF- α e IL-1 β e manutenção dos níveis basais de IL-10).

Considerações Finais

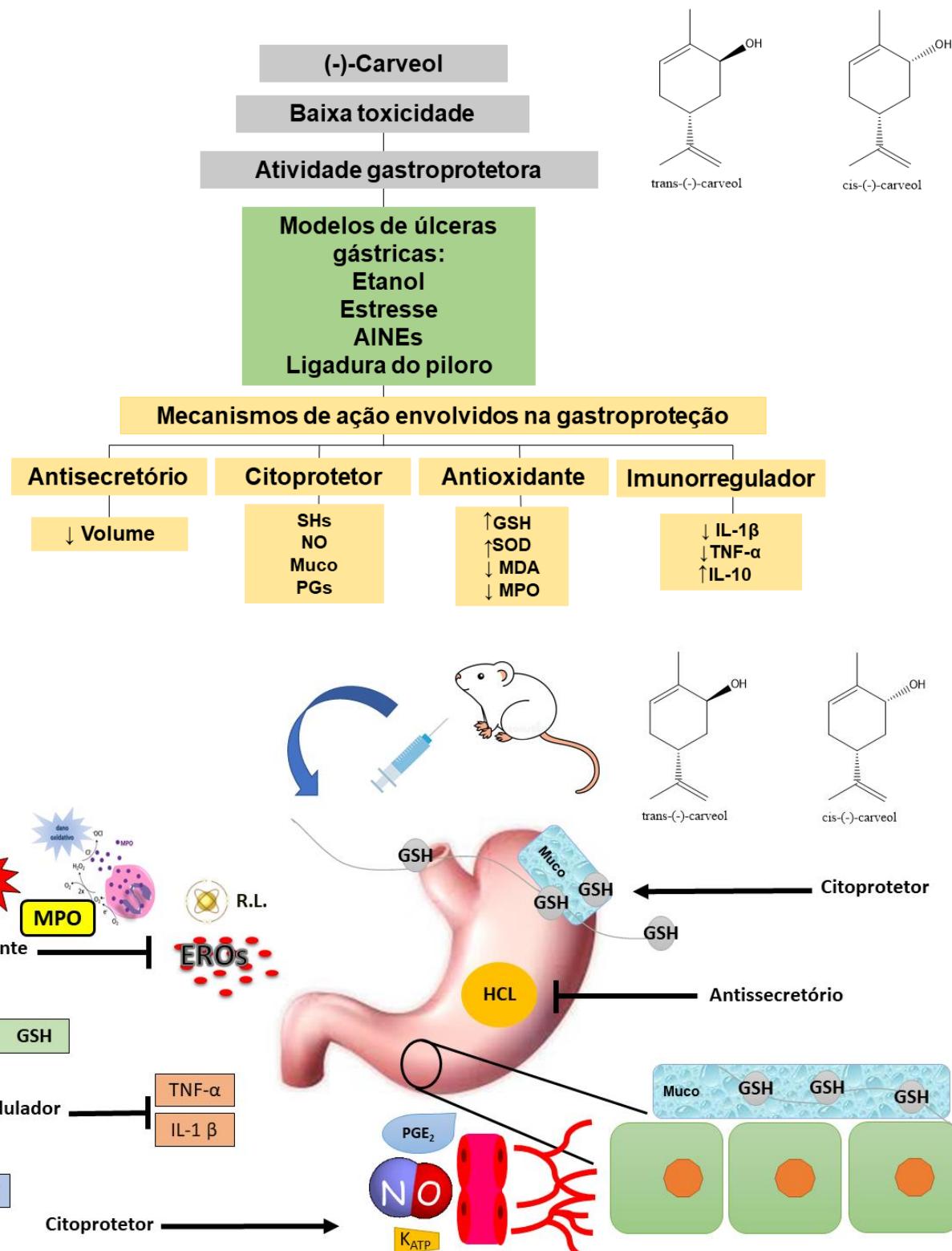
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da avaliação do monoterpeno (-)-carveol frente aos diferentes métodos experimentais de indução que mimetizam as úlceras gástricas no homem e considerando o que foi discutido até o momento, pode-se concluir que:

- O (-)-carveol apresentou baixo grau de toxicidade aguda quando administrado por via oral nas condições experimentais avaliadas;
- Apresentou atividade gastroprotetora, nas diferentes doses testadas, frente aos modelos de indução aguda de úlceras gástricas;
- Reduziu os parâmetros inflamatórios em lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE), ácido periódico de schiff (PAS), tricômico de Masson e azul de toluidina (AT);
- O efeito gastroprotetor do (-)-carveol:
 - Pode envolver mecanismos inibitórios da secreção ácida gástrica (antissecretórios), entretanto não modifica o pH ou a concentração de íons H⁺;
 - Está associado a mecanismos citoprotetores, com a participação dos grupamentos sulfidrilas, óxido nítrico, canais K_{ATP}, aumento de muco e prostaglandinas;
 - Envolve mecanismos antioxidantes, demonstrado por meio da manutenção dos níveis basais de GSH e aumento da atividade da enzima SOD e redução da peroxidação lipídica (manutenção dos níveis fisiológicos de MDA) e da infiltração neutrofílica (redução dos níveis de MPO);
- O (-)-carveol possui potencial em minimizar a resposta inflamatória, observado por meio da redução dos níveis das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) e manutenção dos níveis basais da modulação da citocina reguladora IL-10.

Na figura 30, está esquematizado as respostas encontradas nos modelos agudos de úlcera gástrica na investigação do efeito gastroprotetor do (-)-carveol para elucidar os mecanismos de ação da substância testada.

Figura 30 - Representação esquemática das atividades farmacológicas encontradas para o (-)-carveol em modelos animais com ratos ou camundongos



Legenda: AINEs, Anti-inflamatórios Não Esteroidais; SHs, grupamentos sulfidrilas; NO, óxido nítrico; PGs, prostaglandinas; GSH, Glutationa reduzida; SOD, suero-óxido dismutase; MDA, Malondialdeído; MPO, Mieloperoxidase; IL-1 β , Interleucina 1 beta; TNF- α , Fator de necrose tumoral alfa; IL-10, Interleucina 10.

Referências Bibliográficas

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELFATTAH, M. S., ELMALLAH, M. I. Y., EBRAHIM, H. Y., ALMEER, S., ELTANANY, R. M. A., ABDEL, A. E. M. Prodigiosins from a marine sponge-associated actinomycete attenuate HCl / ethanol-induced gastric lesion via antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. *PLoS One.* v. 13;14, n. 6, p. 1–20, 2019.
- ADAMSON, R. H. The acute lethal dose 50 (LD50) of caffeine in albino rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 80, 274–276, 2016.
- AHMED, O. A. A., FAHMY, U. A., BAKHAIDAR, R., EL-MOSELHY, M. A., OKBAZGHI, S. Z., AHMED, A. F., HAMMAD, A. S. A., ALHAKAMY, N. A. Omega-3 Self-Nanoemulsion Role in Gastroprotection against Indomethacin-Induced Gastric Injury in Rats. *Pharmaceutics.* v. 7;12, n. 2, p. 140, 2020.
- ALEKSUNES, L. M. et al. Induction of Mrp3 and Mrp4 transporters during acetaminophen hepatotoxicity is dependent on Nrf2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* v. 226, p. 74–83, 2008.
- ALKIM, H., KOKSAL, A. R., BOGA, S., SEN, I., ALKIM, C. Role of Bismuth in the Eradication of Helicobacter pylori. *American Journal of Therapeutics*, v. 24, n. 6, p. 751–757, 2017.
- ALMEIDA, R.N.; FALCÃO, A.C.G.M.; DINIZ, R. S. T. et al. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, São Paulo, v.80, p.72-76, 1999.
- ALVES JÚNIOR, E. B., DE OLIVEIRA FORMIGA, R., DE LIMA SERAFIM, C. A., et al. Estragole prevents gastric ulcers via cytoprotective, antioxidant and immunoregulatory mechanisms in animal models. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 130, 2020.
- AMAGASE, K., IZUMI, N., TAKAHIRA, Y., WADA, T., TAKEUCHI, K. Importance of cyclooxygenase-1/prostacyclin in modulating gastric mucosal integrity under stress conditions. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 29, 3–10, 2014.
- AMELO, W., NAGPAL, P., MAKONNEN, E. Antiplasmodial activity of solvent fractions of methanolic root extract of Dodonaea angustifolia in Plasmodium berghei infected mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 14, n. 1, p. 462, 2014.
- ANVISA. *Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos*, 2013.
- ARATANI, Y. Myeloperoxidase : Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys.* v. 15, n. 640, p. 47-52, 2018.
- ARUNACHALAM, K., DAMAZO, A. S., PAVAN, E., et al. Cochlospermum regium (Mart. ex Schrank) Pilg.: Evaluation of chemical profile, gastroprotective activity and mechanism of action of hydroethanolic extract of its xylopodium in acute and chronic experimental models. *Journal of Ethnopharmacology*, 233, 101–114, 2019.
- ASHFORD, M. Gastrointestinal tract–physiology and drug absorption. In *Aulton's Pharmaceutics E-Book: The Design and Manufacture of Medicines*, 2017.
- AULETTA, C. S. *Acute, subchronic, and chronic toxicology*. In CRC Press (Ed.), 1995.

AZIZ, R. S., SIDDIQUA, A., SHAHZAD, M., SHABBIR, A., NASEEM, N. Oxyresveratrol ameliorates ethanol-induced gastric ulcer via downregulation of IL-6, TNF- α , NF- κ B, and COX-2 levels, and upregulation of TFF-2 levels. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 110, 554–560, 2019.

BAANANOU, S., BAGDONAITE, E., MARONGIU, B., PIRAS, A., PORCEDDA, S., FALCONIERI, D., BOUGHATTAS, N. Extraction of the volatile oil from Carum carvi of Tunisia and Lithuania by supercritical carbon dioxide: chemical composition and antiulcerogenic activity. *Natural Product Research*, v. 27, n. 22, p. 2132–2136, 2013.

BADR, A. M., EL-ORABI, N. F., ALI, R. A. The implication of the crosstalk of Nrf2 with NOXs, and HMGB1 in ethanol-induced gastric ulcer: Potential protective effect is afforded by Raspberry Ketone. *PLoS ONE*, v. 14, n. 8, p. 1–23, 2019.

BARREIRO, E. J. What is hidden in the biodiversity? The role of natural products and medicinal chemistry in the drug discovery process. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 91, 1–6, 2019.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS-NETO, A. G. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. EDART. São Paulo, 1976.

BELSITO, A. et al. A toxicologic and dermatologic assessment of cyclic and non-cyclic terpene alcohols when used as fragrance ingredients. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2008.

BENTO, E. B., JÚNIOR, F. E. B., DE OLIVEIRA, D. R., et al. Antiulcerogenic activity of the hydroalcoholic extract of leaves of Annona muricata Linnaeus in mice. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 25, n. 4, p. 609–621, 2018.

BERGMAN, M. E., DAVIS, B., PHILLIPS, M. A. Medically Useful Plant Terpenoids: Biosynthesis, Occurrence, and Mechanism of Action. *Molecules*. v. 24, n. 21, p. 3961, 2019.

BERRAONDO, P., SANMAMED, M. F., OCHOA, M. C., ETXEVERRIA, I., AZNAR, M. A., PÉREZ-GRACIA, J. L., RODRÍGUEZ-RUIZ, M. E., PONZ-SARVISE, M., CASTAÑÓN, E., MELERO, I. Cytokines in clinical cancer immunotherapy. *British Journal of Cancer*, v. 120, n. 1, p. 6–15, 2019.

BERRIDGE, M. Cellular processes. In *Cell Signalling Biology* (pp. 95–101), 2014.

BHATIA, S. P., MCGINTY, D., LETIZIA, C. S., API, A. M. Fragrance material review on carveol. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 11, S85–S87, 2008.

BHATIA, S. P., MCGINTY, D., LETIZIA, C. S., API, A. M. Fragrance material review on laevo-carveol. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 11, S88–S90, 2008.

BINDU, S., MAZUMDER, S., BANDYOPADHYAY, U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochemical Pharmacology*, 180, 114147, 2020.

BIRCHENOUGH, G. M. H., JOHANSSON, M. E., GUSTAFSSON, J. K., BERGSTROM, J. H., HANSSON, G. C. New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunology*, v. 8, n. 4, p. 712–719, 2015.

BJARNASON, I., SCARPIGNATO, C., HOLMGREN, E., OLSZEWSKI, M., RAINSFORD, K. D., LANAS, A. Mechanisms of Damage to the Gastrointestinal Tract From Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Gastroenterology*, v. 154, n. 3, p. 500–514, 2018.

BOEING, T., DA SILVA, L. M., SOMENSI, L. B., CURY, B. J., MICHELS COSTA, A. P., PETREANU, M., NIERO, R., DE ANDRADE, S. F. Antiulcer mechanisms of Vernonia condensata Baker: A medicinal plant used in the treatment of gastritis and gastric ulcer. *Journal of Ethnopharmacology*, 184, 196–207, 2016.

BOEING, T., MARIANO, L. N. B., DOS SANTOS, A. C., TOLENTINO, B., VARGAS, A. C., DE SOUZA, P., NESELLO, L. A. N., DA SILVA, L. M. Gastroprotective effect of the alkaloid boldine: Involvement of non-protein sulfhydryl groups, prostanoids and reduction on oxidative stress. *Chemico-Biological Interactions*, 327, 109166, 2020.

BONAMIN, F., MORAES, T.M., DOS SANTOS, R.C. et al. The effect of a minor constituent of essential oil from Citrus aurantium: the role of β -myrcene in preventing peptic ulcer disease. *Chem Biol Interact*, v. 5, n. 212, p. 11–19, 2014.

BOSHTAM, M., ASGARY, S., KOUHPAYEH, S., SHARIATI, L., KHANAHMAD, H. Aptamers Against Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines: A Review. *Inflammation*, v. 40, n. 1, p. 340–349, 2017.

BOSSOU, A. D., MANGELINCKX, S., YEDOMONHAN, H., BOKO, P. M., AKOGBETO, M. C., DE KIMPE, N., AVLESSI, F., SOHOUNHLOUE, D. C. K. Chemical composition and insecticidal activity of plant essential oils from Benin against Anopheles gambiae (Giles). *Parasites & Vectors*, v. 6, n. 1, p. 337, 2013.

BRITO, S. A., BARBOSA, I. S., DE ALMEIDA, C. L. F., DE MEDEIROS, J. W., SILVA NETO, J. C., ROLIM, L. A., DA SILVA, T. G., XIMENES, R. M., MENEZES, I. R. A. DE, CALDAS, G. F. R., WANDERLEY, A. G. Evaluation of gastroprotective and ulcer healing activities of yellow mombin juice from Spondias mombin L. *PLOS ONE*, v. 13, n. 11, 2018.

BRUNEAU, E. Basic Anatomy and of the Gastrointestinal Tract. *Springer International Publishing Switzerland*, 19–25, 2017.

BRUNEL, A., LANG, J., COUTURE, M., BOUCHER, J. L., DORLET, P., SANTOLINI, J. Oxygen activation in NO synthases: Evidence for a direct role of the substrate. *FEBS Open Bio*, v. 6, n. 5, p. 386–397, 2016.

BRUNTON, L. L. *Bases Farmacologicas Da Terapeutica De Goodman E Gilman*. Artmed, ed. 13^a, 2018.

BYRNE, B. E., BASSETT, M., ROGERS, C. A., ANDERSON, I. D., BECKINGHAM, I., BLAZEBY, J. M. Short-term outcomes after emergency surgery for complicated peptic ulcer disease from the UK National Emergency Laparotomy Audit: A cohort study. *BMJ Open*, v. 8, n. 8, 2018.

CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 91, 1–7, 2019.

CAMILO, V., SUGIYAMA, T., TOUATI, E. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter*, 22, 1, 2017.

CAMPBELL, I. The mouth, stomach and intestines. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, v. 16, n. 1, p. 37–39, 2015.

CARDOSO-TEIXEIRA, A. C., FERREIRA-DA-SILVA, F. W., PEIXOTO-NEVES, D., OLIVEIRA-ABREU, K., PEREIRA-GONÇALVES, Á., COELHO-DE-SOUZA, A. N., LEAL-CARDOSO, J. H. Hydroxyl group and vasorelaxant effects of perillyl alcohol, carveol, limonene on aorta smooth muscle of rats. *Molecules*, v. 23, n. 6, p. 1–13, 2018.

CHATTERJEE, A., CHATTERJEE, S., DAS, S., SAHA, A., CHATTOPADHYAY, S., BANDYOPADHYAY, S. K. Ellagic acid facilitates indomethacin-induced gastric ulcer healing via COX-2 up-regulation. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, v. 44, n. 7, p. 565–576, 2012.

CHAUHAN, A. K., KANG, S. C. Therapeutic potential and mechanism of thymol action against ethanol-induced gastric mucosal injury in rat model. *Alcohol*, v. 49, n. 7, p. 739–745, 2015.

CHO, J. H., CHOI, J. S., CHUN, S. W., LEE, S., HAN, K. J., KIM, H. M. The IL-1B Genetic Polymorphism Is Associated with Aspirin-Induced Peptic Ulcers in a Korean Ethnic Group. *Gut and Liver*, v. 10, n. 3, 2016.

CHOI, E. S., YOON, J. J., HAN, B. H., JEONG, D. H., LEE, Y. J., KANG, D. G., LEE, H. S. Ligustilide attenuates vascular inflammation and activates Nrf2/HO-1 induction and, NO synthesis in HUVECs. *Phytomedicine*, v. 38, p. 12–23, 2018.

CHRISTIANSON, D. W. Structural and Chemical Biology of Terpenoid Cyclases. *Chemical Reviews*, v. 117, n. 17, p. 11570–11648, 2017.

CLOMBURG, J. M., QIAN, S., TAN, Z., CHEONG, S., GONZALEZ, R. The isoprenoid alcohol pathway, a synthetic route for isoprenoid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 116, n. 26, p. 12810–12815, 2019.

CLYNE, M., MAY, F. E. B. The Interaction of Helicobacter pylori with TFF1 and Its Role in Mediating the Tropism of the Bacteria Within the Stomach. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 18, p. 4400, 2019.

COELHO, L. G. V., MARINHO, J. R., GENTA, R., et al. IVTH BRAZILIAN CONSENSUS CONFERENCE ON HELICOBACTER PYLORI INFECTION. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 55, n. 2, p. 97–121, 2018.

DA SILVA, F. V., DE BARROS FERNANDES, H., OLIVEIRA, I. S. et al. Beta-cyclodextrin enhanced gastroprotective effect of (−)-linalool, a monoterpenoid present in rosewood essential oil, in gastric lesion models. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, n. 389, v. 11, p. 1245–1251, 2016.

DACHA, S., RAZVI, M., MASSAAD, J., CAI, Q., WEHBI, M. Hypergastrinemia. *Gastroenterology Report*, v. 3, n. 3, p. 201–208, 2015.

DAVID, B., WOLFENDER, J. L., DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. *Phytochemistry Reviews*, v. 14, n. 2, p. 299–315, 2015.

DE ARAÚJO RODRIGUES, P., DE MORAIS, S. M., DE SOUZA, C. M., SILVA, A. R. A., DE ANDRADE, G. M., SILVA, M. G. V., ALBUQUERQUE, R. L., RAO, V. S., SANTOS, F. A. Gastroprotective effect of barbatusin and 3-beta-hydroxy-3-deoxibarbatusin, quinonoid diterpenes isolated from Plectranthus grandis, in ethanol-induced gastric lesions in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 127, n. 3, p. 725–730, 2010.

DE CARVALHO, K. I. M., BONAMIN, F., DOS SANTOS, R. C., PÉRICO, L. L., BESERRA, F. P., DE SOUSA, D. P., FILHO, J. M. B., DA ROCHA, L. R. M., HIRUMA-LIMA, C. A. Geraniol—a flavoring agent with multifunctional effects in protecting the gastric and duodenal mucosa. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 387, n. 4, p. 355–365, 2014.

DE OLINDA, T. M., LEMOS, T. L. G., MACHADO, L. L., RAO, V. S., SANTOS, F. A. Quebrachitol-induced gastroprotection against acute gastric lesions: Role of prostaglandins, nitric oxide and K⁺-ATP channels. *Phytomedicine*, v. 15, n. 5, p. 327–333, 2008.

DE SALES, I. R. P., FORMIGA, R. D. O., MACHADO, F. D. F., NASCIMENTO, R. F., PESSOA, M. M. B., BARROS, M. E. F. X., VIEIRA, G. C., GADELHA, F. A. A. F., MARINHO, A. F., BARBOSA FILHO, J. M., JÚNIOR, R. F. D. A., ANTUNES, A. A., BATISTA, L. M. Cytoprotective, antioxidant and anti-inflammatory mechanism related to antiulcer activity of *Cissampelos sympodialis* Eichl. in animal models. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 222, p. 190–200, 2018.

DE SOUZA, M. C., VIEIRA, A. J., BESERRA, F. P., PELLIZZON, C. H., NÓBREGA, R. H., ROZZA, A. L. Gastroprotective effect of limonene in rats: Influence on oxidative stress, inflammation and gene expression. *Phytomedicine*, v. 53, p. 37–42, 2019.

DIACONU, S., PREDESCU, A., MOLDOVEANU, A., POP, C. S., FIERBINTEANU-BRATICEVICI, C. Helicobacter pylori infection: old and new. *Journal of Medicine and Life*, v. 10, n. 2, p. 112–117, 2017.

DO CARMO, T. L. L., AZEVEDO, V. C., DE SIQUEIRA, P. R., GALVÃO, T. D., DOS SANTOS, F. A., DOS REIS MARTINEZ, C. B., APPOLONI, C. R., FERNANDES, M. N. Reactive oxygen species and other biochemical and morphological biomarkers in the gills and kidneys of the Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*, exposed to titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, n. 23, p. 22963–22976, 2018.

DO NASCIMENTO, R. F., DE OLIVEIRA FORMIGA, R., MACHADO, F. D. F., DE SALES, I. R. P., DE LIMA, G. M., ALVES JÚNIOR, E. B., VIEIRA, G. C., PEREIRA, R. F., DE ARAÚJO, A. A., DE ARAÚJO JUNIOR, R. F., BARBOSA FILHO, J. M., BATISTA, L. M. Rosmarinic acid prevents gastric ulcers via sulphydryl groups reinforcement, antioxidant and immunomodulatory effects. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 393, n. 12, p. 2265–2278, 2020.

DOSSETT, M. L., COHEN, E. M., COHEN, J. Integrative Medicine for Gastrointestinal Disease. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, v. 44, n. 2, p. 265–280, 2017.

DUMIC, I., NORDIN, T., JECMENICA, M., STOJKOVIC LALOSEVIC, M., MILOSAVLJEVIC, T., MILOVANOVIC, T. Gastrointestinal tract disorders in older age. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2019, 2019.

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*, v. 112, n. 4–29, 2016.

ECHEVERRIGARAY, S., ZACARIA, J., BELTRÃO, R. Nematicidal Activity of Monoterpenoids Against the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita*. *Phytopathology*, v. 100, n. 2, 199–203, 2010.

ECKL, P. M., BRESGEN, N. Genotoxicity of lipid oxidation compounds. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 111, p. 244–252, 2017.

EL ASBAHANI, A., MILADI, K., BADRI, W., SALA, M., ADDI, E. H. A., CASABIANCA, H., MOUSADIK, A. EL, HARTMANN, D., JILALE, A., RENAUD, F. N. R., ELAISSARI, A. Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 483, n. 1–2, p. 220–243, 2015.

ELSHAZLY, S. M., ABD EL MOTTELEB, D. M., IBRAHIM, I. A. A. E. H. Hesperidin protects against stress induced gastric ulcer through regulation of peroxisome proliferator activator receptor gamma in diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, v. 291, p. 153–161, 2018.

ESTERBAUER, H., CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* v. 186, p. 407–421, 1990.

FAGUNDES, F. L., PIFFER, G. DE M., PÉRICO, L. L., RODRIGUES, V. P., HIRUMA-LIMA, C. A., DOS SANTOS, R. DE C. Chrysin Modulates Genes Related to Inflammation, Tissue Remodeling, and Cell Proliferation in the Gastric Ulcer Healing. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 3, p. 760, 2020.

FANG, R., JIANG, C. H., WANG, X. Y., ZHANG, H. M., LIU, Z. L., ZHOU, L., DU, S. S., DENG, Z. W. Insecticidal Activity of Essential Oil of Carum Carvi Fruits from China and Its Main Components against Two Grain Storage Insects. *Molecules*, v. 15, n. 12, p. 9391–9402, 2010.

FAURE, P.; LAFOND, J. L. Measurement of plasma sulphhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In A. E. et al. FAVIER (Ed.), *Analysis of free radicals in biological systems*, p. 237–248, 1995.

FERNANDES, Y. C. F., DA BONATTO, G. R., BONATTO, M. W. Taxa de reinfecção por Helicobacter pylori em pacientes com úlcera péptica cinco anos após erradicação. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 53, n. 3, p. 152–155, 2016.

FRANCISQUETI-FERRON, F. V., FERRON, A. J. T., GARCIA, J. L., SILVA, C. C. V. DE A., COSTA, M. R., GREGOLIN, C. S., MORETO, F., FERREIRA, A. L. A., MINATEL, I. O., CORREA, C. R. Basic Concepts on the Role of Nuclear Factor Erythroid-Derived 2-Like 2 (Nrf2) in Age-Related Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 13, p. 3208, 2019.

FRANK, A., GROLL, M. The Methylerythritol Phosphate Pathway to Isoprenoids. *Chemical Reviews*, v. 117, n. 8, p. 5675–5703, 2017.

GARNOCK-JONES, K. P. Vonoprazan: First Global Approval. *Drugs*, v. 75, n. 4, p. 439–443, 2015.

GĘGOTEK, A., SKRZYDLEWSKA, E. Biological effect of protein modifications by lipid peroxidation products. *Chem Phys Lipids*. 221, 46–52, 2019.

GEYIKOGLU, F., YILMAZ, E. G., EROL, H. S., KOC, K., CERIG, S., OZEK, N. S., AYSIN, F. Hepatoprotective Role of Thymol in Drug-Induced Gastric Ulcer Model. *Annals of Hepatology*, v. 17, n. 6, p. 980–991, 2018.

GOMM, W., VON HOLT, K., THOMÉ, F., BROICH, K., MAIER, W., FINK, A., DOBLHAMMER, G., HAENISCH, B. Association of proton pump inhibitors with risk of dementia: A pharmacoepidemiological claims data analysis. *JAMA Neurology*, v. 73, n. 4, p. 410–416, 2016.

GRAVINA, A. G., ZAGARI, R. M., MUSIS, C. DE ROMANO, L., LOGUERCIO, C., ROMANO, M. Helicobacter pylori and extragastric diseases: A review. *World Journal of Gastroenterology*, v. 24, n. 29, p. 3204–3221, 2018.

GREENWOOD-VAN MEERVELD, B., JOHNSON, A. C., GRUNDY, D. Gastrointestinal Physiology and Function. *Handb Exp Pharmacol.* v. 239, p. 1-16, 2017.

GUAN, Q., ZHANG, J. Recent Advances: The Imbalance of Cytokines in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Mediators of Inflammation*, 2017, 2017.

GUO, J. Y., WHITE, E. Autophagy, metabolism, and cancer. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* v.81, p. 73–78, 2016.

GUIMARÃES, A. C., MEIRELES, L. M., LEMOS, M. F., GUIMARÃES, M. C. C., ENDRINGER, D. C., FRONZA, M., SCHERER, R. Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. *Molecules*, v. 24, n. 13, p. 1–12, 2019.

GUIMARÃES, A. G., SERAFINI, M. R., QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Terpenes and derivatives as a new perspective for pain treatment: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, v. 24, n. 3, p. 243–265, 2014.

GUPTA, A., CHAUHAN, N. R., CHOWDHURY, D., SINGH, A., MEENA, R. C., CHAKRABARTI, A., SINGH, S. B. Heat stress modulated gastrointestinal barrier dysfunction : role of tight junctions and heat shock proteins. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 1–5, 2017.

HAN, J., LEE, S. H., GIEBISCH, G., WANG, T. Potassium Channelopathies and Gastrointestinal Ulceration. *Gut and Liver*, v. 10, n. 6, p. 881–889, 2016.

HAYES, W. A., KRUGER, C. *Hayes principles and methods of toxicology*. CRC Press. 6^a ed., 2014.

HELGADOTTIR, H., BJORNSSON, E. S. Problems associated with deprescribing of proton pump inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 21, 2019.

HELGADÓTTIR, H., LUND, S. H., GIZURARSON, S., METZ, D. C., BJÖRNSSON, E. S. Predictors of Gastrin Elevation Following Proton Pump Inhibitor Therapy. *Journal of Clinical Gastroenterology*, v. 54, n. 3, p. 227–234, 2020.

HIROTA, R., ROGER, N. N., NAKAMURA, H., SONG, H.-S., SAWAMURA, M., SUGANUMA, N. Anti-inflammatory Effects of Limonene from Yuzu (*Citrus junos* Tanaka) Essential Oil on Eosinophils. *Journal of Food Science*, v. 75, n. 3, p. 87–92, 2010.

HOFFMANN, W. TFF2, a MUC6-binding lectin stabilizing the gastric mucus barrier and more (Review). *International Journal of Oncology*, v. 47, n. 3, p. 806–816, 2015.

HRITCU, L., BOIANGIU, R. S., DE MORAIS, M. C., DE SOUSA, D. P. (-)- cis -Carveol, a Natural Compound, Improves β -Amyloid-Peptide 1-42-Induced Memory Impairment and Oxidative Stress in the Rat Hippocampus. *BioMed Research International*, v. 2020, p. 1–9, 2020.

HUANG, H. B, JIANG, W., WANG, C. Y., QIN, H. Y., DU, B. Stress ulcer prophylaxis in intensive care unit patients receiving enteral nutrition: A systematic review and meta-analysis. *Critical Care*, v. 22, n. 1, p. 1–9, 2018.

HUH, C. W., KIM, B. W. Clinical significance of risk factors for asymptomatic peptic ulcer disease. *Clinical Endoscopy*, v. 50, n. 6, p. 514–515, 2017.

HWA, S., EUN, J., EUN, J., AH, H., BIN, W., HEE, Y., SONG, H., HWANG, D. Journal of Traditional and Complementary Medicine Anti-ulcer effect of Gallarhois extract with anti-oxidant activity in an ICR model of ethanol / hydrochloride acid-induced gastric injury. *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences*, v. 9, n. 4, p. 372–382, 2019.

JEE, H. Size dependent classification of heat shock proteins: a mini-review. *Journal of Exercise Rehabilitation*, v. 12, n. 4, p. 255–259, 2016.

JIN, C., KENNY, D. T., SKOOG, E. C., PADRA, M., ADAMCZYK, B., VITIZEVA, V., THORELL, A., VENKATAKRISHNAN, V., LINDÉN, S. K., KARLSSON, N. G. Structural Diversity of Human Gastric Mucin Glycans. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 16, n. 5, p. 743–758, 2017.

JOCA, H. C., CRUZ-MENDES, Y., OLIVEIRA-ABREU, K., MAIA-JOCA, R. P. M., BARBOSA, R., LEMOS, T. L., LACERDA BEIRÃO, P. S., LEAL-CARDOSO, J. H. Carvacrol Decreases Neuronal Excitability by Inhibition of Voltage-Gated Sodium Channels. *Journal of Natural Products*, v. 75, n. 9, p. 1511–1517, 2012.

KAKAGIA, D., PAPALOIS, A., LAMBROPOULOU, M., PAPACHRISTOU, F., TRYPSIANNIS, G., ANAGNOSTOPOULOS, C., PITIAKOUDIS, M. The Use of Pistacia Lentiscus Chia Resin versus Omeprazole in Protecting Male Rats Peptic Mucosa against Cold Restraint Stress. *J Crit Care Med (Targu Mures)*. v. 6, n. 2, p. 100–110, 2020.

KAMEYAMA, A., DONG, W., MATSUNO, Y. Chapter 33 Succinylation-Alcian Blue Staining of Mucins on Polyvinylidene Difluoride Membranes. *Methods Mol Biol.* v. 1314, p. 325–331, 2015.

KARAMPOUR, N. S., ARZI, A., REZAEI, A., PASHMFOROOOSH, M., & KORDI, F. Gastroprotective effect of zingerone on ethanol-induced gastric ulcers in rats. *Medicina (Lithuania)*, v. 55, n. 3, p. 1–9, 2019.

KAUR, N., CHAHAL, K. K., KUMAR, A., SINGH, R., BHARDWAJ, U. Antioxidant activity of Anethum graveolens L. essential oil constituents and their chemical analogues. *Journal of Food Biochemistry*, v. 43, n. 4, 2019.

KAWATA, J., KAMEDA, M., MIYAZAWA, M. Cyclooxygenase-2 inhibitory effects of monoterpenoids with a p-menthane skeleton. *Intern. J. Essent. Oil Therap.* v. 2, p. 145–148, 2008.

KAVITT, R. T., LIPOWSKA, A. M., ANYANE-YEBOA, A., GRALNEK, I. M. Diagnosis and Treatment of Peptic Ulcer Disease. *American Journal of Medicine*, v. 132, n. 4, p. 447–456, 2019.

KEMPENICH, J. W., SIRINEK, K. R.. Acid Peptic Disease. *Surgical Clinics of North America*, v. 98, n. 5, p. 933–944, 2018.

KENDALL, A. C., KEYS, A. J., TURNER, J. C., LEA, P. J., MIFLIN, B. J. The isolation and characterisation of a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare L.*). *Planta*, v. 159, n. 6), p. 505–511, 1983.

KENNEDY G. L., FERENZ R. L., B. B. A. Estimation of acute oral toxicity in rats by determination of the approximate lethal dose rather than the LD50. *Journal of Applied Toxicology*, v. 6, n. 3, p. 145–148, 1986.

KHAN, A. Q., NAFEES, S., SULTANA, S. Perillyl alcohol protects against ethanol induced acute liver injury in Wistar rats by inhibiting oxidative stress, NF κ -B activation and proinflammatory cytokine production. *Toxicology*, v. 279, n. 1–3, p. 108–114, 2011.

KHAN, A., WAQAR, K., SHAFIQUE, A., IRFAN, R., GUL, A. In Vitro and In Vivo Animal Models. In *Omics Technologies and Bio-Engineering*. Elsevier, p. 431–448, 2018.

KIM, T. H., SHIVDASANI, R. A. Stomach development, stem cells and disease. *Development (Cambridge)*, v. 143, n. 4, p. 554–565, 2016.

KIM, Y., PARK, H. J., KIM, H., SONG, J., LEE, D. Gastroprotective Effects of Paeonia Extract Mixture HT074 against Experimental Gastric Ulcers in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*, 17, 2019, 2019.

KIM, Y.W., KIM, M.J., CHUNG, B.Y., et al. Safety evaluation and risk assessment of d-Limonene. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.*, v. 16, n. 1, p. 17–38, 2013.

KITAY, A. M., LINK, A., GEIBEL, J. P. Activation of Secretagogue Independent Gastric Acid Secretion via Endothelial Nitric Oxide Synthase Stimulation in Rats. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 44, n. 4, 1606–1615, 2017.

KOC, K., CERIG, S., UCAR, S., COLAK, S., BAKIR, M., EROL, H. S., YILDIRIM, S., HOSSEINIGOUZDAGANI, M., SIMSEK OZEK, N., AYSIN, F., FEHIM KOCPINAR, E., BUDAK, H., GEYIKOGLU, F. Gastroprotective effects of oleuropein and thymol on indomethacin-induced gastric ulcer in Sprague-Dawley rats. *Drug and Chemical Toxicology*, p. 1–13, 2018.

KOUNTOURAS, J., BOZIKI, M., POLYZOS, S. A., KATSINELOS, P., GAVALAS, E., ZEGLINAS, C., TZIVRAS, D., ROMIPOULOS, I., GIORGAKIS, N., ANASTASIADOU, K., VARDAKA, E., KOUNTOURAS, C., KAZAKOS, E., XIROMERISIOU, G., DARDIOTIS, E., DERETZI, G. Impact of reactive oxygen species generation on Helicobacter pylori-related extragastric diseases: a hypothesis. *Free Radical Research*, v. 51, n. 1, p. 73–79, 2017.

KRAWISZ, J. E., SHARON, P., STENSON, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology*, v. 87, n. 6, p. 1344–1350, 1984.

KUNA, L., JAKAB, J., SMOLIC, R., RAGUZ-LUCIC, N., VCEV, A., SMOLIC, M. Peptic Ulcer Disease: A Brief Review of Conventional Therapy and Herbal Treatment Options. *Journal of Clinical Medicine*, v. 8, n. 2, p. 179, 2019.

KWIECIEŃ, S., MAGIEROWSKA, K., ŚLIWOWSKI, Z., WÓJCIK, D., MAGIEROWSKI, M., BRZOZOWSKI, T. New insight into the mechanisms of gastroduodenal injury induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: practical implications. *Polish Archives of Internal Medicine*, v. 125, n. 3, p. 191–198, 2015.

LANAS, A. We Are Using Too Many PPIs, and We Need to Stop: A European Perspective. *American Journal of Gastroenterology*, v. 111, n. 8, p. 1085–1086, 2016.

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

LEHOURS, P., FERRERO, R. L. Review: Helicobacter: Inflammation, immunology, and vaccines. *Helicobacter*, 24(S1), 2019.

LEVINE, R. J. A method for rapid production of stress ulcers in rats. In C. J. PFEIFFER. (Ed.), *Peptic Ulcer* (pp. 92–97), 1971.

LI, Q., HU, X., XUAN, Y., YING, J., FEI, Y., RONG, J., ZHANG, Y., ZHANG, J., LIU, C., LIU, Z. Kaempferol protects ethanol-induced gastric ulcers in mice via pro-inflammatory cytokines and NO. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, v. 50, n. 3, p. 246–253, 2018.

LI, S., LEI, Y., CHEN, J. D. Z. Roles of ATP sensitive potassium channel in modulating gastric tone and accommodation in dogs. *Scand J Gastroenterol.* v. 52, n. 5, p. 515–522, 2017.

LIANG, J., DOU, Y., WU, X., LI, H., WU, J., HUANG, Q., LUO, D., YI, T., LIU, Y., SU, Z., CHEN, J. Prophylactic efficacy of patchoulene epoxide against ethanol-induced gastric ulcer in rats: Influence on oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Chemico-Biological Interactions*, v. 283, p. 30–37, 2018.

LIJU, V. B., JEENA, K., KUTTAN, R. Gastroprotective activity of essential oils from turmeric and ginger. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, v. 26, n. 1, 2015.

LIN, H., SHEU, S., SHEEN, L., SHEU, P., CHIANG, W., KUO, T. Journal of Traditional and Complementary Medicine The gastroprotective effect of the foxtail millet and adlay processing product against stress-induced gastric mucosal lesions in rats. *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences*, v. 10, n. 4, p. 336–344, 2020.

LIU, J., WANG, J., SHI, Y., SU, W., CHEN, J., ZHANG, Z., WANG, G., WANG, F. Short Chain Fatty Acid Acetate Protects against Ethanol-Induced Acute Gastric Mucosal Lesion in Mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 40, n. 9, p. 1439–1446, 2017.

LIU, P., LIU, X.C., DONG, H.W. et al. Chemical Composition and Insecticidal Activity of the Essential Oil of *Illicium pachyphyllum* Fruits against Two Grain Storage Insects. *Molecules*, v. 17, n. 12, p. 14870–14881, 2012.

LIU, W., SHANG, P., LIU, T., XU, H., REN, D., ZHOU, W., WEN, A., DING, Y. Gastroprotective effects of chebulagic acid against ethanol-induced gastric injury in rats. *Chemico-Biological Interactions*, v. 278, p. 1–8, 2017.

LOREN, L. Upper gastrointestinal bleeding due to a peptic ulcer. *New England Journal of Medicine*, v. 374, n. 24, p. 2367–2376, 2016.

LOZON, Y., SULTAN, A., LANSDELL, S. J., PRYTKOVA, T., SADEK, B., YANG, K. H. S., HOWARTH, F. C., MILLAR, N. S., OZ, M. Inhibition of human α 7 nicotinic acetylcholine receptors by cyclic monoterpenes carveol. *European Journal of Pharmacology*, v. 776, p. 44–51, 2016.

MAGALHÃES, A., ROSSEZ, Y., ROBBE-MASSELOT, C., MAES, E., GOMES, J., SHEVTSOVA, A., BUGAYTSOVA, J., BORÉN, T., REIS, C. A. Muc5ac gastric mucin glycosylation is shaped by FUT2 activity and functionally impacts Helicobacter pylori binding. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, 2016.

MAGIEROWSKI, M., MAGIEROWSKA, K., HUBALEWSKA-MAZGAJ, M., SLIWOWSKI, Z., PAJDO, R., GINTER, G., KWIECIEN, S., BRZOZOWSKI, T., NAGAHARA, N., WROBEL, M. Exogenous and endogenous hydrogen sulfide protects gastric mucosa against the formation and time-dependent development of ischemia/reperfusion-induced acute lesions progressing into deeper ulcerations. *Molecules*, v. 22, n. 2, p. 1–16, 2017.

MAGIEROWSKA, K., WOJCIK, D., CHMURA, A., BAKALARZ, D., WIERDAK, M., KWIECIEN, S., SLIWOWSKI, Z., BRZOZOWSKI, T., MAGIEROWSKI, M. Alterations in Gastric Mucosal Expression of Calcitonin Gene-Related Peptides, Vanilloid Receptors, and Heme Oxygenase-1 Mediate Gastroprotective Action of Carbon Monoxide against Ethanol-Induced Gastric Mucosal Lesions. *Int J Mol Sci.* v. 28;19, n. 10, p. 2960, 2018.

MALFERTHEINER, P., MEGRAUD, F., O'MORAIN, C. A., GISBERT, J. P., KUIPERS, E. J., AXON, A. T., BAZZOLI, F., GASBARRINI, A., ATHERTON, J., GRAHAM, D. Y., HUNT, R., MOAYYEDI, P., ROKKAS, T., RUGGE, M., SELGRAD, M., SUERBAUM, S., SUGANO, K., EL-OMAR, E. M. Management of Helicobacter pylori infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut*, v. 66, n. 1, p. 6–30, 2017.

MALFERTHEINER, PETER, SCHULZ, C. Peptic Ulcer: Chapter Closed? *Digestive Diseases*, v. 38, n. 2, p. 112–116, 2020.

MALIK I, et al. Potent Natural Antioxidant Carveol Attenuates MCAO-Stress Induced Oxidative, Neurodegeneration by Regulating the Nrf-2 Pathway. *Front Neurosci.* v. 26, n. 14, p. 659, 2020.

MANTOVANI, A., DINARELLO, C. A., MOLGORA, M., GARLANDA, C. Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. *Immunity*. v. 50, n. 4, p. 778–795, 2020.

MARCELLO, L. S., MARIA, I., WERNER, F. D. P., & CIPRIANI, T. R. Gastroprotective effect and chemical characterization of a polysaccharide fraction from leaves of Croton cajucara Benth. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016.

MARQUES, F. M., FIGUEIRA, M. M., SCHMITT, E. F. P., KONDRTATYUK, T. P., ENDRINGER, D. C., SCHERER, R., FRONZA, M. In vitro anti-inflammatory activity of terpenes via suppression of superoxide and nitric oxide generation and the NF-κB signalling pathway. *Inflammopharmacology*, v. 27, n. 2, p. 281–289, 2019.

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

MCDONALD, S. W., MACFARLANE, N. G. The mouth, stomach and intestines. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, v. 19, n. 3, p. 128–132, 2018.

MINOZZO, B. R., LEMES, B. M., JUSTO, A. DA S., LARA, J. E., PETRY, V. E. K., FERNANDES, D., BELLÓ, C., VELLOSA, J. C. R., CAMPAGNOLI, E. B., NUNES, O. C., KITAGAWA, R. R., AVULA, B., KHAN, I. A., BELTRAME, F. L. Anti-ulcer mechanisms of polyphenols extract of Euphorbia umbellata (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 191, p. 29–40, 2016.

MOLLAZADEH, H., CICERO, A. F. G., BLESSO, C. N., PIRRO, M., MAJEED, M., SAHEBKAR, A. Immune modulation by curcumin: The role of interleukin-10. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 59, n. 1, p. 89–101, 2019.

MONTENEGRO, I., MELLADO, M., RUSSO, A., SAID, B., BESOAIN, X., GODOY, P., WERNER, E., CARO, N., MADRID, A. Carveoylphenols and their antifungal potential against pathogenic yeasts. *Antibiotics*, v. 8, n. 4, p. 1–12, 2019.

MORAES, T. M., ROZZA, A. L., KUSHIMA, H., PELLIZZON, C. H., ROCHA, L. R. M., & HIRUMA-LIMA, C. A. Healing Actions of Essential Oils from Citrus aurantium and d-Limonene in the Gastric Mucosa: The Roles of VEGF, PCNA, and COX-2 in Cell Proliferation. *Journal of Medicinal Food*, v. 16, n. 12, p. 1162–1167, 2013.

MORIMOTO, Y., SHIMOHARA, K., OSHIMA, S., SUKAMOTO, T. Effects of the New Anti-Ulcer Agent KB-5492 on Experimental Gastric Mucosal Lesions and Gastric Mucosal Defensive Factors, as Compared to Those of Teprenone and Cimetidine. *The Japanese Journal of Pharmacology*, v. 57, n. 4, p. 495–505, 1991.

MORIS, D., SPARTALIS, M., TZATZAKI, E., SPARTALIS, E., KARACHALIOU, G.-S., TRIANTAFYLLOIS, A. S., KARAOLANIS, G. I., TSILIMIGRAS, D. I., THEOCHARIS, S. The role of reactive oxygen species in myocardial redox signaling and regulation. *Annals of Translational Medicine*, v. 5, n. 16, p. 324–324, 2017.

MOUSA, A. M., EL-SAMMAD, N. M., HASSAN, S. K., MADBOLI, A. E. N. A., HASHIM, A. N., MOUSTAFA, E. S., BAKRY, S. M., ELSAYED, E. A. Antiulcerogenic effect of Cuphea ignea extract against ethanol-induced gastric ulcer in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 19, n. 1, p. 1–13, 2019.

MOUSTAFA, Y. M., EL-AZAB, M. F., FOUDA, A. 15-PGDH inhibitors: The antiulcer effects of carbenoxolone, pioglitazone and verapamil in indomethacin induced peptic ulcer rats. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v. 17, n. 15, p. 2000–2009, 2013.

NAMULEMA, J., NANSUNGA, M., KATO, C. D., KALANGE, M., OLALEYE, S. B. Thyroid hormones increase stomach goblet cell numbers and mucin expression during indomethacin induced ulcer healing in Wistar rats. *Thyroid Research*, v. 11, n. 1, p. 6, 2018.

NARAYANANKUTTY, A., JOB, J. T., NARAYANANKUTTY, V. Glutathione, an Antioxidant Tripeptide: Dual Roles in Carcinogenesis and Chemoprevention. *Current Protein & Peptide Science*, v. 20, n. 9, p. 907–917, 2019.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

NIV, Y. Mucin gene expression in the intestine of ulcerative colitis patients. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, v. 28, n. 11, p. 1241–1245, 2016.

OECD. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic. *OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS*, 2001.

OKSUZ, E., ATALAR, F., TANIRVERDI, G., BILIR, A., SHAHZADI, A., YAZICI, Z. Therapeutic potential of cyclooxygenase-3 inhibitors in the management of glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology*, v. 126, n. 2, p. 271–278, 2016.

OLIVEIRA, A. F., CARVALHO, J. R., COSTA, M. F. S., LOBATO, L. C. P., SILVA, R. S., SCHRAMM, J. M.A. Estimativa da prevalência e da mortalidade por complicações da úlcera péptica, Brasil, 2008: uma proposta metodológica. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 24, n. 1, p. 383–394, 2015.

OLIVEIRA, I. S., DA SILVA, F. V., VIANA, A. F. S. C., DOS SANTOS, M. R. V., QUINTANS-JÚNIOR, L. J., MARTINS, M. DO C. C., NUNES, P. H. M., OLIVEIRA, F. DE A., OLIVEIRA, R. DE C. M. Gastroprotective activity of carvacrol on experimentally induced gastric lesions in rodents. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 385, n. 9, p. 899–908, 2012.

OMOLO, M. O., OKINYO, D., NDIEGE, I. O., LWANDE, W., HASSANALI, A. Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. *Phytochemistry*, v. 65, n. 20, p. 2797–2802, 2004.

OPPONG, P., MAJUMDAR, D., ATHERTON, J., BEBB, J. Helicobacter pylori infection and peptic ulcers. *Medicine*, v. 43, n. 4, p. 215–222, 2015.

OUYANG, Y., PENG, Y., LI, J., HOLMGREN, A., LU, J. Modulation of thiol-dependent redox system by metal ions via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Metalomics*, v. 10, n. 2, p. 218–228, 2018.

PANDYA, H. B., AGRAVAT, H. H., PATEL, J. S. Prevalence of specific helicobacter pylori CagA, VacA, IceA, UreC genotypes and its clinical relevance in the patients with acid-peptic diseases. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 11, n. 8, p. 23–26, 2017.

PEATE, I. The gastrointestinal system. *British Journal of Healthcare Assistants*, v. 12, n. 3, p. 110–115, 2018.

PATTERSON, A. D. et al. Disruption of thioredoxin reductase 1 protects mice from acute acetaminophen-induced hepatotoxicity through enhanced NRF2 activity. *Chem. Res. Toxicol.* v. 26, p. 1088–1096, 2013.

PÉREZ, S., TALÉNS-VISCONTI, R., RIUS-PÉREZ, S., FINAMOR, I., SASTRE, J. Redox signaling in the gastrointestinal tract. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 104, p. 75–103, 2017.

PÉRICO, L. L., EMÍLIO-SILVA, M. T., OHARA, R., RODRIGUES, V. P., BUENO, G., BARBOSA-FILHO, J. M., DA ROCHA, L. R. M., BATISTA, L. M., HIRUMA-LIMA, C. A. Systematic analysis of monoterpenes: Advances and challenges in the treatment of peptic ulcer diseases. *Biomolecules*, v. 10, n. 2, 2020.

PINHEIRO, M. A., MAGALHÃES, R., TORRES, D., CAVALCANTE, R., MOTA, F. X., OLIVEIRA COELHO, E. A., MOREIRA, H., LIMA, G., DA COSTA ARAÚJO, P., CARDOSO, J. L., DE SOUZA, A. C., DINIZ, L. L. Gastroprotective effect of alpha-pinene and its correlation with antiulcerogenic activity of essential oils obtained from *Hyptis* species. *Pharmacognosy Magazine*, v. 11, n. 41, p. 123, 2015.

PISOSCHI, A. M., POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 97, n. 55–74, 2015.

PRIETO-MARTÍNEZ, F. D., NORINDER, U., MEDINA-FRANCO, J. L. Cheminformatics Explorations of Natural Products. *Prog Chem Org Nat Prod.* v. 110, p. 1-35, 2019.

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. *Arzneimittel-Forschung*, v. 47, p. 568–572, 1997.

RAFATULLAH, S., TARIQ, M., AL-YAHYA, M. A., MOSSA, J. S., AGEEL, A. M. Evaluation of turmeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 29, n. 1, p. 25–34, 1990.

RAJAKRISHNAN, R., ALFARHAN, A. H., AL-ANSARI, A. M., LEKSHMI, R., SREELAKSHMI, R., BENIL, P. B., KIM, Y., TACK, J., NA, S. W., KIM, H. Therapeutic efficacy of the root tubers of *Aconitum heterophyllum* and its substitute *Cyperus rotundus* in the amelioration of pylorus ligation induced ulcerogenic and oxidative damage in rats. *Saudi Journal*

of Biological Sciences., v. 27, p. 1124–1129, 2020.

RAHMAN, Z.U et al. Carveol a Naturally-Derived Potent and Emerging Nrf2 Activator Protects Against Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity. *Front Pharmacol.* v. 28, n.11, p. 621538, 2021.

RAO, T., TAN, Z., PENG, J., GUO, Y., CHEN, Y., ZHOU, H., OUYANG, D. The pharmacogenetics of natural products: A pharmacokinetic and pharmacodynamic perspective. *Pharmacological Research*, v. 146, 2019.

RAU, W., HOHAUS, C., JESSEN, E. A Differential Approach to Form and Site of Peptic Ulcer. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–21, 2019.

REYES CHACÓN, J. A., GUZMÁN GUERRERO, K. V., PACHECO TIGSELEMA, R. E., PAZMIÑO QUIRÓS, G. F., MORALES ÑACATO, E. J., ESCALANTE VANONI, L. S. Susceptibilidad antibiótica de Helicobacter pylori: un estudio de prevalencia en pacientes con dispepsia en Quito-Ecuador. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, v. 32, n. 4, p. 305, 2017.

RIBEIRO, A. R. S., DINIZ, P. B. F., PINHEIRO, M. S., ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C., THOMAZZI, S. M. Gastroprotective effects of thymol on acute and chronic ulcers in rats: The role of prostaglandins, ATP-sensitive K⁺ channels, and gastric mucus secretion. *Chemico-Biological Interactions*, v. 244, p. 121–128, 2016.

RIBEIRO, A. R. S., DO NASCIMENTO VALENÇA, J. D., DA SILVA SANTOS, J., BOEING, T., DA SILVA, L. M., DE ANDRADE, S. F., ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C., THOMAZZI, S. M. The effects of baicalein on gastric mucosal ulcerations in mice: Protective pathways and anti-secretory mechanisms. *Chemico-Biological Interactions*, v. 260, p. 33–41, 2016.

ROCHA CALDAS, G. F., OLIVEIRA, A. R. DA S., ARAÚJO, A. V., LAFAYETTE, S. S. L., ALBUQUERQUE, G. S., SILVA-NETO, J. DA C., COSTA-SILVA, J. H., FERREIRA, F., COSTA, J. G. M. DA, WANDERLEY, A. G. Gastroprotective Mechanisms of the Monoterpene 1,8-Cineole (Eucalyptol). *PLOS ONE*, v. 10, n. 8, 2015.

ROCHA, N. F. M., OLIVEIRA, G. V., ARAÚJO, F. Y. R., RIOS, E. R. V., CARVALHO, A. M. R., VASCONCELOS, L. F., MACÊDO, D. S., SOARES, P. M. G., SOUSA, D. P., SOUSA, F. C. F. (-)- α -Bisabolol-induced gastroprotection is associated with reduction in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity and neutrophil migration. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 44, n. 4, p. 455–461, 2011.

ROOSTAEE, A., BENOIT, Y. D., BOUDJADI, S., BEAULIEU, S. O. I. S. Epigenetics in Intestinal Epithelial Cell Renewal. *J Cell Physiol*. v. 231, n. 11, p. 2361–2367, 2016.

ROSE-JOHNS, S. Interleukin-6 family cytokines. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 10, n. 2, p. 1–17, 2018.

ROZZA, A.L., HIRUMA-LIMA, C. A., TAKAHIRA, R. K., PADOVANI, C. R., PELLIZZON, C. H. Effect of menthol in experimentally induced ulcers: Pathways of gastroprotection. *Chemico-Biological Interactions*, v. 206, n. 2, p. 272–278, 2013.

ROZZA, A. L., MEIRA DE FARIA, F., SOUZA BRITO, A. R., PELLIZZON, C. H. The gastroprotective effect of menthol: Involvement of anti-apoptotic, antioxidant and anti-inflammatory activities. *PLoS ONE*, v. 9, n. 1, p. 1–6, 2014.

ROZZA, A. L. MORAES, T. M., KUSHIMA, H., TANIMOTO, A., MARQUES, M. O. M., BAUAB, T. M., HIRUMA-LIMA, C. A., PELLIZZON, C. H. Gastroprotective mechanisms of Citrus lemon (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and β -pinene: Involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E. *Chemico-Biological Interactions*, v. 189, n. 1–2, p. 82–89, 2011.

ROZZA, A.L., MORAES, T.M., KUSHIMA, H. Involvement of Glutathione, Sulfhydryl Compounds, Nitric Oxide, Vasoactive Intestinal Peptide, and Heat-Shock Protein-70 in the Gastroprotective Mechanism of Croton cajucara Benth. (Euphorbiaceae) Essential Oil. *Journal of Medicinal Food*. v. 14, n. 9, p. 1011-1017, 2011.

SACHAN, A. K., DAS, D. R., KUMAR, M. Carum carvi-An important medicinal plant. *J. Chem. Pharm. Res.* v. 8, p. 529–533, 2016.

SAHOO, N., GU, M., ZHANG, X., RAVAL, N., YANG, J., CALVO, R., PATNAIK, S., WANG, W., KING, G., GAO, Q., SAHOO, S., SUNDARESAN, S., KEELEY, T. M., MARUGAN, J., FERRER, M., SAMUELSON, L. C., MERCHANT, J. L. Gastric Acid Secretion from Parietal Cells Is Mediated by a Ca²⁺ Efflux Channel in the Tubulovesicle. *Developmental Cell*. v. 41, n. 3, p. 262–273, 2018.

SAŁAGA, M., MOSIŃSKA, P. Pharmacological Treatment of Peptic Ulcer Disease. In *Introduction to Gastrointestinal Diseases Vol. 2* (pp. 39–51). Springer International Publishing, 2017.

SALEEM, M., HUSSAIN, D., GHOUSE, G., ABBAS, M., FISHER, S. W. Monitoring of insecticide resistance in Spodoptera litura (Lepidoptera: Noctuidae) from four districts of Punjab, Pakistan to conventional and new chemistry insecticides. *Crop Protection*, v. 79, p. 177–184, 2016.

SARRI, G. L., GRIGG, S. E., YEOMANS, N. D. Helicobacter pylori and low-dose aspirin ulcer risk: A meta-analysis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v. 34, n. 3, 517–525, 2019.

SASIDHARAN, S., KWAN, Y., LATHA, L., RAJEH, M. A., ZAKARIA, Z., JOTHY, S. Acute toxicity impacts of Euphorbia hirta L extract on behavior, organs body weight index and histopathology of organs of the mice and Artemia salina. *Pharmacognosy Research*, v. 4, n. 3, p. 170, 2012.

SAUER, J. M., MERCHANT, H. A. Physiology of the Gastrointestinal System. In *Comprehensive Toxicology: Third Edition* (Third Edit, Vols. 3–15). Elsevier, 2018.

SEPULVEDA, B., QUISPE, C., SIMIRGIOTIS, M., TORRES-BENÍTEZ, A., REYES-ORTÍZ, J., ARECHE, C., GARCÍA-BELTRÁN, O. Gastroprotective activity of synthetic coumarins: Role of endogenous prostaglandins, nitric oxide, non-protein sulfhydryls and vanilloid receptors. *Bioorg Med Chem Lett*. v. 1;26, n. 23, p. 5732-5735, 2016.

SCALLY, B., EMBERSON, J. R., SPATA, E., REITH, C., DAVIES, K., HALLS, H., HOLLAND, L., WILSON, K., BHALA, N., HAWKEY, C., HOCHBERG, M., HUNT, R., LAINE, L., LANAS, A., PATRONO, C., BAIGENT, C. Effects of gastroprotectant drugs for the prevention and treatment of peptic ulcer disease and its complications: a meta-analysis of randomised trials. *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*, v. 3, n. 4, p. 231–241, 2018.

SCHNEIDER, A., FEUSSNER, H. Anatomy, Physiology, and Selected Pathologies of the Gastrointestinal Tract. *Biomedical Engineering in Gastrointestinal Surgery*, 11–39, 2017.

SCHUBERT, M. L. Gastric acid secretion. *Current Opinion in Gastroenterology*, v. 32, n. 6, p. 452–460, 2016.

SHAMES, B. Anatomy and Physiology of the Duodenum. In *Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, 2 Volume Set* (Eighth Edi). Elsevier Inc, 2019.

SHARMA, V., KATIYAR, A., AGRAWAL, R. C. *Glycyrrhiza glabra: Chemistry and Pharmacological Activity*. In: Mérillon JM., Ramawat K. (eds) Sweeteners. Reference Series in Phytochemistry. Springer, Cham. 87–100, 2018.

SHAY, H. et al. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterology*, v. 5, p. 46–61, 1945.

SHEN, F., ZHAO, C. S., SHEN, M. F., WANG, Z., CHEN, G. The role of hydrogen sulfide in gastric mucosal damage. *Medical Gas Research*, v. 9, n. 2, p. 88–92, 2019.

SIERRA, D., WOOD, M., KOLLI, S., FELIPEZ, L. M. Pediatric gastritis, gastropathy, and peptic ulcer disease. *Pediatrics in Review*, v. 39, n. 11, p. 542–549, 2018.

SIES, H. (2015). Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, v. 4, p. 180–183, 2015.

SIES, H., JONES, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2020.

SIKIRIĆ, P., SEIWERTH, S., GRABAREVIĆ, Ž., et al. The influence of a novel pentadecapeptide, BPC 157, on NG-nitro-l-arginine methylester and l-arginine effects on stomach mucosa integrity and blood pressure. *European Journal of Pharmacology*, v. 332, n. 1, p. 23–33, 1997.

SILVA, R. et al. Alendronate induces gastric damage by reducing nitric oxide synthase expression and NO/cGMP/KATP signaling pathway. *Nitric Oxide*, v. 40, p. 22–30, 2014.

SØREIDE, K., THORSEN, K., HARRISON, E. M., BINGENER, J., MØLLER, M. H., OHENE-YEBOAH, M., & ARNE SØREIDE, J. Perforated peptic ulcer. HHS Public Access. *Lancet*, 386(10000), 1288–1298, 2015.

STEPHEN, A. O., JAMES, O., IKOOJO, E. R., SUNDAY, A. O. Effects of Selenium Treatment on Healing of Acetic Acid Induced Gastric Ulcer in Albino Wistar Rats. *American Journal of Biomedical Research*, v. 4, n. 1, p. 18–22, 2016.

STEPHEN, B., HULLEY, S.R., CUMMINGS, W.S., BROWNER, D.G., GRADY, T. B. N. *Delineando a pesquisa clínica* (4 ed.). ARTMED. 2019.

SUN, Y., OBERLEY, L.W., LI, Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*. v. 34, n. 3, p. 497-500, 1988.

SVERDÉN, E., BRUSSELAERS, N., WAHLIN, K., LAGERGREN, J. Time latencies of Helicobacter pylori eradication after peptic ulcer and risk of recurrent ulcer, ulcer adverse events, and gastric cancer: a population-based cohort study. *Gastrointestinal Endoscopy*, v. 88, n. 2, p. 242-250, 2018.

SZABO, S., YOSHIDA, M., FILAKOVSKY, J., JUHASZ, G. "Stress" is 80 Years Old: From Hans Selye Original Paper in 1936 to Recent Advances in GI Ulceration. *Current Pharmaceutical Design*, v. 23, n. 27, 2017.

SZELENYI, I., THIEMER, K. Distention ulcer as a model for testing of drugs for ulcerogenic side effects. *Archives of Toxicology*, v. 41, n. 1, p. 99–105, 1978.

TARNAWSKI, S. A., AHLUWALIA, A. Molecular Mechanisms of Epithelial Regeneration and Neovascularization During Healing of Gastric and Esophageal Ulcers. *Current Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 1, p. 16–27, 2012.

TAKAHASHI, M., KATAYAMA, Y. Reversal of the tolerance phenomenon by the intermittent administration of a histamine H₂-receptor antagonist. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v. 25, n. 9, p. 1493–1497, 2010.

TAKEUCHI, K., AMAGASE, K. Roles of Cyclooxygenase, Prostaglandin E2 and EP Receptors in Mucosal Protection and Ulcer Healing in the Gastrointestinal Tract. *Current Pharmaceutical Design*, v. 24, n. 18, p. 2002–2011, 2018.

TAN, P. V., MEZUI, C., ENOW-OROCK, G., NJIKAM, N., DIMO, T., BITOLOG, P. Teratogenic effects, acute and sub chronic toxicity of the leaf aqueous extract of Ocimum suave Wild (Lamiaceae) in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 115, n. 2, p. 232–237, 2008.

TARNAWSKI, A., AHLUWALIA, A., K. JONES, M. Gastric Cytoprotection Beyond Prostaglandins: Cellular and Molecular Mechanisms of Gastroprotective and Ulcer Healing Actions of Antacids. *Current Pharmaceutical Design*, v. 19, n. 1, p. 126–132, 2012.

TETALI, S. D. Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. *Planta*, v. 249, n. 1, p. 1–8, 2019.

THORSEN, K., SØREIDE, J. A., KVALØY, J. T., GLOMSAKER, T., SØREIDE, K. Epidemiology of perforated peptic ulcer: Age- and genderadjusted analysis of incidence and mortality. *World Journal of Gastroenterology*, v. 19, n. 3, p. 347–354, 2013.

TRAN-DUY, A., SPAETGENS, B., HOES, A. W., DE WIT, N. J., STEHOUWER, C. D. A. Use of Proton Pump Inhibitors and Risks of Fundic Gland Polyps and Gastric Cancer: Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, v. 14, n. 12, p. 1706–1719, 2016.

VENKATESAN, N., RAMANATHAN, M. Preclinical Toxicity Studies-Tool of Drug Discovery. *Pharmacovigilance and Pharmacoeconomics*, 1–7, 2017.

VENZON, L., MARIANO, L. N. B., SOMENSI, L. B., BOEING, T., DE SOUZA, P., WAGNER, T. M., ANDRADE, S. F. DE, NESELLO, L. A. N., DA SILVA, L. M. Essential oil of Cymbopogon citratus (lemongrass) and geraniol, but not citral, promote gastric healing activity in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 98, p. 118–124, 2018.

VIANA, A. F. S. C., DA SILVA, F. V., FERNANDES, H. B., OLIVEIRA, I. S., BRAGA, M. A., NUNES, P. I. G., VIANA, D.A., DE SOUSA, D. P., RAO, V. S., OLIVEIRA, R. C. M., ALMEIDA SANTOS, F. Gastroprotective effect of (-)-myrtenol against ethanol-induced acute gastric lesions: possible mechanisms. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 68, n. 8, p. 1085–1092, 2016.

VOULGARIS, T., KARAGIANNAKIS, D., SIAKAVELLAS, S., KALOGERA, D., ANGELOPOULOS, T., CHLOUPI, E., KARAMANOLIS, G., PAPATHEODORIDIS, G., VLACHOGIANNAKOS, J. High prevalence of asymptomatic peptic ulcers diagnosed during screening endoscopy in patients with cirrhosis. *Annals of Gastroenterology*, v. 32, n. 5, p. 451–456, 2019.

WAGNER, K.H., ELMADFA, I. Biological Relevance of Terpenoids. *Annals of Nutrition and Metabolism*, v. 47, n. 3–4, p. 95–106, 2003.

WALDUM, H. L., HAUSO, Ø., BRENNA, E., QVIGSTAD, G., FOSSMARK, R. Does long-term profound inhibition of gastric acid secretion increase the risk of ECL cell-derived tumors in man? *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, v. 51, n. 7, p. 767–773, 2016.

WALDUM, H. L., REHFELD, J. F. Gastric cancer and gastrin: on the interaction of Helicobacter pylori gastritis and acid inhibitory induced hypergastrinemia. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, v. 54, n. 9, p. 1118–1123, 2019.

WALDUM, H. L., SØRDAL, Ø. F., MJØNES, P. G. The enterochromaffin-like [ECL] cell—central in gastric physiology and pathology. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 10, 2019.

WALLACE, J. L. Nitric oxide in the gastrointestinal tract: opportunities for drug development. *British Journal of Pharmacology*, v. 176, n. 2, p. 147–154, 2019.

WANG, Y.K. Diagnosis of Helicobacter pylori infection: Current options and developments. *World Journal of Gastroenterology*, v. 21, n. 40, p. 11221, 2015.

WANG, Z., LUO, H., XIA, H. Theaflavins attenuate ethanol-induced oxidative stress and cell apoptosis in gastric mucosa epithelial cells via downregulation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Molecular Medicine Reports*, 2018.

WILSON, R., STEVENSON, C. Anatomy and physiology of the stomach - Canadian Cancer Society. In *Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, 2 Volume Set* (Eighth Edi). Elsevier Inc, 2017.

WOJTUNIK-KULESZA, K. A., KASPRZAK, K., ONISZCZUK, T., ONISZCZUK, A. Natural Monoterpenes: Much More than Only a Scent. *Chemistry & Biodiversity*, v. 16, n. 12, 2019.

XIE, W., HUANG, X., CHEN, R., CHEN, R., LI, T., WU, W., HUANG, Z. Esomeprazole alleviates the damage to stress ulcer in rats through not only its antisecretory effect but its antioxidant effect by inactivating the p38 MAPK and NF-κB signaling pathways. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 13, p. 2969–2984, 2019.

XIONG, J., WANG, K., YUAN, C., XING, R., NI, J., HU, G., CHEN, F., WANG, X. Luteolin protects mice from severe acute pancreatitis by exerting HO-1-mediated anti-inflammatory and antioxidant effects. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 39, n. 1, p. 113–125, 2017.

YANDRAPU, H., SAROSIEK, J. Protective Factors of the Gastric and Duodenal Mucosa: An Overview. *Current Gastroenterology Reports*, v. 17, n. 6, p. 1–8, 2015.

YANG, X., LI, Y., SUN, Y., ZHANG, M., GUO, C., MIRZA, I. A., LI, Y. Q. Vonoprazan: A Novel and Potent Alternative in the Treatment of Acid-Related Diseases. *Digestive Diseases and Sciences*, v. 63, n. 2, p. 302–311, 2018.

YAO H, et al. Andrographolide attenuates imbalance of gastric vascular homeostasis induced by ethanol through glycolysis pathway. *Sci Rep.* v.9, n.1, p. 4968, 2019.

YAZDI, A. S., GHORESCHI, K. The Interleukin-1 Family. In: Ma X. (eds) Regulation of Cytokine Gene Expression in Immunity and Diseases. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 941. Springer, Dordrecht (pp. 21–29), 2016.

YEGEN, B. C. Lifestyle and Peptic Ulcer Disease. *Current Pharmaceutical Design*, v. 24, n. 18, p. 2034–2040, 2018.

YU, L. Y., SUN, L. N., ZHANG, X. H., LI, Y. Q., YU, L., YUAN, Z. Q. Y., MENG, L., ZHANG, H. W., WANG, Y. Q. A Review of the Novel Application and Potential Adverse Effects of Proton Pump Inhibitors. *Advances in Therapy*, v. 34, n. 5, p. 1070–1086, 2017.

ZHANG, J., CAI, S., LI, J., XIONG, L., TIAN, L., LIU, J., HUANG, J., LIU, Z. Neuroprotective Effects of Theaflavins Against Oxidative Stress-Induced Apoptosis in PC12 Cells. *Neurochemical Research*, v. 41, n. 12, p. 3364–3372, 2016.

ZHANG, Y., JIA, J., DING, Y., MA, Y., SHANG, P., LIU, T., HUI, G., WANG, L., WANG, M., ZHU, Z., LI, Y., WEN, A. Alpha-boswellic acid protects against ethanol-induced gastric injury in rats: involvement of nuclear factor erythroid-2-related factor 2/heme oxygenase-1 pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 68, n. 4, p. 514–522, 2016.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, v. 16, n. 2, 109–110, 1983.

Anexos

ANEXO A

Certidão da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Rectoria



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DO CARVEOL EM MODELOS ANIMAIS", protocolada sob o CEUA nº 4881190619 (ID 000757), sob a responsabilidade de **Leônia Maria Batista** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 09/08/2019.

We certify that the proposal "EVALUATION OF GASTROPROTECTIVE ACTIVITY OF CARVEOL IN ANIMAL MODELS", utilizing 298 Heterogenics rats (298 males), 144 Heterogenics mice (144 males), protocol number CEUA 4881190619 (ID 000757), under the responsibility of **Leônia Maria Batista** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 08/09/2019.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 08/2019 a 02/2021 Área: Ciências Farmacêuticas

Origem:	Unidade de Produção Animal IPeFarM	sexos:	Machos	idade:	6 a 8 semanas	N:	298
Espécie:	Ratos heterogênicos			Peso:	180 a 250 g		
Linhagem:	Rattus Norvegicus - Wistar						
Origem:	Unidade de Produção Animal IPeFarM	sexos:	Machos	idade:	6 a 8 semanas	N:	144
Espécie:	Camundongos heterogênicos			Peso:	25 a 35 g		
Linhagem:	Mus musculus - Swiss						

Local do experimento: Laboratório de Farmacologia do Trato Gastrintestinal - LFTGI - UFPB

João Pessoa, 05 de dezembro de 2020

Profa. Dra. Jailane de Souza Aquino
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Carlos Augusto Alanis Clemente
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

ANEXO B

Avaliação Comportamental

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	0 min	15 min	30 min	60 min	4 h
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras					
b – Depressora					
Hipnose					
Ptose					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
c – Outros comportamentos					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotipia					
2 - SN AUTÔNOMO					
Diarréia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tônus muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					

Observações

complementares.: _____

Produção científica

ARTIGOS

- AUTORA PRINCIPAL



Review

A Review of the Role of Flavonoids in Peptic Ulcer (2010–2020)

Catarina Serafim ¹, Maria Elaine Araruna ¹, Edvaldo Alves Júnior ¹, Margareth Diniz ², Clélia Hiruma-Lima ³ and Leônia Batista ^{2,*}

¹ Postgraduate Program in Natural Products and Bioactive Synthetic, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051900, Paraíba, Brazil; catarinaalvesdelima@gmail.com (C.S.); elaine.araruna@gmail.com (M.E.A.); edvaldojunioralves@gmail.com (E.A.J.)

² Department of Pharmacy, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051900, Paraíba, Brazil; margareth@reitoria.ufpb.br

³ Department of Structural and Functional Biology (Physiology), Institute of Biosciences, São Paulo State University, Botucatu 18618970, São Paulo, Brazil; clelia.hiruma@unesp.br

* Correspondence: leoniab@uol.com.br; Tel.: +55-83-32167003; Fax: +55-83-32167502

Received: 25 August 2020; Accepted: 16 September 2020; Published: 20 November 2020



Abstract: Peptic ulcers are characterized by erosions on the mucosa of the gastrointestinal tract that may reach the muscle layer. Their etiology is multifactorial and occurs when the balance between offensive and protective factors of the mucosa is disturbed. Peptic ulcers represent a global health problem, affecting millions of people worldwide and showing high rates of recurrence. *Helicobacter pylori* infection and the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are one of the most important predisposing factors for the development of peptic ulcers. Therefore,

- CO-AUTORIA



Review

Intestinal Anti-Inflammatory Activity of Terpenes in Experimental Models (2010–2020): A Review

Maria Elaine Araruna¹, Catarina Serafim¹, Edvaldo Alves Júnior¹, Clelia Hiruma-Lima², Margaret Diniz^{1,3} and Leônia Batista^{1,3,*}

¹ Postgraduate Program in Natural Products and Bioactive Synthetic, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil; elaine.araruna@gmail.com (M.E.A.); catarinaalvesdelima@gmail.com (C.S.); edvaldojunioralves@gmail.com (E.A.J.); margareth@reitoria.ufpb.br (M.D.)

² Department of Structural and Functional Biology (Physiology), Institute of Biosciences, São Paulo State University, Botucatu 18618-970, SP, Brazil; clelia.hiruma@unesp.br

³ Department of Pharmacy, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil

* Correspondence: leoniab@uol.com.br; Tel.: +55-83-32167003; Fax: +55-83-32167502

Academic Editors: Maurizio Battino, Jesus Simal-Gandara and Esra Capanoglu

Received: 8 September 2020; Accepted: 28 September 2020; Published: 20 November 2020



Abstract: Inflammatory bowel diseases (IBDs) refer to a group of disorders characterized by inflammation in the mucosa of the gastrointestinal tract, which mainly comprises Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). IBDs are characterized by inflammation of the intestinal mucosa, are highly debilitating, and are without a definitive cure. Their pathogenesis has not yet been fully elucidated; however, it is assumed that genetic, immunological, and environmental factors are involved. People affected by IBDs have relapses, and therapeutic regimens are not always able to



Contents lists available at ScienceDirect

Biomedicine & Pharmacotherapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biopharm



Original article

Estragole prevents gastric ulcers via cytoprotective, antioxidant and immunoregulatory mechanisms in animal models



Edvaldo Balbino Alves Júnior^a, Rodrigo de Oliveira Formiga^a, Catarina Alves de Lima Serafim^a, Maria Elaine Cristina Araruna^a, Michele Liz de Souza Pessoa^a, Roseane Carvalho Vasconcelos^b, Thais Gomes de Carvalho^c, Tamires Gonçalves de Jesus^a, Aurigena Antunes Araújo^b, Raimundo Fernandes de Araújo Junior^c, Giciane Carvalho Vieira^a, Marianna Vieira Sobral^a, Leônia Maria Batista^{a,*}

^a Postgraduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba (UFPB), João Pessoa, PB, Brazil

^b Department of Biophysics and Pharmacology, Biosciences Center Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil

^c Department of Morphology, Histology and Basic Pathology, Biosciences Center, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Estragole
Gastric ulcer
Gastroprotection
Cytoprotection
Antioxidant
Immunoregulatory

ABSTRACT

Background: Estragole is an aromatic organic compound belonging to the class of phenylpropanoids derived from cinnamic aldehydes and present in essential oils of plant species, such as *Ravenea anisata* (madeira), *Ocimum basilicum* (manjericão/alfavaca) and *Croton zehntneri* (canelinha). Pharmacological studies report its anti-inflammatory, antioxidant and vasorelaxant activity.

Hypothesis/Purpose: This study aimed to evaluate the acute non-clinical toxicity, gastroprotective activity and the related mechanisms of action.

Methods: Acute toxicity was assessed according to OECD guideline 423 in mice. Ethanol stress nimixcam and



Basic Study

Antifungal activity and antidiarrheal activity via antimotility mechanisms of (-)-fenchone in experimental models

Michelle Liz de Souza Pessoa, Leiliane Macena Oliveira Silva, Maria Elaine Cristina Araruna, Catarina Alves de Lima Serafim, Edvaldo Balbino Alves Júnior, Alessa Oliveira Silva, Matheus Marley Bezerra Pessoa, Hermes Diniz Neto, Edeltrudes de Oliveira Lima, Leônia Maria Batista

CAPÍTULOS DE LIVROS

- **AUTORA PRINCIPAL**

O PAPEL DA MICROBIOTA INTESTINAL NA MANUTENÇÃO DA HOMEOSTASE E
SUA INFLUÊNCIA NAS DOENÇAS DIGESTIVAS: UMA REVISÃO
CAPÍTULO 31

**O PAPEL DA MICROBIOTA INTESTINAL NA
MANUTENÇÃO DA HOMEOSTASE E SUA
INFLUÊNCIA NAS DOENÇAS DIGESTIVAS:
UMA REVISÃO**

Catarina Alves de Lima SERAFIM¹
Maria Elaine Cristina ARARUNA¹
Edvaldo Balbino ALVES JÚNIOR¹
Alessa Oliveira SILVA²
Leônia Maria BATISTA³

¹Pós-graduandos do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB);

²Graduanda do curso de Farmácia, UFPB;

³Orientadora/Professora do PgPNSB, UFPB.
leoniab@uol.com.br

CAPÍTULO 04

DAS PLANTAS AOS FITOTERÁPICOS

Catarina Alves de Lima Serafim;
Edvaldo Balbino Alves Júnior;
Maria Elaine Cristina Araruna;
Leônia Maria Batista;

Considerações gerais

O uso de plantas medicinais com o objetivo de recuperar ou manter a saúde é uma prática que se confunde com a própria história da humanidade. No

Capítulo 10

Perfil sociodemográfico e estilo de vida de indivíduos portadores de HIV/AIDS em hospital de referência no município de João Pessoa-PB

*Catarina Alves de Lima Serafim
Leônia Maria Batista
Luciana Lucena Aranha de Macedo*

Resumo: A infecção pelo HIV e a AIDS constituem um dos mais preocupantes problemas de saúde pública mundial que vêm afetando as mais diversas culturas, diferentes níveis socioeconômicos e faixas etárias, explicando o seu rápido avanço e disseminação entre a população. O objetivo desta pesquisa foi traçar o perfil sociodemográfico e hábitos de

- CO-AUTORIA

ÚLCERA PÉPTICA: UMA REVISÃO DA LITERATURA
CAPÍTULO 51

ÚLCERA PÉPTICA: UMA REVISÃO DA LITERATURA

Maria Elaine Cristina ARARUNA¹

Catarina Alves de Lima, SERAFIM¹

Edvaldo Balbino, ALVES JÚNIOR¹

Leônia Maria BATISTA²

¹Pós-Graduandos do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB);

²Orientadora/Professora do PgPNSB, UFPB;
elaine.araruna@lrf.ufpb.com.br

ELABORAÇÃO DE UM GUIA DE MEDICAMENTOS PARA IDOSOS EM UMA INSTITUIÇÃO DE LONGA PERMANÊNCIA: UM RELATO DE EXPERIÊNCIA
CAPÍTULO 14

ELABORAÇÃO DE UM GUIA DE MEDICAMENTOS PARA IDOSOS EM UMA INSTITUIÇÃO DE LONGA PERMANÊNCIA: UM RELATO DE EXPERIÊNCIA

Suamy Rabelo Rocha da COSTA¹

Catarina Alves de Lima SERAFIM²

Thassy Matias RIBEIRO³

Thaynara Amaral LEITE³

Leônia Maria BATISTA⁴

¹Graduanda em Farmácia pela UFPB;

²Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB) da UFPB;

³Graduadas em Farmácia pela UFPB;

⁴Orientadora/ Tutora do Programa de Educação Tutorial - Farmácia, UFPB;
suamycosta@gmail.com

ANATOMOFISIOLOGIA E VIAS DE REGULAÇÃO DA HOMEOSTASE GÁSTRICA:
UMA REVISÃO
CAPÍTULO 7

ANATOMOFISIOLOGIA E VIAS DE REGULAÇÃO DA HOMEOSTASE GÁSTRICA: UMA REVISÃO

Edvaldo Balbino ALVES JUNIOR¹

Maria Elaine Cristina ARARUNA¹

Catarina Alves de Lima SERAFIM²

Leiliane Macena Oliveira SILVA³

Leônia Maria BATISTA⁴

¹Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB); ²Mestranda do PgPNSB;

³Graduanda do curso de Farmácia/UFPB; ⁴Orientadora/Professora do PgPNSB/UFPB.
edvaldojunioralves@gmail.com.br

DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS, FISIOPATOLOGIA E TRATAMENTO:
UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
CAPÍTULO 20

DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS, FISIOPATOLOGIA E TRATAMENTO: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Gedson Rodrigues de Moraes LIMA¹

Edvaldo Balbino ALVES JÚNIOR²

Catarina Alves de Lima SERAFIM²

Maria Elaine Cristina ARARUNA²

Leônia Maria BATISTA³

¹Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos;

²Pós-graduandos do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB);

³Orientadora/Professora do PgPNSB, UFPB.

gedsonfarm@hotmail.com

PREMIAÇÕES (MENÇÃO HONROSA)



CINASAMA 2019
CONGRESSO INTERNACIONAL DE SAÚDE E MEIO AMBIENTE

Tecnologia e sustentabilidade

CERTIFICADO

Concedemos este certificado de **HONRA AO MÉRITO** aos autores **MARIA ELAINE CRISTINA ARARUNA, CATARINA ALVES DE LIMA SERAFIM, EDVALDO BALBINO ALVES JÚNIOR, LEÔNIA MARIA BATISTA** do trabalho apresentado na área de **FORMA ORAL** intitulado por **ÚLCERA PÉPTICA: UMA REVISÃO DA LITERATURA**, durante CINASAMA -CONGRESSO INTERNACIONAL DE SAÚDE E MEIO AMBIENTE realizado nos dias 6 e 7 de Dezembro no Espaço Cultural José Lins do Rêgo e na Faculdade Internacional da Paraíba – FPB, João Pessoa – Paraíba- Brasil, como melhor trabalho apresentado na área.

João Pessoa - PB, 7 de Dezembro de 2019

Giselle Medeiros da Costa One

Giselle Medeiros da Costa One

Coordenadora do Evento

Instituto Medeiros de Educação Avançada



51st Brazilian Congress of
Pharmacology and
Experimental Therapeutics

Certificado

Edvaldo Balbino Alves Junior

Certificamos que o trabalho o8.002 Evaluation of immunoregulatory, antioxidant and anti-secretory activity of estragole in the gastric mucosa in animals models. Alves Júnior EB1, Serafim CAL1, Pessoa MLS1, Vieira GC1, Jesus TG1, Silva LM01, Silva AO1, Gomes TGC2, Araújo Júnior RF2, Batista LM1, Vasconcelos RC2, Araújo AA2 1UFPB, 2UFRN recebeu MENÇÃO HONROSA na Sessão de Painéis no setor o8. Respiratory and Gastrointestinal Pharmacology durante o 51º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, realizado no período de 24 a 27 de setembro de 2019 no Centro de Convenções Ruth Cardoso em Maceió/AL.

André S. Pupo

André S. Pupo
Congress President

Ruth Cardoso Convention Center
September 24-27, 2019
Maceió, AL