



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**



MARIA ELAINE CRISTINA ARARUNA

**ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA E ANTI-INFLAMATÓRIA
INTESTINAL DO ISÔMERO (-)-FENCHONA EM MODELOS ANIMAIS**

**JOÃO PESSOA
2022**

MARIA ELAINE CRISTINA ARARUNA

**ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA E ANTI-INFLAMATÓRIA
INTESTINAL DO ISÔMERO (-)-FENCHONA EM MODELOS ANIMAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de Concentração: Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Leônia Maria Batista

**JOÃO PESSOA
2022**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A662a Araruna, Maria Elaine Cristina.

Atividade antiulcerogênica e anti-inflamatória
intestinal do isômero (-)-fenchona em modelos animais /
Maria Elaine Cristina Araruna. - João Pessoa, 2022.
134 f. : il.

Orientação: Leônia Maria Batista.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Anti-inflamatório intestinal. 2. Cicatrizante
gástrica - Atividade. 3. Antiúlcera duodenal -
Atividade. I. Batista, Leônia Maria. II. Título.

UFPB/BC

CDU 615.276:591.434(043)

MARIA ELAINE CRISTINA ARARUNA

**ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA E ANTI-INFLAMATÓRIA INTESTINAL DO
ISÔMERO (-)-FENCHONA EM MODELOS ANIMAIS**

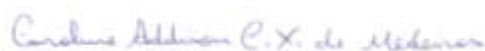
Tese de Maria Elaine Cristina Araruna aprovada pela banca examinadora em:



Profa. Dra. Leônia Maria Batista
Presidente da banca /UFPB



Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam
Examinadora Interna titular /UFPB



Profa Dra Caroline Addison Carvalho Xavier de Medeiros
Examinador Externo / UFRN



Profa. Dra. Vanda Lucia Santos
Examinador Externo /UEPB



Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima
Examinador Externo /UNESP

*Dedico esse trabalho à minha família, em
especial, minha querida mãe,
Maria Audete Araruna,
por acreditar nos meus sonhos e pelo apoio
incondicional e suporte ao longo de toda
minha caminhada acadêmica*

AGRADECIMENTOS

*A **Deus** por ser meu porto seguro em todos os momentos e por todas as graças alcançadas. Obrigada por ter permitido a concretização deste sonho a sua graça e bondade me sustentaram até aqui!*

*A **minha família**, meu ponto de equilíbrio e força para buscar me tornar uma pessoa melhor a cada dia. Minha eterna gratidão por todo suporte emocional e investimento na minha formação. Meus pais Francisco Fábio (in memorian) e Maria Audete, meus irmãos Évila e Fábio Júnior, minha prima-irmã Milena, meus avós, tios, primos, meu querido esposo Fabrício e meu filho(a), a descoberta da sua existência e a espera pela sua chegada, trouxe mais leveza e alegria ao final dessa jornada. Sem vocês a batalha seria mais árdua. Essa conquista é nossa!*

*A **Prof. Leônia**, pela confiança, incentivo e por ter proporcionado todo o suporte necessário para conclusão deste trabalho. Sou grata pelos ensinamentos, ética, zelo e profissionalismo que dedica ao seu trabalho.*

*Aos **alunos do Lab. de Farmacologia do TGI** composto pelo doutorando Edvaldo Alves, mestrandos Matheus, Michelle e Catarina e aos alunos de iniciação científica Leiliane, Alessa, Vitória e Juliana. Sem a ajuda de vocês nada disso seria possível. Agradeço pela amizade e ajuda na construção desse trabalho e da minha formação como pesquisadora.*

*Aos **professores colaboradores** Aurigena Antunes e Adriano Alves pela disponibilidade e auxílio para o aprofundamento dos nossos resultados.*

*Aos **Professores da UFPB** pela contribuição para minha formação profissional. Em especial a Prof. Dra. Márcia Piuvezam que acompanhou esse trabalho na fase de qualificação e defesa.*

*À **banca examinadora** composta pelos professores Vanda Lucia Santos, Caroline Caroline Addison de Medeiros, Clélia Akiko e Márcia Piuvezam por aceitarem o convite e por contribuir com a nossa pesquisa.*

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

*Aos **professores Marcelo Sobral e Marianna Sobral**, pelo apoio técnico para realização dos experimentos.*

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

Aos amigos da pós-graduação pelo companheirismo e convivência nas disciplinas do doutorado.

Ao Sr. Josué pela dedicação, competência e cordialidade no seu trabalho.

A todos os meus amigos e colegas de trabalho pelo carinho, momentos de descontração e incentivo, em especial a Gessenildo que contribuiu com apoio emocional e científico.

Aos órgãos de fomento CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

A UFPB/PROPESQ pelo apoio institucional.

Aos cidadãos brasileiros que por meio dos seus impostos possibilitam formação profissional em instituições PÚBLICAS de QUALIDADE.

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

*Não temas, porque eu sou contigo; não te
assombres, porque eu sou teu Deus; eu te
fortaleço, te ajudo e te sustento com a destra da
minha justiça.*

Isaías 42-10

ARARUNA, M.E.C. ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA E ANTI-INFLAMATÓRIA INTESTINAL DO ISÔMERO (-)-FENCHONA EM MODELOS ANIMAIS. 2022. 135 p. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, CCS/UFPB.

RESUMO

Os monoterpenos são metabólitos secundários presentes em diversas espécies medicinais. A (-)-fenchona é um monoterpeno presente nas espécies vegetais *Foeniculum vulgare* (funcho), *Thuja occidentalis* L. (tuja) e *Lavandula stoechas* (rosmarinho). Estudos farmacológicos apontam seus efeitos anti-inflamatório, antioxidante, gastroprotetor, antidiarreico e antifúngico. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar sua atividade anti-úlcera duodenal, cicatrizante gástrica e anti-inflamatória intestinal em modelos animais. A administração oral (v.o) de (-)-fenchona nas doses de 37,5; 75; 150 e 300 mg/kg reduziu ($p < 0,001$) a área de lesão ulcerativa (ALU) em duodenos de ratos submetidos às lesões induzidas pela cisteamina. A partir do modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético foi investigada a toxicidade por doses repetidas durante 14 dias. Os resultados mostraram que o tratamento com (-)-fenchona na dose de 150 mg/kg (v.o) reduziu ($p < 0,001$) a ALU, quando comparado ao grupo controle. Esse efeito foi relacionado a um aumento dos níveis de GSH, SOD, IL-10 ($p < 0,001$) e TGF β ($p < 0,01$) e uma redução ($p < 0,001$) dos níveis de MDA, MPO, IL-1 β , TNF- α e NF κ B. A administração de (-)-fenchona durante 14 dias não alterou o peso dos órgãos (coração, fígado, baço e rins), nem os parâmetros bioquímicos e hematológicos. Ainda foi observado que a substância teste protege os animais da redução do consumo de água e de ração. No modelo de indução aguda de inflamação intestinal induzida por TNBS, a (-)-fenchona em todas as doses (37,5; 75; 150 e 300 mg/kg, v.o.) reduziu ($p < 0,05$) o escore de lesão macroscópica, a ALU, a relação peso/comprimento e o índice diarreico. O efeito anti-inflamatório intestinal também foi avaliado em modelo sub-crônico de colite ulcerativa com recidiva. A (-)-fenchona sua melhor dose (150 mg/kg) reduziu ($p < 0,01$) o escore de lesão macroscópica, a ALU e a relação peso/comprimento do cólon. Em amostras de cólon provenientes dos modelos agudo e sub-crônico foi demonstrado que na sua melhor dose (150 mg/kg) reduziu ($p < 0,001$) os níveis de MDA e MPO e restaurou os níveis de GSH e SOD. Além disso, reduziu ($p < 0,001$) os níveis de IL-1 β , TNF- α e NF κ B, bem como, aumentou os níveis de TGF β ($p < 0,001$) e restaurou ($p < 0,01$) os de IL-10. No estudo do mecanismo citoprotetor intestinal foi mostrado um aumento ($p < 0,001$) da imunomarcagem para zona de oclusão-1 (ZO-1). Dessa forma, estes dados sugerem que a (-)-fenchona apresenta atividade anti-úlcera duodenal, atividade cicatrizante gástrica relacionada à indução da reepitelização da lesão e baixa toxicidade por doses repetidas. E atividade anti-inflamatória intestinal na fase aguda e sub-crônica, sendo relacionada à citoproteção da barreira intestinal por meio da preservação das junções comunicantes. Esses efeitos envolvem ainda a participação do sistema antioxidante e da imunomodulação.

Palavras chave: (-)-Fenchona, atividade cicatrizante gástrica, atividade anti-úlcera duodenal, atividade anti-inflamatória intestinal

ARARUNA, M.E.C. ANTIULCEROGENIC AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF THE ISOMER (-)-FENCHONE IN ANIMAL MODELS. 2022. 135 p. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, CCS/UFPB.

ABSTRACT

Monoterpenes are secondary metabolites present in several medicinal species. (-)-fenchone is a monoterpene present in the plant species *Foeniculum vulgare* (fennel), *Thuja occidentalis* L. (tujá) and *Lavandula stoechas* (lavender). Pharmacological studies point to its anti-inflammatory, antioxidant, gastroprotective, antidiarrheal and antifungal effects. Thus, the present study aimed to evaluate its anti-duodenal ulcer, healing gastric and intestinal anti-inflammatory activity in animal models. Oral administration (p.o) of (-)-fenchone at all doses evaluated (37.5; 75; 150 and 300 mg/kg) reduced ($p<0.001$) the ulcerative lesion area (ALU) in duodenum of rats subjected to cysteamine-induced injuries. From the model of gastric ulcer induced by acetic acid, toxicity was investigated by repeated doses for 14 days. The results showed that treatment with (-)-fenchone at a dose of 150 mg/kg (p.o) reduced ($p<0.001$) ALU when compared to the control group. This effect was related to an increase in the levels of GSH, SOD, IL-10 ($p<0.001$) and TGF β ($p<0.01$) and a reduction ($p<0.001$) in the levels of MDA, MPO, IL-1 β , TNF- α and NF κ B. The administration of (-)-fenchone for 14 days did not change the weight of the organs (heart, liver, spleen and kidneys), nor the biochemical and hematological parameters. It was also observed that the test substance protects the animals from the reduction of water and feed consumption. In the TNBS-induced acute induction model of intestinal inflammation, (-)-fenchone at all doses (37.5; 75; 150 and 300 mg/kg, v.o.) reduced ($p<0.05$) the lesion score macroscopic examination, ALU, weight/length ratio and diarrheal index. The intestinal anti-inflammatory effect was also evaluated in a subchronic model of relapsing ulcerative colitis. (-)-fenchone at its best dose (150 mg/kg) reduced ($p<0.01$) the macroscopic lesion score, ALU and colonic weight/length ratio. In colon samples from the acute and sub-chronic models it was shown that at its best dose (150 mg/kg) it reduced ($p<0.001$) the levels of MDA and MPO and restored the levels of GSH and SOD. In addition, it reduced ($p<0.001$) the levels of IL-1 β , TNF- α and NF κ B, as well as increased the levels of TGF β ($p<0.001$) and restored ($p<0.01$) those of IL-10. In the study of the intestinal cytoprotective mechanism, an increase ($p<0.001$) of immunostaining for zone of occlusion-1 (ZO-1) was shown. Thus, these data suggest that (-)-fenchone presents anti-duodenal ulcer activity, gastric healing activity related to the induction of lesion re-epithelialization and low toxicity by repeated doses. And intestinal anti-inflammatory activity in the acute and sub-chronic phases, being related to the cytoprotection of the intestinal barrier through the preservation of gap junctions. These effects also involve the participation of the antioxidant system and immunomodulation.

Keywords: (-)-Fenchone, gastric healing activity, duodenal anti-ulcer activity, intestinal anti-inflammatory activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da anatomia do trato gastrointestinal humano	11
Figura 2: Representação de regiões anatômicas e camadas teciduais do trato gastrointestinal acometidas pelas úlceras pépticas	13
Figura 4. Representação dos processos de reepitelização, migração celular, restauração das glândulas gástricas, formação do tecido de granulação e angiogênese	19
Figura 5: Representação comparativa das características das lesões na doença de Crohn e colite ulcerativa.....	20
Figura 6: Disfunção na barreira intestinal em indivíduos com DII com aumento na captação de antígenos luminais através do epitélio intestinal	25
Figura 7: Incidência de CD e UC dos anos de 1990 a 2016. Mapa do mundo representando a incidência de (A) CD e de (B) CU.....	27
Figura 8: Inflamação do cólon nas DIIs e as alterações na microbiota intestinal	31
Figura 9: Representação das principais reações pró-oxidantes-antioxidantes relevantes no sistema biológico	34
Figura 10: Immunopatogênese das Doenças Inflamatórias Intestinais	39
Figura 11: Sítios de ação dos fármacos utilizados no tratamento da doença ulcerosa péptica. antagonistas dos receptores H ₂ ; antagonistas do receptor muscarínico M ₃ ; inibidores da bomba de prótons; antiácidos; agentes de revestimento (citoprotetores) e antibióticos	42
Figura 12: Isômero (-)-fenchona	47

LISTA DE ABRVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
ALU	Área de lesão ulcerativa
AMPc	3',5'- monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	Análise de variância de uma via
CAT	Catalase
CEUA	Comitê de Ética em Uso Animal
COX	Ciclooxigenase
CU	Colite ulcerativa
DC	Doença de Crohn
DII	Doença inflamatória intestinal
DL ₅₀	Dose letal 50
d.p	Desvio padrão da média
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GI	Gastrintestinal
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
H ⁺ /K ⁺ ATPase	Bomba de prótons
H ₂	Receptor de histamina tipo 2
HCl	Ácido clorídrico
HCO ₃ ⁻	Íon bicarbonato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
HPA	Eixo Hipotalâmico-pituitário-adrenal
HSP	Proteínas de choque térmico
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
ILC	Célula linfóide inata
i.p.	Intraperitoneal

IFN γ	Interferon- γ
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina-1
iNOS	Sintase do óxido nítrico induzível
M ₃	Receptor muscarínico tipo 3
MDA	Malondialdeído
MMP	Metaloproteinase
MPO	Mieloperoxidase
MUC	Mucina
NF κ B	Fator nuclear Kb
NK	Natural killer
NLR	Receptor do tipo NOD
NO	Óxido nítrico
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
NOS	Sintase do óxido nítrico
NOX	NADPH oxidases
O ₂ ⁻	Superóxido
·OH	Hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PAMP	Padrão molecular associado a patógeno
PG	Prostaglandina
PGE ₂	Prostaglandina da série E ₂
PGI ₂	Prostaciclina
PgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos
PRR	Receptor de reconhecimento de padrão
RAGE	Receptor de produtos finais de glicação avançada
RNA	Ácido ribonucleico
ROOH	Hidroperóxidos
-SH	Grupamentos sulfidrilas
SOD	Superóxido dismutase
STAT	Fatores de transcrição ativados por tirosinas quinases
TLR	Receptor do tipo Toll
TFF	Fator trefoil
TGF- β	Fator de crescimento transformante β

TGI	Trato gastrointestinal
TLRs	Receptores Toll-like
TNBS	Ácido trinitrobenzenosulfônico
TNF α	Fator de necrose tumoral- α
UP	Úlcera péptica
v.o.	Via oral
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Trato Gastrintestinal	19
2.2 Úlceras Pépticas	20
2.2.1 Fisiopatologia e Etiologia	20
2.2.2 Cicatrização gástrica	24
2.3 Doenças Inflamatórias Intestinais (DIIs)	27
2.3.1 Fisiopatologia e Etiologia das DIIs	27
• Fatores ambientais	29
• Fatores genéticos	30
• Barreira epitelial	31
2.4 Epidemiologia	33
2.5 Microbiota	35
2.6 Sistema antioxidante	38
2.7 Citocinas	42
2.8 Terapêutica	47
2.9 Produtos naturais	53
2.10 (-)-Fenchona	54
3 OBJETIVOS	55
3.1 Objetivo geral	55
3.2 Objetivos específicos	55
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1 Artigo 1: <i>(-)-Fenchone prevents cysteamine-induced duodenal ulcers and accelerates healing promoting re-epithelialization of gastric ulcers in rats via antioxidant and immunomodulatory mechanisms</i> . Artigo a ser submetido a revista Frontiers in Pharmacology	56
4.2 Artigo 2: <i>(-)-Fenchone ameliorate TNBS-induced colitis in rats via antioxidant, immunomodulatory and cytoprotective mechanisms</i> . Artigo a ser submetido a revista Frontiers in Pharmacology	82
REFERENCIAS	113
CONCLUSÃO	128
APÊNDICES	129
APÊNDICE A- Artigo publicado na revista Molecules	130
APÊNDICE B- Artigo publicado na revista World Journal of Gastroenterology	131

APÊNDICE C- Artigo publicado na revista Molecules	132
APÊNDICE D- Artigo publicado na revista Biomedicine & Pharmacotherapy	133
APÊNDICE E- Artigo publicado na revista Frontiers in Pharmacology	134
ANEXO.....	135
ANEXO A- Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA	136

1 INTRODUÇÃO

As afecções gastrintestinais (GI), a exemplo da úlcera péptica, doenças inflamatórias intestinais e diarreia, estão atualmente entre os problemas de saúde mais prevalentes em todo o mundo. Constituem um conjunto de doenças de natureza debilitante e recorrente com alto índice de complicações (PETRYSZYN; WITCZAK, 2016; ANANTHAKRISHNAN; XAVIER, 2020).

As úlceras pépticas (UP) consistem em lesões inflamatórias ou necrotizantes que podem acometer esôfago, estômago ou duodeno. Encontram-se situadas na camada mucosa, bem como em camadas teciduais mais profundas, possuem origem multifatorial e complexa, resultantes de alterações no equilíbrio entre os fatores protetores e agressores da mucosa (LANAS; CHAN, 2017; WOODS; CAREY, 2017; ARAGÃO et al., 2018).

As doenças inflamatórias intestinais (DIIs) compreendem um conjunto heterogêneo de doenças caracterizadas por uma inflamação na mucosa do trato gastrintestinal (TGI). As duas principais formas das DIIs são a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa ou colite ulcerativa (CU). As DII são doenças debilitantes e sem cura efetiva, cuja etiologia ainda permanece desconhecida, com origem multifatorial e estão associadas a fatores genéticos, ambientais e imunológicos (MOLODECKY et al., 2012; KANDULA et al., 2016; MIELE et al., 2018).

A terapêutica da úlcera péptica é baseada na inibição da secreção ácida gástrica ou no reforço dos fatores de proteção da mucosa (SUBUDHI et al., 2016; BANIHANI, 2017). Para as DII, o tratamento convencional está voltado para a ‘redução do processo inflamatório por supressão do sistema imunológico e consequente alívio dos sintomas (GOMOLLON et al., 2017). Vários fatores limitam o uso destes agentes, como a alta taxa de recidiva da doença, as interações medicamentosas e os efeitos colaterais decorrentes do uso a longo prazo. Para as DII nenhuma estratégia de tratamento tem potencial curativo (BANIHANI, 2017; HARBORD et al., 2017).

Nessa perspectiva, a busca de novas alternativas terapêuticas possui grande relevância. Assim, os produtos naturais, incluindo plantas, animais, micro-organismos e minerais, são fontes de moléculas com potencial terapêutico, servindo na maioria das vezes, como ponto de partida para a química medicinal e desenvolvimento de novas moléculas e medicamentos (RAO et al., 2019; BARREIRO, 2019).

Os produtos oriundos de espécies vegetais, tem atraído cada vez mais a atenção de pesquisadores e da indústria farmacêutica, especialmente, devido à grande variedade química e estrutural de seus fitoconstituintes e a diversidade de efeitos biológicos (PRIETO-MARTÍNEZ et al., 2019). Estudos tem comprovado o potencial dos produtos naturais na melhoria da qualidade da cicatrização e prevenção da recorrência das afecções gastrointestinais (KANGWAN et al, 2014; ESCOBEDO-HINOJOSA et al., 2018).

Nos últimos anos, muitas espécies de plantas e seus compostos isolados incluindo terpenos, mostraram efeitos promissores no contexto das úlceras pépticas e das DIIs, em estudos utilizando modelos animais, a exemplo dos monoterpenos: geraniol (VENZON et al., 2018), D-limonene (YU et al., 2017), nerol (GONZÁLES-RAMÍREZ et al., 2016) e carvacrol (SUNTRES et al., 2014; DE SANTANA SOUZA et al., 2017).

A fenchona é um monoterpeno que ocorre naturalmente no óleo essencial de plantas como a *Foeniculum vulgare* (funcho/erva-doce) (BAPTISTA et al., 2015), *Thuja occidentalis* (thuja) (MIYAZAWA; MIYAMOTO, 2005), *Peumus boldus* (boldo) (JÄGER, 2010) e *Mesosphaerum sidifolium* (alfazema do mato) (ROLIM et al., 2017). Esse monoterpeno é composto por dois enantiômeros, (+)-fenchona e (-)-fenchona. De acordo com os estudos tem sido mostrado que o isômero (-)-fenchona possui atividade antimicrobiana (INSAWANG et al., 2019), anti-inflamatória (ALGIERI et al., 2016), antioxidante (BAPTISTA et al., 2015), antidiarreica e antifúngica (PESSOA et al., 2020).

Nesse contexto, o presente estudo se propôs a dar continuidade as pesquisas iniciadas pelo grupo do Laboratório de Farmacologia do Trato Gastrointestinal (IPeFarM/UFPB), por meio da avaliação da (-)-fenchona frente à atividade antiulcerogênica gástrica e duodenal, bem como, sua atividade anti-inflamatória intestinal aguda e crônica em modelos animais.

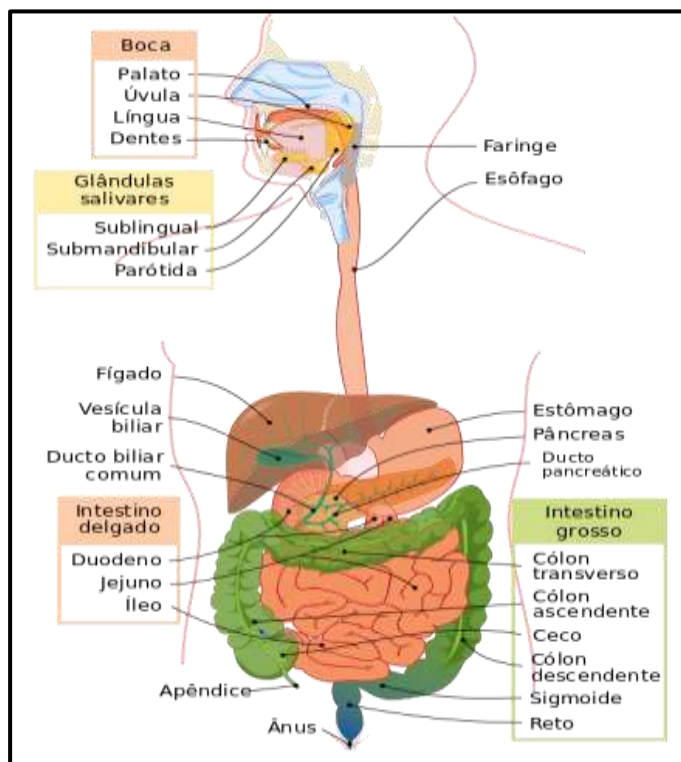
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Trato Gastrointestinal

O trato gastrointestinal (TGI) é um sistema eficiente, que pode ser definido como um tubo oco que se estende da boca até o ânus, sendo responsável por desempenhar importantes processos fisiológicos como digestão, absorção e excreção, além de ser uma barreira protetora contra o ambiente externo (TREUTING; ARENDS; DINTZIS, 2018).

Anatomicamente o TGI, compreende um tubo muscular longo com aproximadamente 6 metros de comprimento e de diâmetro variável nas suas diferentes secções, sendo revestido por um epitélio especializado, com diferentes compartimentos. É formado pela cavidade oral, esôfago, estômago, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e intestino grosso (cólon, ceco e reto). É em sua maioria, composto por camadas musculares (músculo liso), vasos sanguíneos, tecido linfóide e conectivo e glândulas anexas, conforme demonstrado na **figura 1** (CAMPBELL, 2015; ASHFORD, 2017).

Figura 1: Representação esquemática da anatomia do trato gastrointestinal humano



Fonte: Digestive system, 2016.

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 (CAMPBELL, 2015; ASHFORD, 2017; PEATE, 2018).

As principais funções do TGI são a motilidade, absorção, secreção, digestão e função de barreira intestinal as quais ocorrem de maneira ordenada e autônoma devido a presença do sistema entérico que, por meio de nervos aferentes extrínsecos e intrínsecos regulam as respostas fisiológicas e mantém a homeostase, ativando respostas locais (BROWNING; TRAVAGLI, 2019).

As afecções do TGI, a exemplo de dispepsia, úlcera péptica, doenças inflamatórias intestinais, diarreia, entre outras, constituem um conjunto de doenças de alta prevalência em todo o mundo (PETRYSZYN; WITCZAK, 2016; ACTIS; PELLICANO, 2017).

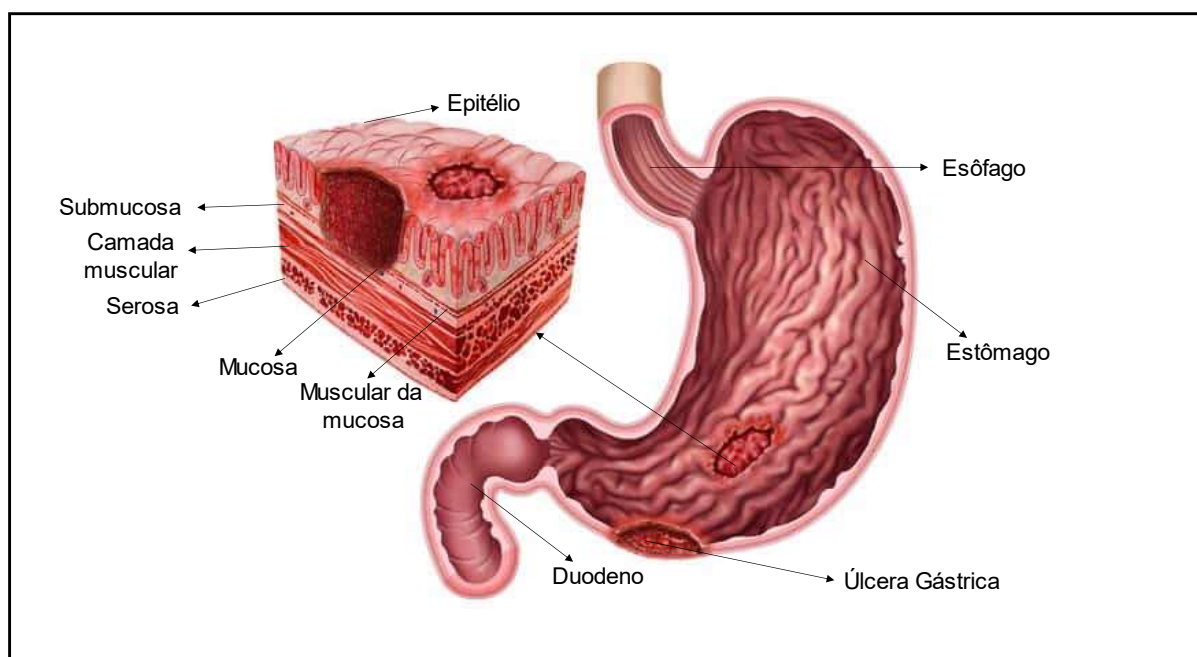
2.2 Úlceras Pépticas

2.2.1 Fisiopatologia e Etiologia

O termo úlcera péptica (UP) 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 lesões necróticas e hemorrágicas (LANAS; CHAN, 2017). Pode atingir desde as camadas superficiais da mucosa até as camadas tissulares mais profundas, como a camada muscular da mucosa em direção à serosa, em que os componentes dos tecidos epitelial e conectivo, incluindo miofibroblastos subepiteliais, células do músculo liso, vasos e nervos, podem ser destruídos (**Figura 2**) (LANAS; CHAN, 2017; DA SILVA et al., 2018).

Os principais fatores de defesa da mucosa incluem os pré-epiteliais (barreira de muco, bicarbonato e fosfolipídeos), epiteliais (células epiteliais de superfície ligadas por junções comunicantes, que fornecem os elementos da defesa pré-epitelial, geram prostaglandinas, as proteínas de choque térmico, β -defensinas e catelicidinas) e a defesa pós-epitelial composta pela microcirculação capilar, fatores de crescimento e regeneração celular; prostaglandinas, óxido nítrico, sulfato de hidrogênio e inervações. Esses fatores protegem as células epiteliais e endoteliais contra lesões e previnem a agregação de plaquetas e leucócitos (**Figura 3**) (BATISTA et al., 2015; WILSON; STEVENSON, 2019).

Figura 2: Representação de regiões anatômicas e camadas teciduais do trato gastrointestinal acometidas pelas úlceras pépticas

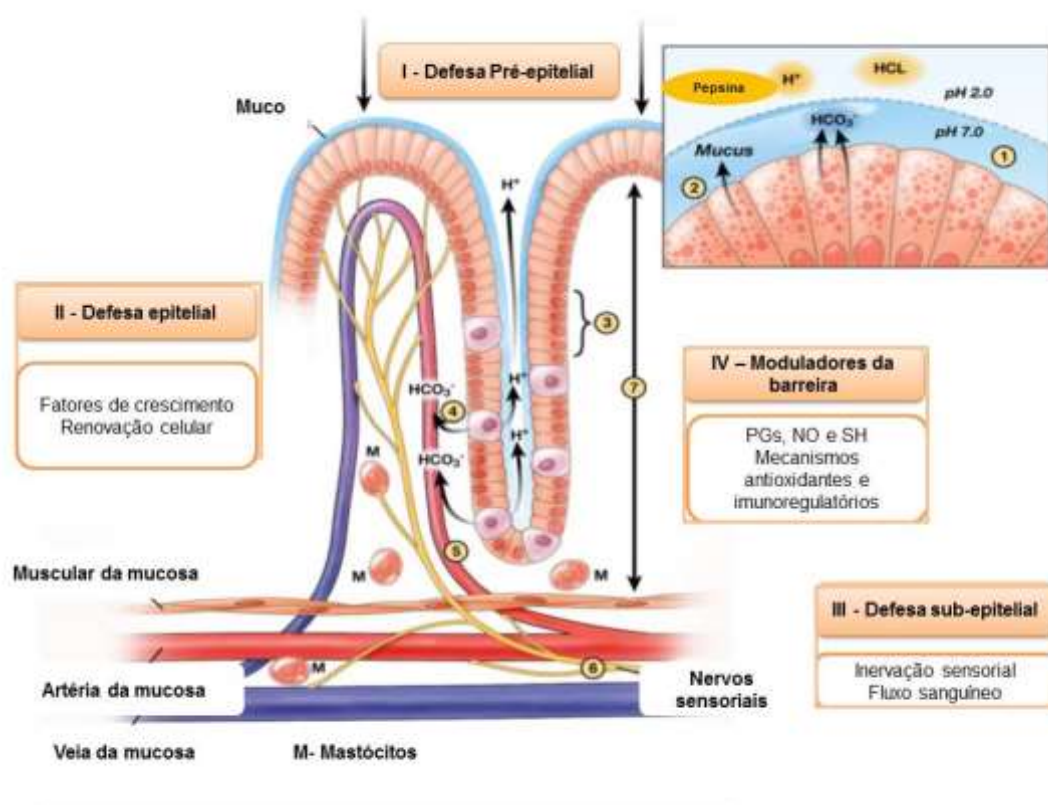


Fonte: Adaptado de <https://www.shutterstock.com/>

Os fatores agressores podem ser de origem endógena (ácido clorídrico e pepsina, refluxo biliar, peroxidação lipídica e formação de radicais livres), bem como pode estar relacionado a fatores exógenos (consumo abusivo de álcool, estresse, tabagismo, maus hábitos alimentares e o uso contínuo de anti-inflamatórios não esteroidais - AINEs) (RIBEIRO et al., 2016; BOEING et al., 2016).

Dentre os fatores agressores da mucosa, o etanol e seu metabólito, o acetaldeído, são responsáveis por causar grande parte das injúrias gástricas no homem e geram lesões hemorrágicas, edema, esfoliação e infiltração de células inflamatórias (BOUTEMINE et al., 2018; WANG et al., 2018). As erosões gástricas causadas pelo etanol têm sido atribuídas a danos causados pelos radicais livres, o que resulta em produtos de peroxidação lipídica, desestabilização da camada de muco, degranulação de mastócitos, aumento no infiltrado inflamatório, inibição da síntese de prostaglandinas endógenas e alteração na expressão de citocinas (IL-1 β e TNF- α) ocasionando apoptose e reações inflamatórias agudas no epitélio gástrico (BOEING et al., 2016; WANG et al., 2018).

Figura 3. Representação dos mecanismos de proteção da mucosa gástrica



Fonte: Adaptado de TARNAWSKI et al., 2013; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015.

Os AINEs são ácidos orgânicos fracos, muito utilizados na prática clínica em função dos seus efeitos sobre processos inflamatórios e sobre a dor, no entanto, promovem efeitos adversos ao trato digestório, que vão desde sintomas dispépticos e erosões gástricas até úlceras pépticas com complicações graves, como sangramento ou perfuração (ADEFISAYO et al., 2017). Os AINES não seletivos bloqueiam a atividade das enzimas ciclooxygenase (COX-1 e COX-2), inibição da liberação de fatores de proteção como prostaglandina E_2 , redução da secreção de muco e bicarbonato, diminuição do fluxo sanguíneo da mucosa e diminuição da agregação plaquetária (ADEFISAYO et al., 2017; ARAGÃO et al., 2018).

Mecanismos sistêmicos estão associados a inibição da COX, como a redução do fluxo sanguíneo e consequente aumento de mediadores inflamatórios e biomarcadores apoptóticos; danos epiteliais resultantes de alteração das estruturas microvasculares; aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs); aumento da peroxidação lipídica redução das enzimas antioxidantes. Além de aumento da migração de células inflamatórias e infiltração de neutrofílica (ADEFISAYO et al., 2017; TAMADDONFARD et al., 2019).

A infecção pelo *Helicobacter pylori* é outro importante fator etiológico atribuído como causas da úlcera péptica, o que resulta em uma alta prevalência de infecção por essa bactéria (WHITE; WINTER; ROBINSON, 2015; CHEN et al., 2018).

Para colonizar a mucosa gástrica, o *Helicobacter pylori* se difunde na região do antro gástrico onde se formam aglomerados em torno das junções celulares. A bactéria se adapta ao ambiente hostil do lúmen gástrico, devido à alta atividade da enzima urease, com capacidade de catalisar a hidrólise da ureia e produzir amônia e CO₂, produtos que neutralizam a secreção no local da infecção (WOODS; CAREY, 2017; TRAN et al., 2017). Além disso, o estresse oxidativo, a apoptose das células epiteliais e a inflamação na mucosa estão associados com a patogênese desta doença (YANG et al., 2017)

Pesquisas demonstram que dentre os fatores ambientais, as condições de estresse se destacam como risco para integridade da mucosa gástrica, desencadeando uma resposta excitatória do organismo. O estresse que estimula a liberação de catecolaminas, a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e liberação de cortisol, afeta as funções do TGI e gera impactos a curto ou longo prazo, contribuindo para a formação de úlceras, alterando a circulação na mucosa gástrica, o que resulta em acúmulo de EROs, estimulação da liberação de histamina pelos mastócitos estomacais e a produção de ácido (AHMAD, et al., 2017).

Sob condições normais, existe um equilíbrio fisiológico entre a secreção ácida gástrica e os componentes protetores da mucosa. Alterações na homeostasia do TGI podem levar ao desenvolvimento de úlceras pépticas, uma doença de etiologia complexa e multifatorial, de evolução geralmente crônica, em que uma das principais hipóteses aceita trata da perda do equilíbrio entre os agentes protetores e agressores da mucosa (ATEUFACK et al., 2015; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015; BOEING et al., 2016).

Os principais sintomas apresentados por indivíduos com úlceras pépticas, irão depender do tipo de úlcera. Em indivíduos com úlcera gástrica, a dor localiza-se na região epigástrica antes da ingestão de alimentos e normalmente está associada a falta de apetite e perda de peso. Já nos casos de úlcera duodenal, a dor ocorre na região epigástrica, com sensação de ardência que surge duas a três horas após as refeições, e que diminui com a ingestão de alimentos. Além disso, outros sintomas como o desconforto abdominal, náuseas, vômitos, sensação de plenitude, refluxo e azia podem estar associados (NIETO, 2012; VALLE, 2015; SHAW, 2017). A variação na intensidade ou na distribuição da dor abdominal, bem como o início dos sintomas associados, como náuseas, vômitos, sensação de plenitude, azia e fadiga, podem ser indicativas

de uma complicação da úlcera, como perfuração. Nesses casos, pode ocorrer fezes escurecidas ou vômitos em borra de café (VALLE, 2015).

2.2.2 Cicatrização gástrica

A cicatrização é uma resposta a lesão tecidual para reparar os tecidos, que consiste em um processo multifacetado conduzido por fases sequenciais, porém sobrepostas, que necessita de componentes sistêmicos incluindo hemostasia, envolvimento de células inflamatórias, quimiocinas, citocinas, moléculas da matriz e nutrientes locais, com um aumento na demanda metabólica. Essas etapas ocorrem simultaneamente e são divididos em três fases: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelação (LINDLEY et al., 2016; HAN; CEILLEY, 2017).

A fase inflamatória da cicatrização consiste em remover patógenos e materiais estranhos da ferida e conter os danos a uma área localizada. A permeabilidade vascular aumenta com a vasodilatação, permitindo que neutrófilos e monócitos se direcionem para o local da lesão (HAN; CEILLEY, 2017). Uma interação complexa de citocinas também ajuda a regular essa fase, culminando na conversão de monócitos em macrófagos, os quais fagocitam e digerem os restos de tecido e os neutrófilos remanescentes e também secretam fatores de crescimento e citocinas que promovem a proliferação de tecidos e a migração celular. Além disso, as células do tecido adjacente, como as células epiteliais, queratinócitos e fibroblastos, migram para o local da lesão e juntamente com as células residentes participarão do processo de reparação tecidual (GONZALEZ et al., 2016; HAN; CEILLEY, 2017).

O epitélio do TGI tem elevada taxa de renovação celular, processo essencial para manter a integridade estrutural e funcional da mucosa, substituindo o epitélio danificado ou senescente (FALLAH et al., 2018). A renovação epitelial ocorre de 2-4 dias por meio da substituição de células epiteliais lesionadas ou envelhecidas por células progenitoras, controladas pela sinalização de fatores de crescimento, regulando a proliferação celular, em que logo após a lesão, ocorre a reepitelização e reconstrução glandular pela migração celular (YANDRAPU; SAROSIEK, 2015). Este processo é executado por meio da ação de vários compartimentos cutâneos locais, matriz extracelular de suporte e colaboradores sistêmicos. Sob condições fisiológicas, o processo de reparo é altamente eficiente, no entanto, quando esse processo é interrompido, o tecido falha ao recuperar estruturas e integridade funcional, resultando em lesões crônicas (LINDLEY et al., 2016).

Morfologicamente a úlcera péptica consiste em uma lesão circular dividida em duas regiões: 1. a margem da úlcera, que é formada pela mucosa circundante sem área necrosada e com presença de componentes epiteliais; 2. a base da úlcera, que é caracterizada pelo comprometimento dos tecidos de granulação e conectivo, formado por macrófagos, fibroblastos e células endoteliais de proliferação (TARNAWSKI et al., 2012; KANGWAN et al., 2014).

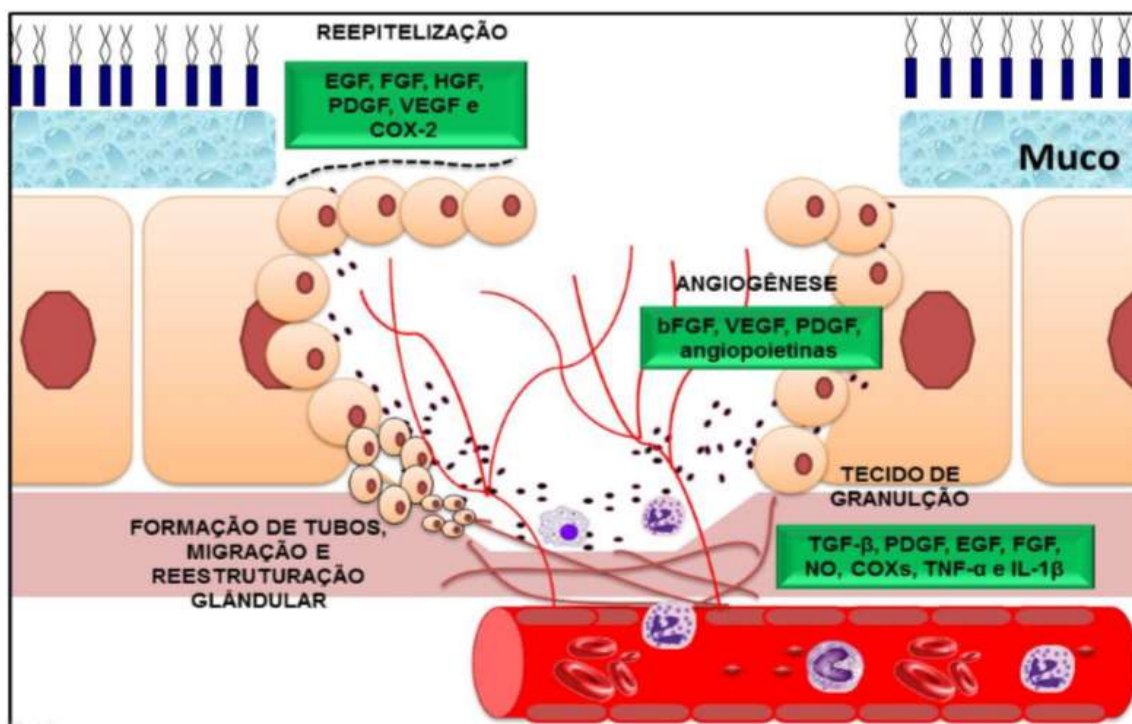
No processo de cicatrização gástrica, as células epiteliais proliferam e migram a partir da margem para o tecido de granulação provocando a reepitelização da base da úlcera. Fatores de crescimento controlam a reepitelização e reconstrução glandular, a exemplo do fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), assim como fator trefoil (TFF), prostaglandinas produzidas pela COX e outras citocinas produzidas localmente pela regeneração de células de maneira ordenada e integrada. Esses fatores atuam por meio da ligação aos seus receptores específicos (EGF a EGF-R) na superfície da célula, o que provoca uma série de eventos intracelulares culminando na migração e proliferação celular (TARNAWSKI et al., 2012; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

Na base da úlcera, o tecido de granulação se desenvolve dentro de 48 a 72 horas após a ulceração, composto por células em proliferação, como macrófagos, fibroblastos e células endoteliais, que formam microvasos por meio da angiogênese. A migração de fibroblastos para o tecido de granulação e sua proliferação é desencadeada por fatores como TGF β , PDGF, EGF e citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-8) derivadas de células inflamatórias e endoteliais. O TGF- β 1 é um fator de crescimento multifuncional, que desempenha um papel importante na remodelação tecidual, formação de matriz extracelular e angiogênese, promovendo, o reparo da úlcera (TARNAWSKI; AHLUWALIA; K. JONES, 2012; YANG et al., 2017).

Na remodelação tecidual, as principais enzimas que participam da síntese e degradação da matriz extracelular são as metaloproteinases de matriz (MMPs), proteases dependentes de zinco que atuam por meio de degradação proteolítica de seus componentes. O aumento da expressão das MMP-2 e MMP-9, produzidas por fibroblastos, queratinócitos e células inflamatórias no tecido gástrico, está frequentemente relacionado ao desenvolvimento e progressão da úlcera gástrica (LI et al., 2013; VIANA et al, 2019). O controle da expressão de MMPs no tecido gástrico lesado, tem relação com o equilíbrio funcional na degradação da matriz tecidual, que junto ao aumento na expressão de colágenos tipo I, III e IV, favorecem a cicatrização e remodelamento tecidual (SRIKANTA et al., 2010; LI et al., 2013; VIANA et al, 2019).

Os microvasos sanguíneos (capilares e vênulas coletoras) consistem em células endoteliais aderentes à membrana basal, que têm a capacidade de proliferar, formar tubos, ramos, anastomoses e uma rede capilar em resposta a estímulos angiogênicos, conforme demonstrado na **figura 4**. (TARNAWSKI; AHLUWALIA, 2012; TARNAWSKI; AHLUWALIA; JONES, 2014).

Figura 4. Representação dos processos de reepitelização, migração celular, restauração das glândulas gástricas, formação do tecido de granulação e angiogênese



Abreviações – 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: ciclooxigenase; IL: interleucina; TNF: fator de necrose tumoral. Fonte: LFTGI - Adaptado de TARNAWSKI, 2005; TARNAWSKI, 2012.

Em situações como necrose ou lesão tecidual, o fenótipo de repouso é alterado para um fenótipo angiogênico sendo o principal gatilho para essa alteração a hipóxia tecidual, que ativa genes que codificam fatores de crescimento angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Como resultado, as células de microvasos preservados na borda da ferida/lesão migram, proliferam e finalmente reestabelecem uma rede microvascular. A angiogênese é essencial para a restauração da microcirculação sanguínea na mucosa sendo fundamental na oxigenação e na nutrição da mucosa (TARNAWSKI; AHLUWALIA, 2012).

O resultado final do processo cicatricial da úlcera péptica reflete uma interação dinâmica entre os componentes epiteliais a partir da zona de cura, à margem da úlcera e os componentes do tecido conjuntivo (KANGWAN et al., 2014). A mucosa gástrica reepitelializada possui anormalidades histológicas, que podem interferir na defesa da mucosa e causar recorrência quando os fatores pró-ulcerogênicos estão presentes (TARNAWSKI; AHLUWALIA, 2012).

A busca por agentes terapêuticos que atuem no processo de cicatrização da lesão visa principalmente estimular a reepitelização ou a granulação do tecido estomacal, acelerar o processo de reparação e melhorar a qualidade de cicatrização da úlcera (YANG et al., 2017).

2.3 Doenças Inflamatórias Intestinais (DIIs)

2.3.1 Fisiopatologia e Etiologia das DIIs

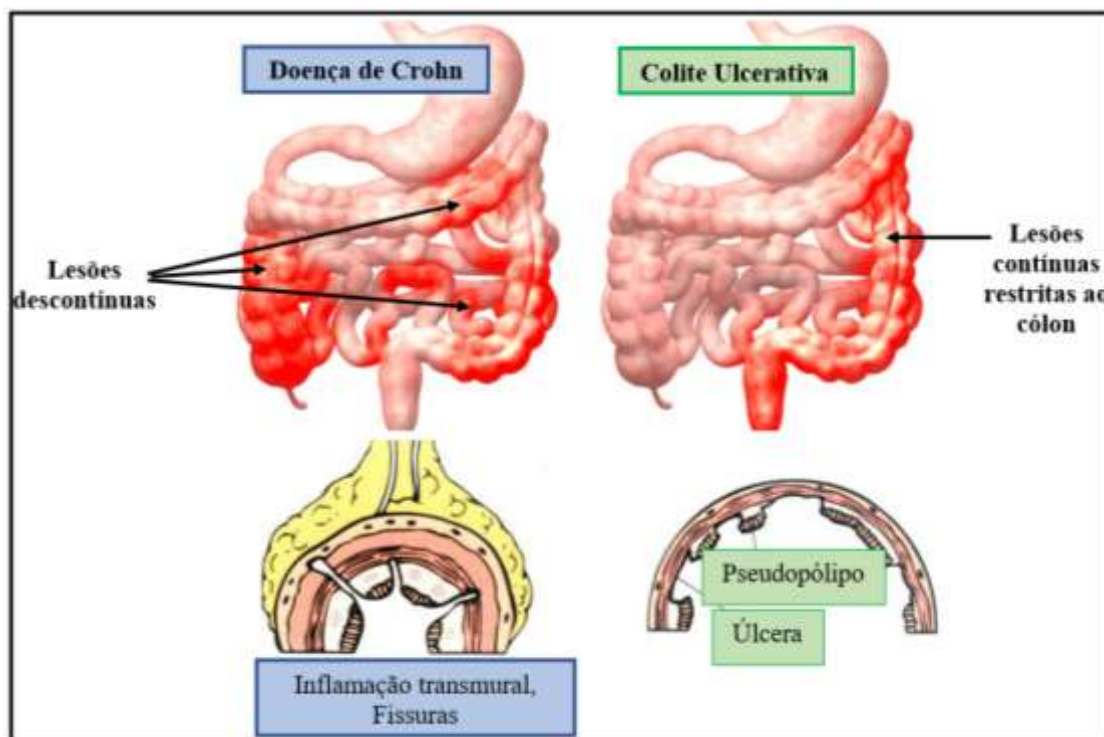
As DIIs, incluindo a Doença de Crohn (CD) e a Colite Ulcerativa (CU), são afecções reincidentes de natureza inflamatória, mediadas pela imunidade e afetam principalmente o trato gastrointestinal. Na ausência de tratamento oportuno e eficaz, a lesão intestinal progressiva e cumulativa pode levar a complicações como estenoses, fístulas, perda da função intestinal, intervenções cirúrgicas e câncer (TORRES et al., 2017; AGRAWAL; COLOMBEL, 2019). Embora compartilhem algumas semelhanças essas doenças diferem nos padrões histológicos e na liberação de citocinas (BARBALHO et al., 2016).

A DC é caracterizada por uma inflamação transmural, com acometimento de todas as camadas teciduais, da mucosa a serosa, apresentando um caráter descontínuo das lesões, com áreas de mucosa preservada em meio às de atividade inflamatória (VINDIGNI, et al., 2016) (**Figura 5**). Inicialmente, se apresenta como uma inflamação superficial com formação de estreitamentos fibroestenoses e transpassando a parede intestinal, que posteriormente evolui para a formação de fístulas, sendo geralmente associada a complicações, tais como abscessos, estenoses e obstrução parcial ou total do lúmen. Pode ser classificada em inflamatória, estenosante e fistulizante (HART; NG, 2015; MARTON et al., 2019).

A CU caracteriza-se como uma inflamação não transmural, ou seja, o processo inflamatório normalmente não afeta a espessura completa da parede intestinal, permanecendo restrita à mucosa e submucosa. O padrão inflamatório tende a ser simétrico, contínuo e difuso, não havendo mucosa sadia intercalando as lesões (VINDIGNI, et al., 2016) (**Figura 5**). As lesões acometem a mucosa e submucosa, podendo se apresentar ao longo do reto e cólon (pancolite), isolado no lado esquerdo (colite distal), envolvendo cólon sigmoide e reto (proctostigmoidite) ou limitado ao reto (proctite). Geralmente, apresenta-se com menor

inflamação que a DC e muito raras estenoses e fístulas, sendo o sangramento mais comum que na DC (HO et al., 2015; TORRES et al., 2017).

Figura 5: Representação comparativa das características das lesões na doença de Crohn e colite ulcerativa



Fonte: Adaptado de <https://www.google.com.br/search?q=inflammatory+bowel+disease>.

Nos casos em que não é possível diferenciar entre as duas formas da doença, denomina-se de “colite indeterminada” (CI) ou “colite não classificada” (CNC) (BAUMGART, 2017).

Os principais sinais clínicos da DC são o aparecimento dos granulomas intestinais, infiltração de macrófagos, linfócitos e eosinófilos, lesões aftosas, estenoses, fístulas, abscessos, fibrose e hipertrofia da parede intestinal (TOLEDO et al, 2016). Os sintomas da DC incluem diarreia, dor abdominal, sangramento, febre, perda de peso, e existe o risco de complicações como estenose, fístulas e abscessos (MARTON et al., 2019). Já os sintomas da CU podem incluir urgência, incontinência, fadiga, aumento da frequência de evacuações, secreção de muco, sangramento retal, dor abdominal e febre. Cerca de 50% dos indivíduos com CU apresentam manifestações extra intestinais na pele, articulações ou olhos (TEIXEIRA et al., 2015; TORRES et al., 2017).

Em relação às diferenças no perfil inflamatório, na DC as células T expressam majoritariamente o fenótipo T_H1 e T_H17 a partir da ação das citocinas IL-12, IL-6, IL-23 e TGF-

β com a síntese e liberação de IL-17, IL-22 e IFN- γ . Já na CU o perfil inflamatório é caracterizado principalmente por células T com fenótipo semelhante ao T_H2 e de células T natural killer (NKT), com participação das citocinas IL-4 e IL-13 (MARANHÃO et al., 2015; UNGARO et al., 2017).

A etiologia das doenças inflamatórias intestinais é complexa e multifatorial e ainda não está completamente elucidada. No entanto, estudos demonstram que elas podem se desenvolver a partir da interação de fatores, que se sobrepõem uns aos outros, são eles exposição a fatores ambientais, susceptibilidade genética, incoerências na resposta imune inata e adaptativa e as alterações na microbiota intestinal (SOUZA; FICCHI, 2016; KIM; CHEON, 2017).

- **Fatores ambientais**

Diversos fatores ambientais já foram descritos como determinantes na patogênese das DIIs. Dentre estes estão o tabagismo, fatores dietéticos, a utilização de alguns medicamentos, estresse e infecções por patógenos entéricos (LIMKETKAI et al., 2017).

O tabagismo foi o primeiro fator de risco a ser relacionado à suscetibilidade as DIIs, sendo também o mais estudado. Acredita-se que seu efeito nocivo seja mediado pela geração de um estresse oxidativo e radicais-livres, como também de alterações imunológicas e da microbiota intestinal, especialmente na DC (YADAV et al., 2017). Na CU parece exercer um papel protetor por levar a redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como a IL-8, o aumento na produção de muco e a diminuição da permeabilidade epitelial do intestino (ROM, 2013; YADAV et al., 2017).

Os fatores dietéticos também são componentes críticos para a suscetibilidade à ocorrência dessas doenças. Estudos apontam que o maior consumo de carne vermelha, gorduras saturadas, carboidratos simples e aditivos alimentares, bem como a baixa quantidade de fibras dietéticas, frutas, vegetais e antioxidantes, aumentam o risco de desenvolver DIIs (BARBALHO et al., 2016). As deficiências de micro e macronutrientes e a superabundância de calorias e macronutrientes aumentam a suscetibilidade a infecções e risco de doenças auto inflamatórias. Além disso, compostos alimentares como proteínas e carboidratos digeríveis podem contribuir para a patogênese das DIIs por promoverem modificações da microbiota levando a um aumento da processos de permeabilidade e inflamação (BARBALHO et al., 2016; ALEKSANDROVA; ROMERO-MOSQUERA; HERNANDEZ, 2017).

O uso contínuo de alguns medicamentos a exemplo dos AINES está relacionado com a patogênese das DII por inibirem a enzima ciclooxigenase (COX) e a síntese de prostaglandinas

citoprotetoras. Com isso ocorre o desvio do substrato para a via dos leucotrienos, bem como, a inibição da atividade do NF- κ B, que exerce um importante papel na resposta contra micro-organismos invasores. Portanto, são medicamentos que podem induzir o quadro inflamatório da mucosa gastrintestinal, e por isso têm sido descritos como agentes potenciais para exacerbação das DIIs (MARCEN et al., 2016).

O uso prolongado de antimicrobianos pode alterar a microbiota intestinal, levando a instalação de um quadro de disbiose e consequentemente ao aumento da colonização de micro-organismos potencialmente patogênicos, como a *Escherichia coli*, e redução dos micro-organismos comensais essenciais para a homeostase (THEOCHARI et al., 2017).

O estresse crônico está relacionado ao desenvolvimento de DIIs, no entanto, os mecanismos permanecem em grande parte não elucidados. No entanto, o estresse psicossocial e a depressão têm sido relatados como fatores envolvidos na patogênese e no aumento do índice de atividade da doença na DC e CU (GAO et al., 2018).

O mecanismo envolvido na depressão pode está associado ao aumento da suscetibilidade as doenças mediadas pelo sistema imune, através do eixo hipotálamo-hipófise e a ativação do sistema nervoso autônomo, com aumento dos níveis de cortisol e citocinas pró-inflamatórias. O estresse crônico também está associado a perturbação da microbiota intestinal que desencadeia a resposta inflamatória do sistema imunológico (BRZOZOWSKI et al., 2016; GAO et al., 2018).

- **Fatores genéticos**

Nos últimos anos muitos estudos sobre a base genética das DIIs revelaram informações importantes para melhorar o entendimento da sua patogênese. Dos mais de 200 polimorfismos de nucleotídeo único associados ao aumento do risco para a DII, foram identificadas várias vias e genes que podem afetar a maneira como micro-organismos intestinais são montados ou alterações na microbiota intestinal que afetam o hospedeiro. Essas vias envolvem funções importantes como a função da barreira intestinal, cicatrização de feridas, autofagia, apoptose, ativação imune e respostas ao estresse (LIU; THADDEUS, 2016; MIYOSHI; CHANG, 2017).

O NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain containing 2*) é um receptor de reconhecimento padrão envolvido na imunidade inata, presente na superfície de macrófagos e monócitos. Alterações genéticas nos genes NOD2 estão relacionadas com um maior risco de desenvolvimento de DIIs e estima-se que esse receptor esteja mutado em quase 25% dos indivíduos com DC. Essas mutações podem afetar o microbioma intestinal por interromper as

interações do hospedeiro com os micro-organismos envolvidas no estágio inicial da doença, bem como que a microbiota intestinal parece afetar a expressão do gene NOD2, pois, camundongos livres de germes têm menos expressão desse receptor (CAMMAROTA et al., 2015; MIYOSHI; CHANG, 2017).

Os genes do receptor de IL-23 (IL-23R) e de autofagia ATG16L1 e IRGM estão envolvidos nas DIIs, principalmente na DC. Os indivíduos que apresentam mutações nos genes para IL-23R apresentam resposta T_H17 exacerbada e mutações nos genes de autofagia, que dificultam a eliminação dos produtos de degradação celular e bacterianos, acarretando o constante recrutamento de linfócitos e amplificação da resposta inflamatória intestinal (LAN et al., 2015).

Os genes receptores de IL-10 (IL-10RA e IL-10RB) foram os primeiros genes que se mostraram associados ao início precoce das DIIs. A principal função desse receptor é suprimir a secreção de citocinas inflamatórias como o TNF. A ausência desse receptor está associada a um aumento de citocinas pró-inflamatória e redução da secreção de citocinas anti-inflamatórias. Essa mutação é caracterizada por colite refratária e doença perianal, com envolvimento significativo do intestino delgado (KOTLARZ et al., 2012; LIU; STAPPENBECK, 2016).

- **Barreira epitelial**

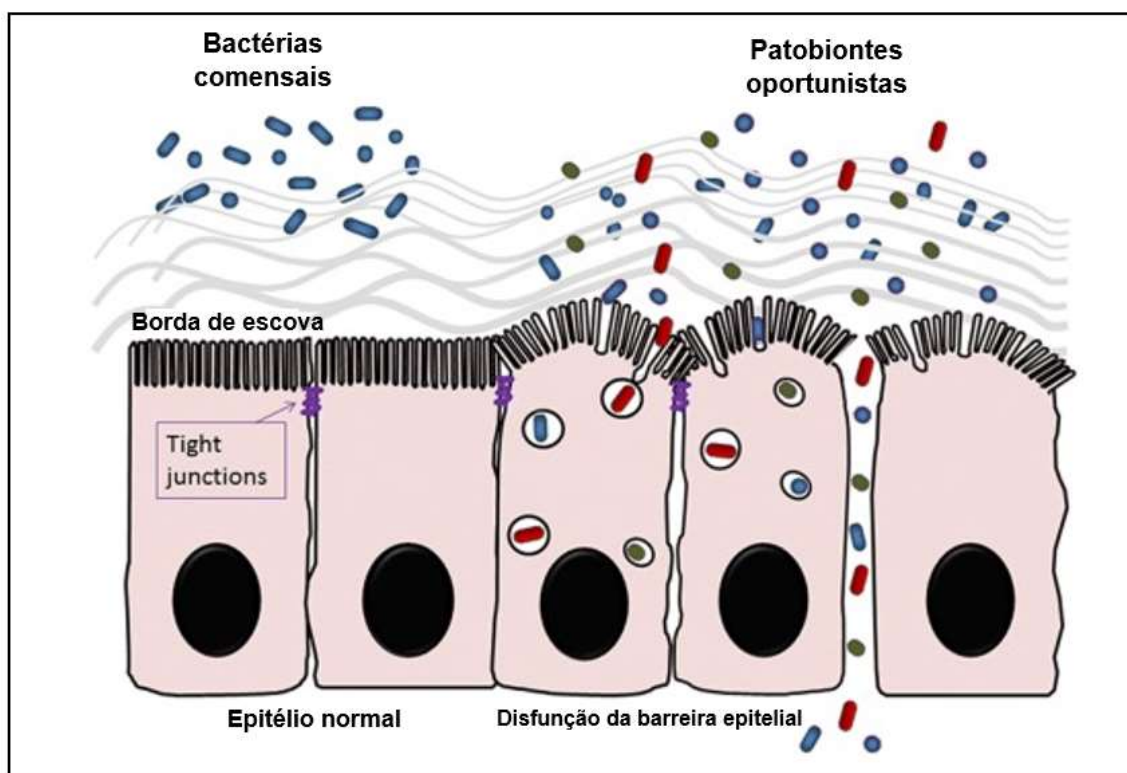
A barreira intestinal está localizada na interface entre o ambiente luminal externo e o sistema imunológico interno e consiste em uma parede de células epiteliais firmemente conectadas, apoiadas por fatores antimicrobianos e muco, que limita a interação entre o microbioma e o sistema imunológico. O epitélio intestinal é uma barreira crítica que controla a entrada de moléculas e microrganismos potencialmente patogênicos e é permeável a nutrientes e solutos essenciais ao lúmen (PASTORELLI et al., 2013; LUCERI et al., 2019).

O epitélio intestinal é disposto em uma monocamada de células epiteliais colunares, ligadas por meio de junções de oclusão (VARGAS-ROBLES et al., 2019). Uma camada mucosa protetora recobre a superfície externa do epitélio, composta de mucinas glicosiladas secretadas por células caliciformes, bem como, de defensinas liberadas por células de Paneth e células epiteliais (KIM; CHEON, 2017).

Defeitos na barreira intestinal em indivíduos com DII resultam em um aumento na captação de antígenos luminais através do epitélio intestinal, o que, por sua vez gera um estímulo ao sistema imunológico e causa a inflamação da mucosa (**Figura 6**) (SALIM; SÖDERHOLM, 2011; VANCAMELBEKE; VERMEIRE, 2017).

No entanto, se as alterações da barreira mucosa representam uma disfunção primária na etiologia da DII ou se desenvolvem como consequência dos processos inflamatórios nos indivíduos com DII, ainda não está totalmente elucidado. Contudo, existe consenso que as disfunções na barreira intestinal representam uma das principais vias na patogênese da DII (SALIM; SÖDERHOLM, 2011; VANCAMELBEKE, VERMEIRE, 2017).

Figura 6: Disfunção na barreira intestinal em indivíduos com DII com aumento na captação de antígenos luminais através do epitélio intestinal



Fonte: Adaptado de YU et al., 2018.

A alteração do complexo de junção apical pode ocorrer em resposta à exposição a *Escherichia coli* aderente invasiva e outras *E. coli* enteropatogênicas. A interação dessa bactéria com as células epiteliais intestinais, induz uma resposta inflamatória que leva à superprodução de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α . Esses mediadores aumentam a permeabilidade intestinal, agindo sobre as proteínas de junção “apertada”, as *tight junctions*, que exacerba a disfunção da barreira nas DIIs (SHAWKI; MCCOLE, 2017).

A liberação de mucinas é controlada por duas vias, a basal e a estimulada. A via basal está envolvida nos processos fisiológicos, já a via estimulada é ativada em resposta a fatores bioativos ou epigenéticos, como micróbios, toxinas, citocinas pró-inflamatórias, neuropeptídeos e fatores de crescimento. Esses fatores levam à mudança da expressão das

mucinas em resposta à inflamação na mucosa do cólon. A hiperprodução e glicosilação anormal das mucinas são características típicas relacionadas à DC (KIM; CHEON, 2017; MINER-WILLIAMS; MOUGHAN, 2016).

A mucina secretora MUC2 é predominante na camada de muco expressa por células caliciformes no cólon. A síntese de MUC2 diminui nas DIIs, sua expressão pode ser inversamente correlacionada com a gravidade da inflamação (MINER-WILLIAMS; MOUGHAN, 2016; KIM; CHEON, 2017).

2.4 Epidemiologia

A úlcera péptica acomete cerca de 5 a 10% da população mundial, com incidência de 0,1 a 0,3% ao ano, ocasionando morbidade e mortalidade significativa em todo o mundo e as sequelas podem variar de dor e sangramento gastrointestinal à obstrução e perfuração. É considerada um problema de saúde pública que compromete a qualidade de vida da população (LANAS, CHAN, 2017; KAVITT et al, 2019).

Dados epidemiológicos, mostram que os homens são mais acometidos do que as mulheres, na proporção de 3,5:1 para úlceras duodenais e 2,5:1 para úlceras gástricas. A úlcera duodenal é mais incidente entre 20 e 50 anos enquanto que a úlcera gástrica é diagnosticada nas pessoas a partir dos 55 anos de idade. Além disso a sua incidência também está associada ao tabagismo e a condições clínicas crônicas (LANAS, CHAN, 2017; KAVITT et al, 2019).

As internações hospitalares e complicações da úlcera péptica têm diminuído nos últimos anos. Essa redução pode estar associada ao uso disseminado de fármacos antissecretores em todo o mundo, ao uso mais racional dos AINEs e aos esforços para erradicar a infecção por *H. pylori*, que é um dos principais fatores envolvidos no desenvolvimento dessa afecção. Entretanto, as úlceras têm alto índice de recorrência, que pode acontecer em 67% dos casos em que o *H. pylori* não é erradicado e em 6% quando há erradicação (MIN; MIN 2018; ESCOBEDO-HINOJOSA et al., 2018).

Uma das infecções bacterianas mais comuns no mundo é pela bactéria *H. pylori*. Estima-se que a incidência dessa infecção em adultos em países desenvolvidos é cerca de 0,5% ao ano. Nos países em desenvolvimento, a incidência de infecção por *H. pylori* varia entre 3% a 10% por ano, todavia, esse índice vem diminuindo ao longo do tempo nos países desenvolvidos (NEJATI et al., 2018).

O Brasil é o 11º no ranking dos países acometidos por doenças digestivas, com aproximadamente 4.660 mortes decorrentes de úlceras pépticas em 2016, sendo a terceira causa

mais frequente de mortalidade por doenças digestivas no Brasil (GDB, 2017). Apesar de ser uma doença frequente, sua real prevalência ainda é desconhecida, devido à escassez de estudos de base populacional. 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).

Contudo, esses dados epidemiológicos não reproduzem verdadeiramente os casos de úlcera péptica no país devido às subnotificações, reforçando a necessidade de pesquisas para estimativas mais precisas de sua ocorrência.

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DIIs), são doenças crônicas com alta taxa de recidiva que afetam a qualidade de vida dos indivíduos. Estima-se que mais de dois milhões de norte-americanos vivem com DIIs e a previsão é que essa população que se aproxime de quatro milhões em 2030 (**Figura 7**) (NG et al., 2018; WINDSOR; KAPLAN, 2019).

Apesar da escassez de estudos populacionais na maioria dos países em desenvolvimento, estudos epidemiológicos indicaram um aumento na incidência e prevalência da DC e CU em diferentes regiões do mundo. Embora a incidência esteja se estabilizando em muitos países ocidentais, o número de casos continua alto, uma vez que a prevalência estimada excede 0,3% da população na América do Norte e 0,7% na Europa (NG et al., 2018; COWARD et al., 2019).

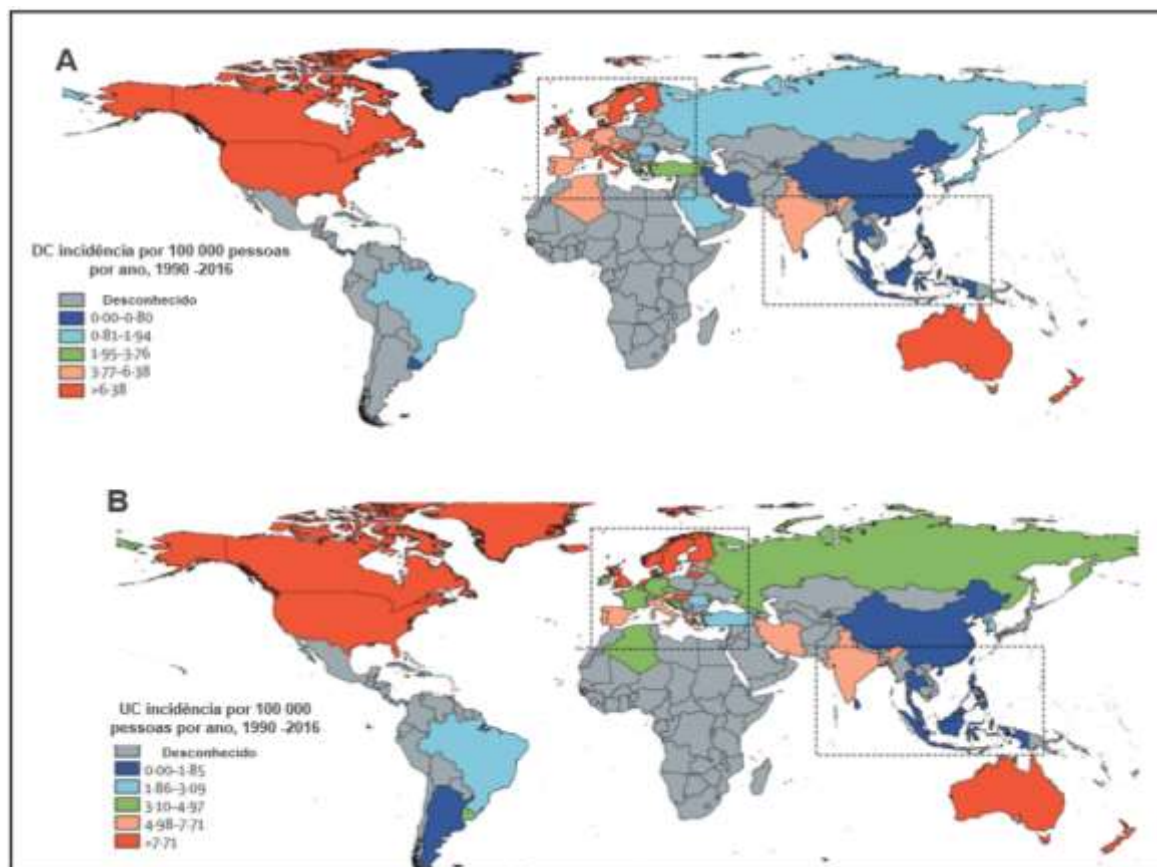
Em relação à CU, observa-se uma maior incidência nos países ocidentais, no entanto, nos últimos anos o número de casos vem crescendo rapidamente em países em desenvolvimento, estando relacionado aos hábitos dietéticos e estilo de vida desses indivíduos (NIKKHAH-BODAGHI et al., 2019).

Quanto à faixa etária, geralmente os diagnósticos são em indivíduos entre 18 e 35 anos de idade, embora a taxa de diagnóstico pediátrico tenha aumentado nos últimos anos (LOFTUS, 2016; SÝKORA et al., 2018). Quanto ao gênero, acometem de forma semelhante homens e mulheres, entretanto, pode ser influenciada por fatores como raça e etnia (ANANTHAKRISHNAN, 2015; LOFTUS, 2016).

Estudos realizados no Brasil mostraram variações importantes na prevalência dessas doenças em diferentes regiões. A prevalência de DII no estado de São Paulo é de 52,6 por 100.000 habitantes, enquanto no Piauí é de 12,8 por 100.000 habitantes. O desenvolvimento social e econômico, são fatores que possivelmente influenciaram esses números que são

maiores no estado de São Paulo em comparação com os estados com o menor índice de desenvolvimento (QUARESMA et al., 2019).

Figura 7: Incidência de CD e UC dos anos de 1990 a 2016. Mapa do mundo representando a incidência de (A) CD e de (B) CU.



Fonte: Adaptado de NG et al., 2018.

Apesar dos avanços na farmacoterapia mais de 20% dos indivíduos acometidos por DC são submetidos a cirurgia e mais de 10% dos pacientes com CU ainda precisam de colectomia (YUKSEL et al., 2017).

2.5 Microbiota

O termo microbiota refere-se aos micro-organismos que colonizam o organismo humano (DORÉ et al., 2017). Existe uma relação de simbiose entre a microbiota e o hospedeiro, ou seja, ambos se beneficiam dessa associação. Suas principais funções fisiológicas são metabólica, imunomoduladora e de barreira de defesa natural a fim de dificultar a colonização por micro-organismos patogênicos.

O trato gastrointestinal, sobretudo o intestino, é o local que abriga de mais de 100-1000 espécies microbianas, que modulam principalmente o ambiente interno do hospedeiro e,

portanto, desempenham um papel importante na sua saúde. O desequilíbrio na composição da microbiota intestinal é denominado disbiose, influencia na modulação do sistema imunológico, e está relacionada ao desenvolvimento de doenças inflamatórias, autoimunes ou atópicas (SENDER et al., 2016; CHANG, 2020).

Atualmente a população apresenta uma alta prevalência destas doenças e dados epidemiológicos apontam que o estilo de vida e fatores ambientais são agentes importantes para esse aumento (DARGAHI et al., 2019). A alteração na microbiota resultante de uma dieta pobre em fibras pode levar a deterioração da camada de muco, aumentando a suscetibilidade a infecções e desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas (MAKKI et al., 2018).

Estudos recentes evidenciam a participação da microbiota não só na patogênese das doenças inflamatórias intestinais (DONG et al., 2019), mas também na diarreia infecciosa, na síndrome do intestino irritável (FAN et al., 2017) e nas úlceras pépticas (KIM et al., 2017).

A literatura evidencia que a composição da microbiota é alterada em indivíduos portadores de DIIs, em comparação a indivíduos saudáveis (SCHIRMER et al., 2018), incluindo redução na diversidade e na abundância de taxa bacteriana nos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, e aumentos nos membros do filo Proteobacteria, como *Enterobacteriaceae* (KNOX et al., 2019).

Indivíduos com DIIs apresentam disbiose com um padrão característico de redução na diversidade de micro-organismos residentes da microbiota, a exemplo dos *Firmicutes* e *Bacteroides*, que consistem nos dois grupos de bactérias mais abundantes do intestino humano. Além disso, na DC, tem sido relatado um aumento da família *Enterobacteriaceae* e uma redução de *Faecalibacterium prausnitzii* e *Bifidobacterium* (LI et al., 2015; NISHIDA et al. 2017).

A perpetuação da inflamação crônica nas DIIs ocorre devido a diminuição dos microorganismos anti-inflamatórios aliado ao aumento do número de bactérias inflamatórias. Estudos evidenciam que a redução de *Faecalibacterium prausnitzii*, espécie bacteriana prevalente em adultos saudáveis, está relacionada com a recidiva de CU, não obstante sua reposição está relacionada à manutenção da remissão clínica (NISHIDA et al. 2017).

Estudos recentes em modelos animais e testes em humanos sugerem que a microbiota intestinal patogênica e a expressão aumentada de citocinas pró-inflamatórias nas DIIs desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e manutenção da doença (DALCIN et al., 2019).

Aproximadamente um terço dos indivíduos com DC tem um aumento de *Escherichia coli* invasora aderente associada à mucosa, que atravessam a barreira mucosa, aderem e invadem células epiteliais intestinais, sobrevivem e se replicam dentro dos macrófagos, provocando secreção de grandes quantidades de TNF- α . Além disso, sua sobrevivência intracelular a longo prazo nas células epiteliais do intestino, suprime a autofagia, o que pode contribuir para a gravidade da infecção (TORRES et al., 2017; YU, 2018).

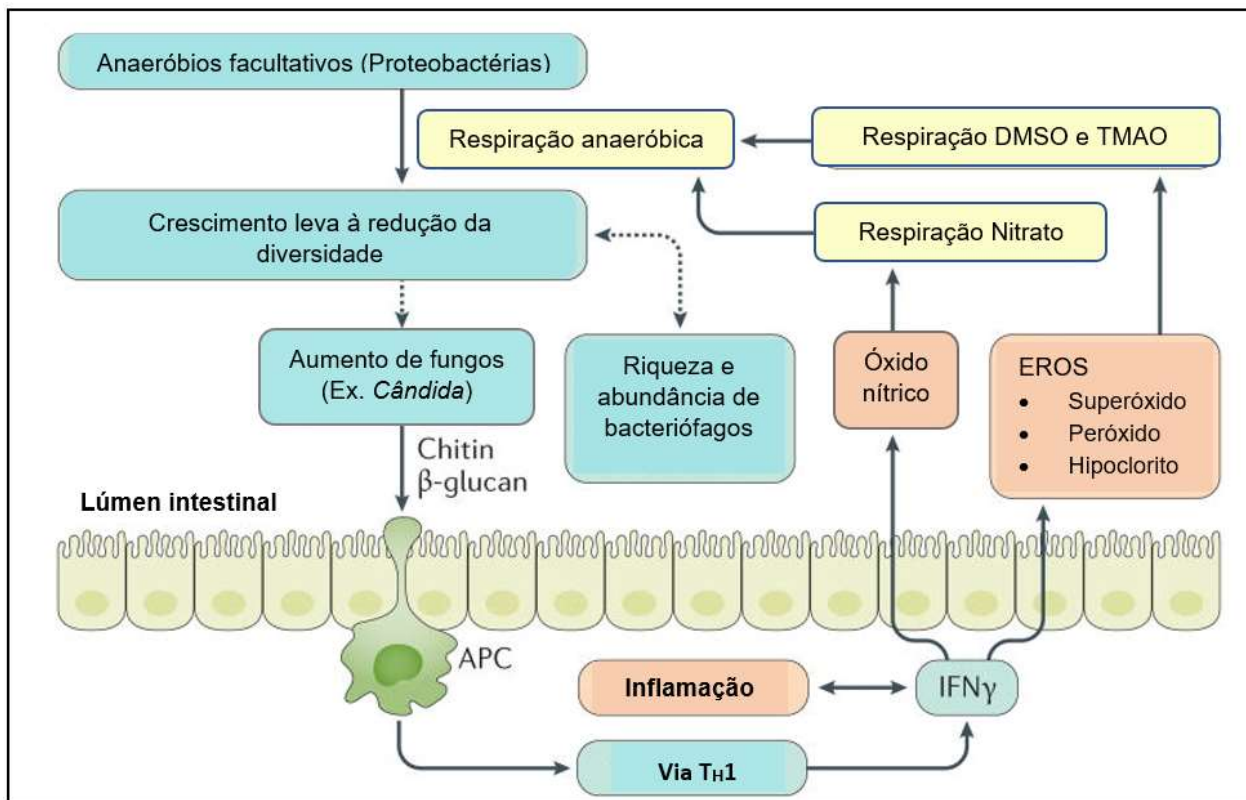
A inoculação de *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* não patogênicos em camundongos geneticamente deficientes de IL-10 induziu inflamação no ceco e no cólon distal. A associação das duas bactérias comensais induz pancolite agressiva e inflamação duodenal, o que sugere que bactérias comensais oportunistas podem se transformar em patobiontes em hospedeiros geneticamente predispostos (KARRASCH et al., 2007; YU, 2018).

Bactérias comensais como *Bacteroides fragilis* e *Enterococcus faecalis* têm sido relatadas como colitogênicas, aumentando a permeabilidade intestinal e causando degradação da E-caderina, uma importante proteína de junção celular. A *Enterococcus faecalis* causa ativação de células dendríticas mediada por TLR2 e contribui para a inflamação. Já a enterotoxina produzida por *bacteroides fragilis* atua como uma metaloprotease para a clivagem de proteínas juncionais e indução da síntese de IL-8 (REMACLE; SHIRYAEV; STRONGIN, 2014; OCVIRK et al., 2015; YU, 2018).

A inflamação do cólon estimula a ativação dos linfócitos do subgrupo T_H1, que induzem a liberação de IFN γ aumentando a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelas células imunes fagocíticas da imunidade inata. Esses radicais formam produtos para a respiração anaeróbica. Os anaeróbios facultativos utilizam esses produtos para o seu crescimento, causando reduções na diversidade bacteriana (**Figura 8**) (NI et al., 2017).

Outros membros não bacterianos da microbiota, fungos, vírus, arqueias e os fagos também podem ter um papel significativo na doença gastrointestinal. A disbiose fúngica na DII está associada a uma proporção reduzida de *Saccharomyces cerevisiae* e um aumento da *Candida albicans* (NORMAN et al., 2015; NI et al., 2017). Além disso, foram observadas alterações na composição dos bacteriófagos associados à DII, principalmente o aumento das sequências de bacteriófagos *Caudovirales* em amostras de biópsias de DC. Esse aumento foi associado a uma redução na diversidade bacteriana (NORMAN et al., 2015; NI et al., 2017).

Figura 8: Inflamação do cólon nas DIIs e as alterações na microbiota intestinal



Fonte: Adaptado de NI et al., 2017.

A interação entre a microbiota intestinal, os fatores genéticos e a resposta inflamatória do hospedeiro indicam que tratamentos alternativos com prebióticos, probióticos e transplante de microbiota fecal possam desempenhar um papel importante na prevenção e tratamento das DIIs (NI et al., 2017; CHIBBAR et al., 2017).

Os probióticos utilizados frequentemente são cepas de bactérias formadoras de ácido láctico como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus*. As bactérias pertencentes a estes gêneros demonstraram habilidade de inibir o crescimento *in vitro* de diversos patógenos entéricos como *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Clostridium difficile* (ALETA; HRVAT; DZUHO, 2020).

2.6 Sistema antioxidante

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. As EROs são formadas pelo metabolismo celular em organelas como mitocôndrias, peroxissomos e retículo endoplasmático, em processos como a respiração celular (SIES, 2015; XIE et al., 2019).

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).

As EROs são classificadas em dois tipos diferentes: 1) Espécies radicalares como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), hidroperoxila ($HOO^{\bullet}$), peroxila ($ROO^{\bullet}$) e alcoxila ($RO^{\bullet}$); 2) Espécies que não apresentam radicais, a exemplo do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlet ($^1O_2$), ozônio (O_3) e ácido hipocloroso ($HClO$) (SIES; JONES, 2020).

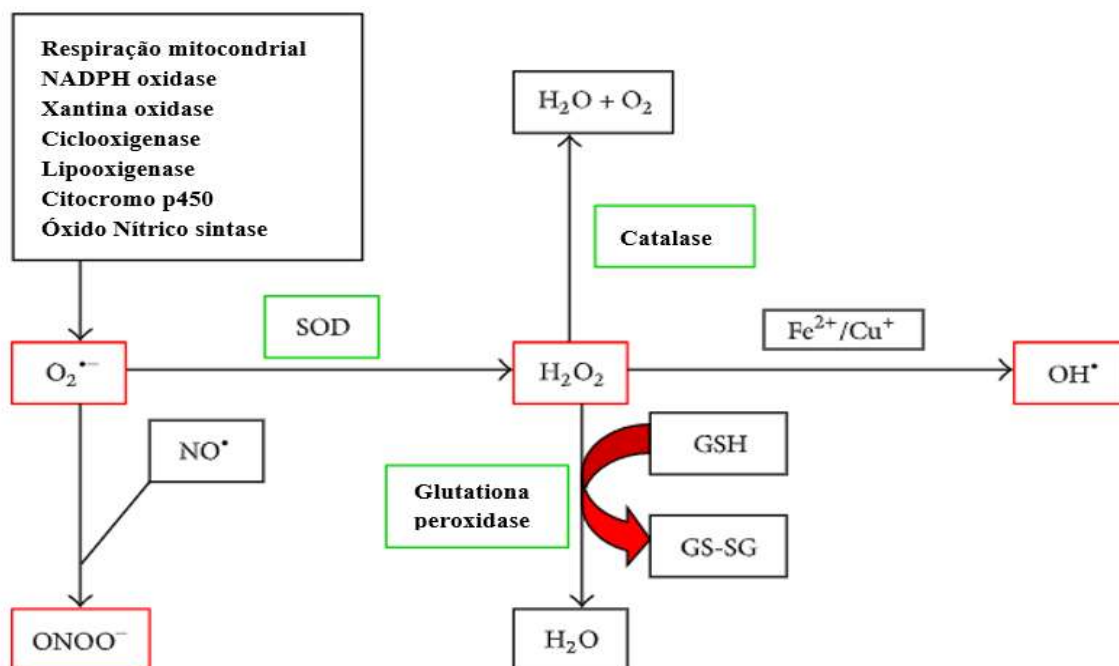
O aumento na produção de espécies reativas, incluindo ânions superóxido, radical hidroxila ($\bullet OH$), peroxinitrito ($ONOO^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroperoxídeos ($ROOH$), aldeídos lipídicos reativos e óxido nítrico reativo, associado a um baixo nível de antioxidantes no organismo, pode causar estresse oxidativo, que gera danos a constituintes celulares como proteínas, lipídios e DNA. As alterações químicas podem levar a quebra de cadeia de DNA e erros no reparo desses danos no DNA podem levar a mutações, interrupção do crescimento celular ou apoptose (TAN et al., 2018; BISWAS, 2019).

O aumento das EROs produzido pelo estresse oxidativo associado ao processo inflamatório nas células, pode desencadear graves danos às macromoléculas. Além disso, pode regular de forma positiva a expressão de genes envolvidos nas respostas imunes adaptativas e inatas no TGI (RANA et al., 2014; DUDZIŃSKA, et al., 2018).

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 de defesa enzimático é composto por proteases que formam a primeira linha de defesa contra o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, como: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione S transferase (GST) (KIVRAK et al., 2017; SARANGARAJAN et al., 2017).

Os antioxidantes não enzimáticos correspondem a segunda linha de defesa antioxidante e pode ser de produção endógena como a glutathione reduzida (GSH), tioredoxinas, ácido úrico e bilirrubina; e os exógenos representados por ácido ascórbico (vitamina C), tocoferóis (vitamina E), carotenóides e compostos fenólicos (KIVRAK et al., 2017; SARANGARAJAN et al., 2017). As principais reações pró-oxidantes e antioxidantes no sistema biológico, encontram-se dispostas na figura 9.

Figura 9: Representação das principais reações pró-oxidantes-antioxidantes relevantes no sistema biológico



Fonte: Adaptado de BISWAS, 2016.

A barreira da mucosa gástrica e o fluxo sanguíneo gástrico mantêm a integridade do estômago contra o suco gástrico e agentes agressores exógenos. Os níveis GSH são maiores na mucosa gástrica em comparação com outras partes do trato gastrointestinal fornecendo proteção adicional contra o ácido gástrico (PÉREZ et al., 2017).

A glutathione possui em sua composição um grupo sulfidril (-SH) facilmente oxidável, que protege o organismo contra lesões oxidantes, protege a integridade e a permeabilidade da membrana celular, promove a montagem de oligômeros de mucina para manter a fluidez do muco, auxilia na manutenção da função imunológica, na regulação da síntese e degradação de proteínas e na manutenção da estrutura proteica (ROBACZEWSKA et al., 2016; PÉREZ et al., 2017).

O equilíbrio do sistema antioxidante é muito delicado pois se houver superprodução dos agentes oxidantes, as células começam a sofrer as consequências. O estresse oxidativo desempenha um papel importante nas alterações relacionadas à fisiopatologia da inflamação, uma vez que a peroxidação lipídica pode exacerbar reações em cadeia por radicais livres e ativar a liberação de mediadores inflamatórios, como neutrófilos, aumento da atividade da mieloperoxidase (MPO) importante marcadora da atividade de neutrófilos e outras citocinas inflamatórias (TAN et al., 2018; BISWAS, 2019).

A inflamação, ativa o epitélio favorecendo a infiltração de neutrófilos, a síntese e liberação de citocinas pelos macrófagos, entre outros mediadores que contribuem para o estresse oxidativo (PEREZ et al., 2017). Tanto a inflamação crônica quanto a hiperativação do sistema imunológico desencadeiam altos níveis de EROs e reduzem os níveis de antioxidantes endógenos. Esse processo induz a formação de danos na camada mucosa e invasão bacteriana, que por sua vez estimula a resposta imune e contribui para a progressão das DIIs (LUCERI et al., 2019).

Várias enzimas, como peroxidases, NADPH oxidase (NOX), xantina oxidase, lipoxigenases, mieloperoxidase (MPO), óxido nítrico sintase (NOS) e ciclooxygenases (COXs), participam da geração endógena de EROs. Dentre essas enzimas, as NOXs da mucosa, foram relatadas como fatores de risco para DIIs. A MPO é ativa na mucosa inflamada em pacientes com CU e contribui para a progressão de malignidades (O'NEILL et al., 2015; TIAN; WANG; ZHANG, 2017).

A NOS tem um importante papel na manutenção a integridade da mucosa gastrointestinal, contudo, altos níveis de expressão da óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) são considerados fatores de risco para o desenvolvimento de lesões nas úlceras pépticas e na CU. O aumento da iNOS induz a produção de óxido nítrico associados à nitrotirosina no epitélio e em focos de inflamação, desencadeando estresse oxidativo e progressão da CU. Esses efeitos demonstram que o desequilíbrio na homeostase redox é fundamental para a patogênese das DIIs (DHILLON et al., 2014; TIAN; WANG; ZHANG, 2017; YU et al., 2017).

As EROs são segundos mensageiros para a ativação de vias de transdução de sinal que induzem inflamação, como as vias da cascata de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitogênio (MAPKs) e NF- κ B. Antígenos bacterianos, como os lipopolissacarídeos, ativam os macrófagos através do receptor Toll-like-4 (TLR4), que desencadeia a ativação da MAPK exercendo um papel crucial na ativação da resposta imune inata e adaptativa e da via do NF- κ B (AKANDA et al., 2018).

As EROs mediam a estimulação da I κ B cinase, que induz a quebra proteasomal de I κ B α ativando o NF- κ B que é o fator de transcrição que se liga a promotores de genes-alvo e desencadeiam a transcrição de citocinas inflamatórias e quimiocinas (SONG et al., 2014; AKANDA et al., 2018).

O fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide-2 (Nrf2) regula a expressão de mais de 300 genes envolvidos na modulação do estresse oxidativo e da inflamação. Estudos demonstram

que a ativação da via do Nrf2, regula negativamente a via de NF- κ B e melhora o estresse oxidativo observado nas DIIs, através de um mecanismo antioxidante (WU et al., 2019).

Camundongos deficientes do gene de Nrf2, mostraram aumento da expressão de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8, iNOS e COX-2) e expressão reduzida de enzimas antioxidantes (TIAN et al., 2017; WU et al., 2019).

O estresse oxidativo sistêmico observado na DC, pode provavelmente contribuir para o desenvolvimento de manifestações extra intestinais, como fístulas perianais, doenças dermatológicas e artrite, que são muito comuns nos indivíduos acometidos por essa doença (YUKSEL et al., 2017).

2.7 Citocinas

As citocinas são proteínas solúveis, produzidas por diferentes tipos de células que desenvolvem ações no controle e função de várias células imunes e não imunes e participam da regulação imunológica, na patogênese e na modulação de doenças mediadas pelo sistema imune, como a inflamação (GUO et al., 2017). Dentro dessa grande classe estão inseridas as interleucinas, os fatores de necrose tumorais, interferons, linfocinas e quimiocinas (GUO et al., 2017; O'SHEA et al., 2019).

A inflamação é uma resposta biológica defensiva a estímulos e infecções que promove a produção de mediadores inflamatórios. O objetivo final dessa resposta protetora é livrar o organismo da causa inicial da lesão celular e das consequências dessa lesão, no entanto, o processo inflamatório prolongado pode induzir danos aos tecidos e é a causa de muitas doenças crônicas (BISWAS, 2019; YUN et al., 2017).

As respostas do sistema imunológico, incluem a liberação de citocinas, que ao interagir com seus respectivos receptores, promovem transdução de sinal por segundo mensageiros promovendo a ativação de fatores de transcrição ou atuando sobre as células do sistema imunológico (BOCKERSTETT; DIPAOLO, 2017). Essas citocinas desempenham um papel importante na gastrite causada por infecções como *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) e, no progresso da doença para complicações clínicas mais avançadas, como úlceras gástricas, duodenais e câncer gástrico (BOCKERSTETT; DIPAOLO, 2017; MOTAMEDIRAD et al., 2018).

No início da inflamação, a infecção ou dano tecidual é detectada pelos receptores de reconhecimento de padrões, como os receptores do tipo Toll (TLR), receptores do tipo NOD (NLR) e pelo receptor de produtos finais de glicação avançada (RAGE), os quais são ativados

após a ligação com as moléculas conhecidas como padrões moleculares ativados por patógenos (PAMPs). Após a ativação, ocorre vias de transdução de sinal que ativam fatores de transcrição, como o fator nuclear κ B (NF- κ B) e ativando a proteína 1 (AP-1) (TABAS; GLASS, 2013; BISWAS, 2019).

A via do NF- κ B desempenha um papel fundamental na regulação dos genes relacionados a reação inflamatória aguda. Na sua forma inativa, o NF- κ B é retido no citoplasma e ligado à proteína I κ B-quinase. Após exposição a vários 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 de NF- κ B, que se transloca para o núcleo e causa a ativação transcricional de outras citocinas inflamatórias (AKANDA et al., 2018; AZIZ et al., 2019).

As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) são as principais vias de transdução de sinal intracelular e incluem vários subgrupos, a exemplo da MAPK p38 um dos membros mais representativos, uma quinase sensível ao estresse oxidativo, ativada por estímulos extracelulares como superprodução de EROS ou inflamação. O estresse oxidativo aumenta a fosforilação da MAPK p38 e promove a ativação dessa via, que está intimamente relacionada à ativação da via do NF- κ B (AKANDA et al., 2018).

Algumas citocinas exercem papéis fundamentais nas respostas inflamatórias, induzindo o processo de inflamação (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7 e TNF) ou atuando para suprimir a resposta inflamatória (IL-10, IL-11, e IL-13), modulando dessa forma a resposta imunológica. As principais citocinas pró-inflamatórias encontradas nos tecidos acometidos pela úlcera gástrica são TNF- α , IL-1 β e IL-6 (BOCKERSTETT; DIPAOLO, 2017; YUN et al., 2017).

A principal fonte celular de IL-1, assim como de TNF, são os fagócitos monoculares ativados. Existem duas formas de IL-1 (IL-1 α e IL-1 β) que têm menos de 30% de homologia, mas se ligam aos mesmos receptores celulares e desempenham as mesmas atividades biológicas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019). A IL-1 medeia seus efeitos biológicos através de um receptor de membrana chamado de receptor de membrana da IL-1, que é expresso em muitos tipos celulares, incluindo células endoteliais, células epiteliais e leucócitos (TURNER et al., 2014; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

A principal forma biologicamente ativa e secretada é a IL-1 β , cuja transcrição do gene é induzida por vias de sinalização do TLR e NLR que ativam NF- κ B, ao passo que a clivagem da pró-IL-1 β é mediada pelo inflamassoma NLRP3.

O TNF- α é outra citocina pró-inflamatória importante com funções pleiotrópicas, que desempenha um papel central no desenvolvimento da úlcera gástrica, iniciando a resposta

inflamatória aguda, acompanhada de infiltração de neutrófilos na mucosa gástrica, modulando a morte celular por apoptose na mucosa gástrica, que ocorre por meio da ativação da via da caspase-3 (HUSSEIN et al, 2016). Também é conhecido por suprimir a microcirculação gástrica, a proliferação celular e a angiogênese na margem da úlcera, atrasando assim a cicatrização da úlcera (HUSSEIN et al, 2016; AZIZ et al., 2019).

A IL-6 é uma citocina multifuncional, sendo considerada um regulador primário da inflamação aguda e crônica, bem como estimulador das células T e B (AZIZ et al., 2019). Ela estimula os neutrófilos, macrófagos e linfócitos. A ativação do receptor de IL-6 dispara uma via de sinalização que ativa o fator de transcrição STAT3 que promove a diferenciação de células T produtoras de IL-17, o que leva ao estímulo de vários produtos nocivos, radicais reativos ao oxigênio e enzimas lisossômicas responsáveis por danos aos tecidos da úlcera gástrica (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019; AZIZ et al., 2019).

Entre vários subgrupos de células T auxiliares, as células T_H22 podem desempenhar um papel fundamental e duplo na geração de proteção imunológica ou respostas patológicas secretando IL-22 (RAPHAEL et al., 2015). O equilíbrio entre essas duas funções é mantido pela presença ou ausência de IL-17A e pode desempenhar uma função protetora na ausência de IL-17A, enquanto a sinergia dessas duas citocinas pode levar ao aumento da inflamação. Estudos revelam níveis elevados dessas citocinas em indivíduos com úlcera péptica e esse efeito sinérgico leva ao aumento da inflamação e, portanto, à intensificação dos danos e degradação dos tecidos (SANAI et al., 2019).

O principal mecanismo para controle das respostas no intestino é a ativação das células T regulatórias (Treg), que são um subconjunto supressivo de células T que desempenham um papel importante na manutenção da homeostase gastrointestinal e secretam citocinas imunorreguladoras como IL-10 e TGF- β (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

A IL-10 é uma citocina pleiotrópica com importantes propriedades imunomoduladoras, exercendo imunossupressão em vários tipos de células, incluindo DCs e macrófagos, inibindo sua capacidade de estimular células T efectoras. Da mesma forma, o TGF- β suprime respostas inflamatórias mediadas por macrófagos e células T efectoras (YAMADA et al., 2016; AHLUWALIA et al., 2018). Ao interagir com seu receptor (IL-10R), leva à fosforilação do transdutor de sinal STAT3, ativando os genes sensíveis a IL-10 e impulsionando a expressão de mediadores anti-inflamatórios, bloqueando a ação do NF- κ B e também estimulando o fator supressor da sinalização de citocinas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019; VERMA et al., 2016).

O TGI desempenha papel chave na manutenção da homeostase imune, promovendo tolerância a bactérias comensais, autoantígenos e antígenos alimentares, enquanto protege o hospedeiro contra organismos patogênicos por meio de uma resposta inflamatória. Quando a linha tênue entre a tolerância e a inflamação do sistema imunológico GI é interrompida, pode resultar em doenças como DIIs (AHLUWALIA et al., 2017; AHLUWALIA et al., 2018).

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa contra as infecções, sendo constituída pelo sistema complemento, granulócitos, mastócitos, macrófagos, células dendríticas e células NK (GEREMIA et al., 2014; UNGARO et al., 2017).

As células dendríticas, no estado de homeostase em um ambiente influenciado pelas células epiteliais intestinais que produzem ácido retinóico, linfopoietina estromica tímica (TSLP) e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), secretam IL-10 e estimulam respostas anti-inflamatórias e de tolerância. Em condições inflamatórias, desenvolvem maior expressão de TLR2, TLR4 e moléculas co-estimulatórias, além de secretar citocinas pró-inflamatórias. Nas DIIs tem sido observado uma expressão reduzida de ácido retinóico, TSLP e TGF- β na mucosa que leva a um condicionamento inadequado das células dendríticas (**Figura 10**) (TORRES et al., 2017; AHLUWALIA et al., 2018).

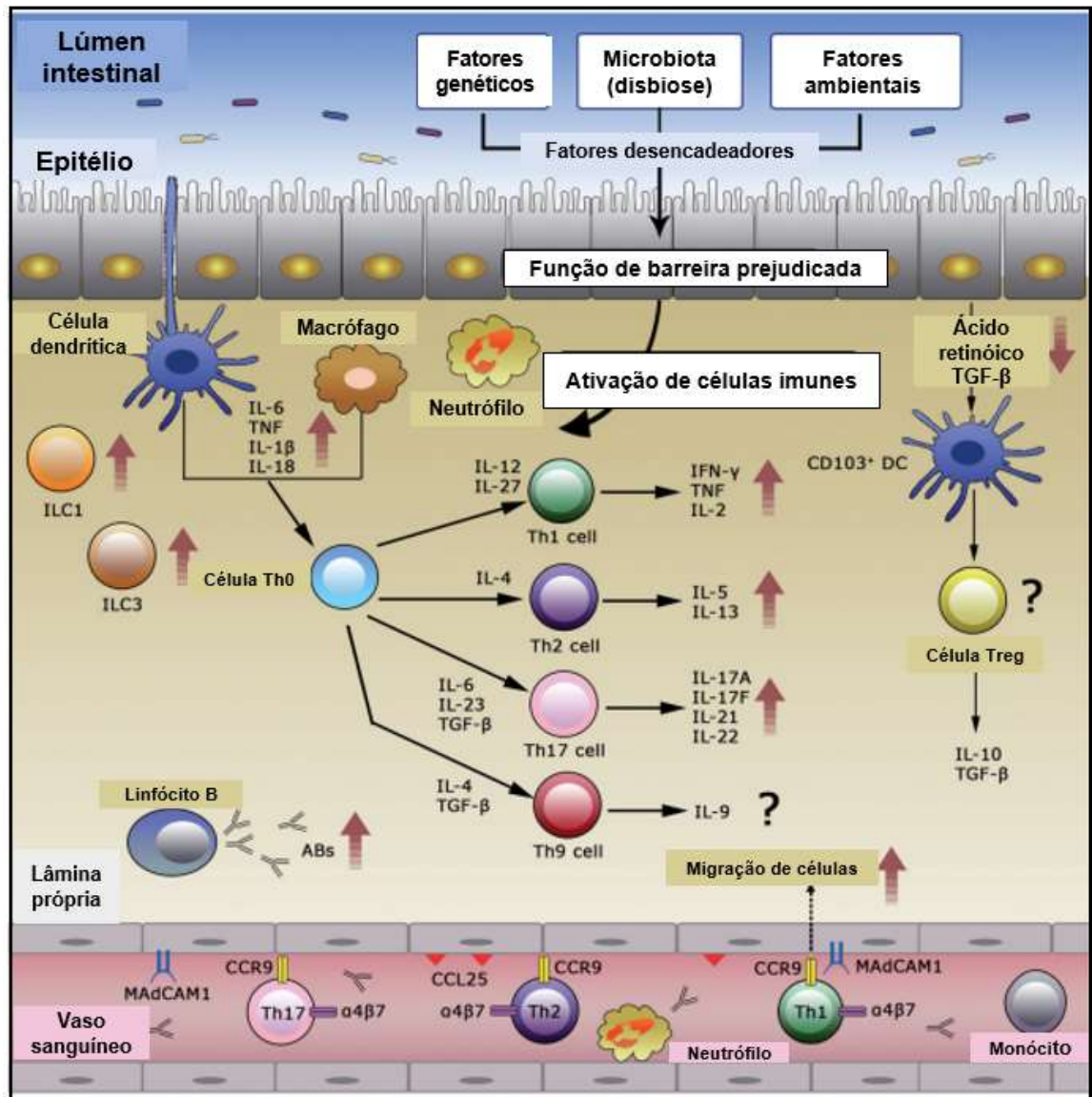
Os macrófagos participam da resposta inata e têm funções essenciais de limpeza, como a depuração de células e tecidos apoptóticos ou senescentes, além da apresentação de antígenos (TORRES et al., 2017). Os neutrófilos são responsáveis pela resposta precoce a estímulos microbianos e produção de citocinas. Quando ativados, se acumulam no sangue e no tecido do cólon dos indivíduos com CU ativa, perpetuam a inflamação intestinal por meio do comprometimento da função da barreira epitelial e induzem a liberação de múltiplos mediadores inflamatórios (TORRES et al., 2017; SOUZA; FIOCCHI, 2016).

As citocinas da imunidade inata têm papel fundamental na ruptura do estado de homeostase intestinal. Dentre as principais citocinas inflamatórias, envolvidas tanto na CU quanto na DC, destacam-se TNF- α e IL-1 β e a IL-6. A IL-1 β , está envolvida no recrutamento de granulócitos e aumento da atividade T_H17, já IL-6, regula a migração de leucócitos por expressão de quimiocinas, participa da ativação, proliferação e diferenciação de células TCD4⁺ e TCD8⁺ por meio da ativação da via de sinalização JAK-STAT (DANESE et al., 2017; AHLUWALIA et al., 2017).

As células linfoides inatas (ILCs), é uma população heterogênea de células, que estão criticamente envolvidas na manutenção da integridade da barreira, e respondem a sinais microbianos e dietéticos. Possuem similaridade com as populações de células TCD4⁺ e são

divididas em ILC1, ILC2 e ILC3, com base nas citocinas produzidas (AHLUWALIA et al., 2018).

Figura 10: Imunopatogênese das Doenças Inflamatórias Intestinais



Fonte: Adaptado de AHLUWALIA et al., 2018.

Legenda: DII: doença inflamatória intestinal; DC: doença de Crohn; CU: colite ulcerativa; DC: célula dendrítica; ILC: células linfóides inatas; Th: célula T auxiliar; Célula Treg: célula T reguladora; IL: interleucina; TNF: fator de necrose tumoral; IFN: interferon; TGF-β: fator de crescimento transformante-β; AB: anticorpo; CCR: receptor de quimiocina; MAdCAM-1: molécula-1 de adesão celular a mucosa; α4β7: integrina; LP: lâmina própria.

As ILCs3 e ILCs1 estão envolvidas na patogênese da DC e CU. As ILCs isoladas do cólon inflamado de indivíduos com DC e CU mostram aumento da expressão gênica das

principais citocinas do subgrupo ILCs3, a IL-17A e IL-22 (TORRES et al., 2017; UNGARO et al., 2017).

A imunidade adaptativa participa da cronicidade das DIIs. Na DC as células T expressam majoritariamente os fenótipos T_H1 e T_H17 a partir da ação das citocinas IL-12, IL-6, IL-23 e TGF- β com a síntese e liberação de IL-17, IL-22 e IFN- γ . Já na CU o perfil inflamatório é caracterizado principalmente por células T com fenótipo semelhante ao T_H2 e de células T natural killer (NKT), com participação das citocinas IL-4 e IL-13 (MARANHÃO; VIEIRA; CAMPOS, 2015; TORRES et al., 2017)

A IL-13, produzida por células NKT é um mediador chave da citotoxicidade epitelial e disfunção de barreira na CU (UNGARO et al., 2017). Além disso, a IL-9 pode contribuir para o desenvolvimento de lesões ulcerativas, pois inibe as células de proliferação e reparo, aumenta os níveis de TNF- α teciduais e possui efeito negativo sobre a função da barreira intestinal (UNGARO et al., 2017; MARTON et al., 2019).

Quanto a participação da imunidade humoral, foi observada concentrações elevadas de IgM, IgA e IgG nas DIIs. Em indivíduos com CU foi relatado um aumento desproporcional dos anticorpos IgG1, todavia, ainda não se sabe se as células B são fatores determinantes da patogênese da CU ou apenas no rompimento de barreira epitelial (UNGARO et al., 2017).

2.8 Terapêutica

A terapia da úlcera péptica se dá pela utilização de medidas farmacológicas e não farmacológicas. O tratamento farmacológico tem como objetivo reestabelecer o equilíbrio perdido entre a ação dos fatores citoprotetores frente aos fatores agressores e tem como principais funções diminuir ou neutralizar a secreção ácida e/ou estimular o sistema de citoproteção gástrica (BOEING et al., 2016; KAZMI et al., 2017).

Durante anos a regulação da secreção ácida péptica constituiu um importante alvo farmacológico para o tratamento da úlcera péptica. Com base nesse princípio foram desenvolvidos medicamentos como antiácidos, anticolinérgicos, antagonistas do receptor H_2 de histamina e inibidores da bomba de prótons (IBPs) (MEHTA, 2016; KAZMI et al., 2017).

Os primeiros a serem desenvolvidos foram os antiácidos, que agem por meio da neutralização da acidez gástrica estomacal e promovem efeito local e instantâneo com promoção do alívio imediato, porém, de modo paliativo, já que não agem diretamente na causa da doença, ou pelo menos em um dos mecanismos causadores, como a secreção ácida gástrica (SURDEA-BLAGA et al., 2016).

Na busca por medicamentos que substituíssem os antiácidos, devido ao mecanismo de secreção ácida também envolver receptores muscarínicos, surgiram, em seguida, os medicamentos anticolinérgicos, como a pirenzepina e a telenzepina, que antagonizam os receptores muscarínicos M_3 da acetilcolina nas células parietais e, assim, diminuem a secreção ácida gástrica basal em 40-50%, com pouca alteração no pH. **Figura 10.** Entretanto, os anticolinérgicos também antagonizam receptores M_3 fora do tecido estomacal, causando vários efeitos adversos, incluindo boca seca, visão turva, arritmias cardíacas e retenção urinária, por isso, atualmente estão em desuso (HOLLE, 2010; WALLACE; SHARKEY, 2012).

A histamina, um dos secretagogos responsáveis por ativar a secreção ácida, também é alvo terapêutico para o desenvolvimento de medicamentos. Os antagonistas dos receptores H_2 histaminérgicos, atuam diretamente na redução da secreção ácida, o que leva a redução do volume do suco gástrico e consequentemente da concentração de íons H^+ (SUBUDHI et al., 2016) (Figura 10). No entanto, em casos crônicos de ulceração, sua eficácia é limitada e apresentam efeitos colaterais como ginecomastia em homens, galactorreia em mulheres, impotência, náuseas, tonturas e alterações hematológicas (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2011; SUBUDHI et al., 2016; BANIHANI, 2017), por isso são cada vez mais substituídos pelos inibidores de bomba de prótons.

O surgimento dos IBPs para controle da secreção e do pH gástrico representou grande avanço na terapia, por exercer efeito específico sobre as células parietais. Esses medicamentos são bases fracas que se tornam ativas no baixo pH dos canalículos estomacais e formam ligações covalentes com resíduos de cisteínas expostos na subunidade α da bomba, causando o seu bloqueio, **figura 10** (ROY et al., 2016; (HELGADOTTIR; BJORNSSON, 2019).

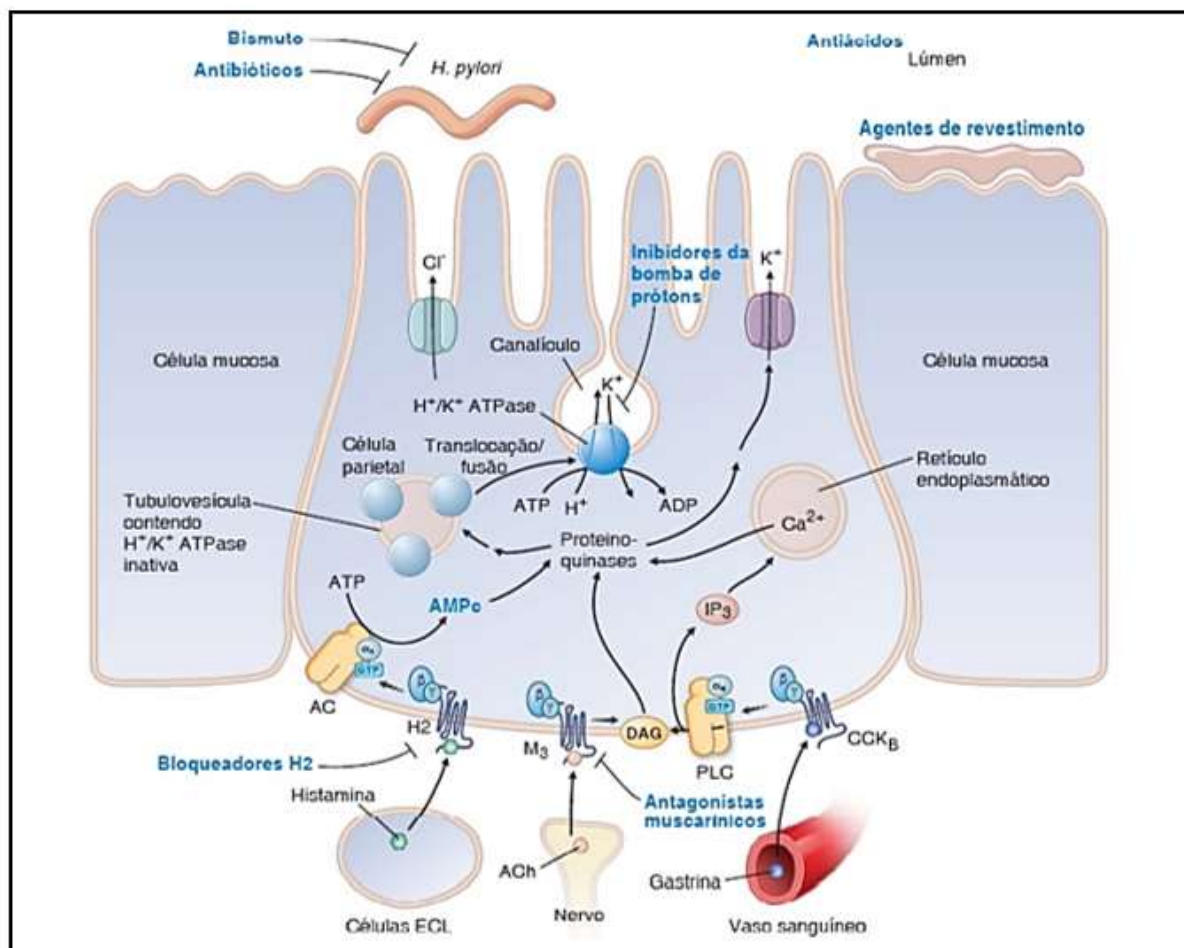
Os principais efeitos indesejados dos inibidores de bomba são a cefaleia, náuseas, dor abdominal, fadigas e vertigem (ROY et al., 2016). A utilização a longo prazo desses medicamentos está associada ao surgimento da osteoporose, infecções entéricas, alteração no metabolismo de outros medicamentos, ocasionando uma diminuição da absorção de fármacos e de vitaminas que são prontamente absorvidos em pH ácido. Além disso, o uso crônico do omeprazol está associado com o desenvolvimento de pólipos que podem evoluir para o câncer gástrico (CHEUNG et al., 2017).

Um novo medicamento foi lançado para 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).

Algumas classes de fármacos atuam por meio do estímulo de fatores de proteção da mucosa a exemplo dos compostos de bismuto como o sucralfato, que após liberação do metal é capaz de formar géis complexos com o muco, diminuindo sua degradação, limitando a retrodifusão de íons H^+ , além de inibir a ação da pepsina e estimular a secreção de muco, HCO_3^- e prostaglandinas, **figura 10**. Esse medicamento atua formando um gel complexo com o muco que recobrem as lesões, favorecendo a cicatrização (SURDEA-BLAGA et al., 2016).

Figura 10: Sítios de ação dos fármacos utilizados no tratamento da doença ulcerosa péptica. antagonistas dos receptores H_2 ; antagonistas do receptor muscarínico M_3 ; inibidores da bomba de prótons; antiácidos; agentes de revestimento (citoprotetores) e antibióticos.



Fonte: GOLAN et al., 2014.

Os análogos das prostaglandinas, a exemplo do misoprostol, atuam melhorando a circulação nos microvasos da mucosa e estimulando a produção de muco e bicarbonato. O

misoprostol é análogo da prostaglandina E1, após a administração 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. Entretanto, seus efeitos colaterais estão associados a casos de diarreias, cólicas abdominais e abortos, o que restringiu o seu uso (KHULBE et al., 2017; SAŁAGA; MOSIŃSKA, 2017).

Quando a úlcera péptica tem etiologia relacionada à infecção pelo *H. pylori*, é necessário utilizar associações de medicamentos de diferentes classes, tanto pra combater a infecção, quanto para tratar as complicações causadas pela instalação do bacilo (LANAS; CHAN, 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 e tetraciclina. Todos os regimes terapêuticos devem ser administrados durante 14 dias (SILVA et al., 2015; MALFERTHEINER et al., 2017). A eficácia da terapia tripla para erradicação do *H. pylori* diminuiu para menos de 70% em muitos países, devido ao aumento da resistência aos antimicrobianos (MALFERTHEINER et al., 2017). Dessa forma cada vez mais tem sido recomendada a terapia quádrupla.

Diante das limitações da terapia convencional o alto índice de recidiva da doença, complicações e alto custo de internações dos indivíduos, os produtos naturais, sobretudo, oriundos de plantas medicinais, surgem como uma alternativa de estudo para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas (BOEING et al., 2016).

Como não existe cura definida para as DIIs, a terapia farmacológica atual tem como objetivo manter os sintomas controlados, prevenção de incapacidade, da colectomia e câncer colorretal. São utilizadas combinações de fármacos anti-inflamatórios, imunossupressores e imunobiológicos. Entretanto, nenhuma estratégia de tratamento tem potencial curativo ou é livre de efeitos colaterais (GEREMIA et al., 2014; UNGARO et al., 2017).

O uso desses medicamentos tem como objetivo reduzir o processo inflamatório pela atuação no sistema imunológico, o que possibilitou grandes avanços no tratamento de uma doença que historicamente só tinha opções de tratamento cirúrgico. A descoberta dos agentes biológicos revolucionou o tratamento da DII, fornecendo opções terapêuticas para DII refratária e melhorando a probabilidade de cicatrização da mucosa (VINDIGNI et al., 2016; GOMOLLON et al., 2017;).

Os aminosalicilatos compreendem todos os medicamentos que tem como metabólito ativo o ácido 5-aminossalicílico (5-ASA). Que apresenta diferentes mecanismos de ação, que incluem: a inibição da síntese de mediadores inflamatórios, neutralização de EROs e a inibição da quimiotaxia para macrófagos e da via NF-KB. Atualmente representam a terapia de primeira escolha para pacientes com CU de leve a moderada (ANNAHÁZI; MOLNÁR, 2015; UNGARO et al., 2017).

Os corticosteroides são anti-inflamatórios esteroides, eficazes em induzir a remissão da DC e CU, por inibirem o recrutamento de células imunes, a produção de citocinas inflamatórias e a ativação e proliferação de células T, pelo seu mecanismo de ação em regiões do núcleo da célula altera a transcrição de vários genes. Os agentes mais utilizados na prática clínica são a prednisona, prednisolona e beclometasona (WALJEE et al., 2016). Estudos sugerem que esses medicamentos não promovem uma cicatrização efetiva da mucosa, ponto crucial para o restabelecimento das funções fisiológicas do intestino que evita a ocorrência de recidivas (HARBORD et al., 2017).

Os agentes imunossupressores como as tiopurinas (azatioprina e mercaptopurina), atuam como antagonistas de purina incorporados no DNA e RNA, causando danos ao DNA, parada do ciclo celular, apoptose e citotoxicidade. Devido ao início de ação lento e eficácia limitada a curto prazo, a monoterapia com tiopurina não é recomendada para indução de remissão em DC ou CU, com isso são indicados para manter a doença em resissão. Atualmente, têm sido utilizadas em combinação com agentes biológicos para reduzir a imunogenicidade e aumentar os níveis de medicamentos biológicos (HARBORD et al., 2017; CHANG; HANAUER, 2017).

O metotrexato é um agente imunossupressor indicado tanto na DC como na CU, principalmente nos casos que não respondem ou não toleram as tiopurinas. No entanto, faltam evidências científicas de sua eficácia, principalmente para a CU (HARBORD et al., 2017).

Um alvo que vem sendo investigando para o tratamento da DII é a manipulação do microbioma intestinal. Antimicrobianos como o metronidazol e ciprofloxacino têm sido utilizados no tratamento de fístula e particularmente na indução da remissão da DC. No entanto, podem desencadear efeitos colaterais, incluindo resistência bacteriana, redução da biodiversidade da microbiota e risco de infecção por *Clostridium difficile* (CAMMAROTA et al., 2015; MAO; HU, 2016).

Estudos têm mostrado que os probióticos apresentam eficácia no tratamento das DIIs, testes *in vivo* estabeleceram que determinados probióticos regulam negativamente a expressão

de IL-17, citocina pró-inflamatória relacionada ao desequilíbrio na manutenção da homeostase intestinal, levando assim ao alívio dos sintomas de colite ulcerativa (DARGAHI et al., 2019). Todavia, estudos de metanálise mostraram uma heterogeneidade significativa na resposta a longo prazo e falharam em demonstrar esse efeito benéfico (MAO; HU, 2016; HARBORD et al., 2017; GOMOLLON et al., 2017).

As terapias biológicas alvo-específicas surgiram decorrentes dos avanços na compreensão da patogênese das DIIs. Esses agentes têm como alvo citocinas, proteínas cinases envolvidas na sinalização, transdução de sinal das células T e moléculas de adesão responsáveis pela migração endotelial. Dessa forma, a imunomodulação terapêutica para DII pode ocorrer em vários estágios da cascata inflamatória (COSKUN et al., 2016; AHLUWALIA et al., 2018).

Os inibidores de TNF (infliximab, adalimumab, golimumab e certolizumab pegol) são amplamente utilizados em casos moderados a graves de DII, os anti-TNF- α podem promover resultados terapêuticos como a normalização da proteína C reativa (PCR) e cicatrização da mucosa. Contudo, dados da literatura mostram que de 10 a 30% dos indivíduos não respondem a esses medicamentos. (PAPAMICHAEL et al., 2016). Alguns indivíduos que desenvolvem tolerância a um primeiro inibidor de TNF- α pode apresentar resistência contra essa classe de medicamentos (GOMOLLON et al., 2017).

Os agentes anti-integrinas (natalizumab e vedolizumab) são direcionados às moléculas de adesão, comprometendo assim, a migração dos linfócitos para o intestino. Apesar de aprovado inicialmente o natalizumab não foi amplamente adotado devido ao risco associado de leucoencefalopatia multifocal progressiva, o vedolizumab é eficaz na indução e manutenção da remissão na CU e as taxas de cicatrização da mucosa são consideradas altas (COSKUN et al., 2016; CHANG; HANAUER, 2017).

Os medicamentos recentemente aprovados são o inibidor de JAK tofacitinibe, que media a transcrição de proteínas STAT e a expressão gênica, e o bloqueador da subunidade P-40 IL-12/23, o ustekinumab, ambos interferem na diferenciação de células T efectoras (AHLUWALIA et al., 2018).

A escolha entre as diferentes classes terapêuticas envolve fatores como localização e gravidade da doença, história clínica, idade, presença de comorbidades e manifestações extraintestinais, diretrizes locais e o custo (GOMOLLON et al., 2017; HARBORD et al., 2017). Dessa forma, o tratamento da DII vem evoluindo do objetivo tradicional de remissão clínica para estratégias terapêuticas com abordagem de terapias-alvo, para o futuro se busca

tratamentos personalizados com objetivo de otimizar a eficácia, diminuir o risco de eventos adversos e minimizar custos (MAO; HU, 2016).

2.9 Produtos naturais

Os produtos naturais são compostos químicos de origem animal, mineral, vegetal e de microrganismos (fungos, bactérias) (DUTRA et al., 2016; WANG et al., 2018). São importantes fontes importantes no processo de descoberta de medicamentos, devido a presença de grande variedade de metabólitos e da riqueza suas propriedades bioativas (BOY et al., 2018).

Nos últimos dois séculos, a indústria farmacêutica tem usado compostos químicos de ocorrência natural como princípios ativos em si, bem como base para o desenvolvimento de novas arquiteturas moleculares. Dados da literatura apontam que cerca de 30% dos medicamentos usados na terapêutica são oriundos de produtos naturais, em especial microrganismos e plantas (DUTRA et al., 2016; KHAN, 2018).

As atividades biológicas das plantas são decorrentes da diversidade de metabólitos secundários, estruturas químicas complexas que se ligam às macromoléculas no organismo (BARBOSA et al., 2017). Os metabólitos secundários podem ser caracterizados de acordo com sua via de síntese em diferentes classes, como alcaloides, flavonoides, fenilpropanoides e terpenos (GUO, 2017; SHAO; BAO, 2019).

Os terpenos são o grupo mais abundante de metabólitos secundários obtidos de plantas e os principais constituintes dos óleos essenciais (BARBOSA et al., 2017). Esses metabólitos são biossintetizados a partir das vias de mevalonato (clássica) que tem como precursor a acetil co-enzima A (AcetilCoA) ou metileritritol fosfato (alternativa). Sua estrutura básica é composta por unidades de isopreno (C_5H_8), a partir do arranjo das unidades de isopreno são definidas nas seguintes classes: monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}) (BOOTH et al., 2017; BONCAN et al., 2020).

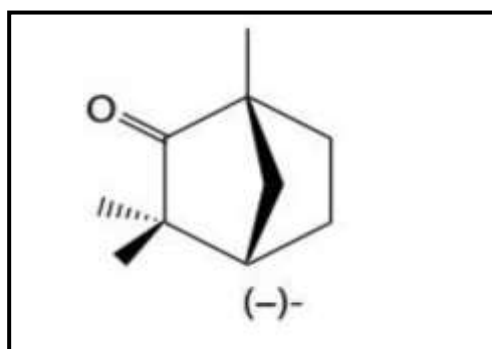
Os monoterpenos são compostos naturais que derivam do geranyl difosfato (GPP) e constituem 90% dos óleos essenciais (SÁ et al., 2013). Esses compostos apresentam diversas atividades biológicas já avaliadas em modelos experimentais como anti-inflamatória (SOMENSI et al., 2019), antibacteriana (HOUDKOVA et al., 2017), gastroprotetora e cicatrizante gástrica (VENZON et al., 2018).

2.10 (-)-Fenchona

O monoterpeno bicíclico fenchona (1,3,3-trimetilbiciclo [2.2.1] heptano-2-ona) (**Figura 11**), é formado por duas unidades isoprênicas e uma função orgânica cetona. Esse monoterpeno é composto por dois enantiômeros (+)-fenchona e (-)-fenchona. Quanto as suas propriedades físico-químicas, apresenta fórmula molecular $C_{10}H_{16}O$, massa molar é de 152.23344 g/mol, se configurando um líquido incolor a temperatura ambiente (JÄGER, 2010; PUBCHEN, 2020).

A fenchona está presente nas espécies vegetais *Foeniculum vulgare* (funcho), *Thuja occidentalis* L. (tujá) e *Lavandula stoechas* (rosmaninho) (ALGIERI et al., 2016; BATISTA et al, 2015), sendo dotada de fragrância de cânfora e usado como flavorizante de alimentos e em perfumes (PUBCHEN, 2020). Esse monoterpeno está presente em plantas que apresentam potencial farmacológico e uso etnofarmacológico nas desordens gastrintestinais (ALGIEIRI et al., 2016).

Figura 11: Isômero (-)-fenchona



Fonte: PUBCHEN, 2020.

Pesquisas mostram que o isômero (-)-fenchona apresenta atividade antinoceptiva (HIM et al., 2008), antimicrobiana (SLAVCHEV et al., 2014; INSAWANG et al., 2019), anti-inflamatória (ALGIERI et al., 2016) e antioxidante (BAPTISTA et al., 2015). As atividades gastroprotetora (GUEDES, 2018), antidiarreica e antifúngica (PESSOA et al., 2020) foram delineados pelo nosso grupo de pesquisa.

Dados da Sigma Aldrich, fornecedora da substância para o presente estudo, mostram que (-)-fenchone apresenta baixa toxicidade aguda, com DL50 Oral em ratas fêmeas de 2.000 mg/kg (OECD Test Guideline 423), sem mortalidade observada nesta dose.

Dessa forma, o presente trabalho se propõe a dar continuidade aos estudos iniciados com a presente substância, por meio da avaliação da (-)-fenchona frente à atividade antiulcerogênica gástrica (modelo de cicatrização) e duodenal, avaliando os seus respectivos

mecanismos de ação, bem como, a sua atividade anti-inflamatória intestinal nos modelos de colite ulcerativa agudo e crônico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antiulcerogênica e anti-inflamatória intestinal do isômero (-)-fenchona em modelos animais

3.2 Objetivos específicos

- ❖ Investigar o efeito cicatrizante da (-)-fenchona no modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético
- Realizar uma avaliação da toxicidade por doses repetidas durante 14 dias

- ❖ Investigar o efeito antiulcerogênico da (-)-fenchona no modelo de úlcera duodenal induzida por cisteamina
- ❖ Avaliar o efeito anti-inflamatório intestinal da (-)-fenchona nos modelos agudo e crônico (mimetiza a recidiva da doença) de colite ulcerativa induzida por TNBS
- Realizar análise histomorfológica dos tecidos
- Avaliar a atividade antioxidante
- Avaliar o efeito sobre a produção de citocinas
- Realizar análise imuno-histoquímica de marcadores envolvidos na inflamação e mecanismos ciprotores da barreira intestinal

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Artigo 1: *(-)-Fenchone prevents cysteamine-induced duodenal ulcers and accelerates healing promoting re-epithelialization of gastric ulcers in rats via antioxidant and immunomodulatory mechanisms.* Artigo a ser submetido a revista Frontiers in Pharmacology

(-)-Fenchone prevents cysteamine-induced duodenal ulcers and accelerates healing promoting re-epithelialization of gastric ulcers in rats via antioxidant and immunomodulatory mechanisms

Maria Elaine Cristina Araruna¹, Edvaldo Balbino Alves Júnior¹, Catarina Alves de Lima Serafim¹, Leiliane Macena Oliveira Silva¹, Vitória Pereira Alves¹, Marcelo Sobral da Silva¹, Marianna Vieira Sobral¹, Adriano Francisco Alves², Mayara Karla dos Santos Nunes², Aurigena Antunes Araújo³ and Leônia Maria Batista^{1*}

¹ Postgraduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba (UFPB), João Pessoa, PB, Brazil

² Department of Physiology and Pathology, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba (UFPB), João Pessoa, PB, Brazil

³ Department of Morphology, Histology and Basic Pathology, Biosciences Center, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil

*** Correspondence:**

Prof. Dr. Leônia Maria Batista, Department of Pharmaceutical Sciences, IPeFarM, Federal University of Paraíba, 58051-970, João Pessoa, PB, Brazil. Tel.: +55-83-32167003; Fax: +55-83-32167502. e-mail: leoniab@uol.com.br.

Keywords: *(-)-Fenchone, gastric ulcer, duodenal ulcers, healing, monoterpene, immunomodulatory*

Abstract

Background: *(-)-Fenchone* is a naturally occurring monoterpene in essential oils of plants such as *Foeniculum vulgare*, *Thuja occidentalis*, *Peumus boldus*, and *Mesosphaerum sidifolium*. Pharmacological studies report its antinociceptive, antimicrobial, anti-inflammatory, antidiarrheal and antioxidant activity.

Hypothesis/Purpose: To evaluate their duodenal antiulcer activity, gastric healing, and repeated dose toxicity of monoterpene *(-)-Fenchone* in rats.

Methods: Preventive antiulcer effects were assessed using oral pre-treatment on cysteamine-induced duodenal lesions models. Gastric healing, the underlining mechanisms, and toxicity

after repeated doses were carried out using the acetic acid-induced gastric ulcer rat model and oral treatment for 14 days.

Results: In the cysteamine-induced duodenal ulcer, fenchone (37.5–300 mg/kg) decreased significantly the ulcer area and so prevented lesions formation. In the acetic acid-induced ulcer model, fenchone (150 mg/kg) reduced ($p < 0.001$) the ulcerative injury. These effects were related to an increase in the levels of reduced glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), interleukin (IL)-10, and transforming growth factor beta (TGF- β). Reduced ($p < 0.001$) malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO), interleukin-1 beta (IL-1 β), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), and nuclear transcription factor kappa B (NF- κ B). Oral toxicity investigation for 14 days revealed no alterations in heart, liver, spleen, and kidney weight nor the biochemical and hematological assessed parameters. (-)-Fenchone protected animals from body weight loss maintaining feed and water intake.

Conclusion: (-)-Fenchone presents low toxicity, and prevents duodenal ulcers and gastric healing activities. Antioxidant and immunomodulatory properties seem to be involved in the curative effect.

1 Introduction

Peptic ulcer consists of an inflammatory or necrotizing lesion, resulting in ulcerations that can extend from the mucosal layer to deeper layers such as submucosa, muscle, and serosa, and may be located in the esophagus, stomach, or duodenum (Lanas and Chan, 2017; Woods and Carey, 2017; Aragão et al., 2018). It is a multifactorial and complex disease, caused by an imbalance of protective and aggressive factors. It represents a major global health problem and is considered the most prevalent gastrointestinal disease, as it affects millions of people worldwide and has high rates of recurrence (Kangwan et al., 2014; Almeida et al., 2017; Aragão et al., 2018).

Peptic ulcer therapy is based on inhibiting gastric acid secretion or enhancing mucosal protective factors (Banihani, 2016; Subudhi and Sahoo, 2016). Several factors limit the use of these agents, drug interactions, side effects resulting from long-term use, the high rate of disease recurrence, in addition, to the need to combine several drugs, which makes the search for new therapies with natural products a viable alternative and often encouraged (Banihani, 2016; Harbord et al., 2017).

In recent years, many plant species and their isolated compounds, including terpenes, have shown promising effects in the context of peptic ulcers in studies using animal models (Suntres et al., 2015; Venzon et al., 2018). Terpenes are a large group of naturally occurring chemical compounds and consist of approximately 90% of essential oil constituents (Ninkuu et al., 2021). These compounds are widely used in the industry as fragrances, agrochemicals, and nutraceuticals (Cox-Georgian et al., 2019).

(-)-Fenchone (1,3,3-trimethylbicyclo [2.2.1] heptane-2-one) is a bicyclic monoterpene, formed by two isoprene units and an organic ketone function, found as a constituent of essential oils of many plants, such as from plants such as *Foeniculum vulgare* (Baptista et al., 2015), *Thuja occidentalis* (Miyazawa and Miyamoto, 2004), *Peumus boldus* (Jäger and Höferl, 2020), and *Mesosphaerum sidifolium* (Rolim et al., 2017). This phytoconstituent showed some pharmacological activities such as antinociceptive (Him et al., 2008), antimicrobial (Slavchev et al., 2014), anti-inflammatory, antidiarrheal ((Pessoa et al., 2020), and antioxidant (Akkol et al., 2015; Algieri et al., 2016) and gastroprotective (Guedes, 2018).

Thus, considering the previous promising results, this study aimed to evaluate the gastric healing activity using the acetic acid induction model, the duodenal anti-ulcer activity induced by cysteamine, and oral toxicity in repeated doses for 14 days, as well as, the mechanisms of action of (-)-Fenchone.

2 Materials and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) (180–250 g) were provided by the Animal Production Unit (APU) of the Institute for Research on Drugs and Medicines of the Federal University of Paraíba (IPEFarM/UFPB). The animals were acclimated to the conditions of the local vivarium at a temperature of $23 \pm 2^\circ\text{C}$ and a light-dark cycle of 12 h, fed with industrial pellet food and water ad libitum. All experimental protocols followed international principles for the study with laboratory animals (Zimmermann, 1983) and were approved by the Institutional Ethics Commission on Animal Use (CEUA/UFPB) under the registration number: 7216040119/19. All efforts were to reduce the number of animals used, and their pain, suffering, and stress.

2.2. Reagents

The following substances were used in this study: (-)-Fenchone (SIGMA Chemical Co, U.S.A) solubilized in 5% Tween 80, sodium acetate (SIGMA Chemical Co, U.S.A), acetonitrile (SIGMA Chemical Co, U.S.A), 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) (SIGMA Chemical Co, U.S.A), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (SIGMA Chemical Co, U.S.A), glacial acetic acid (SIGMA Chemical Co, U.S.A), trichloroacetic acid (SIGMA Chemical Co, U.S.A), anti-rat antibodies for IL-1 β , TNF- α and IL-10 (R&D systems), biotinylated sheep polyclonal antibodies (anti-IL-1 β , anti-TNF- α or anti-IL-10) (R&D Systems), immunohistochemical polyclonal antibodies rats (NF κ B or TGF β) (Cloud-clone Corp), sodium carbonate (MERK, Germany), potassium chloride (SIGMA Chemical Co, USA), magnesium chloride (SIGMA Chemical Co, USA), Cysteamine hydrochloride (SIGMA Chemical Co, USA), sodium chloride PA (QUIMEX-MERCK, Brazil), ethyl ether (MERCK, Germany), monobasic sodium phosphate (SIGMA Chemical Co, USA), dibasic sodium phosphate (SIGMA Chemical Co, USA), lansoprazole (SIGMA Chemical Co, USA), Methyl-Phenylindole (SIGMA Chemical Co, USA), ketamine 5 % (VETANARCOL), Tris Buffer (Vetec®), Trizma Buffer (SIGMA Chemical Co, U.S.A) and xylazine 2 % (DORCIPEC).

2.3. Preventive antiulcer activity evaluation on cysteamine-induced duodenal ulcer model

Rats (N = 6-7) were fasted for 12 h and treated orally (10 ml/kg) with lansoprazole 30 mg/kg (standard control), 5% Tween 80 (negative controls), (-)-Fenchone (37.5, 75, 150 and 300 mg/kg). After 1 h from pretreatment, cysteamine hydrochloride (300 mg/kg) was given twice orally (5 ml/kg) in a 4-h interval induction. After 24 h, animals were euthanized and the small intestine was removed to be opened in the antimesenteric region. They were kept between glass plates to obtain images with the aid of a digital camera for lesion determination. Ulcer area (UA, mm²) quantification was carried out using AVSoft Bioview® software version 4.0.1.

2.4. Healing assessment on acetic acid-induced gastric ulcer model

Wistar rats (N = 8–10), after a 12-h fasting, were randomly assigned to 6 groups: Sham (healthy group), positive control (lansoprazole 30 mg/kg), negative control (5% Tween 80), (-)-Fenchone (150 mg/kg). (-)-Fenchone's most effective dose was selected from the cysteamine-induced duodenal ulcer protocol. The criteria used were based on the highest lesion inhibition percentages among evaluated doses. Animals were anesthetized with ketamine and xylazine and after that, subjected to laparotomy. Stomachs were exposed and the serosa outer face received 100 µl of absolute acetic acid, soaked in a cotton pellet delimited by a 5.0 mm circular diameter plastic tube for 1 min. Then, the stomachs were washed with deionized water, and the abdominal wall was sutured with cotton thread. After 48 h of gastric lesion induction, animals were treated orally (10 ml/kg) once a day for 14 days, as described above. This process was carried out except for the Sham group, which was only subjected to laparotomy and immediately sutured. On the fifteenth day, animals were euthanized, stomachs were removed and opened along the great curvature for determination of the Ulcerative Lesion Area - (mm²) with the aid of a digital caliper and also to state healing percentage (%), as described below.

$$\text{ULA (mm}^2\text{)} = (\text{ulcer length}) \times (\text{ulcer width})$$

$$\text{Healing (\%)} = (\text{Negative control ULA} - \text{Treated group ULA} / \text{Negative control ULA}) \times 100$$

After ULA determination, tissue samples circumscribing gastric injuries were collected and stored in preserved in a 10% buffered formaldehyde solution for histological and immunohistochemical analysis. For biochemical assays, tissues were stripped, weighed, and frozen at – 80 °C.

2.4.1. Histological and morphometric analysis

Fragments of gastric tissue from the acetic acid-induced gastric ulcer protocol and the duodenal tissue from the cysteamine-induced ulcer protocol were preserved in a 10% buffered formaldehyde solution until histological processing. The tissues were embedded in histological paraffin and sectioned with a thickness of 4 µm. From the sectioned tissues, 2 stains were performed: hematoxylin and eosin (HE) and Masson's trichrome (MT). The histological sections stained by Masson's trichrome were visualized through the 40x objective of the Olympus microscope (Tokyo, Japan) and 20 random images were digitalized through the same microscope and Q-Color3 microscope, in each image, all pixels with shades of blue (Masson's trichrome) were selected to create a binary image, digitally processed and calculate the area in µm².

2.4.2 Determination of reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO), and Superoxide dismutase (SOD)

2.4.2.1. Non-protein sulfhydryl group (GSH) determination

The protocol according to Faure and Lafond (1995) was followed to determine the GSH levels (Faure and Lafond, 1995). The tissue samples were suspended in 0.02M 1:10 (v/v) EDTA. From this homogenate, 400 µL were removed and 320 µL of distilled water and 80 µL of 50% trichloroacetic acid were added, being centrifuged at 3000 rpm at 4°C for 15 minutes. Then, 100 µL of the resulting supernatant was pipetted into a 96-well microplate and 200 µL of Tris

and 25 μ L of DTNB were added. This microplate was incubated at room temperature and after 15 minutes, reading on a spectrophotometer (Polaris) was performed at a wavelength of 412 nm. The calibration curve was made with reduced L-glutathione. The GSH values of the samples were calculated by interpolating the values with the standard curve and expressed in nmol GSH/mg of protein.

2.4.2.2. Malondialdehyde (MDA) determination

The samples were suspended in Trizma® buffer (Tris HCl) 1:5 (w/v), homogenized, and centrifuged at 11.000 rpm at 4°C for 10 minutes. Soon after, 300 μ L of the supernatants were transferred to Eppendorf tubes and 750 μ L of the chromogenic compound (10.3 mM of 1-methyl-2-phenylindol) and 225 μ L of hydrochloric acid (37%) were added and incubated at 45°C in a water bath for 40 minutes and again centrifuged at 11.000 rpm at 4°C for 5 minutes. Then, 300 μ L of the supernatant was transferred to a 96-well microplate, and absorbance was determined by colorimetry (586 nm), using a plate reader (Polaris' spectrophotometer). The data were interpolated with the standard curve and the results were expressed as nmol MDA/g tissue (Esterbauer and Cheeseman, 1990).

2.4.2.3. Myeloperoxidase (MPO) determination

The tissue sample fragments were homogenized in the hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) buffer, which has a detergent function, lysing the granules of the neutrophils that contain the myeloperoxidase. After homogenization, the material was subjected to sonication for 5 minutes. Then, the sample was subjected to a double freezing and thawing process to facilitate the disruption of cellular structures and consequently the release of the enzyme. The homogenate was centrifuged at 5.000 rpm at 4°C for 20 minutes and concentrated for 24 hours. On the following day, 7 μ L of the supernatant were collected, to which 200 μ L of the reading solution (o-dianisidine hydrochloride, potassium phosphate buffer, and 1% H₂O₂) were added. The reading was performed using a spectrophotometer at 450 nm wave, at times 0 and 1 minute. The results were expressed as units of myeloperoxidase per gram of tissue (Krawisz et al., 1984).

2.4.2.4. Superoxide dismutase (SOD) determination

The tissue samples were homogenized in phosphate buffer (0.4 M, pH 7.0) and centrifuged for 15 minutes at 10.000 rpm at 4°C. The supernatant was removed and used in the assay. The plates containing the reaction medium (10 mM phosphate buffer), L-methionine (1.79 mg/mL, pH 7.8), riboflavin (0.2 mg/mL, pH 7.8), NBT (1.5 mg/mL, pH 7.8) and 10 μ L of the sample supernatant were exposed to a fluorescent lamp (15W) for 10 minutes. After this period, the material was taken to the 630 nm spectrophotometer (Sun et al., 1988).

2.4.5. Immunomodulatory activity

2.4.5.1. Cytokines determination

The levels of pro-inflammatory (IL-1 β and TNF- α) and immunoregulatory (IL-10) cytokines were determined through an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA - sandwich type). The capture antibodies for each interleukin were sensitized in a 96-well microplate (flat bottom). After 18h, the plate was washed with 0.05% tween 20 solution (wash buffer), blocked with a 1% bovine serum albumin solution, and washed with the wash buffer. Soon after, a tissue

macerate was prepared in phosphate-buffered saline (PBS) in the proportion of 100 mg of tissue to 600 μ L of PBS, homogenized, and centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes at 4°C. Supernatants (100 μ L) were pipetted in a 96-well plate and made the standard curve. The biotinylated secondary antibody (100 μ L) was added to each well, followed by incubation for 2 hours and 3 washes. The plate was incubated with streptavidin for 20 minutes, washed 3 times, and the substrate for development was added (DuoSet Kit © - R & D Systems Catalog - DY999) and incubated for 20 minutes. After this time, the reaction was stopped by adding 50 μ L of the stop solution and the reading was performed on a spectrophotometer at 450 nm. The results were obtained by interpolation with the standard curve and expressed in pg/mL (Kendall et al., 1983).

2.4.6. Immunohistochemical analysis

Stomach sections (5 μ m) of 5 animals per group were obtained with a microtome and transferred to silanized slides (Dako, Glostrup Denmark), and subjected to dewaxing and hydration. Then, the slides are subjected to the simple indirect method of blocking with Anti Peroxidase Peroxidase (APP), where the primary antibody is directed against the antigen (protein) to be detected and the secondary antibody serves as a bridge for binding to the APP complex, and incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies a: nuclear transcription factor kappa B (NF- κ B) and transforming growth factor beta (TGF- β). After being washed with distilled water, the slides were incubated with a secondary for 60 min and 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Biocare Medical, CA, USA) was used as the chromogen and the specimens were counterstained with hematoxylin. The samples were visualized under an optical microscope (Olympus microscope, Tokyo, Japan) with coupled to a camera (Nikon DS-Ri2).

2.5. Evaluation of toxicity after repeated doses

During the course of the acetic acid-induced ulcer model, water and feed intake, and body weight of the animals were evaluated for 14 days. On the 15th day, animals were fasted for 12 h and anesthetized for blood collection via arterial puncture. To perform the biochemical analysis, blood was collected in tubes containing a gel separator and centrifuged for 10 min at 1000 g. Urea, creatinine, alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), glucose, cholesterol, and triglycerides were measured using the animal serum. For hematological analyzes, blood was collected in tubes containing EDTA, followed by determination of red blood cell, hematocrit, hemoglobin, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), global and differential leukocyte counts. Blood smears were also collected and stained to confirm and control differential counts of leukocytes (neutrophils, lymphocytes, monocytes, and eosinophils). Those parameters were determined using specific kits for automatic biochemical analyzer and automatic hematological analyzer. The blood smears were stained and analyzed under optical microscopy. After blood collection, animals were euthanized and organs (heart, liver, spleen, and kidneys) were collected for macroscopic and weight evaluation.

2.6. Statistical analysis

Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) or mean $\pm$ standard error (SE) for parametric values or expressed as median (minimum value - maximum value) for non-parametric data. One-way ANOVA (parametric data) or Kruskal-Wallis test (non-parametric data) was performed, followed by Dunnet and Tukey or Dunn post-tests, respectively. The

results were considered significant when $p < 0.05$. All data were analyzed using GraphPad® 5.0 software.

3 Results

3.1. Effect of (-)-Fenchone oral pre-treatment on duodenal ulcer formation

Results for the cysteamine-induced duodenal ulcer induction model in rats showed that oral administration of lansoprazole (30 mg/kg) or (-)-fenchone at doses of 37.5; 75; 150 and 300 mg/kg significantly reduced ULA ($p < 0.001$) when compared to the negative control group (5% tween 80), with injury inhibition percentages of 60, 31, 68, 74 and 76%, respectively (Figure 1 e 2).

3.1.1. Histological analysis of duodenal ulcer formation

Histological sections of the duodenum stained with hematoxylin and eosin belonging to the Normal lansoprazole and (-)-Fenchone groups (Figure 3A, C, D), the integrity of the villi (V) and enterocytes without cytostructural alterations is observed. In the negative control group (5% tween 80) (B) there is a loss of epithelial cells and an increase in the leukocyte infiltrate. In sections stained with Masson's trichrome, it was found that (-)-Fenchone (Figure 3G) reduced extracellular ($p < 0.05$) 9.00 (5-12) matrix deposition compared to the control group (5% tween 80) ($p < 0.05$) 8.00 (6-11) (3F) (Figure 3).

3.2. Effect of (-)-Fenchone on gastric healing after 14 days of oral treatment

The results for the acetic acid-induced gastric ulcer model in rats showed that (-)-fenchone at the dose (150 mg/kg) and lansoprazole (30 mg/kg) significantly reduced ALU ($p < 0.001$) to 10.15 ± 2.3 and $16.48 \pm 2.5 \text{ mm}^2$ when compared to the negative control group (5% tween 80) with $32.60 \pm 3.2 \text{ mm}^2$, presenting percentages of gastric healing of 69 and 49%, respectively (Figure 4).

3.2.1. Histological analysis of gastric healing

In the histological sections of the stomach stained with hematoxylin and eosin (Fig. 5 A-D), the stomach mucosa is observed (M). In the animals of the Normal (A) lansoprazole (C) or (-)-Fenchone (D) group, the integrity of the mucosa and gastric glands is observed. Unlike animals in the negative control group (5% tween 80), intense mucosal destruction is observed, with ulcer formation, which is characterized by necrosis of the organ surface and intense acute inflammatory reaction (*).

In the histological sections stained with Masson trichrome (Fig. 5 E-H), in the normal (E) 12.00 (10-19), lansoprazole 15.00 (11-19) (G) or (-)-Fenchone 15.00 (10-21) (H) groups, the integrity of the stomach mucosa (M) and gastric glands is observed. However, in the animals of the negative control group (5% tween 80) ($p < 0.001$) 45.00 (31-57) (F) exuberant scar tissue (∞) is observed in the area of the mucosal ulcer.

3.2.3 Effect of (-)-Fenchone in the modulation of antioxidant and anti-inflammatory properties during gastric healing

3.2.3.1. Reduced Glutathione (GSH)

In determining the antioxidant activity of (-)-Fenchone, it was possible to verify that the group of animals pre-treated with the vehicle alone (5% tween 80) showed a reduction in GSH levels to 67.2 ± 6.5 nmol of GSH/mg protein compared to the normal group (90.9 ± 2.8 nmol GSH/mg protein). However, previous administration of lansoprazole (30 mg/kg) (90.0 ± 6.2 nmol of GSH/mg of proteins) or (-)-Fenchone (150 mg/kg) (79.9 ± 9.4 nmol GSH / mg protein) restored baseline GSH levels (Fig. 6 A).

3.2.3.2. Superoxide Dismutase (SOD)

Animals in the control group (5% tween 80) demonstrated a significant reduction in the activity of the SOD enzyme to 3.5 ± 0.86 U of SOD/mg of protein compared to the normal group (7.5 ± 0.76 U SOD/mg protein). However, SOD activity was significantly increased ($p < 0.001$) with previous administration of lansoprazole (30 mg/kg) or (-)-Fenchone (150 mg/kg) to 6.2 ± 0.52 and 5.9 ± 0.48 U of SOD/mg of protein, respectively, when compared to the control (5% tween 80) (Fig. 6 B).

3.2.3.3. Malondialdehyde (MDA)

The group 5% tween 80 showed an increase in MDA levels to 78.5 ± 8.0 nmol MDA/g tissue compared to the normal group (42.9 ± 5.8 nmol MDA / g tissue). However, the administration of lansoprazole (30 mg/kg) (63.5 ± 3.3 nmol of MDA / g tissue) or (-)-Fenchone (150 mg/kg) (57.9 ± 6.4 nmol MDA/g of tissue) restored MDA levels to baseline conditions (Fig. 6 C).

3.2.3.4. Myeloperoxidase (MPO)

The results showed that in the control group (5% tween 80) there was an increase in MPO levels to 28.1 ± 4.0 units of MPO / g of tissue when compared to the normal group (8.5 ± 1.4 units MPO/g tissue). However, the groups treated with lansoprazole (30 mg/kg) or (-)-Fenchone (150 mg/kg) significantly reduced MPO levels to 7.3 ± 2.5 and 5.7 ± 1.7 unit of MPO/g of tissue in comparison with to the control group, respectively (Fig. 6 D).

3.2.3.5. Levels of cytokines IL-1 β , TNF- α and IL-10

In the evaluation of immunomodulatory effects by measuring the levels of cytokines. (-)-Fenchone significantly decreased ($p < 0.001$) the levels of IL-1 β (pg/ml) to $258. \pm 24.58$ compared to the control group (423.6 ± 26.30) (Fig 7 A). TNF- α levels (pg/ml) were also decreased after treatment with (-)-Fenchone (1398 ± 86.20), when compared to the control group 5% tween 80 (2069 ± 83.80) (Fig 7 B). Furthermore, (-)-Fenchone prevented ($p < 0.001$) the reduction of IL-10 (pg/ml) (207.4 ± 17.30) in comparison the control group (94.67 ± 15.54) (Fig 7 C).

3.2.3.6. Immunohistochemical analysis for NF κ B and TGF- β in gastric samples submitted to ethanol-induced gastric ulcer model

Stomachs submitted to acetic acid and treated with (-)-Fenchone showed the presence of NF- κ B (brown color positivity) unevenly distributed and focal similar to the normal group, significantly reduced immunostaining to 36.0 (30.0–46.0) μm^2 when compared to the control group 59.0 (48.0–80.0) μm^2 , in which there is the presence of these irregularly and multifocally marked, especially in the ulcer area (Fig. 8). In the evaluation of immunostaining for TGF- β results showed that treatment with (-)-Fenchone significantly increased positive cells marked for TGF- β to 204.0 (201.0–221.0) μm^2 when compared to the control group 104.0 (100.0–107.0) μm^2 (Fig. 9).

3.2.4. Effect of (-)-Fenchone on low toxicity after repeated doses

Once pharmacological effects were delineated, the safety of phytoconstituent was evaluated after 14 consecutive oral administrations once a day. Results showed that animals treated with (-)-Fenchone (150 mg/kg) increased ($p < 0.01$) water intake (ml) to $243,9 \pm 11,3$ compared to the groups treated with 5% Tween 80 ($207,6 \pm 21,7$). Besides, treatment also increased feed intake (g) to $193 \pm 14,8$ and prevented ($p < 0.001$) body weight (g) loss ($42,33 \pm 2,0$) compared to the control group 5% Tween 80 ($35,57 \pm 2,6$) (Table 1).

In the macroscopic evaluation of the heart, liver, spleen, and kidneys, there was no evidence of alterations between Sham, control, and treated groups. Furthermore, no significant changes ($p > 0.05$) were observed in the organ index across all analyzed groups (Table 2). There were no significant changes ($p > 0.05$) in glucose, urea, creatinine, alkaline phosphatase, AST, and ALT levels when compared to their control group (Table 2).

4 Discussion

Duodenal ulcer is the most prevalent type of peptic ulcer that affects the world population. Its pathogenesis is related to an increase in aggressive factors and acid-peptic secretion and other proteases and a reduction in mucosal protective factors, as well as infection by *H. pylori* (Khomenko et al., 2009; Choi et al., 2012). The experimental model of duodenal ulcer induced by cysteamine in rats has been widely used to mimic this pathological condition (Choi et al., 2012; Adinortey et al., 2013).

Cysteamine (β -mercaptoethylamine) causes rapid ulceration, stimulates the rate of gastric acid secretion, and inhibits defensive processes such as alkaline mucus secretion and bicarbonate levels in the proximal duodenum, resulting in duodenal ulcer formation (Adinortey et al., 2013). Its administration contributes to oxidative stress by generating H_2O_2 , which in the presence of transition metals such as Fe^{3+} leads to the production of highly reactive species (Khomenko et al., 2009). Studies show that cysteamine compromises antioxidant defenses (Adinortey et al., 2013; Besouw et al., 2013; Mishra, 2019).

(-)-fenchone at the doses evaluated (37.5, 75, 150, and 300 mg/kg) significantly reduced duodenal ulcerative lesions when compared to negative controls. A study carried out by Carvalho et al. (2014) with the monoterpene geraniol (7.5mg/kg) showed a protective effect on the duodenal mucosa (Carvalho et al., 2014). The results of this work also corroborate those found for the monoterpenes β -myrcene (7.5mg/kg) (Bonamin et al., 2014) and p-cymene (25,

50, 100, and 200mg/kg) (Formiga et al., 2021), which showed antiulcerogenic activity in the same model evaluated.

Histomorphological analysis showed pre-treatment also promoted an in which it was possible to observe a decrease in cysteamine-induced lesions in the tissue layers of the duodenum, as well as in the migration of inflammatory cells. Previous studies showed a similar protective effect on the duodenal mucosa in studies with monoterpenes carried out by Carvalho et al. (2014) with geraniol (Carvalho et al., 2014), and by Bonamin et al. (2014) with β -myrcene in the same model.

An aggravating factor of gastric ulcers is chronicity, which results in episodes of remission and recurrence (Adinortey et al., 2013). The one caused by the instillation of acetic acid is similar to human ulcers in terms of location, severity, and chronicity, as well as in the healing process, for this reason, this model is widely used in the evaluation of agents with potential pro-healing effects of chronic lesions gastrointestinal (Takagi et al., 1969; Adinortey et al., 2013). The most effective dose of (-)-Fenchone (150 mg/kg) in the evaluation of gastroprotective activity (Guedes, 2018) was selected to assess the gastric healing and toxicity after repeated doses.

In this protocol, treatment with (-)-Fenchone (150mg/kg) for 14 days increased the percentage of healing by 69% when compared to the negative control group. Similar effects have already been demonstrated in the literature for the monoterpene (-)-myrtenol (50mg/kg) (Viana et al., 2019), thymol (30 and 100mg/kg) (Ribeiro et al., 2016) geraniol (3mg/kg). kg) (Venzon et al., 2018) and p-cymene (Formiga et al., 2021) had a healing effect on the gastric mucosa in this experimental protocol.

The histomorphological study conducted from the reading of slides stained with HE showed that the treatment with (-)-Fenchone promoted the protection of tissue architecture and gastric glands, with a decrease in the inflammatory infiltrate and preservation of the gastric glands. In the Masson's trichrome staining, the integrity of the stomach mucosa and gastric glands was observed, different from the control group that presented abundant scar tissue. Studies reported in the literature with monoterpenes corroborate the present result (Rocha Caldas et al., 2015a; Rocha Caldas et al., 2015b; Formiga et al., 2021).

Thus, the duodenal anti-ulcer activity shown in this study may be related to antioxidant effects, the reinforcement of mucosal protection factors, as well as the regulation of acid secretion and blood flow.

In this context, these data provide strong evidence of the healing properties exerted by (-)-Fenchone. Thus, from this point onwards, healing mechanisms were evaluated using gastric tissue samples from an acetic acid-induced gastric ulcer model.

Excessive production of reactive oxygen species in gastric tissue disrupts the integrity and permeability of cell membranes, leading to cell death and favoring ulcer formation (Dunnill et al., 2017; Dudzińska et al., 2018). In this sense, the antioxidant activity was evaluated by measuring the levels of GSH (mg of non-protein sulfhydryl groups per g of tissue), SOD (unit. per g of protein), MDA (nmol per g of tissue) in gastric samples, and MPO (unit. per g of tissue). The antioxidant system acts on gastric mucosal cells to prevent or minimize the cytotoxicity promoted by oxidative stress. This system involves the action of enzymes such as SOD and compounds with the potential to scavenge free radicals such as GSH (do Carmo et al., 2018).

The administration of (-)-Fenchone for 14 days demonstrated an antioxidant effect by increasing the levels of GSH and SOD and reducing the levels of MDA and MPO. Thus, the curative effect found in our study may be related to the inhibition of free radicals with consequent reduction of toxic lipoperoxides and/or due to the promotion of the synthesis of endogenous antioxidants to maintain the cellular redox state.

The monoterpenes 1,8-cineole (Rocha Caldas et al., 2015a; Rocha Caldas et al., 2015b), thymol (Ribeiro et al., 2016) and limonene (de Souza et al., 2019) were shown to increase antioxidant defenses. Such studies corroborate the antioxidant property found in the present work and thus suggest that the decrease in ROS activity by the substance under study may be responsible for reducing the extent of the injury induced by acetic acid, promoting a more favorable environment for the process of healing.

Gastric healing is a complex process involving inflammation, cell migration, proliferation, re-epithelialization, angiogenesis, and tissue remodeling and deposition of the extracellular matrix (ECM). All these processes are controlled by growth factors and transcription factors activated by tissue injury, acting in a coordinated manner (Tarnawski, 2005; Tarnawski and Ahluwalia, 2012). The ulcer healing mechanism depends on the involvement of many molecular pathways, compounds that have therapeutic properties such as increased growth factors and anti-inflammatory activity are strong candidates for the prevention and treatment of human peptic ulcers (Magierowski et al., 2017; Viana et al., 2019).

In the injured gastric mucosa, activation of the inflammatory process occurs with an increase in mediators, such as nuclear transcription factor kappa B (NF- κ B), which upregulates the expression of inflammatory responses with increased release of IL-1, IL-6 TNF, among others (Liu et al., 2016; Wang et al., 2018). Overexpression of IL-1 β contributes to ulcer formation and stimulates the production of more TNF- α (Boshtam et al., 2017), high levels of IL-1 and TNF are related to neutrophil infiltration and epithelial cell apoptosis, which causes reduced gastric microcirculation around the ulcer region and delays in ulcer healing (Wang et al., 2018).

IL-10 acts as a protective cytokine of the gastric mucosa, and signals an anti-inflammatory response, reducing the immune response mediated by inflammatory cells. This effect occurs through the inhibition of TNF- α feedback and the consequent reduction of the inflammatory process in the gastric tissue (Mollazadeh et al., 2019).

Treatment with (-)-Fenchone reduced the levels of inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) and kept the IL-10 cytokine close to the baseline, suggesting an immunomodulatory effect. The monoterpenes limonene (de Souza et al., 2019) and carvacrol (Souza et al., 2017) have demonstrated similar immunomodulatory effects that corroborate our findings.

The results found in the present study demonstrate that treatment by repeated doses for 14 days with (-)-Fenchone reduced immunostaining for NF- κ B when compared to the negative control groups. The NF- κ B pathway plays a key role in the regulation of genes related to an acute inflammatory reaction, after exposure to various inflammatory stimuli, NF- κ B is activated, translocate to the nucleus, and causes transcriptional activation of other pro-inflammatory cytokines (Akanda et al., 2018; Aziz et al., 2019). The healing activity of this substance seems to be, at least in part due to the downregulation of the NF κ B pathway, a key player in pro-inflammatory cytokine production. Furthermore, treatment with (-)-Fenchone increased the immunostaining of TGF- β , a growth factor involved in the migration of fibroblasts and

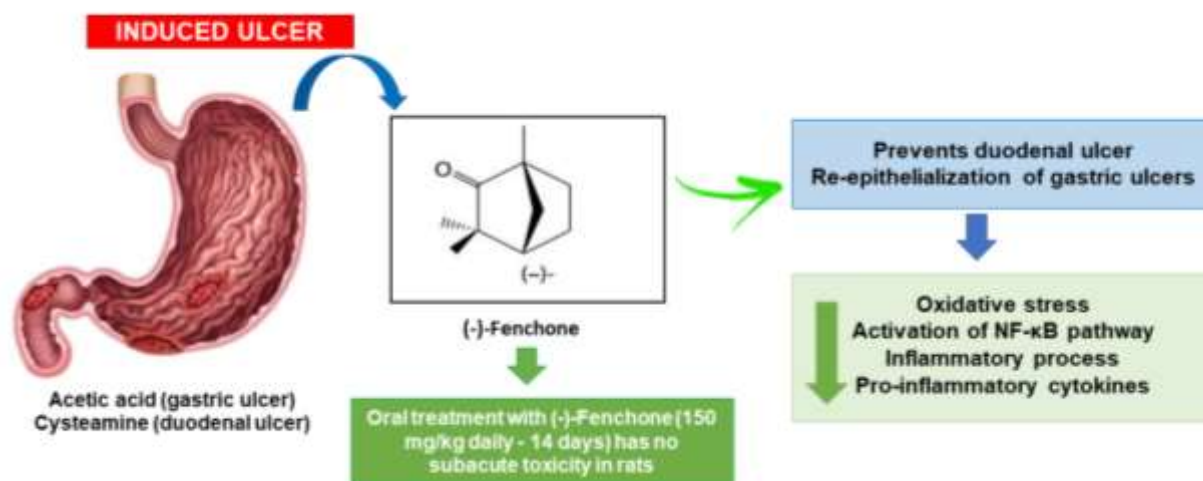
myofibroblasts, stimulation of collagenization in gastric tissues (Tarnawski, 2010). These results point to an immunomodulatory activity of this compound, due to its properties in maintaining basal levels of anti-inflammatory cytokines and decreasing levels of inflammatory cytokines.

These results indicate that the substance under study stimulates endogenous healing mechanisms via induction of multiple factors involved in gastric ulcer healing such as induction of cell proliferation and angiogenesis. These results corroborate a study conducted with the monoterpenes d-limonene and p-cymene in ulcers induced by acetic acid, in which the treatments had a healing effect due to the increase in growth factors that induce the re-epithelisation of the gastric lesion (Moraes et al., 2013; Formiga et al., 2021).

In this model of acetic acid-induced gastric ulcers, we also evaluated the safety of (-)-Fenchone treatment after 14 consecutive oral administrations once a day. Data from Sigma Aldrich, supplier of the substance, show that (-) - fenchone has low acute toxicity LD50 Oral in rats (female) 2.000 mg/kg (OECD Test Guideline 423), with no mortality observed at this dose. Seeking to corroborate previous studies and expand toxicological information, toxicity was evaluated with the most effective dose of (-)-Fenchone (150 mg/kg). No changes in body mass were noted throughout the treatment. The weights of the organs were not detrimentally affected. In addition, evaluation of biochemical parameters indicated no detrimental effect on hepatic function (AST and ALT), and renal function (urea and creatinine). We found that (-)-Fenchone treatment (150 mg/kg daily) did not alter any of the biochemical or hematologic parameters analyzed. Taken together, these findings indicate that 14 d oral treatment with (-)-Fenchone (150 mg/kg daily) has no subacute toxicity in rats.

In this study, it was shown that (-)-Fenchone substance originally derived from natural products, prevents duodenal ulcers as well as possesses gastric ulcer healing effect. Curative mechanisms seem to be due to a reduction in oxidative stress (increase in GSH and SOD with a reduction in MDA and MPO) and immunomodulatory (reduction in TNF- α , IL-1 β , NF κ B and increase in TGF- β and IL-10 levels). These results are accompanied by the safety of their administration evaluated in a 14-days treatment.

Graphical abstract



5 Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

6 Author Contributions

Araruna MEC, Alves Júnior EB, Serafim CAL, Silva LMO, Alves VP, and Batista LM contributed to the conception of the study, execution of the experiments, and writing of the manuscript. Alves AF and Nunes MKS contributed to the histomorphological and immunohistochemical analysis of this study and Araujo AA contributed to the in vitro experiments of this article. Silva MS and Sobral MV provided technical support and the drugs evaluated in this study. All authors reviewed and approved the final version of this manuscript.

7 Funding

Self-funded by the research group.

8 Acknowledgments

The authors would like to express our sincere gratitude to Pharmaceuticals and Medicines Research Institute (IPeFarM) from the Federal University of Paraíba (UFPB) for the institutional support and CAPES and CNPq for the financial support.

9 References

- Adinortey, M.B., Ansah, C., Galyuon, I., and Nyarko, A. (2013). *In Vivo* Models Used for Evaluation of Potential Antigastroduodenal Ulcer Agents. *Ulcers* 2013, 796405. doi: 10.1155/2013/796405.
- Akanda, M.R., Kim, I.S., Ahn, D., Tae, H.J., Nam, H.H., Choo, B.K., et al. (2018). Anti-Inflammatory and Gastroprotective Roles of *Rabdosia inflexa* through Downregulation of Pro-Inflammatory Cytokines and MAPK/NF- κ B Signaling Pathways. *Int J Mol Sci* 19(2). doi: 10.3390/ijms19020584.
- Akkol, E.K., İlhan, M., Ayşe Demirel, M., Keleş, H., Tümen, I., and Süntar, İ. (2015). *Thuja occidentalis* L. and its active compound, α -thujone: Promising effects in the treatment of polycystic ovary syndrome without inducing osteoporosis. *J Ethnopharmacol* 168, 25-30. doi: 10.1016/j.jep.2015.03.029.
- Algieri, F., Rodriguez-Nogales, A., Vezza, T., Garrido-Mesa, J., Garrido-Mesa, N., Utrilla, M.P., et al. (2016). Anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts of *Lavandula dentata* L. and *Lavandula stoechas* L. *J Ethnopharmacol* 190, 142-158. doi: 10.1016/j.jep.2016.05.063.
- Almeida, C.L.F.d., Brito, S.A., de Santana, T.I., Costa, H.B.A., de Carvalho Júnior, C.H.R., da Silva, M.V., et al. (2017). *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae): Antioxidant and Antiulcer Activities of the Leaf Hexane Extract. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017, 6593073. doi: 10.1155/2017/6593073.
- Aragão, T.P., Prazeres, L.D.K.T.d., Brito, S.A., Neto, P.J.R., Rolim, L.A., Almeida, J.R.G.d.S., et al. (2018). Contribution of Secondary Metabolites to the Gastroprotective Effect of Aqueous Extract of *Ximenia americana* L. (Olacaceae) Stem Bark in Rats. *Molecules* 23(1), 112.
- Aziz, R.S., Siddiqua, A., Shahzad, M., Shabbir, A., and Naseem, N. (2019). 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. *Biomed Pharmacother* 110, 554-560. doi: 10.1016/j.biopha.2018.12.002.
- Banihani, S.A. (2016). Histamine-2 Receptor Antagonists and Semen Quality. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 118(1), 9-13. doi: <https://doi.org/10.1111/bcpt.12446>.
- Baptista, R., Madureira, A.M., Jorge, R., Adão, R., Duarte, A., Duarte, N., et al. (2015). Antioxidant and Antimycotic Activities of Two Native *Lavandula* Species from Portugal. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015, 570521. doi: 10.1155/2015/570521.
- Besouw, M., Masereeuw, R., van den Heuvel, L., and Levtchenko, E. (2013). Cysteamine: an old drug with new potential. *Drug Discov Today* 18(15-16), 785-792. doi: 10.1016/j.drudis.2013.02.003.
- Bonamin, F., Moraes, T.M., dos Santos, R.C., Kushima, H., Faria, F.M., Silva, M.A., et al. (2014). The effect of a minor constituent of essential oil from *Citrus aurantium*: The role of β -myrcene in preventing peptic ulcer disease. *Chemico-Biological Interactions* 212, 11-19. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.01.009>.

- Boshtam, M., Asgary, S., Kouhpayeh, S., Shariati, L., and Khanahmad, H. (2017). Aptamers Against Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines: A Review. *Inflammation* 40(1), 340-349. doi: 10.1007/s10753-016-0477-1.
- Carvalho, K.I.M.d., Bonamin, F., dos Santos, R.C., Périco, L.L., Beserra, F.P., de Sousa, D.P., et al. (2014). Geraniol—a flavoring agent with multifunctional effects in protecting the gastric and duodenal mucosa. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 387(4), 355-365. doi: 10.1007/s00210-013-0947-z.
- Choi, K.-S., Kim, E.-H., Hong, H., Ock, C.Y., Lee, J.S., Kim, J.-H., et al. (2012). Attenuation of cysteamine-induced duodenal ulcer with *Cochinchina momordica* seed extract through inhibiting cytoplasmic phospholipase A2/5-lipoxygenase and activating γ -glutamylcysteine synthetase. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 27(s3), 13-22. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2012.07065.x>.
- Cox-Georgian, D., Ramadoss, N., Dona, C., and Basu, C. (2019). "Therapeutic and Medicinal Uses of Terpenes," in *Medicinal Plants: From Farm to Pharmacy*, eds. N. Joshee, S.A. Dhekney & P. Parajuli. (Cham: Springer International Publishing), 333-359.
- de Souza, M.C., Vieira, A.J., Beserra, F.P., Pellizzon, C.H., Nóbrega, R.H., and Rozza, A.L. (2019). Gastroprotective effect of limonene in rats: Influence on oxidative stress, inflammation and gene expression. *Phytomedicine* 53, 37-42. doi: 10.1016/j.phymed.2018.09.027.
- do Carmo, T.L.L., Azevedo, V.C., de Siqueira, P.R., Galvão, T.D., Dos Santos, F.A., Dos Reis Martinez, C.B., et al. (2018). 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. *Environ Sci Pollut Res Int* 25(23), 22963-22976. doi: 10.1007/s11356-018-2393-4.
- Dudzińska, E., Gryzinska, M., Ognik, K., Gil-Kulik, P., and Kocki, J. (2018). Oxidative Stress and Effect of Treatment on the Oxidation Product Decomposition Processes in IBD. *Oxid Med Cell Longev* 2018, 7918261. doi: 10.1155/2018/7918261.
- Dunnill, C., Patton, T., Brennan, J., Barrett, J., Dryden, M., Cooke, J., et al. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *Int Wound J* 14(1), 89-96. doi: 10.1111/iwj.12557.
- Esterbauer, H., and Cheeseman, K.H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186, 407-421. doi: 10.1016/0076-6879(90)86134-h.
- Faure, P., and Lafond, J.L. (1995). "Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation," in *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*, eds. A.E. Favier, J. Cadet, B. Kalyanaraman, M. Fontecave & J.L. Pierre. (Basel: Birkhäuser Basel), 237-248.
- Formiga, R.d.O., Alves Júnior, E.B., Vasconcelos, R.C., Araújo, A.A., de Carvalho, T.G., de Araújo Junior, R.F., et al. (2021). Effect of p-cymene and rosmarinic acid on gastric ulcer healing – Involvement of multiple endogenous curative mechanisms. *Phytomedicine* 86, 153497. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153497>.
- Guedes, J.M. (2018). *Avaliação da Atividade Gastroprotetora de Isômero (-)-Fenchona*. Master, Universidade Federal da Paraíba.

- Harbord, M., Eliakim, R., Bettenworth, D., Karmiris, K., Katsanos, K., Kopylov, U., et al. (2017). Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 2: Current Management. *J Crohns Colitis* 11(7), 769-784. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjx009.
- Him, A., Ozbek, H., Turel, I., and Oner, A.C. (2008). Antinociceptive Activity of Alpha-Pinene and Fenchone. *Pharmacologyonline* 3, 363-369.
- Jäger, W., and Höferl, M. (2020). "Metabolism of Terpenoids in Animal Models and Humans," in *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*, eds. K.H.C. Başer & G. Buchbauer. 3 ed (Boca Raton: CRC Press), 209-234.
- Kangwan, N., Park, J.M., Kim, E.H., and Hahm, K.B. (2014). Quality of healing of gastric ulcers: Natural products beyond acid suppression. *World J Gastrointest Pathophysiol* 5(1), 40-47. doi: 10.4291/wjgp.v5.i1.40.
- Kendall, A.C., Keys, A.J., Turner, J.C., Lea, P.J., and Mifflin, B.J. (1983). The isolation and characterisation of a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* 159(6), 505-511. doi: 10.1007/bf00409139.
- Khomenko, T., Szabo, S., Deng, X., Ishikawa, H., Anderson, G.J., and McLaren, G.D. (2009). Role of iron in the pathogenesis of cysteamine-induced duodenal ulceration in rats. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 296(6), G1277-G1286. doi: 10.1152/ajpgi.90257.2008.
- Krawisz, J.E., Sharon, P., and Stenson, W.F. (1984). Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 87(6), 1344-1350.
- Lanas, A., and Chan, F.K.L. (2017). Peptic ulcer disease. *Lancet* 390(10094), 613-624. doi: 10.1016/s0140-6736(16)32404-7.
- Liu, J., Wang, F., Luo, H., Liu, A., Li, K., Li, C., et al. (2016). Protective effect of butyrate against ethanol-induced gastric ulcers in mice by promoting the anti-inflammatory, anti-oxidant and mucosal defense mechanisms. *Int Immunopharmacol* 30, 179-187. doi: 10.1016/j.intimp.2015.11.018.
- Magierowski, M., Magierowska, K., Hubalewska-Mazgaj, M., Sliwowski, Z., Ginter, G., Pajdo, R., et al. (2017). Carbon monoxide released from its pharmacological donor, tricarbonyldichlororuthenium (II) dimer, accelerates the healing of pre-existing gastric ulcers. *Br J Pharmacol* 174(20), 3654-3668. doi: 10.1111/bph.13968.
- Mishra, A.P.B., A.Chandra, S. (2019). A Comprehensive Review on the Screening Models for the Pharmacological Assessment of Antiulcer Drugs. *Curr Clin Pharmacol* 14(3), 175-196. doi: 10.2174/1574884714666190312143846.
- Miyazawa, M., and Miyamoto, Y. (2004). Biotransformation of (1R)-(+)- and (1S)-(-)-camphor by the larvae of common cutworm (*Spodoptera litura*). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 27(2), 83-89. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2003.09.012>.
- Mollazadeh, H., Cicero, A.F.G., Blesso, C.N., Pirro, M., Majeed, M., and Sahebkar, A. (2019). Immune modulation by curcumin: The role of interleukin-10. *Crit Rev Food Sci Nutr* 59(1), 89-101. doi: 10.1080/10408398.2017.1358139.
- Moraes, T.M., Rozza, A.L., Kushima, H., Pellizzon, C.H., Rocha, L.R., and Hiruma-Lima, C.A. (2013). 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. *J Med Food* 16(12), 1162-1167. doi: 10.1089/jmf.2012.0259.
- Ninkuu, V., Zhang, L., Yan, J., Fu, Z., Yang, T., and Zeng, H. (2021). Biochemistry of Terpenes and Recent Advances in Plant Protection. *Int J Mol Sci* 22(11). doi: 10.3390/ijms22115710.
- Pessoa, M.L.S., Silva, L.M.O., Araruna, M.E.C., Serafim, C.A.L., Júnior, E.B.A., Silva, A.O., et al. (2020). Antifungal activity and antidiarrheal activity via antimotility mechanisms of (-)-fenchone in experimental models. *World J Gastroenterol* 26(43), 6795-6809. doi: 10.3748/wjg.v26.i43.6795.
- Ribeiro, A.R., Diniz, P.B., Pinheiro, M.S., Albuquerque-Júnior, R.L., and Thomazzi, S.M. (2016). Gastroprotective effects of thymol on acute and chronic ulcers in rats: The role of prostaglandins, ATP-sensitive K(+) channels, and gastric mucus secretion. *Chem Biol Interact* 244, 121-128. doi: 10.1016/j.cbi.2015.12.004.
- Rocha Caldas, G.F., Oliveira, A.R., Araújo, A.V., Lafayette, S.S., Albuquerque, G.S., Silva-Neto Jda, C., et al. (2015a). Gastroprotective Mechanisms of the Monoterpene 1,8-Cineole (Eucalyptol). *PLoS One* 10(8), e0134558. doi: 10.1371/journal.pone.0134558.
- Rocha Caldas, G.F., Oliveira, A.R.d.S., Araújo, A.V., Lafayette, S.S.L., Albuquerque, G.S., Silva-Neto, J.d.C., et al. (2015b). Gastroprotective Mechanisms of the Monoterpene 1,8-Cineole (Eucalyptol). *PLOS ONE* 10(8), e0134558. doi: 10.1371/journal.pone.0134558.
- Rolim, T.L., Meireles, D.R.P., Batista, T.M., de Sousa, T.K.G., Manguiera, V.M., de Abrantes, R.A., et al. (2017). Toxicity and antitumor potential of Mesosphaerum sidifolium (Lamiaceae) oil and fenchone, its major component. *BMC Complement Altern Med* 17(1), 347. doi: 10.1186/s12906-017-1779-z.
- Slavchev, I., Dobrikov, G.M., Valcheva, V., Ugrinova, I., Pasheva, E., and Dimitrov, V. (2014). Antimycobacterial activity generated by the amide coupling of (-)-fenchone derived aminoalcohol with cinnamic acids and analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 24(21), 5030-5033. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.09.021>.
- Souza, M.T.d.S., Teixeira, D.F., de Oliveira, J.P., Oliveira, A.S., Quintans-Júnior, L.J., Correa, C.B., et al. (2017). Protective effect of carvacrol on acetic acid-induced colitis. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 96, 313-319. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.017>.
- Subudhi, b.b., and Sahoo, S.P. (2016). Updates in Drug Development Strategies against Peptic ulcer. *Journal of Gastrointestinal & Digestive System* 06. doi: 10.4172/2161-069X.1000398.
- Sun, Y., Oberley, L.W., and Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry* 34(3), 497-500. doi: 10.1093/clinchem/34.3.497.
- Suntres, Z.E., Coccimiglio, J., and Alipour, M. (2015). The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55(3), 304-318. doi: 10.1080/10408398.2011.653458.
- Takagi, K., Okabe, S., and Saziki, R. (1969). A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. *Japanese Journal of Pharmacology* 19(3), 418-424. doi: <https://doi.org/10.1254/jjp.19.418>.

- Tarnawski, A.S. (2005). Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. *Dig Dis Sci* 50 Suppl 1, S24-33. doi: 10.1007/s10620-005-2803-6.
- Tarnawski, A.S. (2010). Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing: state of the art 2010. *Gastroenterologia Polska/Gastroenterology* 17(3).
- Tarnawski, A.S., and Ahluwalia, A. (2012). Molecular mechanisms of epithelial regeneration and neovascularization during healing of gastric and esophageal ulcers. *Curr Med Chem* 19(1), 16-27. doi: 10.2174/092986712803414088.
- Venzon, L., Mariano, L.N.B., Somensi, L.B., Boeing, T., de Souza, P., Wagner, T.M., et al. (2018). Essential oil of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) and geraniol, but not citral, promote gastric healing activity in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 98, 118-124. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.020>.
- Viana, A.F.S.C., Lopes, M.T.P., Oliveira, F.T.B., Nunes, P.I.G., Santos, V.G., Braga, A.D., et al. (2019). (-)-Myrtenol accelerates healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats and in human gastric adenocarcinoma cells. *European Journal of Pharmacology* 854, 139-148. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.04.025>.
- Wang, X.Y., Yin, J.Y., Zhao, M.M., Liu, S.Y., Nie, S.P., and Xie, M.Y. (2018). Gastroprotective activity of polysaccharide from *Herichium erinaceus* against ethanol-induced gastric mucosal lesion and pylorus ligation-induced gastric ulcer, and its antioxidant activities. *Carbohydr Polym* 186, 100-109. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.01.004.
- Woods, Y.L., and Carey, F.A. (2017). Pathology and histology of the oesophagus and stomach. *Surgery - Oxford International Edition* 35(11), 612-618. doi: 10.1016/j.mpsur.2017.08.002.
- Zimmermann, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16(2), 109-110. doi: 10.1016/0304-3959(83)90201-4.

FIGURES

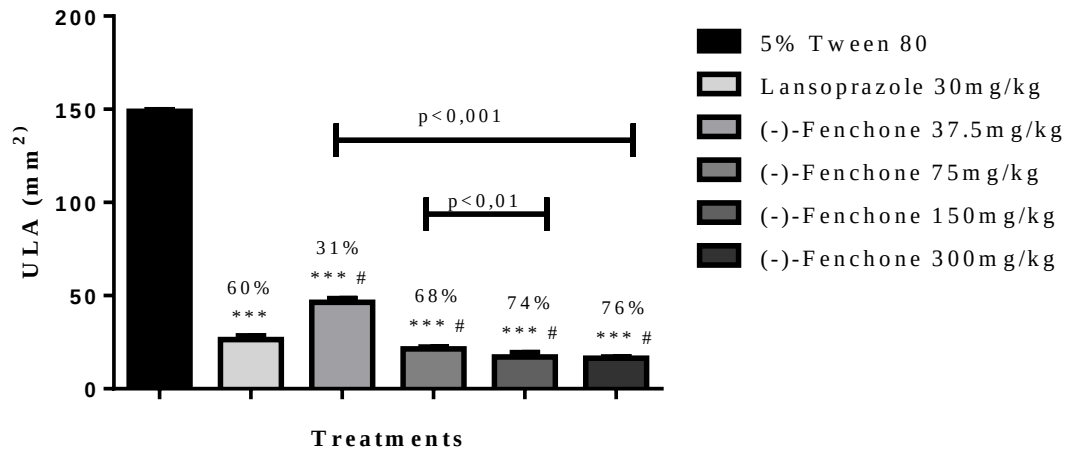


Fig. 1: Effect of oral administration of (-)-fenchone on cysteamine-induced duodenal ulcer. Results are expressed as mean $\pm$ s.d. One-way analysis of variance (ANOVA) was used: $F(5,27) = 4.780$, followed by Dunnett's or Tukey's test. *** $p < 0.001$, compared with the negative control group (0.9% saline solution); # $p < 0.001$, compared to the lansoprazole group (30 mg/kg) ($n = 5-7$). ULA = Ulcerative Lesion Area

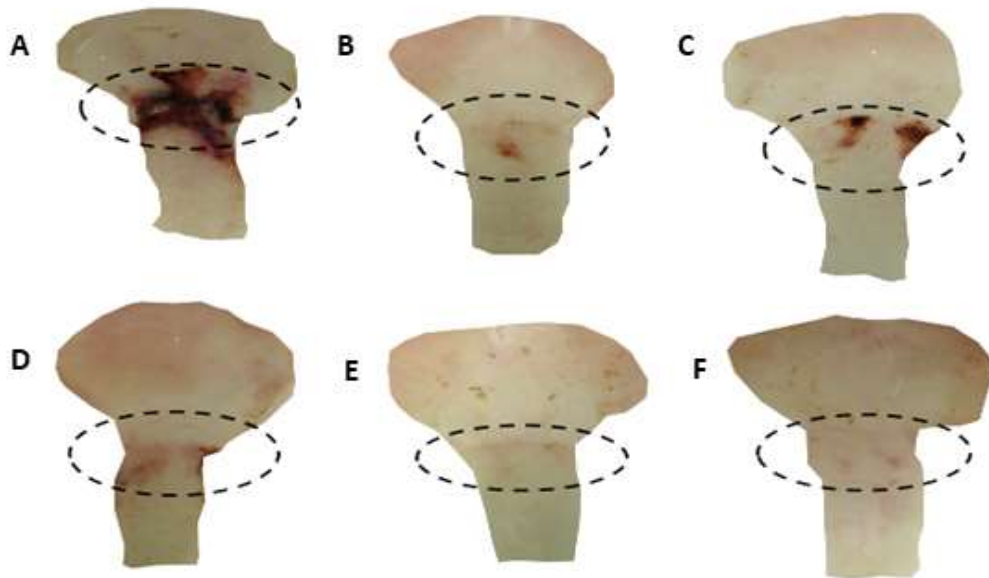


Fig. 2: Macroscopic aspects of the duodenal mucosa of male Wistar rats pretreated (p.o.) with 5% tween 80 (A); lansoprazole 30 mg/kg (B); (-)-Fenchone 37.5 mg/kg (C), 75 mg/kg (D), 150 mg/kg (E) and 300 mg/kg (F) in the cysteamine-induced duodenal ulcer model

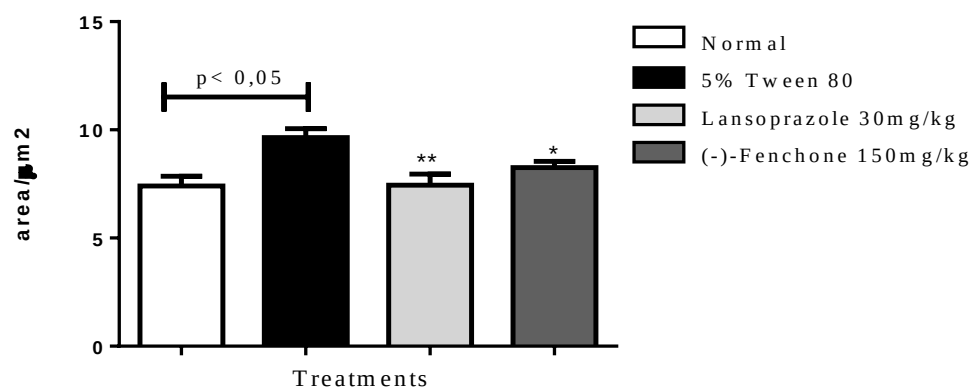
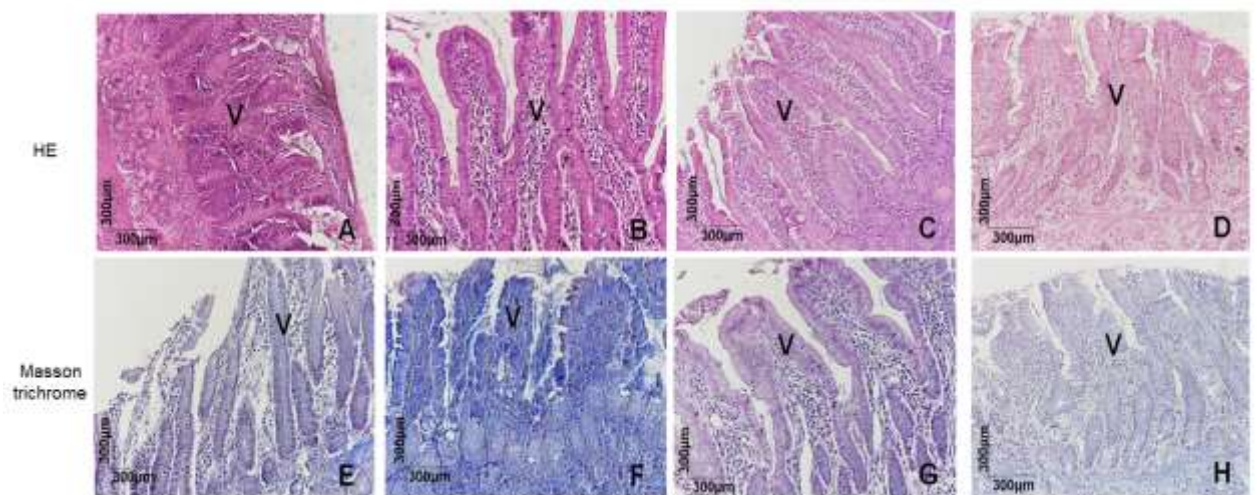


Fig. 3: Microscopic effects of the duodenal mucosa of rats submitted cysteamine-induced duodenal ulcer and pretreated or not with (-)-Fenchone. Representative photomicrographs of the animals' duodene from the experimental groups: Normal (A,E), 5% tween 80 (B,F), lansoprazole 30 mg/kg (C,G) and (-)-Fenchone 150 mg/kg (D,H). HE staining (A,B,C,D) and Masson trichrome (E,F,G,H). Intestinal villi and enterocytes (V). Results are expressed as median (minimum-maximum) of the parameters analyzed (n=5, 3 sessions per animal). Kruskal Wallis test and Dunn's posterior test was performed using the software Graph Pad Prism. **p < 0.01 or *p < 0.05 compared to the control group (5 % tween 80)

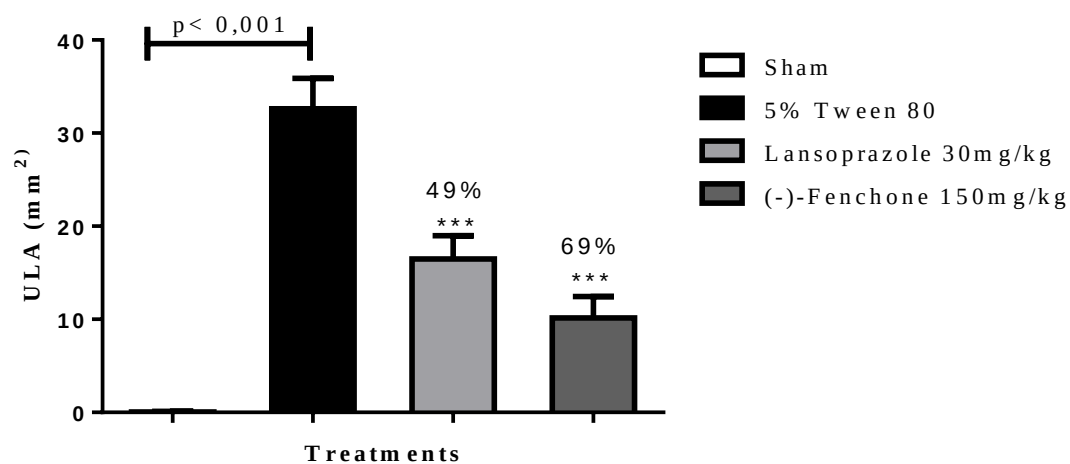


Fig. 4: Effect of oral administration (-)-fenchone and lansoprazole on acetic acid-induced gastric ulcer. Results are expressed as mean $\pm$ s.d. One-way analysis of variance (ANOVA) was used: $F(3,23) = 211.6$, followed by the Dunnett and Tukey test. *** $p < 0.001$, compared with the negative control group (Tween 80 5%) ($n = 6-8$). ULA = Ulcerative Lesion Area

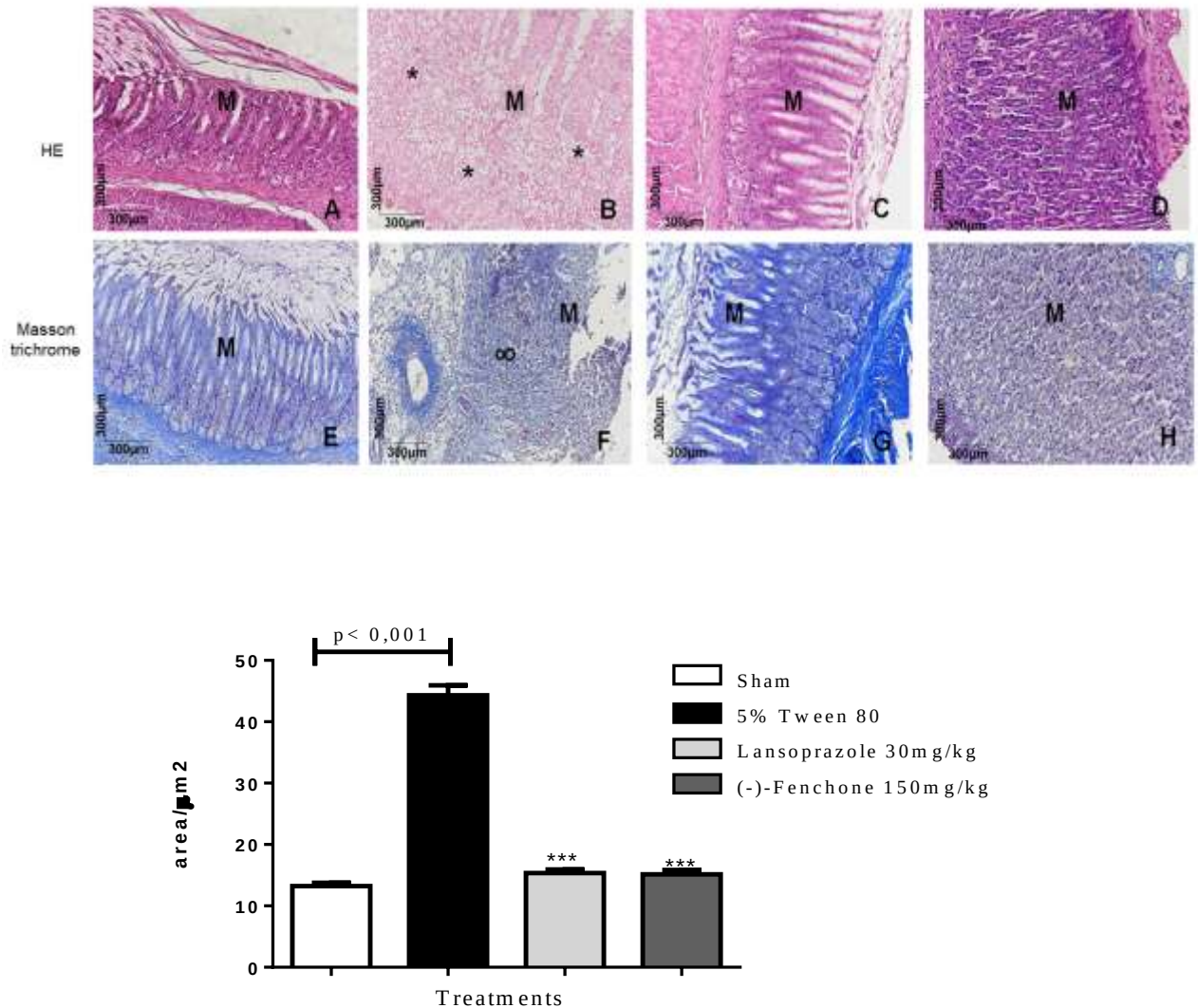
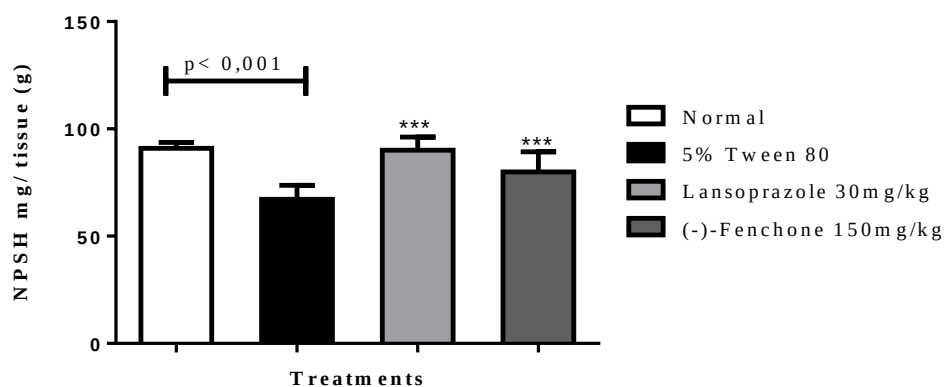
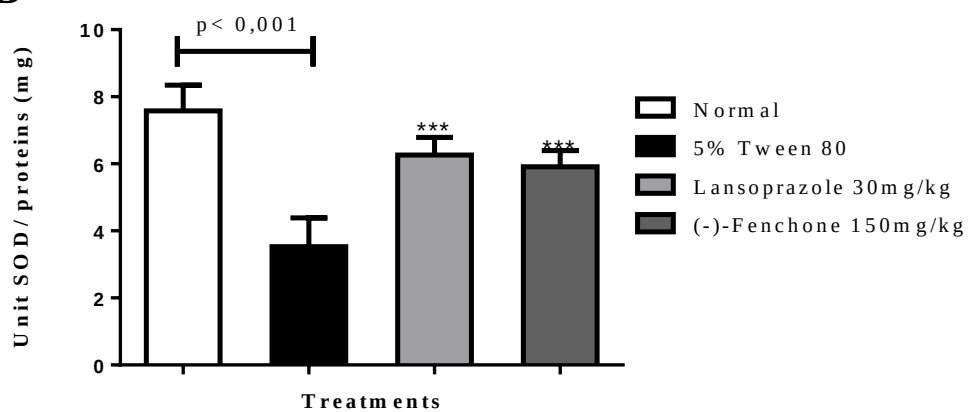
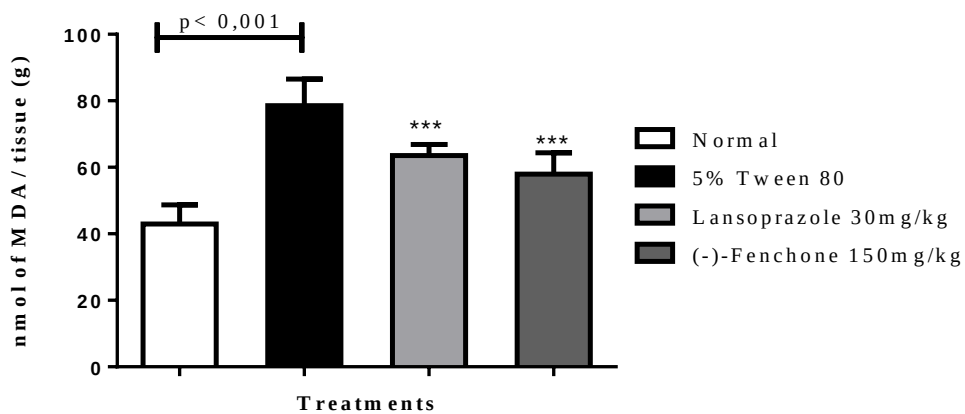


Fig. 5: Microscopic effects of the gastric mucosa of rats submitted acetic acid-induced gastric ulcer and treated or not with (-)-Fenchone. Representative photomicrographs of the animals' stomachs from the experimental groups: Normal (A,E), 5% tween 80 (B,F), lansoprazole 30 mg/kg (C,G) and (-)-Fenchone 150 mg/kg (D,H). HE staining (A, B, C, D) and Masson trichrome (E,F,G,H). Stomach mucosa (M), acute inflammatory reaction(*), scarring tissue (∞). Morphometric analysis by Masson's trichrome. Results are expressed as median (minimum-maximum) of the parameters analyzed ($n=5$, 3 sessions per animal). Kruskal Wallis test and Dunn's posterior test was performed using the software Graph Pad Prism. *** $p < 0.001$ vs. negative control group (5 % tween 80)

A**B****C**

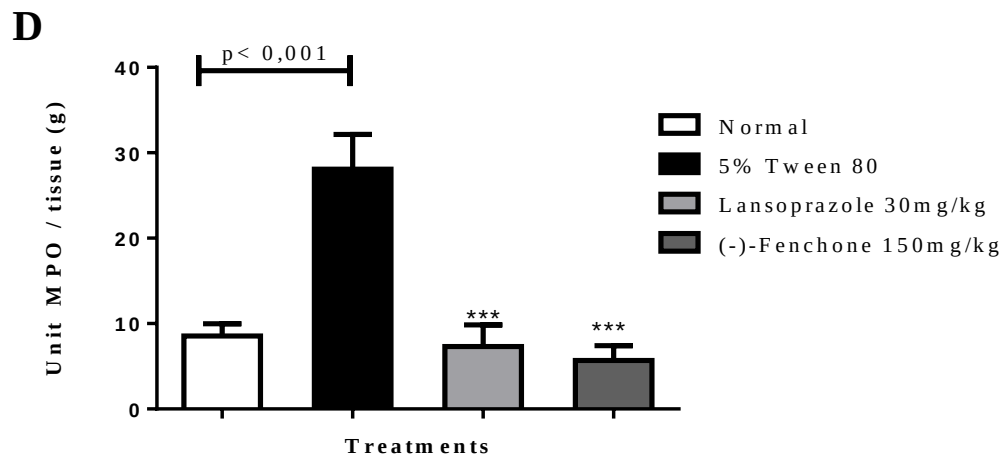
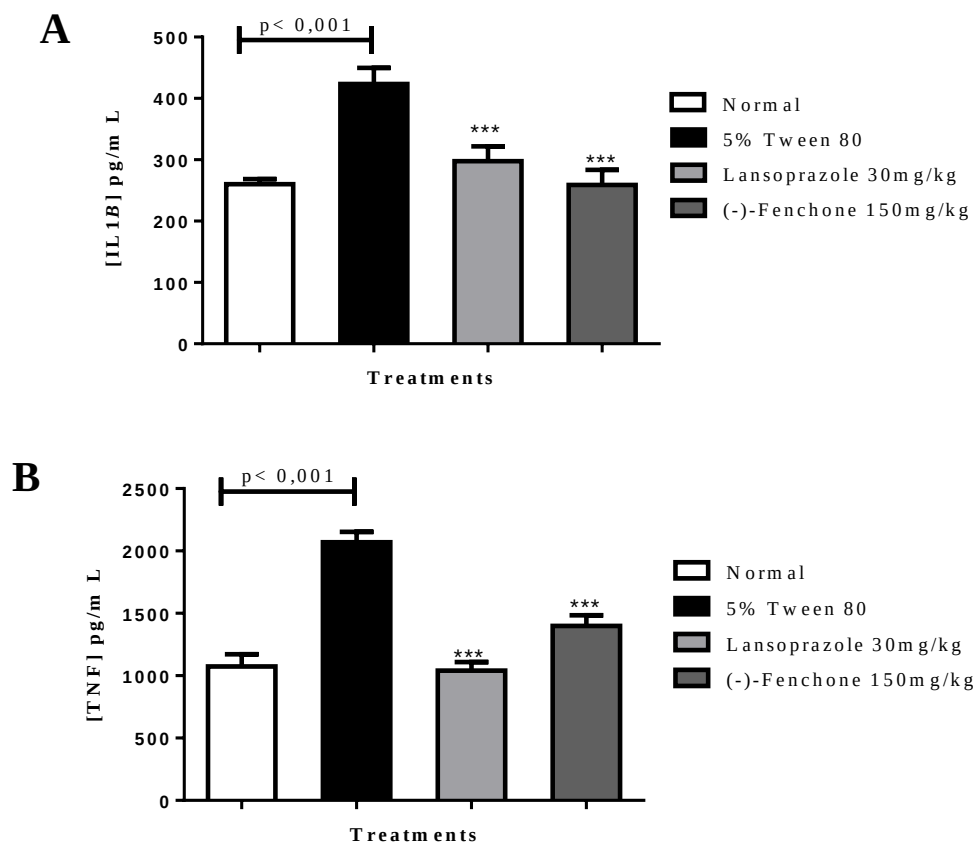


Fig 6. Effect of oral administration of (-)-fenchone and lansoprazole in A) GSH, B) SOD C) MDA and D) MPO levels form gastric ulcer model induced by acetic acid in rats. Results expressed as mean $\pm$ SE of the parameters analyzed (n = 5-8). The analysis of variance of one via (ANOVA) followed by the Dunnett's and Tukey's test. ***p < 0.001 vs control group



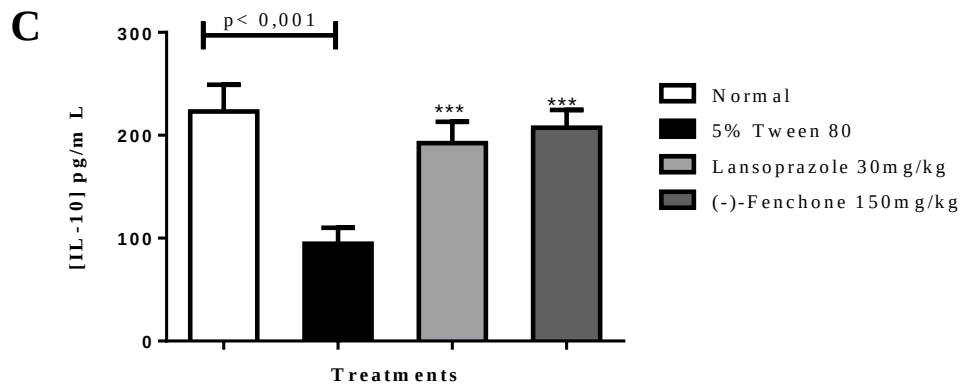


Fig 7. Effect of (-)-fenchone and lansoprazole in A) IL-1 β , B) TNF- α and C) IL-10 levels form gastric ulcer model induced by acetic acid in rats. Results expressed as mean $\pm$ SE of the parameters analyzed (n = 6–8). The analysis of variance of one via (ANOVA) followed by the Dunnett's and Tukey's test. ***p < 0.001 vs control group

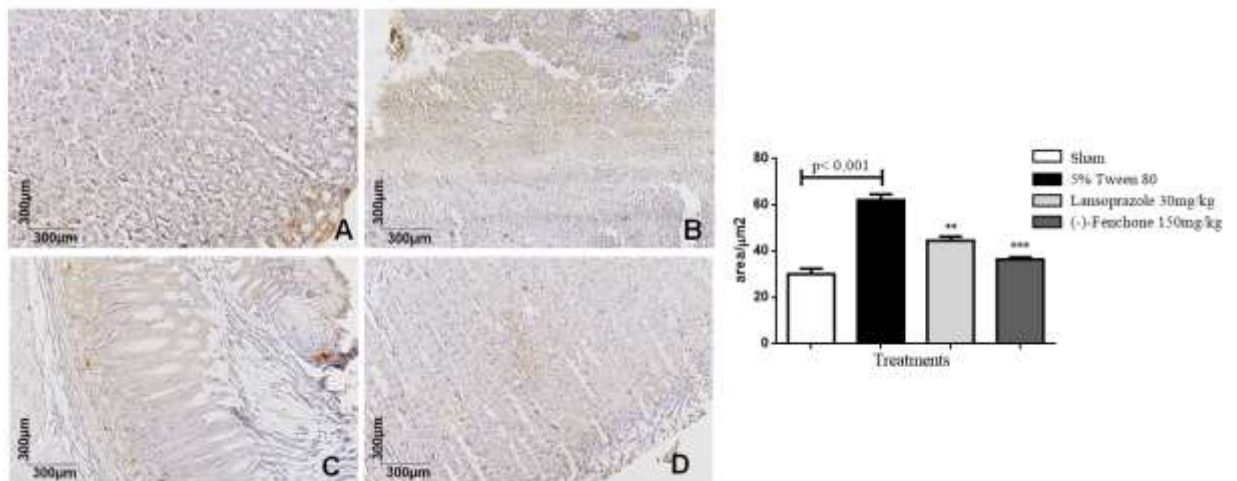


Fig 8. Photomicrographs with immunohistochemical marking for nuclear transcription factor kappa B (NF- κ B) in stomach samples from rats. A - normal; B- 5 % Tween 80 (10 mL/kg); C- Lansoprazole (30 mg/kg); D- (-)-Fenchone (150 mg/kg). Results are expressed as median (minimum-maximum) of the parameters analyzed (n=5, 3 sessions per animal). Kruskal Wallis test and Dunn's posterior test was performed using the software Graph Pad Prism. **p < 0.01, ***p < 0.001 compared to the control group (5 % tween 80)

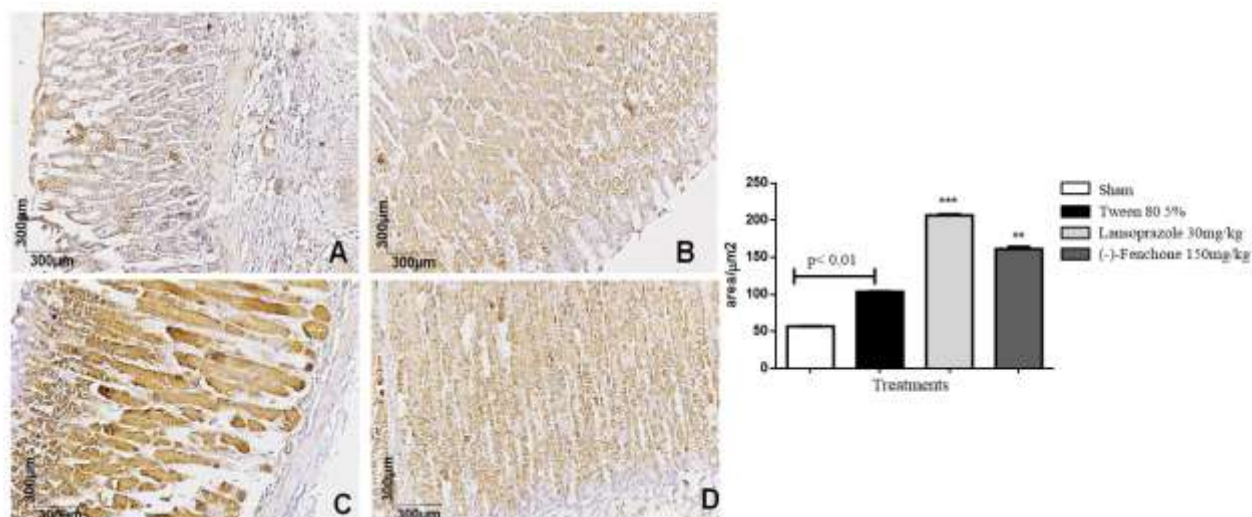


Fig 9. Photomicrographs with immunohistochemical marking for transforming growth factor beta (TGF- β) in stomach samples from rats. A - normal; B- 5 % Tween 80 (10 mL/kg); C- Lansoprazole (30 mg/kg); D- (-)-Fenchone (150 mg/kg). Results are expressed as median (minimum-maximum) of the parameters analyzed (n=5, 3 sessions per animal). Kruskal Wallis test and Dunn's posterior test was performed using the software Graph Pad Prism. **p < 0.01, ***p < 0.001 compared to the control group (5 % tween 80)

TABLES

Table 1. Effect of oral administration of (-)-fenchone for 14 days on water, feed, weight evolution and organ index of rats in the acetic acid-induced ulcer model

Parameters	Treatments			
	Sham	5% Tween 80	Lansoprazole (30mg/kg)	(-)-Fenchone (150mg/kg)
Water intake (mL)	248.2 $\pm$ 15.7	207.6 $\pm$ 21.7 ###	223.8 $\pm$ 12.8*	243.9 $\pm$ 11.3 ***
Feed intake (g)	182.7 $\pm$ 9.5	150.7 $\pm$ 5.4 ###	165.6 $\pm$ 24.2*	193.0 $\pm$ 14.8 ***
Weight evolution (g)	52.3 $\pm$ 3.9	35.6 $\pm$ 2.6 ###	54.8 $\pm$ 3.6 ***	42,3 $\pm$ 2.1 **
Organ index				
Liver	34.9 $\pm$ 1.8	33.5 $\pm$ 2.2	33.6 $\pm$ 2.6	33.1 $\pm$ 1.7
Heart	4.3 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.3	4.2 $\pm$ 0.2	4.3 $\pm$ 0.5
Kidneys	8.2 $\pm$ 0.2	8.5 $\pm$ 0.6	8.8 $\pm$ 0.2	8.3 $\pm$ 0.6
Spleen	2.8 $\pm$ 0.2	2.7 $\pm$ 0.1	3.0 $\pm$ 0.1	2.9 $\pm$ 0.2

Values expressed as mean $\pm$ SD (n=6-8). One-way Analysis of Variance (ANOVA): F(3,52) =19.61, followed by the Dunnett and Tukey post-test. *p<0.05 and ***p<0.001 compared to the 5%Tween 80 group; ###p< 0.001 and ##p< 0.01 compared to the Sham group. . For organ evaluation, values were expressed as organs index corresponding to the division of body (mg) by weight of animals (g)

Table 2. Hematological and biochemical parameters of rats treated for 14 days with lansoprazole or (-)-fenchone, in the acetic acid-induced ulcer model

Parameters	Treatments			
	Sham	5% Tween 80	Lansoprazole (30mg/kg)	(-)-Fenchone (150mg/kg)
Hematological				
Red blood cells ($10^6/\text{mm}^3$)	7.7 ± 0.4	7.3 ± 0.4	7.1 ± 0.4	7.6 ± 0.4
Hemoglobin (g/dL)	14.8 ± 0.4	14.3 ± 1.0	14.0 ± 1.0	14.9 ± 1.2
Hematocrit (%)	39.7 ± 1.5	39.6 ± 2.9	38.3 ± 2.6	40.9 ± 3.8
MCV (μ^3)	52.1 ± 2.0	55.4 ± 2.1	52.3 ± 3.9	52.4 ± 3.0
HCM (μg)	19.5 ± 0.7	19.9 ± 0.7	19.1 ± 1.3	19.1 ± 1.0
CHCM (%)	36.6 ± 1.0	36.0 ± 0.8	36.2 ± 1.1	36.7 ± 0.4
Leukocytes ($10^3/\text{mm}^3$)	8.2 ± 2.9	9.3 ± 4.2	11.6 ± 5.0	10.7 ± 4.6
Neutrophils (%)	6.1 ± 2.8	8.3 ± 1.5	8.8 ± 3.4	8.9 ± 3.7
Lymphocytes (%)	78.9 ± 5.5	77.1 ± 4.9	75.0 ± 5.9	75.0 ± 6.1
Monocytes (%)	14.8 ± 1.6	13.1 ± 2.1	13.3 ± 2.1	14.9 ± 1.6
Biochemicals				
Glucose (mg/dL)	150.7 ± 15.5	147.0 ± 15.3	165.7 ± 23.1	163.6 ± 18.2
Cholesterol (mg/dL)	67.2 ± 6.1	75.0 ± 6.3	71.1 ± 3.9	72.4 ± 6.6
Urea (mg/dL)	47.8 ± 5.6	47.0 ± 4.0	49.1 ± 5.1	49.5 ± 5.5
Creatinine (mg/dL)	0.6 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0
FAL (mg/dL)	269.2 ± 17.4	313.2 ± 44.3	302.1 ± 35.9	315.3 ± 41.7
AST (U/I)	138.8 ± 6.3	124.2 ± 10.8	129.0 ± 12.8	131.4 ± 8.2
ALT (U/I)	58.7 ± 7.4	56.3 ± 13.8	54.6 ± 11.0	57.5 ± 8.1

Values were expressed as mean $\pm$ standard deviation (n=6-8). One-way Analysis of Variance (ANOVA): F(3,25) = 2.050, followed by the Dunnett and Tukey post-test

4.2 Artigo 2: *(-)-Fenchone ameliorate TNBS-induced colitis in rats via antioxidant, immunomodulatory and cytoprotective mechanisms.* Artigo a ser submetido a revista Frontiers in Pharmacology

(-)-Fenchone ameliorate TNBS-induced colitis in rats via antioxidant, immunomodulatory and cytoprotective mechanisms

Maria Elaine Cristina Araruna¹, Edvaldo Balbino Alves Júnior¹, Catarina Alves de Lima Serafim¹, Juliana Schossler de França¹, Marcelo Sobral da Silva¹, Marianna Vieira Sobral¹, Adriano Francisco Alves², Maria Carolina de Paiva Sousa², Aurigena Antunes Araújo³ and Leônia Maria Batista^{1*}

¹ Postgraduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba (UFPB), João Pessoa, PB, Brazil

² Department of Physiology and Pathology, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba (UFPB), João Pessoa, PB, Brazil

³ Department of Morphology, Histology and Basic Pathology, Biosciences Center, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil

*** Correspondence:**

Prof. Dr. Leônia Maria Batista, Department of Pharmaceutical Sciences, IPeFarM, Federal University of Paraíba, 58051-970, João Pessoa, PB, Brazil. Tel.: +55-83-32167003; Fax: +55-83-32167502. e-mail: leoniab@uol.com.br.

Keywords: **(-)-Fenchone, ulcerative colitis, antioxidant, immunomodulatory, cytoprotection**

Abstract

Background: (-)-Fenchone is a bicyclic monoterpene present in the plant species *Foeniculum vulgare* (fennel), *Thuja occidentalis* L. (tuja) and *Lavandula stoechas* (lavender). These plants have a therapeutic importance in the treatment of intestinal disorders. Pharmacological studies report its antinociceptive, antimicrobial, anti-inflammatory, antidiarrheal and antioxidant activity.

Hypothesis/Purpose: To evaluate intestinal anti-inflammatory activity in the trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS)-induced colitis model acute and sub-chronic phase with recurrence in rats.

Methods: Intestinal anti-inflammatory effects were assessed using TNBS-induced colitis model acute and chronic in rats. The mechanisms were evaluated from colonic tissue fragments of the acute and sub-chronic phase with recurrence models.

Results: (-)- fenchone (37.5–300 mg/kg) acute phase or (150 mg/kg) chronic phase oral administration reduced ($p < 0.001$) the macroscopic lesion score, ulcerative area, intestinal

weight/length ratio, and diarrheal index in TNBS-treated animals. At dose (150 mg/kg) acute and chronic phase decreased malondialdehyde (MDA) ($p < 0.001$) and myeloperoxidase (MPO) ($p < 0.001$), restored glutathione (GSH) levels, and superoxide dismutase (SOD) ($p < 0.001$). Decreased immunomarking for factor nuclear kappa B (NF- κ B) and levels interleukin (IL)-1 and tumor necrosis factor α (TNF- α) and maintained IL-10 and TGF- β ($p < 0.001$) basal levels. Furthermore, increased immunostaining for and zonula occludens 1 (ZO-1) was observed.

Conclusion: (-)-fenchone presents intestinal anti-inflammatory activity in acute colitis and sub-chronic phase with recurrence models related to cytoprotection of the intestinal barrier, antioxidant and immunomodulatory effects.

1 Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) is characterized by chronic recurrent intestinal inflammation with tissue remodeling, which primarily affect the gastrointestinal tract (Shapiro et al., 2016; Torres et al., 2017; Huo and Sun, 2021), including two main forms called ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) (Torres et al., 2017; Huo and Sun, 2021).

IBDs are chronic diseases that affect the quality of life of individuals. More than two million Americans are estimated to be living with IBDs and this population is predicted to approach four million by 2030 (Ng et al., 2017; Windsor and Kaplan, 2019). Although the incidence is stabilizing in many Western countries, the number of cases remains high, as the estimated prevalence exceeds 0.3% of the population in North America and 0.7% in Europe (Ng et al., 2017; Coward et al., 2019).

CD is characterized by irregular transmural inflammation that may involve the entire gastrointestinal tract. It is usually associated with complications such as strictures, abscesses and fistulas (Vindigni et al., 2016). UC, on the other hand, is a non-specific chronic inflammatory disease affects the innermost lining of the large intestine colon and rectum (submucosal, mucosa) and is characterized by alternating active and remission periods (Yao et al., 2021). The pathogenesis of UC is multifactorial, involving genetic abnormalities, altered dietary patterns, intestinal barrier dysfunction, microbiota dysbiosis, and abnormal host immune reactions (Kobayashi et al., 2020).

Current pharmacotherapy includes the use of corticosteroids, immunosuppressants, 5-aminosalicylates, and biological therapies to reduce the inflammatory process through the immune system and sometimes surgical interventions (corticosteroids, mesalamine compounds, azathioprine, methotrexate and TNF- α inhibition) (Ahluwalia et al., 2018; Weisshof et al., 2018). The main goal of UC treatment involves inducing and maintaining a long and stable remission, decreasing the incidence of relapses, and preventing further development (Yao et al., 2021). However, current therapy consistently fails to prevent relapse of the active phase of IBD, in addition, it is associated with several side effects that contribute to non-adherence to treatment (Triantafyllidis et al., 2011; Liverani et al., 2016; Actis and Pellicano, 2017).

In the search for new therapeutic alternatives, natural products have emerged, in the last two centuries, the pharmaceutical industry has used naturally occurring chemical compounds as active principles in themselves, as well as a basis for the development of new molecular architectures (Dutra et al., 2016; Khan, 2018). Terpenes are the most abundant group of secondary metabolites obtained from plants and the main constituents of essential oils (Barbosa

et al., 2017). Monoterpenes are natural compounds derived from geranyl diphosphate (GPP) and constitute 90% of essential oils (Sá et al., 2013). These compounds have several biological activities already evaluated in experimental models such as anti-inflammatory (Somensi et al., 2019), antibacterial (Houdkova et al., 2017), gastroprotective and gastric healing (Venzon et al., 2018).

(-)-Fenchone is a bicyclic monoterpene (1,3,3-trimethylbicyclo[2.2.1]heptane-2-one) formed by two isoprene units and an organic ketone function. It is present in the plant species *Foeniculum vulgare* (fennel), *Thuja occidentalis* L. (tuja) and *Lavandula stoechas* (lavender) (Baptista et al., 2015; Algieri et al., 2016), these plants have a therapeutic importance in the treatment of intestinal disorders. Pharmacological studies show that (-)-fenchone exhibits antinociceptive (Him et al., 2008), antimicrobial (Slavchev et al., 2014; Insawang et al., 2019), anti-inflammatory (Algieri et al., 2016), antioxidant (Baptista et al., 2015) antidiarrheal and antifungal properties (Pessoa et al., 2020).

Considering the pharmacological potential of (-)-Fenchone and the lack of studies evaluating the effects of these compounds isolated in IBD models, the aim of this study was to evaluate its effects in the trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced ulcerative colitis model.

2 Materials and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) (180–250 g) were provided by the Animal Production Unit (APU) of the Institute for Research on Drugs and Medicines of Federal University of Paraíba (IPEFarM/UFPB). The animals were acclimated to the conditions of the local bioterium in a temperature of $23 \pm 2^\circ\text{C}$ and a light-dark cycle of 12 h, fed with industrial pellet food and water ad libitum. All experimental protocols followed international principles for the study with laboratory animals (Zimmermann, 1983) and were approved by the Institutional Ethics Commission on Animal Use (CEUA/UFPB) under registration number: 7216040119/19. All efforts were to reduce the number of animals used, their pain, suffering and stress.

2.2. Reagents

The following substances were used in this study: (-)-Fenchone (SIGMA Chemical Co, U.S.A), prednisolone (SIGMA Chemical Co, U.S.A), sodium acetate (SIGMA Chemical Co, U.S.A), acetonitrile (SIGMA Chemical Co, U.S.A), 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) (SIGMA Chemical Co, U.S.A), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (SIGMA Chemical Co, U.S.A), bovine serum albumin (BSA) (SIGMA Chemical Co, U.S.A), trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) (SIGMA Chemical Co, U.S.A), trichloroacetic acid (SIGMA Chemical Co, U.S.A), biotinylated sheep polyclonal antibodies (anti-IL-1 β , anti-TNF- α or anti-IL-10) (R&D systems), immunohistochemical polyclonal antibodies rats (NF κ B, TGF β or ZO-1) (Cloud-clone Corp), sodium carbonate (MERK, Germany), potassium chloride (SIGMA Chemical Co, USA), magnesium chloride (SIGMA Chemical Co, USA), sodium chloride PA (QUIMEX-MERCK, Brazil), ethyl ether (MERCK, Germany), phenolphthalein (RIEDELDE HAËN, Germany), monobasic sodium phosphate (SIGMA Chemical Co, USA), dibasic sodium phosphate (SIGMA Chemical Co, USA), prednisolone (SIGMA Chemical Co, USA), Methyl-

Phenylindole (SIGMA Chemical Co, USA), ketamine 5 % (VETANARCOL), Tris Buffer (Vetec ®), Trizma Buffer (SIGMA Chemical Co, U.S.A) and xylazine 2 % (DORCIPEC).

2.3 Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced intestinal acute inflammation in rats

The experimental protocol described by Morris et al. [1989] was conducted with some modifications. Each group of animals was pre-treated orally with 5% Tween 80 (colitic group), 2 mg/kg prednisolone (standard control group), (-)-Fenchone (37.5, 75, 150 and 300 mg/kg), 48, 24, and 1 h before TNBS administration and 24 h after inflammation induction. After fasting for 24 h, rats were anesthetized with 2% xylazine hydrochloride and 5% ketamine hydrochloride for rectal administration of TNBS (10 mg per animal dissolved in 0.25 mL of 50% ethanol) with the aid of a 2 mm diameter probe, which was inserted around 8 cm inside the rectum. Following the administration of TNBS, animals were kept for 10 min upside down. Then, after 48 h of TNBS administration, rats were anesthetized and euthanized. Colonic segments were collected and photographed for ulcerative area (UA) quantification and macroscopic score determination. General parameters such as diarrhea and colon weight/length ratio were also evaluated. An untreated non-colitic group was added to the experiment whose animals were not submitted to inflammation induction. Intestinal injury score was assessed according to a scale previously described by Bell et al. (1995): (1) focal hyperemia, no ulcer; (2) ulceration, no hyperemia/bowel wall thickening; (3) ulceration, inflammation at one site; (4) ulceration, inflammation at 2 or more sites; (5) major injury > 1 cm; 6–10 major damage > 2 cm (Bell et al., 1995).

The percentage of injury inhibition (%) was calculated as described:

$$\% \text{ Lesion inhibition} = \left[\frac{\text{Sample UA} \times 100}{\text{Colitic group UL}} \right] - 100$$

To calculate the weight/length ratio parameter, the following formula was used:

$$\frac{\text{Colon weight (g)}}{\text{Colon lenght (cm)}}$$

Diarrheal status was determined from the Evacuation Index (EI) for 24 h until euthanasia. Stools were counted and classified as solids, semisolids, and liquids. The EI was calculated as follows:

$$\text{EI} = \text{S (no of solid stools} \times 1) + (\text{no of watery stools} \times 2) + (\text{no of liquid stools} \times 3)$$

2.4 Sub-chronic phase with recurrence of the intestinal inflammatory process trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced intestinal inflammation in rats

The experimental protocol described by Morris et al. (1989) was conducted with some modifications (Morris et al., 1989). After fasting for 24 h, rats were anesthetized with 2% xylazine hydrochloride and 5% ketamine hydrochloride for rectal administration of TNBS (10 mg per animal dissolved in 0.25 mL of 50% ethanol) with the aid of a 2 mm diameter probe, which was inserted around 8 cm inside the rectum. Following the administration of TNBS, animals were kept for 10 min upside down. 24 h after the initial induction, the groups of animals will be treated orally with 5% tween 80 (colitic group), 2 mg/kg prednisolone (standard control group) or (-)-Fenchone 150 mg/kg. The animals were treated once a day for 21 days. On the 14th day after the first induction, the second administration (recurrence) of TNBS (10 mg/0.25

mL 50% v/v, rectally) was performed to mimic the recurrent relapses in inflammatory bowel diseases in humans. On the 21st day rats were anesthetized and euthanized. Colonic segments were collected and photographed for ulcerative area (UA) quantification and macroscopic score determination. General parameters such as diarrhea and colon weight/length ratio were also evaluated. An untreated non-colitic group was added to the experiment whose animals were not submitted to inflammation induction. Intestinal injury score was assessed according to a scale previously described by Bell et al. (1995): (1) focal hyperemia, no ulcer; (2) ulceration, no hyperemia/bowel wall thickening; (3) ulceration, inflammation at one site; (4) ulceration, inflammation at 2 or more sites; (5) major injury > 1 cm; 6–10 major damage > 2 cm (Bell et al., 1995).

After ULA determination, tissue samples of colon injuries were collected and stored in preserved in a 10% buffered formaldehyde solution for histological and immunohistochemical analysis. For biochemical assays, tissues were stripped, weighed and frozen at – 80 °C.

2.4.1 Histological analysis and morphometric analysis

Fragments of colon tissue from the TNBS-induced ulcerative colitis acute and recurrence-phase protocol from the cysteamine-induced ulcer protocol were preserved in a 10% buffered formaldehyde solution until histological processing. The tissues were embedded in histological paraffin and sectioned with a thickness of 4 µm. From the sectioned tissues, 2 stains were performed: hematoxylin and eosin (HE) and Masson's trichrome (MT). The histological sections stained by Masson's trichrome were visualized through the 40x objective of the Olympus microscope (Tokyo, Japan) and 20 random images were digitalized through the same microscope and Q-Color3 microscope, in each image, all pixels with shades of blue (Masson's trichrome) were selected to create a binary image, digitally processed and calculate the area in µm².

2.4.2 Determination of reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO) and Superoxide dismutase (SOD)

2.4.2.1. Non-protein sulfhydryl group (GSH) determination

The protocol according to Faure and Lafond, (1995) was followed to determine the GSH levels (Faure and Lafond, 1995). The tissue samples were suspended in 0.02M 1:10 (v/v) EDTA. From this homogenate, 400 µL were removed and 320 µL of distilled water and 80 µL of 50% trichloroacetic acid were added, being centrifuged at 3000 rpm at 4°C for 15 minutes. Then, 100 µL of the resulting supernatant was pipetted into a 96-well microplate and 200 µL of Tris and 25 µL of DTNB were added. This microplate was incubated at room temperature and after 15 minutes, a reading on a spectrophotometer (Polaris) was performed at a wavelength of 412 nm. The calibration curve was made with reduced L-glutathione. The GSH values of the samples were calculated by interpolating the values with the standard curve and expressed in nmol GSH/mg of protein.

2.4.2.2. Malondialdehyde (MDA) determination

The samples were suspended in Trizma® buffer (Tris HCl) 1:5 (w/v), homogenized and centrifuged at 11.000 rpm at 4°C for 10 minutes. Soon after, 300 µL of the supernatants were transferred to Eppendorf tubes and 750 µL of the chromogenic compound (10.3 mM of 1-methyl-2-phenylindol) and 225 µL of hydrochloric acid (37%) were added and incubated at

45°C in a water bath for 40 minutes and again centrifuged at 11.000 rpm at 4°C for 5 minutes. Then, 300 µL of the supernatant was transferred to a 96-well microplate and absorbance was determined by colorimetry (586 nm), using a plate reader (Polaris' spectrophotometer). The data were interpolated with the standard curve and the results were expressed as nmol MDA/g tissue (Esterbauer and Cheeseman, 1990).

2.4.2.3. Myeloperoxidase (MPO) determination

The tissue samples fragments were homogenized in the hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) buffer, which has a detergent function, lysing the granules of the neutrophils that contain the myeloperoxidase. After homogenization, the material was subjected to sonication for 5 minutes. Then, the sample was subjected to a double freezing and thawing process to facilitate the disruption of cellular structures and consequently the release of the enzyme. The homogenate was centrifuged at 5.000 rpm at 4°C for 20 minutes and concentrated for 24 hours. On the following day, 7 µL of the supernatant were collected, to which 200 µL of the reading solution (o-dianisidine hydrochloride, potassium phosphate buffer and 1% H₂O₂) were added. The reading was performed using a spectrophotometer at 450 nm wave, at times 0 and 1 minute. The results were expressed as units of myeloperoxidase per gram of tissue (Krawisz et al., 1984).

2.4.2.4. Superoxide dismutase (SOD) determination

The tissue samples were homogenized in phosphate buffer (0.4 M, pH 7.0) and centrifuged for 15 minutes at 10.000 rpm at 4°C. The supernatant was removed and used in the assay. The plates containing the reaction medium (10 mM phosphate buffer), L-methionine (1.79 mg/mL, pH 7.8), riboflavin (0.2 mg/mL, pH 7.8), NBT (1.5 mg/mL, pH 7.8) and 10 µL of the sample supernatant were exposed to a fluorescent lamp (15W) for 10 minutes. After this period, the material was taken to the 630 nm spectrophotometer (Sun et al., 1988).

2.4.5. Immunomodulatory activity

2.4.5.1. Determination of IL-1, TNF- α and IL-10 Levels

The levels of pro-inflammatory (IL-1 β and TNF- α) and immunoregulatory (IL-10) cytokines were determined by means of an ELISA immunoenzymatic assay (sandwich type). The capture antibodies for each interleukin were sensitized in a 96-well microplate (flat bottom). After 18h, the plate was washed with 0.05% tween 20 solution (wash buffer), blocked with a 1% bovine serum albumin solution and washed with the wash buffer. Soon after, a tissue macerate was prepared in phosphate buffered saline (PBS) in the proportion of 100 mg of tissue to 600 µL of PBS, homogenized and centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes at 4°C. Supernatants (100 µL) were pipetted in a 96-well plate and made the standard curve. The biotinylated secondary antibody (100 µL) was added to each well, followed by incubation for 2 hours and 3 washes. The plate was incubated with streptavidin for 20 minutes, washed 3 times, the substrate for development was added (DuoSet Kit © - R & D Systems Catalog - DY999) and incubated for 20 minutes. After this time, the reaction was stopped by adding 50 µL of the stop solution and the reading was performed on a spectrophotometer at 450 nm. The results were obtained by interpolation with the standard curve and expressed in pg/mL (Kendall et al., 1983).

2.4.6. Immunohistochemical analysis

Colons sections (5 μ m) of 5 animals per group were obtained with a microtome and transferred to silanized slides (Dako, Glostrup Denmark), and subjected to dewaxing and hydration. Then, the slides subjected to the simple indirect method of blocking with Anti Peroxidase Peroxidase (APP), where the primary antibody is directed against the antigen (protein) to be detected and the secondary antibody serves as a bridge for binding to the APP complex, and incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies a: nuclear transcription factor kappa B (NF- κ B), transforming growth factor beta (TGF- β) and zonula occludens 1 (ZO-1). After being washed with distilled water, the slides were incubated with a secondary for 60 min and 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Biocare Medical, CA, USA) was used as the chromogen and the specimens were counterstained with hematoxylin. The samples were visualized under an optical microscope (Olympus microscope, Tokyo, Japan) with coupled to a camera (Nikon DS-Ri2).

2.6. Statistical analysis

Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) or mean $\pm$ standard error (SE) for parametric values or expressed as median (minimum value - maximum value) for non-parametric data. One-way ANOVA (parametric data) or Kruskal-Wallis test (non-parametric data) was performed, followed by Dunnet and Tukey or Dunn post-tests, respectively. The results were considered significant when $p < 0.05$. All data were analyzed using GraphPad® 5.0 software.

3 Results

3.1. Effect of (-)-Fenchone in intestinal acute inflammation in a TNBS-induced colitis model

The parameters ulcerative lesion area (ULA), lesion score, weight/length ratio, and diarrhea were evaluated 48 h after TNBS administration, as shown in Table 1. TNBS administration to colitic groups led to the development of large lesions and intense signs of inflammation with gross ulcerative areas. These effects were followed by an increased weight/length ratio of the colonic segment and the diarrhea score, which was determined by the evacuation index (EI), when compared to non-colitic group ($p < 0.001$). The treatments with (-)-fenchone (37.5; 75; 150 or 300 mg/kg) ($p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.001$; $p < 0.001$) or prednisolone ($p < 0.001$) reduced those parameters in all evaluated doses. Representative images of rat colons in Figure 1. The most effective dose of (-)-fenchone (150 mg/kg) were selected for the following experiments.

3.1.1. Histological analysis

Histological sections of the colon stained with hematoxylin and eosin belonging to the non-colitic, prednisolone and (-)-Fenchone groups (Figure 2A, C, D), the integrity of the mucosa (M) and goblet cells is observed. In the colitic group (5% tween 80) (2B) intense mucosal destruction is observed, with ulcer formation, which is characterized by organ surface necrosis and intense acute inflammatory reaction (*) and increased leukocyte infiltrate. In sections stained with Masson's trichrome, it was found that (-)-Fenchone (Figure 2H) reduced extracellular matrix deposition ($p < 0.001$) 9.00 (5-19) compared to the colitic group (5% tween 80) (2F) who presented scar tissue (∞) in the area of the mucosal ulcer ($p < 0.001$) 30.50 (20-35) (Figure 2).

3.1.2 Effect of (-)-Fenchone in the modulation of antioxidant and anti-inflammatory properties in acute colitis

3.1.2.1. Reduced Glutathione (GSH)

In determining the antioxidant activity of (-)-Fenchone, it was possible to verify that colitic group (5% tween 80) showed a reduction ($p < 0.001$) in GSH levels to 36.7 ± 5.9 nmol of GSH / mg protein compared to the non-colitic group (68.5 ± 4.6 nmol GSH/mg protein). However, administration of (-)-Fenchone (150 mg/kg) to 55.9 ± 6.5 nmol GSH/mg protein) restored ($p < 0.001$) baseline GSH levels (Fig. 3 A).

3.1.2.2. Superoxide Dismutase (SOD)

Colitic group (5% tween 80) demonstrated a significant reduction in the activity of the SOD enzyme to 0.24 ± 0.09 U of SOD/mg of protein compared to the non-colitic group (2.32 ± 0.37 U SOD/mg protein). However, SOD activity was significantly increased ($p < 0.001$) with administration of (-)-Fenchone (150 mg/kg) to 2.28 ± 0.29 of SOD/mg of protein when compared to the colitic group (5% tween 80) (Fig. 3 B).

3.1.2.3. Malondialdehyde (MDA)

Colitic group (5% tween 80) showed an increase in MDA levels to 173.2 ± 26.8 nmol MDA/g tissue compared to the non-colitic group (109.5 ± 12.07 nmol MDA/g tissue). However, the administration of prednisolone (2 mg/kg) (109.5 ± 12.43 nmol of MDA/g tissue) or (-)-Fenchone (150 mg/kg) (115.2 ± 15.84 nmol MDA / g of tissue) respectively, significantly reduced ($p < 0.001$) MDA levels when compared to the colitic group (Fig. 3 C).

3.1.2.4. Myeloperoxidase (MPO)

The results showed that in the colitic group (5% tween 80) there was an increase in MPO levels to 62.06 ± 8.41 units of MPO/g of tissue when compared to the non-colitic group (14.39 ± 3.53 units MPO/g tissue). However, the groups treated with prednisolone (2 mg/kg) or (-)-Fenchone (150 mg/kg) significantly ($p < 0.001$) reduced MPO levels to 35.28 ± 5.54 and 30.44 ± 6.90 unit of MPO/g of tissue, respectively, in relation to the colitic group (Fig. 3 D).

3.1.2.5. Levels of IL-1 β , TNF- α and IL-10

Next, was evaluated the immunomodulatory effects by measuring the levels of cytokines. (-)-Fenchone significantly decreased ($p < 0.001$) the levels of IL-1 β (pg/ml) to 494.3 ± 31.19 compared to the colitic group (5% tween 80) (1145.0 ± 59.81) (Fig 4 A). TNF- α levels (pg/ml) were also decreased ($p < 0.001$) after treatment with (-)-Fenchone (215.0 ± 23.58), when compared to the colitic group (5% tween 80) (493.5 ± 47.77) (Fig 4 B). Furthermore, (-)-Fenchone prevented ($p < 0.01$) the reduction of IL-10 (pg/ml) (251.3 ± 25.88) in comparison the control group (192.0 ± 19.49) (Fig 4 C).

3.1.3. Immunohistochemical analysis for NF κ B, TGF- β and ZO-1 in colon samples submitted to acute inflammation in a TNBS-induced colitis model

Colons submitted to TNBS and treated with (-)-Fenchone showed presence of NF- κ B (brown color positivity) focal and concentrated labeling in the distal enterocytes close to the lumen of the organ, next to the goblet cells, significantly reduced immunostaining ($p < 0.001$) to 18.0

(10.0-25.0) μm^2 when compared to the colitic group 24.5 (20.0-29.0) μm^2 , in which there is the presence of these irregularly and multifocally marked, especially in the ulcer area (Fig. 5). In the evaluation of immunostaining for TGF- β results showed that treatment with (-)-Fenchone significantly increased ($p < 0.001$) positive cells marked for TGF- β to 100.5 (201.0–221.0) μm^2 when compared to the colitic group 104.0 (85.0-120.0) μm^2 (Fig. 6). In the evaluation for ZO-1, the treatment with fenchone increased ($p < 0.001$) the marking 107.5 (102.0-112.0) μm^2 (brown color positivity) which was distributed in a regular and multifocal way, similar to the normal group 200.0 (150.0-222.0) μm^2 . In the colitic group, partial and irregular marking is observed in the colonic mucosa 41.5 (25.0-58.0) μm^2 (Fig. 7).

3.2. Effect of (-)-Fenchone in sub-chronic phase with recurrence of the intestinal inflammatory process in a TNBS-induced colitis model

The parameters ulcerative lesion area (ULA), lesion score and weight/length ratio were evaluated 21 days after TNBS administration, as shown in Table 2. TNBS administration to colitic groups led to the development of large lesions and intense signs of inflammation with gross ulcerative areas. These effects were followed by an increased weight/length ratio of the colonic segment, when compared to non-colitic group ($p < 0.001$). The treatments with (-)-fenchone (150mg/kg) ($p < 0.001$) or prednisolone ($p < 0.001$) reduced those parameters. Representative images of rat colons in Figure 8.

3.2.1. Histological analysis

Histological sections of the colon stained with hematoxylin and eosin belonging to the non-colitic, prednisolone and (-)-Fenchone groups (Figure 9A, C, D), the integrity of the mucosa (M) and goblet cells is observed. In the colitic group (5% tween 80) (9B) intense mucosal destruction is observed, with ulcer formation, which is characterized by organ surface necrosis and intense acute inflammatory reaction (*) and increased leukocyte infiltrate. In sections stained with Masson's trichrome, it was found that (-)-Fenchone (Figure 9H) reduced extracellular matrix deposition ($p < 0.001$) 8.00 (5-14) compared to the colitic group (5% tween 80) who presented scar tissue (∞) in the area of the mucosal ulcer 26.50 (20-30) (9F) (Fig. 9).

3.2.2 Effect of (-)-Fenchone in the modulation of antioxidant and anti-inflammatory properties in sub-chronic phase with recurrence of the intestinal inflammatory

3.2.2.1. Reduced Glutathione (GSH)

In determining the GSH, it was possible to verify that colitic group (5% tween 80) showed a reduction in GSH levels to 39.8 ± 4.3 nmol of GSH/mg protein compared to the non-colitic group (59.6 ± 5.7 nmol GSH/mg protein). However, administration of (-)-Fenchone (150 mg/kg) to 53.5 ± 6.3 nmol GSH/mg protein restored baseline ($p < 0.001$) GSH levels (Fig. 10 A).

3.2.2.2. Superoxide Dismutase (SOD)

Animals in the colitic group (5% tween 80) demonstrated a significant reduction in the activity of the SOD enzyme to 1.39 ± 0.30 U of SOD/mg of protein compared to the non-colitic group (5.10 ± 0.58 U SOD/mg protein). However, SOD activity was significantly increased ($p < 0.001$)

with administration of (-)-Fenchone (150 mg/kg) to 4.99 ± 0.42 of SOD/mg of protein, when compared to the colitic group (5% tween 80) (Fig. 10 B).

3.2.2.3. Malondialdehyde (MDA)

The colitic group (5% tween 80) showed an increase in MDA levels to 175.1 ± 18.1 nmol MDA/g tissue compared to the non-colitic group (83.4 ± 8.21 nmol MDA/g tissue). However, the administration of (-)-Fenchone (150 mg/kg) significantly reduced ($p < 0.001$) MDA levels (86.25 ± 12.6 nmol MDA/g of tissue) when compared to the colitic group (Fig. 10 C).

3.2.2.4. Myeloperoxidase (MPO)

The results showed that in the colitic group (5% tween 80) there was an increase in MPO levels to 55.41 ± 7.03 units of MPO/g of tissue when compared to the non-colitic group (4.95 ± 0.82 units MPO/g tissue). However, the groups treated with (-)-Fenchone (150 mg/kg) significantly reduced ($p < 0.001$) MPO levels to 23.55 ± 2.55 unit of MPO/g of tissue, in relation to the colitic group (Fig. 10 D).

3.2.2.5. Levels of IL-1 β , TNF- α and IL-10

The next step was to evaluate the immunomodulatory effects by measuring the levels of cytokines. (-)-Fenchone significantly decreased ($p < 0.001$) the levels of IL-1 β (pg/ml) to 896.2 ± 138.3 compared to the colitic group (5% tween 80) (3126.0 ± 317.1) (Fig. 11 A). TNF- α levels (pg/ml) were also decreased after treatment with (-)-Fenchone ($p < 0.001$) (556.3 ± 36.64), when compared to the colitic group (5% tween 80) (790.2 ± 43.60) (Fig. 11 B). Furthermore, (-)-Fenchone prevented ($p < 0.01$) the reduction of IL-10 (pg/ml) (289.3 ± 24.82) in comparison the control group (213.5 ± 20.83) (Fig. 11 C).

3.2.3. Immunohistochemical analysis for NF κ B, TGF- β and ZO-1 in colon samples submitted to sub-chronic phase with recurrence of the intestinal inflammatory process

Colons submitted to TNBS and treated with (-)-Fenchone showed presence of NF- κ B focal and concentrated labeling in the distal enterocytes close to the lumen of the organ, significantly reduced ($p < 0.001$) immunostaining to 4.00 (2.0 - 5.0) μm^2 when compared to the colitic group 11.00 (9.0 - 14.0) μm^2 (Fig. 12). In the evaluation of immunostaining for TGF- β results showed that treatment with (-)-Fenchone significantly increased ($p < 0.001$) positive cells marked for TGF- β to 12.00 (11.0 - 15.0) μm^2 when compared to the control group 2.50 (1.0 - 5.0) μm^2 (Fig. 13). In the evaluation for ZO-1, the treatment with fenchone increased ($p < 0.001$) the marking 68.00 (64.0 - 72.0) μm^2 which presence of regular and evenly distributed staining in the mucosal colon, in the colitic group, partial and irregular marking is observed in the colonic mucosa 48.5 (35.0 - 54.0) μm^2 (Fig. 14).

4 Discussion

UC is characterized as a non-transmural inflammation the inflammatory process normally does not affect the full thickness of the intestinal wall, remaining restricted to the mucosa and submucosa. The inflammatory pattern tends to be symmetrical, continuous and diffuse (Vindigni et al., 2016). In the absence of timely and effective treatment, progressive and cumulative intestinal injury can lead to complications such as strictures, fistulas, loss of

intestinal function, surgical interventions and cancer (Torres et al., 2017; Agrawal and Colombel, 2019).

The experimental model used was the chemical one, using TNBS, which mimics inflammatory events in humans from the induction of T cell reactivity (Antoniou et al., 2016). TNBS administration induces transmural colitis that is driven by a TH1-mediated immune response that is characterized by the infiltration of CD4⁺ cells, neutrophils, and macrophages into the lamina propria and the secretion of cytokines (Kiesler et al., 2015; Silva et al., 2022). The model employs intrarectal administration of TNBS, solubilized in ethanol, which breaks the protective colonic mucus barrier, allowing the hapten to penetrate the lamina propria. TNBS will then haptenize the self or microbial proteins/peptides, making them immunogenic, and triggering both innate and adaptive immune responses in the host (Morris et al., 1989; Kiesler et al., 2015; Antoniou et al., 2016). Additionally, the TNBS-induced model can mimic the acute and chronic stages of IBD (Silva et al., 2022).

In the acute model (-)-fenchone at the doses evaluated significantly reduced ulcerative lesions when compared to colitic group, with a significant reduction in diarrhea and in the severity and extent of the lesion which was reflected in the macroscopic lesion score. Diarrhea is an important parameter for evaluating the intestinal anti-inflammatory effect, since its increase indicates loss of the absorptive capacity of the colon (Binder, 2009). In addition, reports in the literature demonstrate an association between diarrhea and epithelial barrier dysfunction, through failures in the integrity of gap junctions (Barmeyer et al., 2017). Histomorphological evaluation of tissues from rats subjected to (-)-fenchone treatment showed decreased lesion area and the inflammatory infiltrate. Thus, fenchone showed a reduction in ulcerated mucosal lesions, epithelial reconstitution with preservation of the intestinal crypts and reduction of the inflammatory infiltrate, similar effects were previously found for monoterpenes p-cimene (Formiga et al., 2020) and geraniol (Soubh et al., 2015).

In view of the promising results obtained in the acute model of ulcerative colitis, the best dose (150 mg/kg) was selected to investigate its effect in the 21-day sub-chronic ulcerative colitis model with recurrence on the 14th day and to investigate the antioxidant and immunomodulatory effect of (-)-fenchone. The relapsing ulcerative colitis model is considered to mimic this disease in humans and can be used to evaluate new treatments potentially applicable to IBD (Yang et al., 2012).

In the sub-chronic model with recurrence of the inflammatory process, (-)-fenchone (150 mg/kg) significantly reduced ulcerative lesions when compared to the colitic group, with a significant reduction in the severity and extent of the lesion, in the weight/weight ratio, length and macroscopic score of the lesion, thus evidencing the anti-inflammatory effect of the administration during the period of 21 days of treatment. The weight/length ratio is a parameter for evaluating the inflammatory effect, in which the increase in this ratio in the colonic tissues is associated with the respective increase in edema, one of the first markers of inflammation (Jones et al., 2016). The histomorphological evaluation confirms the reduction of the inflammatory infiltrate in the group treated with (-)-fenchone. These results are related to a decrease in the migration of inflammatory cells.

IBD both in humans and in animal models are characterized by the activation of polymorphonuclear cells, which increase the levels of reactive oxygen species (ROS) and generate oxidative stress (Hendrickson et al., 2002; Matricon et al., 2010). In this context, the

next step of the present study was to investigate whether the intestinal anti-inflammatory effect of (-)-fenchone is related to its antioxidant capacity.

Oxidative stress plays an important role in the pathophysiology of inflammation, as lipid peroxidation can exacerbate free radical chain reactions and activate the release of inflammatory mediators (Biswas, 2016; Tan et al., 2018). Chronic inflammation causes overactivation of the immune system and triggers high levels of ROS that reduce levels of endogenous antioxidants. This process induces the formation of damage in the mucosal layer and bacterial invasion, which in turn stimulates the immune response and contributes to the progression of IBDs (Luceri et al., 2019). In both acute and sub-chronic models, (-)-fenchone (150 mg/kg) increased GSH and SOD levels compared to the colitic group, restoring baseline levels. SOD is part of the enzymatic antioxidant system that forms the first line of defense against superoxide anion and hydrogen peroxide (Kıvrak et al., 2017; Sarangarajan et al., 2017). GSH participates in the non-enzymatic system that protects the integrity and permeability of the cell membrane, promotes the assembly of mucin oligomers, helps in the maintenance of immune function and in the maintenance of protein structure (Robaczewska et al., 2016; Pérez et al., 2017).

In addition, the treatment with (-)-fenchone reduced the levels of MDA and MPO compared to the colitic group. These enzymes participate in the lipid peroxidation process, activate the epithelium favoring the infiltration of neutrophils, the synthesis and release of cytokines by macrophages, among other mediators that contribute to oxidative stress (Pérez et al., 2017). Thus, the anti-inflammatory effect found in our study may be related to the inhibition of toxic lipoperoxides and/or due to the promotion of the synthesis of endogenous antioxidants. The monoterpenes carvacrol ((de Santana Souza et al., 2017) and menthol (Ghasemi-Pirbaluti et al., 2017) have been shown to reduce MPO-mediated lipoperoxidation and increase antioxidant defenses.

ROS are second messengers for the activation of signal transduction pathways that induce inflammation, such as the signaling pathways of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and NF- κ B, a transcription factor that binds to gene promoters target and trigger the transcription of inflammatory cytokines and chemokines (Song et al., 2014; Akanda et al., 2018). Treatment with (-)-fenchone in both the acute and sub-chronic phases significantly reduced immunostaining for NF- κ B, as well as reduced levels of inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α . These cytokines participate in the innate immune response and play a key role in disrupting the state of intestinal homeostasis and are involved in the recruitment of granulocytes and increased TH17 activity (Ahluwalia et al., 2018; Danese et al., 2019).

The main mechanism for controlling responses in the gut is the activation of regulatory T cells (Treg) that play an important role in the maintenance of gastrointestinal homeostasis and secrete immunoregulatory cytokines such as IL-10 and TGF- β . These cytokines suppress macrophage-mediated inflammatory responses and effector T cells (Yamada et al., 2016; Ahluwalia et al., 2018). In our study, treatment with (-)-fenchone restored levels of IL-10 and increased immunostaining for TGF- β when compared to the colitic group. In IBDs, a reduced expression of TGF- β in the mucosa has been observed which leads to inadequate conditioning of dendritic cells and the perpetuation of the inflammatory state (Ahluwalia et al., 2018).

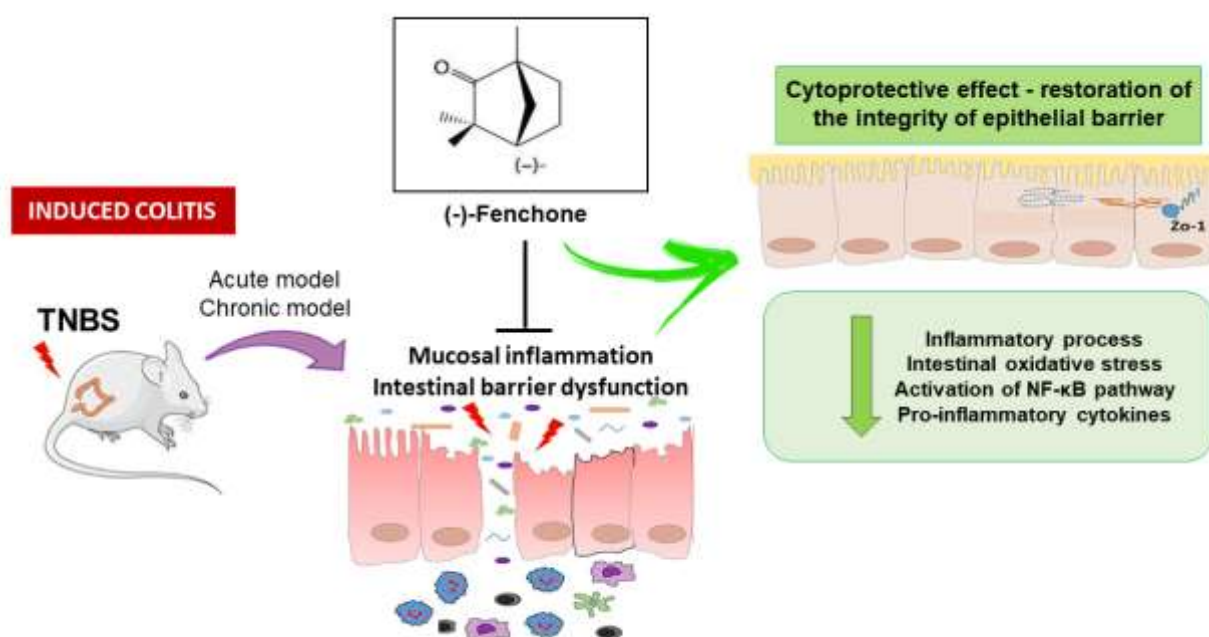
In our study, treatment with (-)-Fenchone in the acute and sub-chronic phases reduced the levels of inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) considered responsible for amplifying and

maintaining chronic inflammation in IBDs and kept the cytokines IL-10 and TGF- β close to baseline, suggesting a immunomodulatory effect. The monoterpene d-limonene and demonstrated that its intestinal anti-inflammatory effect is related to a decrease in TNF- α concentrations via inhibition of the NF- κ B pathway (d'Alessio et al., 2013). Studies with geraniol (Soubh et al., 2015) demonstrated inhibition of IL-1 β and the NF- κ B pathway and corroborated this study.

The intestinal epithelium is arranged in a monolayer of columnar epithelial cells, linked through tight junctions (Vargas-Robles et al., 2019), a protective mucous layer covers the outer surface of the epithelium. Defects in the intestinal barrier in individuals with IBD result in an increase in the uptake of luminal antigens through the intestinal epithelium and represent one of the main pathways in the pathogenesis of IBD (Salim and Söderholm, 2011; Vancamelbeke and Vermeire, 2017). An increase in immunostaining for ZO-1 was observed for the groups treated with (-)-fenchone, these findings may be related to the pre-epithelial protection and hinder the development of inflammation. In a study with the p-cymene monoterpene (Formiga et al., 2020), a similar result was shown.

Our data demonstrated that the monoterpene (-)-fenchone has intestinal anti-inflammatory activity related to antioxidant (increase in GSH and SOD with reduction in MDA and MPO) and immunomodulatory (reduction in NF- κ B, TNF- α and IL-1 β and increase in IL-10 and TGF) effects, as well as cytoprotective mechanisms, acting on the epithelial barrier (increase in ZO-1). Thus, these results suggest a potential use of this substance for the treatment of intestinal inflammation.

Graphical abstract



5 Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

6 Author Contributions

Araruna MEC, Alves Júnior EB, Serafim CAL, França JS and Batista LM contributed to the conception of the study, execution of the experiments and writing of the manuscript. Silva MS provided the substance under study, Alves AF and Sousa MCP contributed to the histomorphological and immunohistochemical analysis of this study and Araujo AA contributed to the in vitro experiments of this article. All authors reviewed and approved the final version of this manuscript.

7 Funding

Self-funded by research group.

8 Acknowledgments

The authors would like to express our sincere gratitude to Pharmaceuticals and Medicines Research Institute (IPeFarM) from the Federal University of Paraíba (UFPB) for the institutional support and CAPES and CNPq for the financial support.

9 References

- Actis, G.C., and Pellicano, R. (2017). Inflammatory bowel disease: Efficient remission maintenance is crucial for cost containment. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 8(2), 114-119. doi: 10.4292/wjgpt.v8.i2.114.
- Agrawal, M., and Colombel, J.F. (2019). Treat-to-Target in Inflammatory Bowel Diseases, What Is the Target and How Do We Treat? *Gastrointest Endosc Clin N Am* 29(3), 421-436. doi: 10.1016/j.giec.2019.02.004.
- Ahluwalia, B., Moraes, L., Magnusson, M.K., and Öhman, L. (2018). Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. *Scand J Gastroenterol* 53(4), 379-389. doi: 10.1080/00365521.2018.1447597.
- Akanda, M.R., Kim, I.S., Ahn, D., Tae, H.J., Nam, H.H., Choo, B.K., et al. (2018). Anti-Inflammatory and Gastroprotective Roles of *Rabdosia inflexa* through Downregulation of Pro-Inflammatory Cytokines and MAPK/NF- κ B Signaling Pathways. *Int J Mol Sci* 19(2). doi: 10.3390/ijms19020584.
- Algieri, F., Rodriguez-Nogales, A., Vezza, T., Garrido-Mesa, J., Garrido-Mesa, N., Utrilla, M.P., et al. (2016). Anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts of *Lavandula dentata* L. and *Lavandula stoechas* L. *J Ethnopharmacol* 190, 142-158. doi: 10.1016/j.jep.2016.05.063.
- Antoniou, E., Margonis, G.A., Angelou, A., Pikouli, A., Argiri, P., Karavokyros, I., et al. (2016). The TNBS-induced colitis animal model: An overview. *Ann Med Surg (Lond)* 11, 9-15. doi: 10.1016/j.amsu.2016.07.019.
- Baptista, R., Madureira, A.M., Jorge, R., Adão, R., Duarte, A., Duarte, N., et al. (2015). Antioxidant and antimycotic activities of two native lavandula species from portugal. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015, 570521. doi: 10.1155/2015/570521.
- Barbosa, H.M., Albino, A.M., Cavalcante, F.S.A., and Lima, R.A. (2017). ABORDAGEM FITOQUÍMICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM *Solanum acanthodes* (SOLANACEAE) HOOK. *South American Journal of Basic Education, Technical and Technological* 4(1).
- Barmeyer, C., Fromm, M., and Schulzke, J.D. (2017). Active and passive involvement of claudins in the pathophysiology of intestinal inflammatory diseases. *Pflugers Arch* 469(1), 15-26. doi: 10.1007/s00424-016-1914-6.
- Bell, C.J., Gall, D.G., and Wallace, J.L. (1995). Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. *Am J Physiol* 268(4 Pt 1), G622-630. doi: 10.1152/ajpgi.1995.268.4.G622.
- Binder, H.J. (2009). Mechanisms of diarrhea in inflammatory bowel diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1165, 285-293. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04039.x.
- Biswas, S.K. (2016). Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxid Med Cell Longev* 2016, 5698931. doi: 10.1155/2016/5698931.
- Coward, S., Clement, F., Benchimol, E.I., Bernstein, C.N., Avina-Zubieta, J.A., Bitton, A., et al. (2019). Past and Future Burden of Inflammatory Bowel Diseases Based on Modeling of Population-Based Data. *Gastroenterology* 156(5), 1345-1353.e1344. doi: 10.1053/j.gastro.2019.01.002.

- d'Alessio, P.A., Ostan, R., Bisson, J.F., Schulzke, J.D., Ursini, M.V., and Béné, M.C. (2013). Oral administration of d-limonene controls inflammation in rat colitis and displays anti-inflammatory properties as diet supplementation in humans. *Life Sci* 92(24-26), 1151-1156. doi: 10.1016/j.lfs.2013.04.013.
- Danese, S., Vermeire, S., Hellstern, P., Panaccione, R., Rogler, G., Fraser, G., et al. (2019). Randomised trial and open-label extension study of an anti-interleukin-6 antibody in Crohn's disease (ANDANTE I and II). *Gut* 68(1), 40-48. doi: 10.1136/gutjnl-2017-314562.
- de Santana Souza, M.T., Teixeira, D.F., de Oliveira, J.P., Oliveira, A.S., Quintans-Júnior, L.J., Correa, C.B., et al. (2017). Protective effect of carvacrol on acetic acid-induced colitis. *Biomed Pharmacother* 96, 313-319. doi: 10.1016/j.biopha.2017.10.017.
- Dutra, R.C., Campos, M.M., Santos, A.R., and Calixto, J.B. (2016). Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacol Res* 112, 4-29. doi: 10.1016/j.phrs.2016.01.021.
- Esterbauer, H., and Cheeseman, K.H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186, 407-421. doi: 10.1016/0076-6879(90)86134-h.
- Faure, P., and Lafond, J.L. (1995). "Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation," in *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*, eds. A.E. Favier, J. Cadet, B. Kalyanaraman, M. Fontecave & J.L. Pierre. (Basel: Birkhäuser Basel), 237-248.
- Formiga, R.O., Alves Júnior, E.B., Vasconcelos, R.C., Guerra, G.C.B., Antunes de Araújo, A., Carvalho, T.G., et al. (2020). p-Cymene and Rosmarinic Acid Ameliorate TNBS-Induced Intestinal Inflammation Upkeeping ZO-1 and MUC-2: Role of Antioxidant System and Immunomodulation. *Int J Mol Sci* 21(16). doi: 10.3390/ijms21165870.
- Ghasemi-Pirbaluti, M., Motaghi, E., and Bozorgi, H. (2017). The effect of menthol on acute experimental colitis in rats. *Eur J Pharmacol* 805, 101-107. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.03.003.
- Hendrickson, B.A., Gokhale, R., and Cho, J.H. (2002). Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev* 15(1), 79-94. doi: 10.1128/cmr.15.1.79-94.2002.
- Him, A., Ozbek, H., Turel, I., and Oner, A.C. (2008). Antinociceptive Activity of Alpha-Pinene and Fenchone. *Pharmacologyonline* 3, 363-369.
- Houdkova, M., Rondevaldova, J., Daskocil, I., and Kokoska, L. (2017). Evaluation of antibacterial potential and toxicity of plant volatile compounds using new broth microdilution volatilization method and modified MTT assay. *Fitoterapia* 118, 56-62. doi: 10.1016/j.fitote.2017.02.008.
- Huo, L.L., and Sun, Z.R. (2021). MiR-128-3p alleviates TNBS-induced colitis through inactivating TRAF6/NF- κ B signaling pathway in rats. *Kaohsiung J Med Sci* 37(9), 795-802. doi: 10.1002/kjm2.12397.
- Insawang, S., Pripdeevech, P., Tanapichatsakul, C., Khruengsai, S., Monggoot, S., Nakham, T., et al. (2019). Essential Oil Compositions and Antibacterial and Antioxidant Activities of Five *Lavandula stoechas* Cultivars Grown in Thailand. *Chem Biodivers* 16(10), e1900371. doi: 10.1002/cbdv.201900371.

- Jones, H.R., Robb, C.T., Perretti, M., and Rossi, A.G. (2016). The role of neutrophils in inflammation resolution. *Semin Immunol* 28(2), 137-145. doi: 10.1016/j.smim.2016.03.007.
- Kendall, A.C., Keys, A.J., Turner, J.C., Lea, P.J., and Mifflin, B.J. (1983). The isolation and characterisation of a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* 159(6), 505-511. doi: 10.1007/bf00409139.
- Khan, R.A. (2018). Natural products chemistry: The emerging trends and prospective goals. *Saudi Pharm J* 26(5), 739-753. doi: 10.1016/j.jsps.2018.02.015.
- Kiesler, P., Fuss, I.J., and Strober, W. (2015). Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 1(2), 154-170. doi: 10.1016/j.jcmgh.2015.01.006.
- Kivrak, E.G., Yurt, K.K., Kaplan, A.A., Alkan, I., and Altun, G. (2017). Effects of electromagnetic fields exposure on the antioxidant defense system. *J Microsc Ultrastruct* 5(4), 167-176. doi: 10.1016/j.jmau.2017.07.003.
- Kobayashi, T., Siegmund, B., Le Berre, C., Wei, S.C., Ferrante, M., Shen, B., et al. (2020). Ulcerative colitis. *Nat Rev Dis Primers* 6(1), 74. doi: 10.1038/s41572-020-0205-x.
- Krawisz, J.E., Sharon, P., and Stenson, W.F. (1984). Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 87(6), 1344-1350.
- Liverani, E., Scaioli, E., Digby, R.J., Bellanova, M., and Belluzzi, A. (2016). How to predict clinical relapse in inflammatory bowel disease patients. *World J Gastroenterol* 22(3), 1017-1033. doi: 10.3748/wjg.v22.i3.1017.
- Luceri, C., Bigagli, E., Agostiniani, S., Giudici, F., Zambonin, D., Scaringi, S., et al. (2019). Analysis of Oxidative Stress-Related Markers in Crohn's Disease Patients at Surgery and Correlations with Clinical Findings. *Antioxidants (Basel)* 8(9). doi: 10.3390/antiox8090378.
- Matricon, J., Barnich, N., and Ardid, D. (2010). Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Self Nonself* 1(4), 299-309. doi: 10.4161/self.1.4.13560.
- Morris, G.P., Beck, P.L., Herridge, M.S., Depew, W.T., Szewczuk, M.R., and Wallace, J.L. (1989). Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 96(3), 795-803.
- Ng, S.C., Shi, H.Y., Hamidi, N., Underwood, F.E., Tang, W., Benchimol, E.I., et al. (2017). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet* 390(10114), 2769-2778. doi: 10.1016/s0140-6736(17)32448-0.
- Pérez, S., Taléns-Visconti, R., Rius-Pérez, S., Finamor, I., and Sastre, J. (2017). Redox signaling in the gastrointestinal tract. *Free Radic Biol Med* 104, 75-103. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.048.
- Pessoa, M.L.S., Silva, L.M.O., Araruna, M.E.C., Serafim, C.A.L., Júnior, E.B.A., Silva, A.O., et al. (2020). Antifungal activity and antidiarrheal activity via antimotility mechanisms of (-)-fenchone in experimental models. *World J Gastroenterol* 26(43), 6795-6809. doi: 10.3748/wjg.v26.i43.6795.
- Robaczewska, J., Kedziora-Kornatowska, K., Kozakiewicz, M., Zary-Sikorska, E., Pawluk, H., Pawliszak, W., et al. (2016). Role of glutathione metabolism and glutathione-

- related antioxidant defense systems in hypertension. *J Physiol Pharmacol* 67(3), 331-337.
- Sá, R.d.C.d.S.e., Andrade, L.N., and de Sousa, D.P. (2013). A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules* 18(1), 1227-1254. doi: 10.3390/molecules18011227.
- Salim, S.Y., and Söderholm, J.D. (2011). Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 17(1), 362-381. doi: 10.1002/ibd.21403.
- Sarangarajan, R., Meera, S., Rukkumani, R., Sankar, P., and Anuradha, G. (2017). Antioxidants: Friend or foe? *Asian Pac J Trop Med* 10(12), 1111-1116. doi: 10.1016/j.apjtm.2017.10.017.
- Shapiro, J.M., Subedi, S., and LeLeiko, N.S. (2016). Inflammatory Bowel Disease. *Pediatr Rev* 37(8), 337-347. doi: 10.1542/pir.2015-0110.
- Silva, I., Solas, J., Pinto, R., and Mateus, V. (2022). Chronic Experimental Model of TNBS-Induced Colitis to Study Inflammatory Bowel Disease. *Int J Mol Sci* 23(9). doi: 10.3390/ijms23094739.
- Slavchev, I., Dobrikov, G.M., Valcheva, V., Ugrinova, I., Pasheva, E., and Dimitrov, V. (2014). Antimycobacterial activity generated by the amide coupling of (-)-fenchone derived aminoalcohol with cinnamic acids and analogues. *Bioorg Med Chem Lett* 24(21), 5030-5033. doi: 10.1016/j.bmcl.2014.09.021.
- Somensi, N., Rabelo, T.K., Guimarães, A.G., Quintans-Junior, L.J., de Souza Araújo, A.A., Moreira, J.C.F., et al. (2019). Carvacrol suppresses LPS-induced pro-inflammatory activation in RAW 264.7 macrophages through ERK1/2 and NF- κ B pathway. *Int Immunopharmacol* 75, 105743. doi: 10.1016/j.intimp.2019.105743.
- Song, X., Zhang, W., Wang, T., Jiang, H., Zhang, Z., Fu, Y., et al. (2014). Geniposide plays an anti-inflammatory role via regulating TLR4 and downstream signaling pathways in lipopolysaccharide-induced mastitis in mice. *Inflammation* 37(5), 1588-1598. doi: 10.1007/s10753-014-9885-2.
- Soubh, A.A., Abdallah, D.M., and El-Abhar, H.S. (2015). Geraniol ameliorates TNBS-induced colitis: Involvement of Wnt/ β -catenin, p38MAPK, NF κ B, and PPAR γ signaling pathways. *Life Sci* 136, 142-150. doi: 10.1016/j.lfs.2015.07.004.
- Sun, Y., Oberley, L.W., and Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 34(3), 497-500.
- Tan, B.L., Norhaizan, M.E., Liew, W.P., and Sulaiman Rahman, H. (2018). Antioxidant and Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases. *Front Pharmacol* 9, 1162. doi: 10.3389/fphar.2018.01162.
- Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J.F., and Peyrin-Biroulet, L. (2017). Crohn's disease. *Lancet* 389(10080), 1741-1755. doi: 10.1016/s0140-6736(16)31711-1.
- Triantafyllidis, J.K., Merikas, E., and Georgopoulos, F. (2011). Current and emerging drugs for the treatment of inflammatory bowel disease. *Drug Des Devel Ther* 5, 185-210. doi: 10.2147/dddt.S11290.
- Vancamelbeke, M., and Vermeire, S. (2017). The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 11(9), 821-834. doi: 10.1080/17474124.2017.1343143.

- Vargas-Robles, H., Castro-Ochoa, K.F., Citalán-Madrid, A.F., and Schnoor, M. (2019). Beneficial effects of nutritional supplements on intestinal epithelial barrier functions in experimental colitis models in vivo. *World J Gastroenterol* 25(30), 4181-4198. doi: 10.3748/wjg.v25.i30.4181.
- Venzon, L., Mariano, L.N.B., Somensi, L.B., Boeing, T., de Souza, P., Wagner, T.M., et al. (2018). Essential oil of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) and geraniol, but not citral, promote gastric healing activity in mice. *Biomed Pharmacother* 98, 118-124. doi: 10.1016/j.biopha.2017.12.020.
- Vindigni, S.M., Zisman, T.L., Suskind, D.L., and Damman, C.J. (2016). The intestinal microbiome, barrier function, and immune system in inflammatory bowel disease: a tripartite pathophysiological circuit with implications for new therapeutic directions. *Therap Adv Gastroenterol* 9(4), 606-625. doi: 10.1177/1756283x16644242.
- Weisshof, R., El Jurdi, K., Zmeter, N., and Rubin, D.T. (2018). Emerging Therapies for Inflammatory Bowel Disease. *Adv Ther* 35(11), 1746-1762. doi: 10.1007/s12325-018-0795-9.
- Windsor, J.W., and Kaplan, G.G. (2019). Evolving Epidemiology of IBD. *Curr Gastroenterol Rep* 21(8), 40. doi: 10.1007/s11894-019-0705-6.
- Yamada, A., Arakaki, R., Saito, M., Tsunematsu, T., Kudo, Y., and Ishimaru, N. (2016). Role of regulatory T cell in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 22(7), 2195-2205. doi: 10.3748/wjg.v22.i7.2195.
- Yang, X.L., Guo, T.K., Wang, Y.H., Gao, M.T., Qin, H., and Wu, Y.J. (2012). Therapeutic effect of ginsenoside Rd in rats with TNBS-induced recurrent ulcerative colitis. *Arch Pharm Res* 35(7), 1231-1239. doi: 10.1007/s12272-012-0714-6.
- Yao, D., Dai, W., Dong, M., Dai, C., and Wu, S. (2021). MUC2 and related bacterial factors: Therapeutic targets for ulcerative colitis. *EBioMedicine* 74, 103751. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103751.
- Zimmermann, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16(2), 109-110. doi: 10.1016/0304-3959(83)90201-4.

TABLES AND FIGURES

Table 1. Effect of (-)-Fenchone in intestinal acute inflammation in a TNBS-induced colitis model

Groups	Dose (mg/kg)	Ulcerative Area (mm ²)	% Lesion Inhibition	Lesion Score	Weight/Length (mg/cm)	Evacuation Index (EI)
Non-colitic	-	ND	ND	ND	74.9 ± 5.9	12.0 ± 3.0
Colitic (5% Tween 80)	-	286.6 ± 5.7 ###	-	6.0 ± 0.9 ###	162.7 ± 22.4 ###	20.0 ± 2.4 #
Prednisolone	2	36.7 ± 5.7 ***	87%	3.0 ± 0.5 ***	107.5 ± 15.0 ***	7.0 ± 3.0 ***
(-)-Fenchone	37.5	240.9 ± 24.9 *	16%	4.5 ± 1.2 *	126.7 ± 10.9 *	9.0 ± 1.1 *
	75	181.4 ± 22.7 ***	37%	4.0 ± 1.5 *	118.5 ± 32.9 **	7.0 ± 0.7 ***
	150	72.2 ± 10.0 ***	75%	3.0 ± 0.7 **	113.1 ± 18.7 **	6.0 ± 1.1 ***
	300	73.8 ± 10.8 ***	74%	3.0 ± 0.8 **	112.8 ± 9.7 **	4.0 ± 1.3 ***

Data are expressed as mean ± SD or median (minimum/maximum values). For parametric data, we used one-way ANOVA followed by Dunnett's and Tukey's post-tests. For non-parametric data, we used Kruskal–Wallis test and Dunn's test. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 compared to colitic groups; ### p < 0.001 compared to non-colitic group. (n = 7–10). ND = not detectable

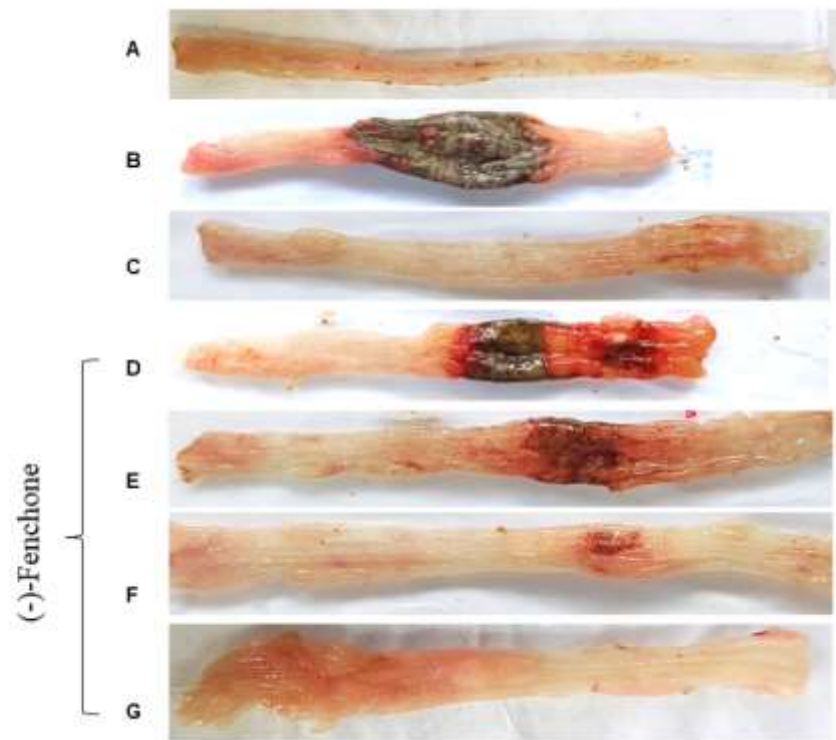
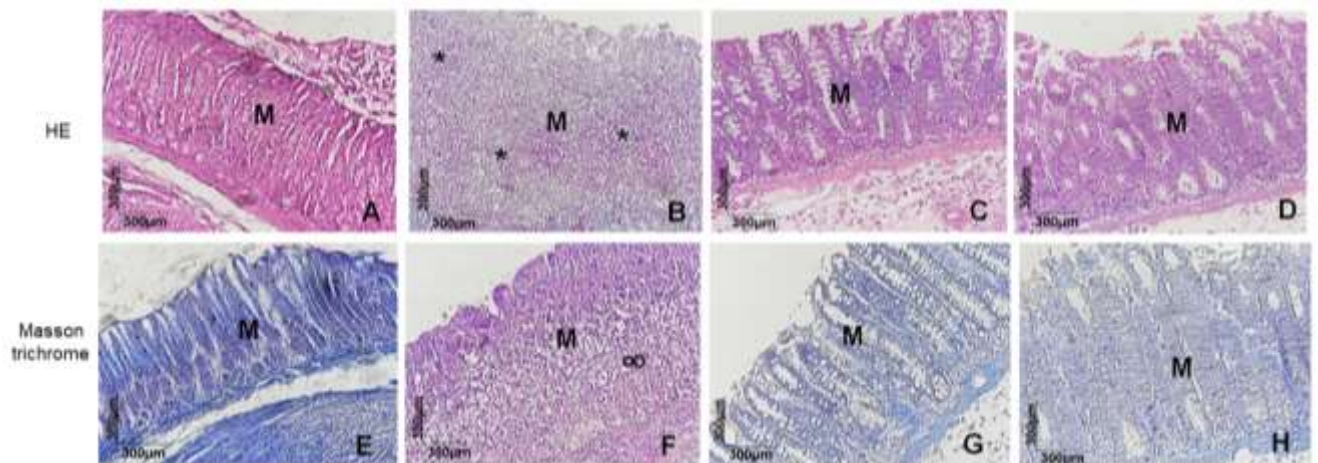


Fig. 1. Representative images of rat colons from non-colitic group (A); colitic groups (5% Tween 80) (B); prednisolone 2 mg/kg (C); (-)-Fenchone 37.5 mg/kg (D), 75 mg/kg (E), 150 mg/kg (F), and 300 mg/kg (G) subjected to acute TNBS-induced ulcerative colitis model



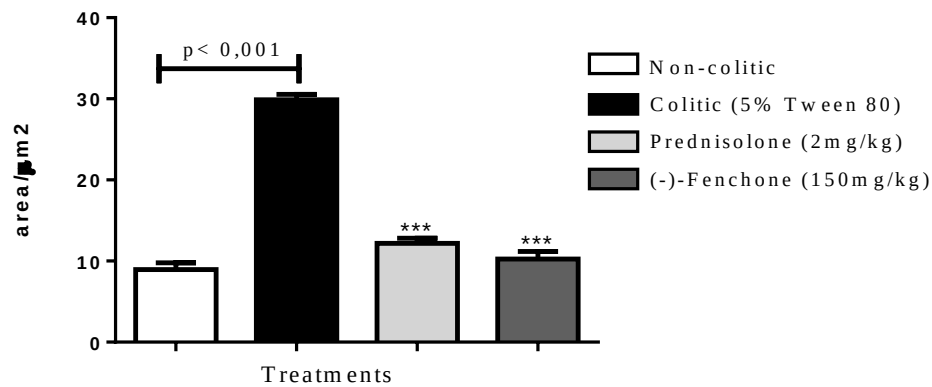
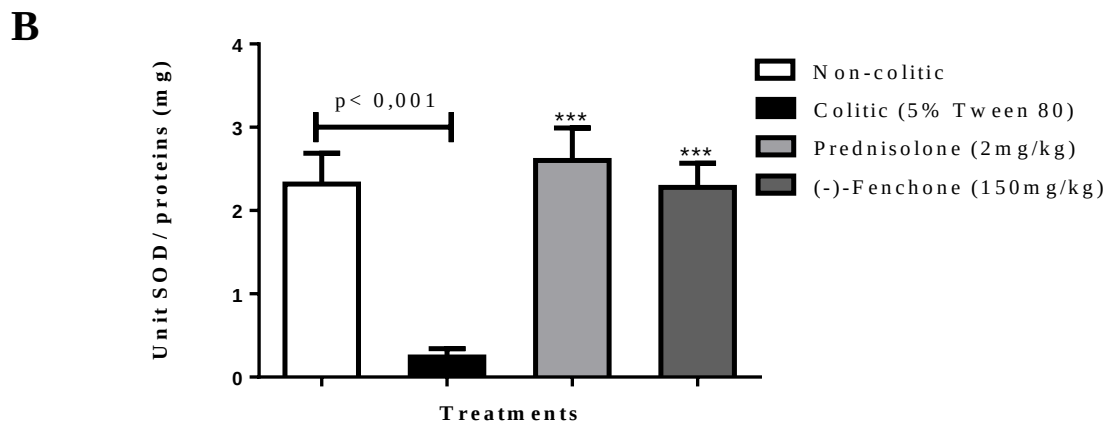
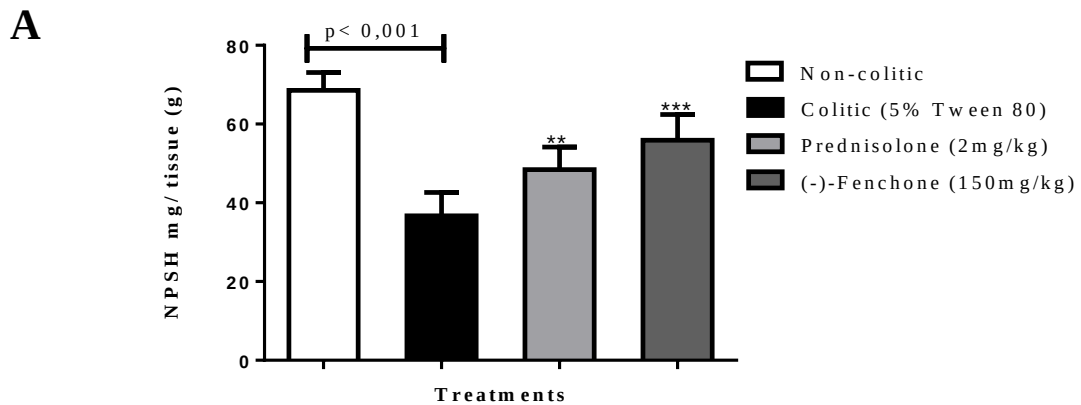


Fig. 2: Microscopic effects of the colon of rats submitted to acute TNBS-induced ulcerative colitis model and treated or not with (-)-Fenchone. Representative photomicrographs of the animals' colon from the experimental groups: HE staining - Non-colitic (A), Colitic (5% tween 80) (B), prednisolone 2 mg/kg (C) and (-)-Fenchone 150 mg/kg (D). Masson trichrome - Non-colitic (E), Colitic (5% tween 80) (F), prednisolone 2 mg/kg (G) and (-)-Fenchone 150 mg/kg (H). Colonic mucosa (M), acute inflammatory reaction (*), scarring tissue (∞). Results are expressed as median (minimum-maximum) of the parameters analyzed (n=5, 3 sessions per animal). Kruskal Wallis test and Dunn's posterior test was performed using the software Graph Pad Prism. ***p < 0.001 compared to the non-colitic group (5 % tween 80)



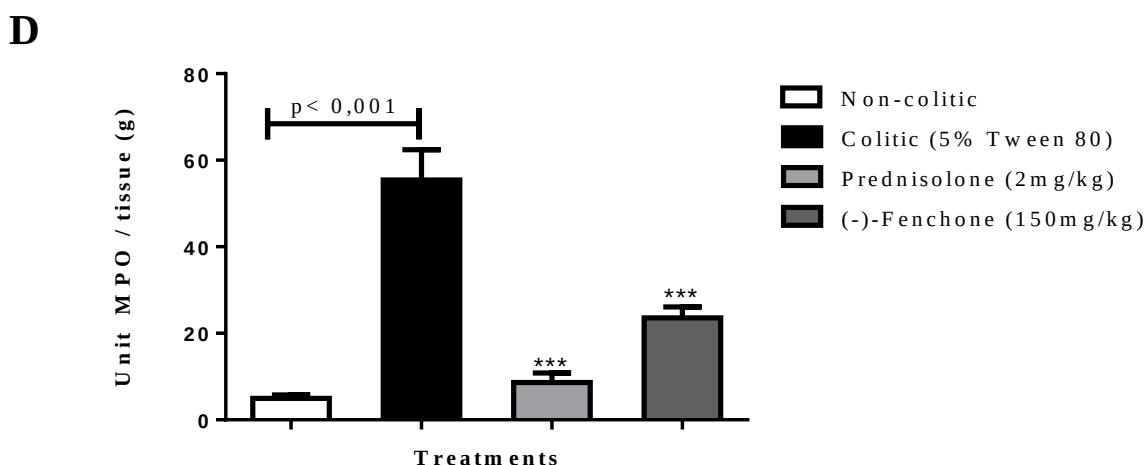
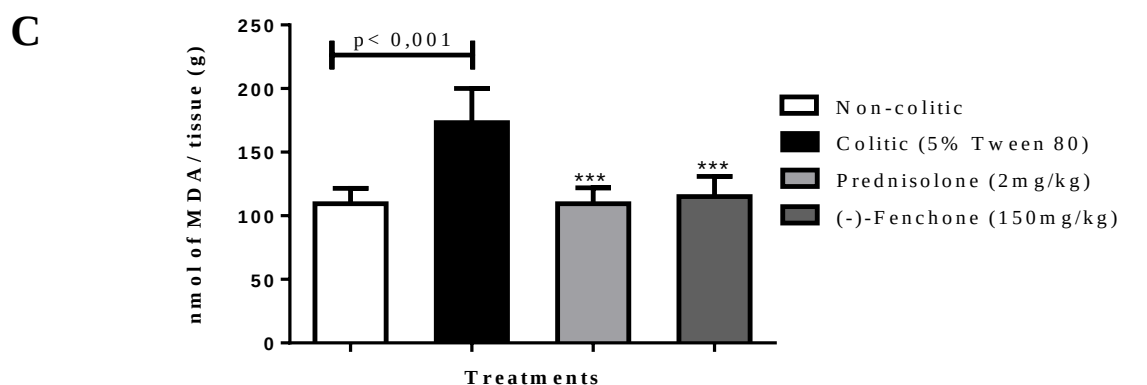
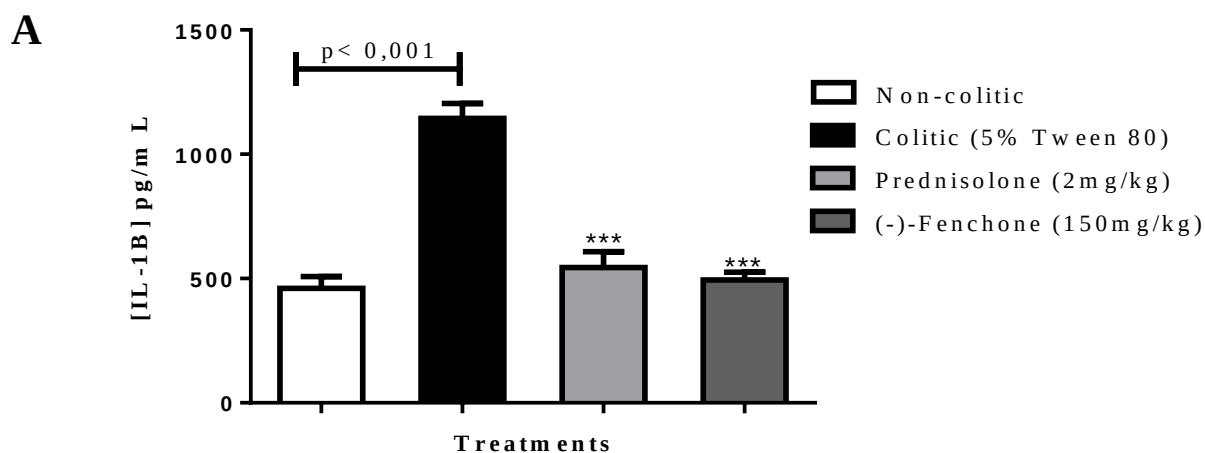


Fig 3. Effect of oral administration of (-)-fenchone and prednisolone in GSH (A), SOD (B), MDA (C) and MPO (D) levels form acute TNBS-induced ulcerative colitis model in rats. Results expressed as mean $\pm$ SE of the parameters analyzed (n = 5-8). The analysis of variance of one via (ANOVA) followed by the Dunnett's and Tukey's test. ** p < 0.01 or ***p < 0.001 vs non-colitic group



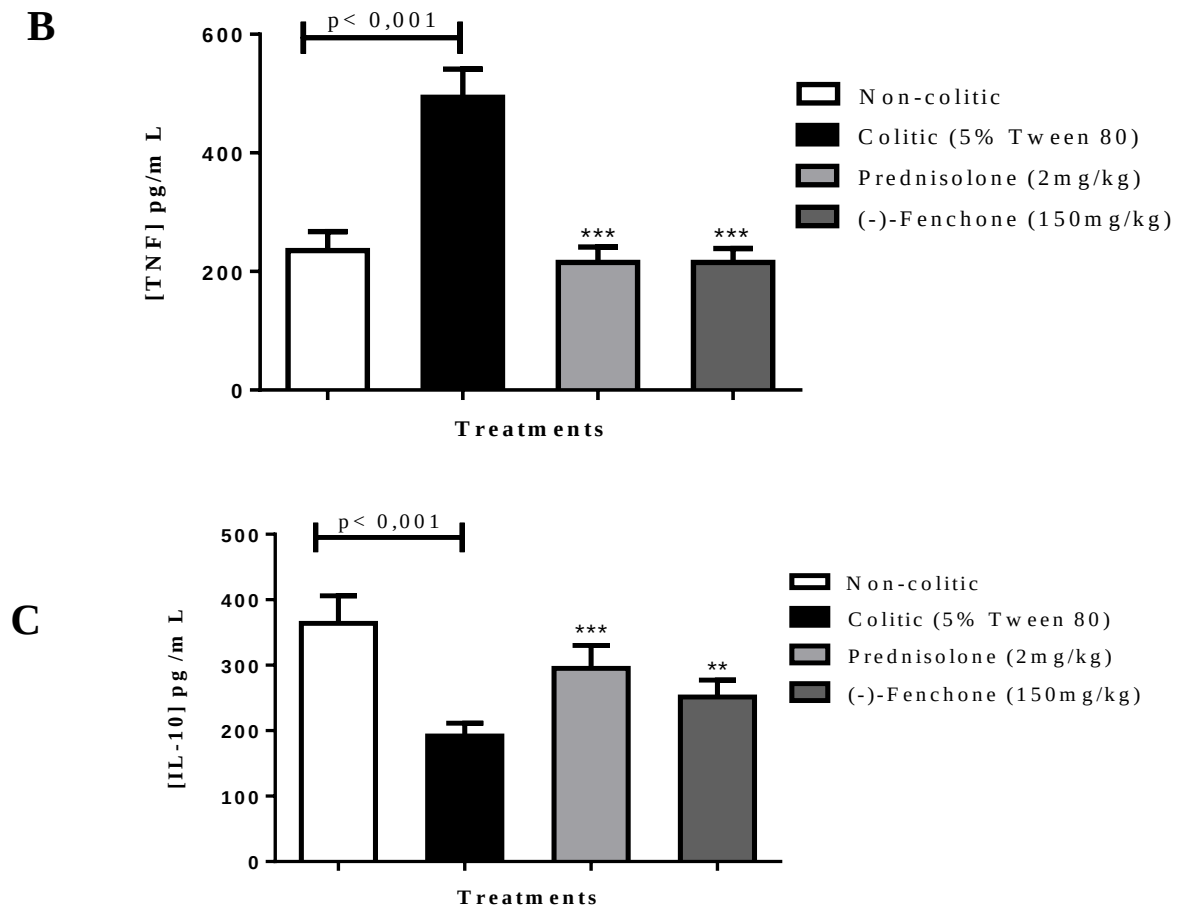


Fig 4. Effect of (-)-fenchone and prednisolone in IL-1 β (A), TNF- α (B) and IL-10 (C) levels from acute TNBS-induced ulcerative colitis model in rats. Results expressed as mean $\pm$ SE of the parameters analyzed (n = 6–8). The analysis of variance of one via (ANOVA) followed by the Dunnett's and Tukey's test. ** p < 0.01 or ***p < 0.001 vs control group

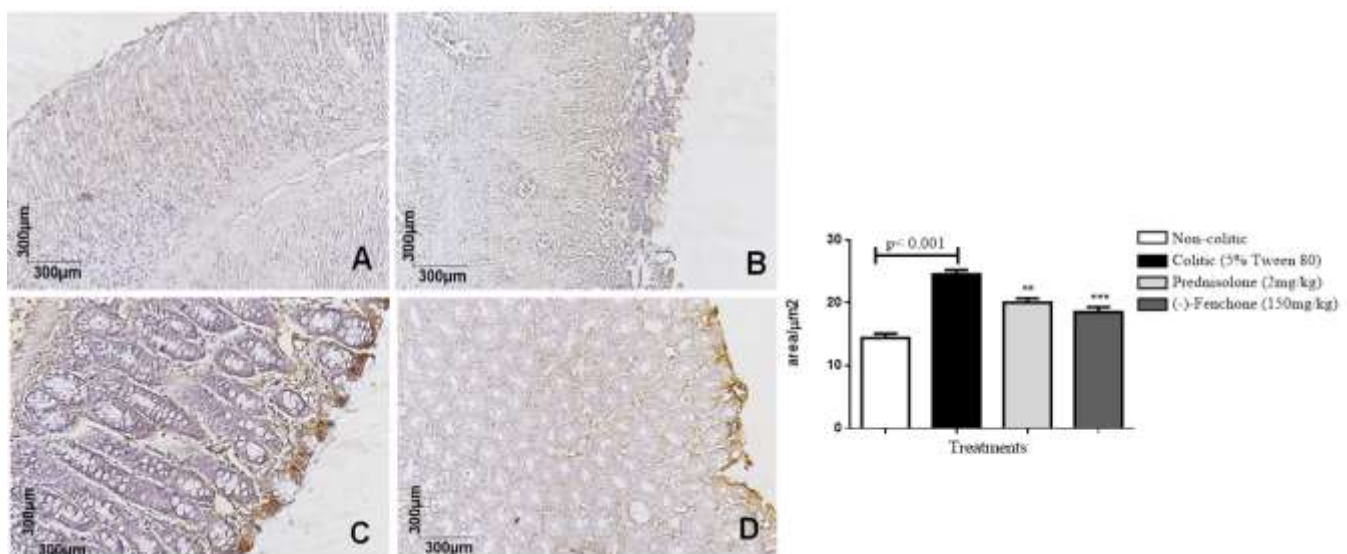


Fig 5. Photomicrographs with immunohistochemical marking for nuclear transcription factor kappa B (NF- κ B) in colon samples from rats. Non-colitic (A); colitic (5 % Tween 80) (B); Prednisolone (2 mg/kg) (C); (-)-Fenchone (150 mg/kg) (D). Results are expressed as median (minimum-maximum) of the parameters analyzed (n=5, 3 sessions per animal). Kruskal Walis test and Dunn's posterior test was performed using the software Graph Pad Prism. **p < 0.01, ***p < 0.001 compared to the colitic group (5 % tween 80)

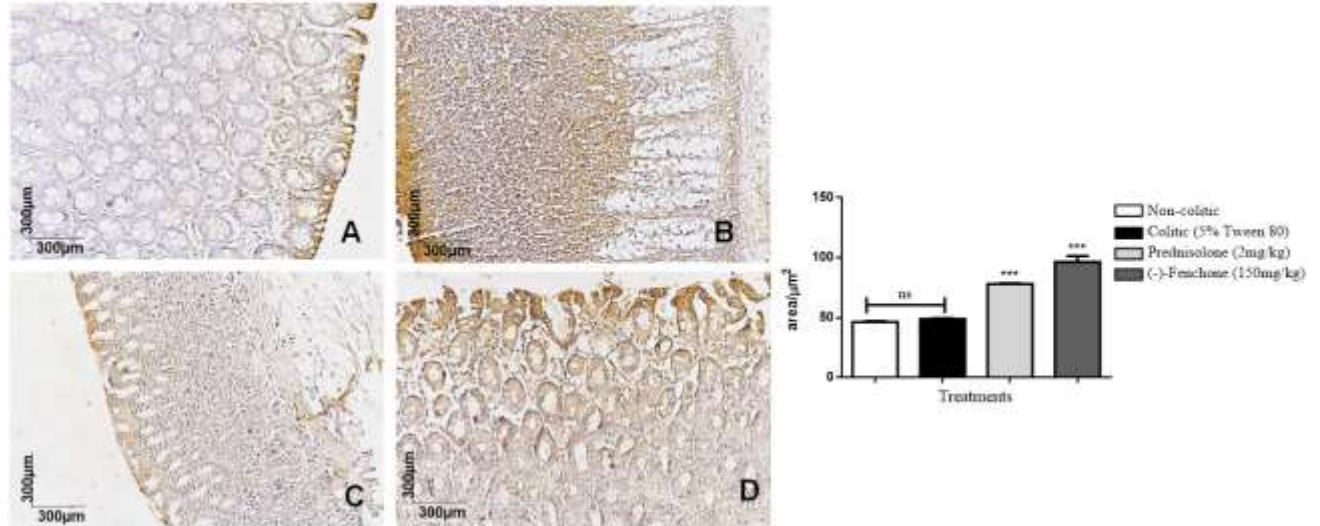


Fig 6. Photomicrographs with immunohistochemical marking for transforming growth factor beta (TGF- β) in colon samples from rats. Non-colitic (A); colitic (5 % Tween 80) (B); Prednisolone (2 mg/kg) (C); (-)-Fenchone (150 mg/kg) (D). Results are expressed as median (minimum-maximum) of the parameters analyzed (n=5, 3 sessions per animal). Kruskal Walis test and Dunn's posterior test was performed using the software Graph Pad Prism. ***p < 0.001 compared to the colitic group (5 % tween 80)

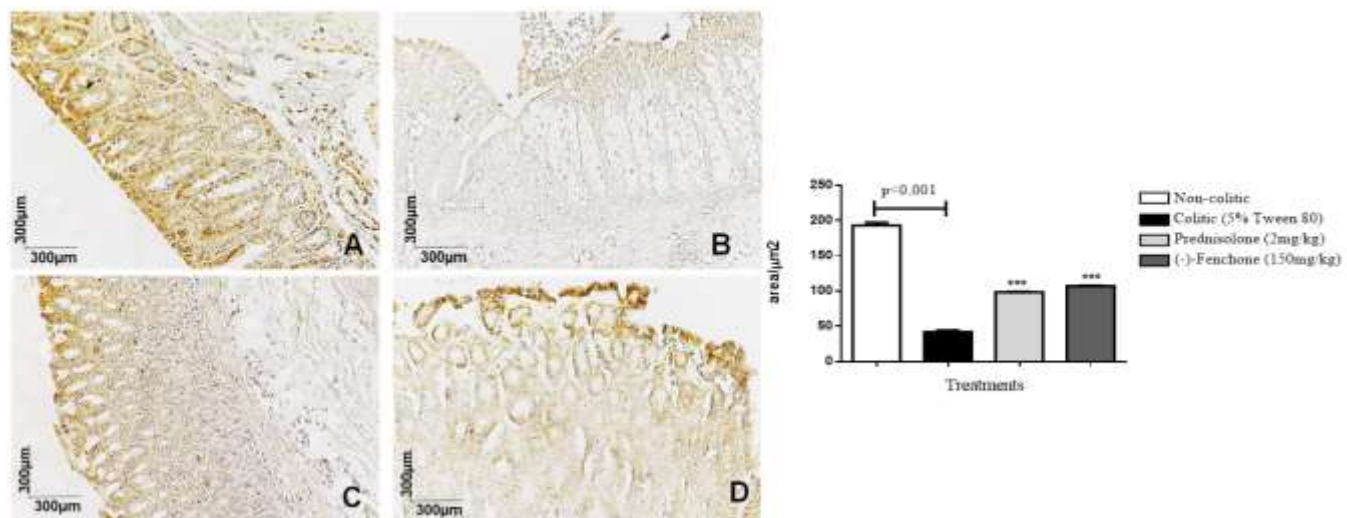


Fig 7. Photomicrographs with immunohistochemical marking for zonula occludens 1 (ZO-1) in colon samples from rats. Non-colitic (A); colitic (5 % Tween 80) (B); Prednisolone (2 mg/kg) (C); (-)-Fenchone (150 mg/kg) (D). Results are expressed as median (minimum-maximum) of the parameters

analyzed (n=5, 3 sessions per animal). Kruskal Wallis test and Dunn's posterior test was performed using the software Graph Pad Prism. ***p < 0.001 compared to the colitic group (5 % tween 80)

Table 2. Effect of (-)-Fenchone in sub-chronic phase with recurrence of the intestinal inflammatory process in a TNBS-induced colitis model. Data are expressed as mean $\pm$ SD or median (minimum/maximum values)

Groups	Ulcerative Area (mm ²)	% Lesion Inhibition	Lesion Score	Weight/Length (mg/cm)
Non-colitic	ND	ND	ND	91.4 $\pm$ 3.5
Colitic (5% Tween 80)	57.17 $\pm$ 7.5 ###	0	3.0 $\pm$ 0.7###	148.9 $\pm$ 10.5 ###
Prednisolone (2mg/kg)	11.00 $\pm$ 2.1***	81%	1.0 $\pm$ 0.6 ***	127.5 $\pm$ 13.7 **
(-)-Fenchone (150mg/kg)	11.50 $\pm$ 2.9 ***	80%	1.5 $\pm$ 0.7 **	130.6 $\pm$ 8.3 **

For parametric data, we used one-way ANOVA followed by Dunnett's and Tukey's post-tests. For non-parametric data, we used Kruskal–Wallis test and Dunn's test. ** p < 0.01, *** p < 0.001 compared to colitic groups; ### p < 0.001 compared to non-colitic group. (n = 7–10). ND = not detectable.



Fig 8. Representative images of rat colons from non-colitic group (A); colitic groups (5% Tween 80); prednisolone 2 mg/kg (C); (-)-Fenchone 150 mg/kg (D) subjected to sub-chronic phase with recurrence of the intestinal inflammatory process in a TNBS-induced colitis model

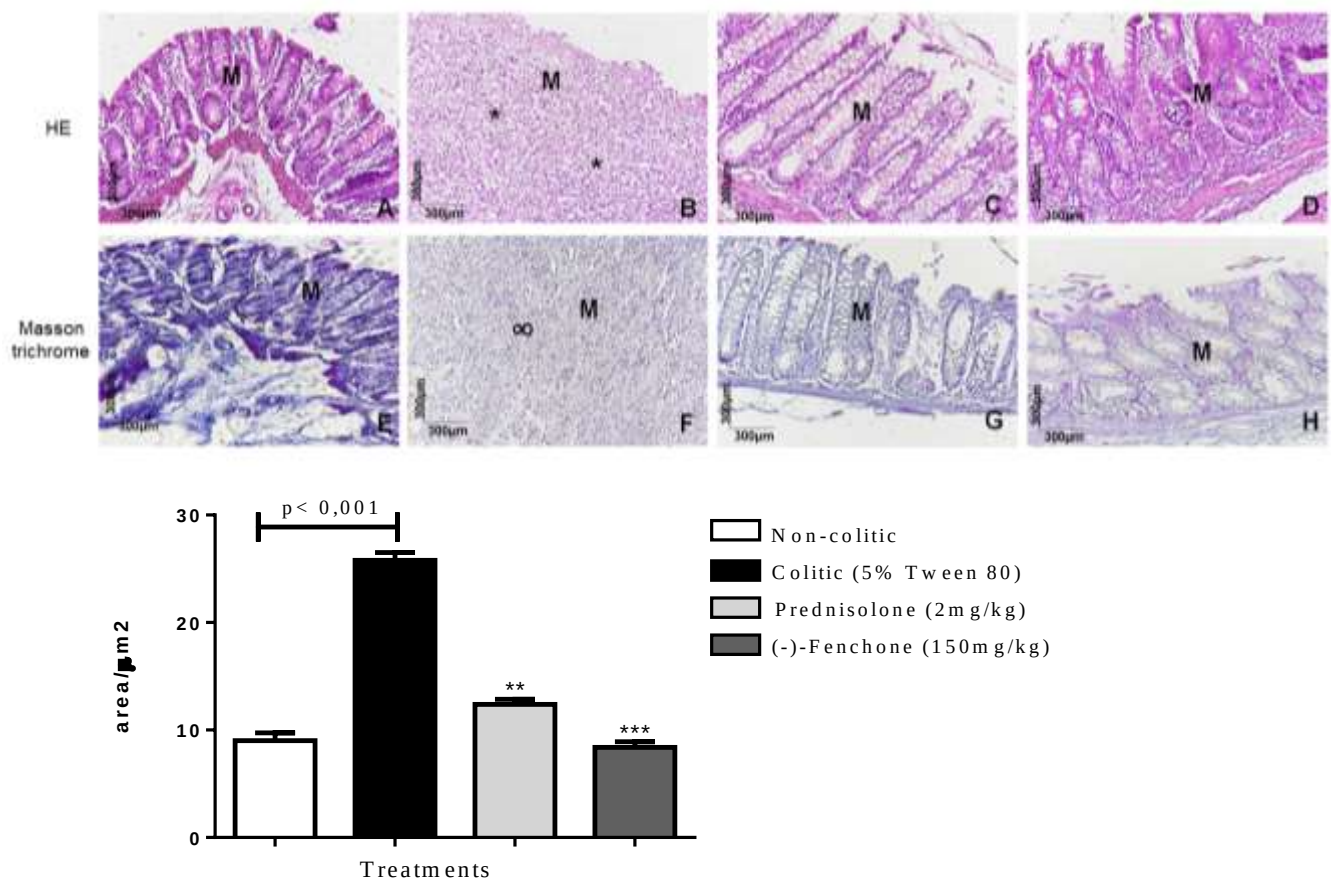
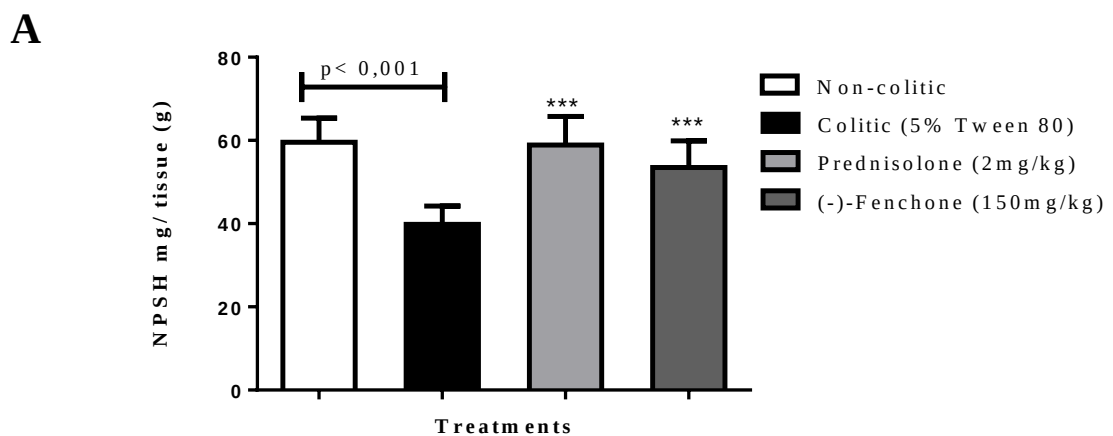


Fig. 9: Microscopic effects of the colon of rats submitted to in sub-chronic phase with recurrence of the intestinal inflammatory process in a TNBS-induced colitis model and treated or not with (-)-Fenchone. Representative photomicrographs of the animals' colon from the experimental groups: HE staining - Non-colitic (A), Colitic (5% tween 80) (B), prednisolone 2 mg/kg (C) and (-)-Fenchone 150 mg/kg (D). Masson trichrome - Non-colitic (E), Colitic (5% tween 80) (F), prednisolone 2 mg/kg (G) and (-)-Fenchone 150 mg/kg (H). Colonic mucosa (M), acute inflammatory reaction (*), scarring tissue (∞). Results are expressed as median (minimum-maximum) of the parameters analyzed (n=5, 3 sessions per animal). Kruskal Wallis test and Dunn's posterior test was performed using the software Graph Pad Prism. ** p,0,01 or ***p < 0.001 compared to the non-colitic group (5 % tween 80)



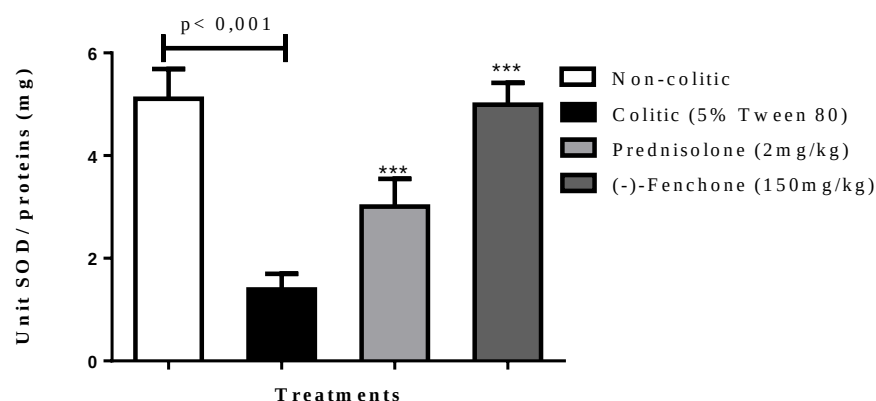
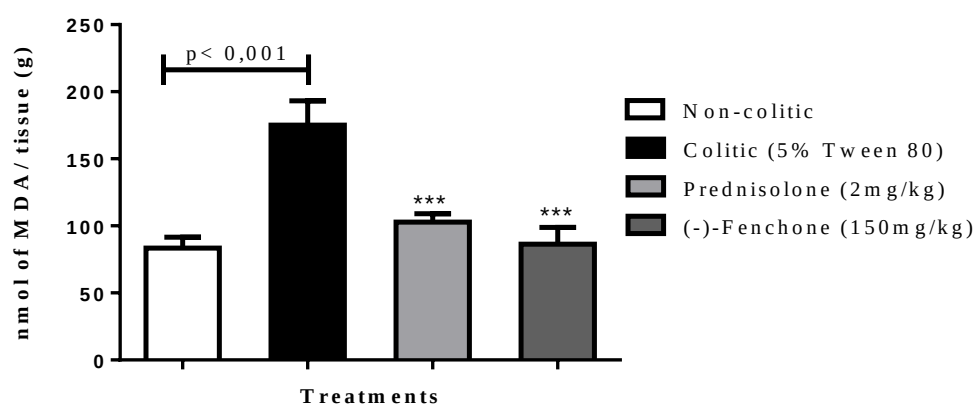
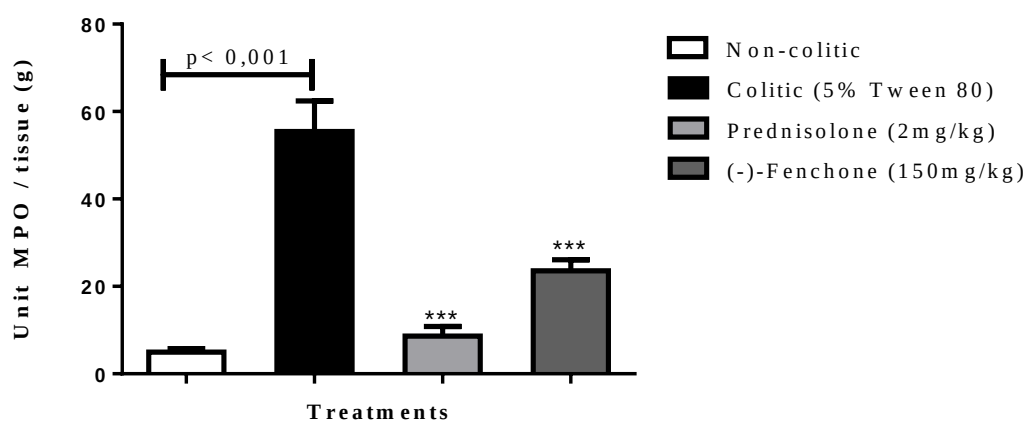
B**C****D**

Fig 10. Effect of oral administration of (-)-fenchone and prednisolone in A GSH (A), SOD (B), MDA (C) and MPO (D) levels form in sub-chronic phase with recurrence of the intestinal inflammatory process in a TNBS-induced colitis model in rats. Results expressed as mean $\pm$ SE of the parameters analyzed (n = 5-8). The analysis of variance of one via (ANOVA) followed by the Dunnett's and Tukey's test. ** p < 0.01 or ***p < 0.001 vs non-colitic group.

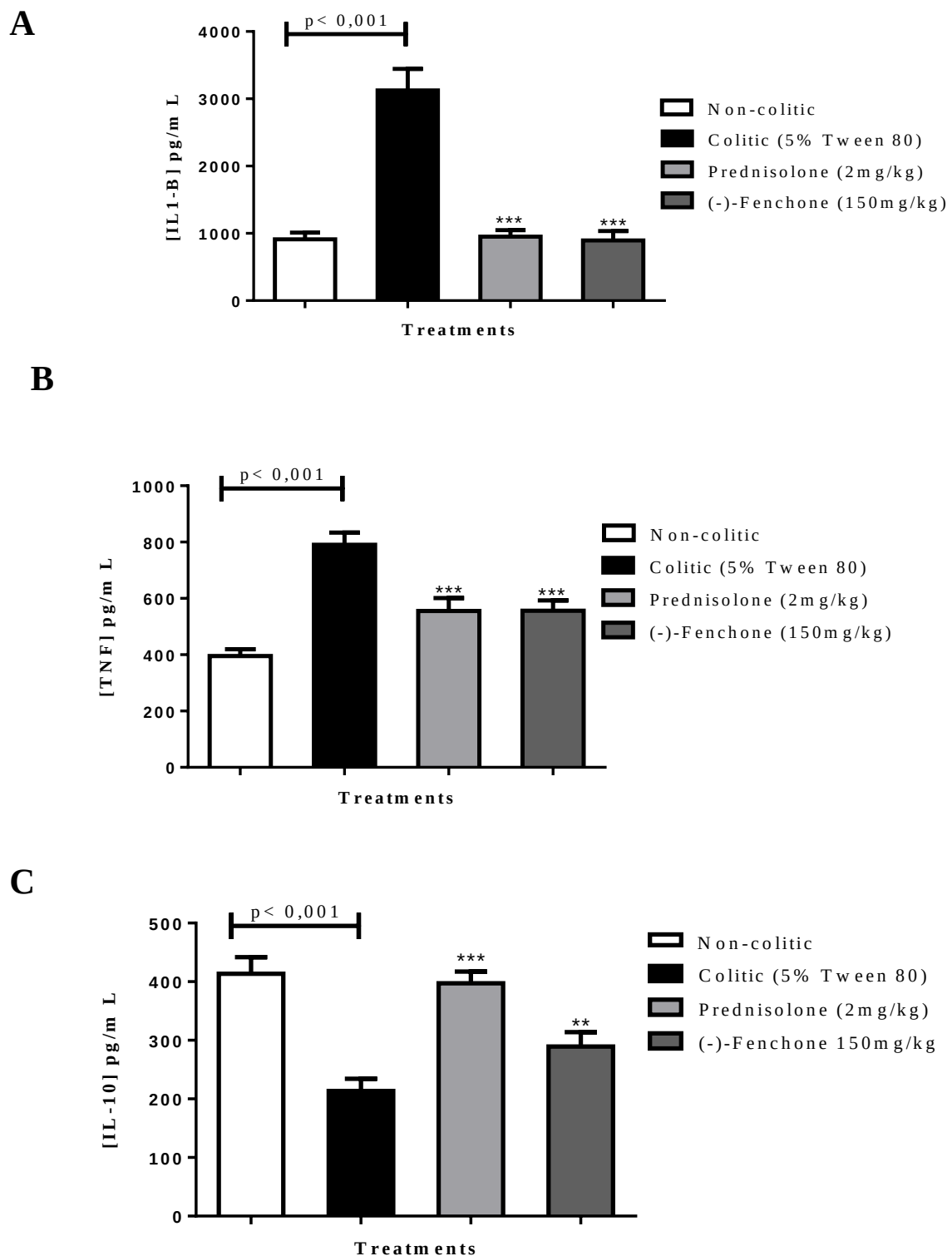


Fig 11. Effect of (-)-fenchone and prednisolone in IL-1 β (A), TNF- α (B) and IL-10 (C) levels form in sub-chronic phase with recurrence of the intestinal inflammatory process in a TNBS-induced colitis model in rats. Results expressed as mean $\pm$ SE of the parameters analyzed (n = 6–8). The analysis of variance of one via (ANOVA) followed by the Dunnett's and Tukey's test. ** p < 0.01 or ***p < 0.001 vs control group

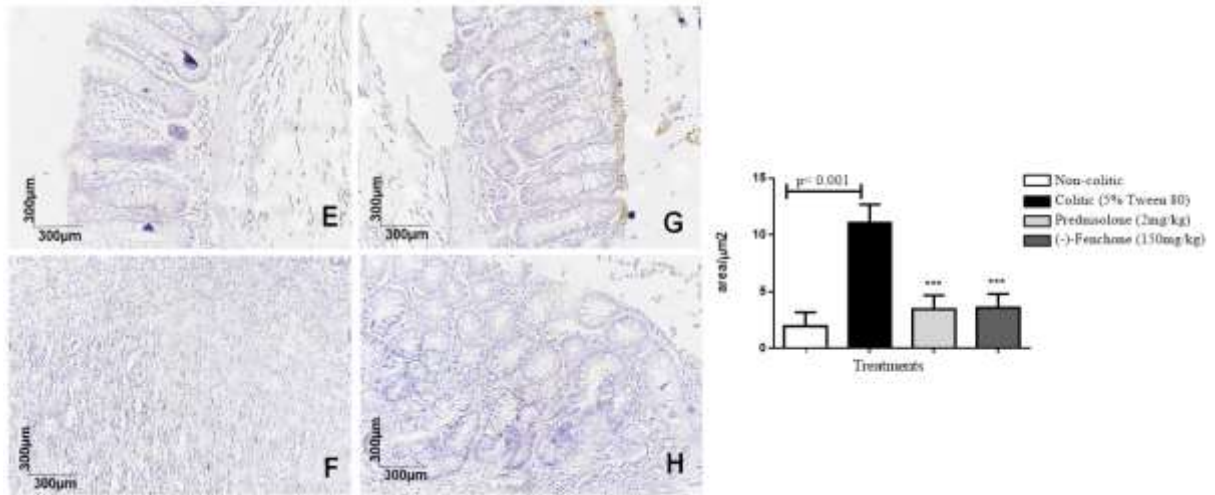


Fig 12. Photomicrographs with immunohistochemical marking for nuclear transcription factor kappa B (NF-κB) in colon samples from in sub-chronic phase with recurrence of the intestinal inflammatory process in a TNBS-induced colitis model in rats. Non-colitic (E); colitic (5 % Tween 80) (F); prednisolone (2 mg/kg) (G); (-)-Fenchone (150 mg/kg) (H). Results are expressed as median (minimum-maximum) of the parameters analyzed (n=5, 3 sessions per animal). Kruskal Wallis test and Dunn's posterior test was performed using the software Graph Pad Prism. ***p < 0.001 compared to the colitic group (5 % tween 80)

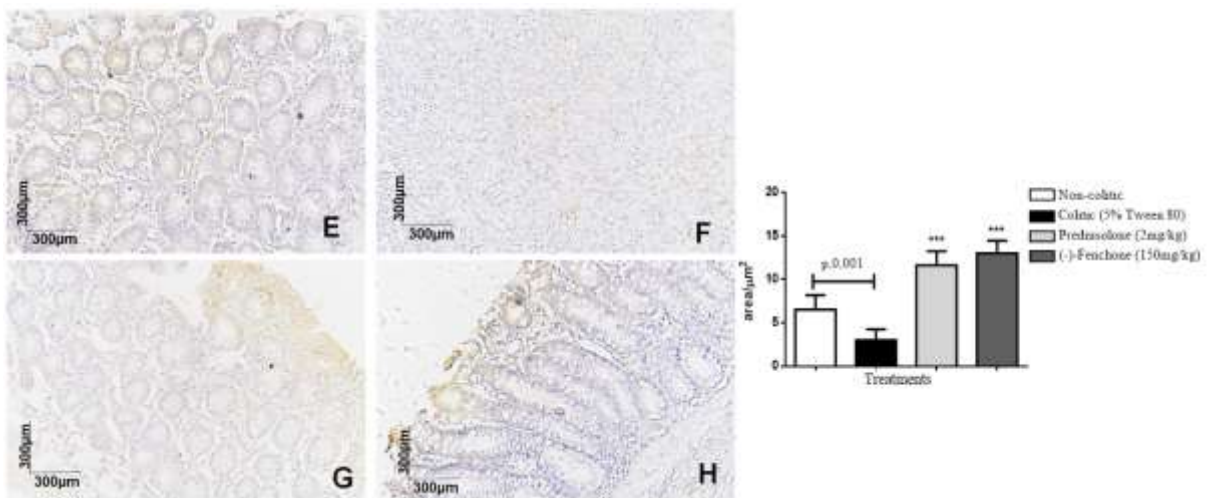


Fig. 13. Photomicrographs with immunohistochemical marking for transforming growth factor beta (TGF-β) in colon samples from in sub-chronic phase with recurrence of the intestinal inflammatory process in a TNBS-induced colitis model in rats. Non-colitic (E); colitic (5 % Tween 80) (F); prednisolone (2 mg/kg) (G); (-)-Fenchone (150 mg/kg) (H). Results are expressed as median (minimum-maximum) of the parameters analyzed (n=5, 3 sessions per animal). Kruskal Wallis test and Dunn's posterior test was performed using the software Graph Pad Prism. ***p < 0.001 compared to the colitic group (5 % tween 80)

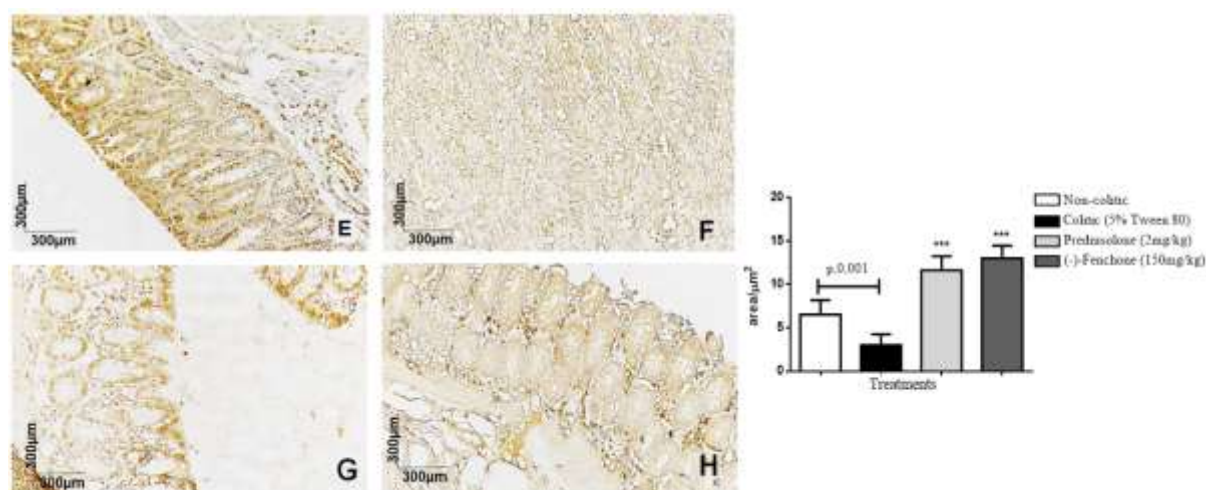


Fig. 14. Photomicrographs with immunohistochemical marking for zonula occludens 1 (ZO-1) in colon samples from in sub-chronic phase with recurrence of the intestinal inflammatory process in a TNBS-induced colitis model in rats. Non-colitic (E); colitic (5 % Tween 80) (F); prednisolone (2 mg/kg) (G); (-)-Fenchone (150 mg/kg) (H). Results are expressed as median (minimum-maximum) of the parameters analyzed (n=5, 3 sessions per animal). Kruskal Walis test and Dunn's posterior test was performed using the software Graph Pad Prism. ***p < 0.001 compared to the colitic group (5 % tween 80)

REFERENCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*, 9º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019.
- ACTIS, G. C., PELLICANO, R. Inflammatory bowel disease: Efficient remission maintenance is crucial for cost containment. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**, v. 8, n. 2, p. 114, 2017.
- ADEFISAYO, M.A. et al. Gastro-protective effect of methanol extract of *Vernonia amygdalina* (del.) leaf on aspirin-induced gastric ulcer in Wistar rats. **Toxicol. Rep.**, v.4, p. 625-633, 2017.
- AGRAWAL M, COLOMBEL JF. Treat-to-Target in Inflammatory Bowel Diseases, What Is the Target and How Do We Treat?. **Gastrointest Endosc Clin N Am.**, v. 29, n. 3, p. 421-436, 2019.
- AHLUWALIA B. et al. Mucosal immune system of the gastrointestinal tract: maintaining balance between the good and the bad. **Scand J Gastroenterol.** v.52, p. 1185–1193, 2017.
- AHLUWALIA, B. et al. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 53, n. 4, 379–389, 2018.
- AHMAD, S.S. et al. Gastroprotective effect of thymoquinone on water immersion restraint stress induced ulceration in rats. **Drug Res (Stuttg)**, v.67, n.6, p. 366-372, 2017.
- AKANDA, M.S. et al. Anti-Inflammatory and Gastroprotective Roles of *Rabdosia inflexa* through Downregulation of Pro-Inflammatory Cytokines and MAPK/NF-κB Signaling Pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, n. 584, 2018.
- ALEKSANDROVA, K.; ROMERO-MOSQUERA, B.; HERNANDEZ, V. Diet, Gut Microbiome and Epigenetics: Emerging Links with Inflammatory Bowel Diseases and Prospects for Management and Prevention. **Nutrients.**, v. 9, n. 9, p. 962, 2017.
- ALGIERI, F. et al. Anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts of *Lavandula dentata* L. and *Lavandula stoechas* L. **J. Ethnopharmacol.**, v. 190, p. 142–158, 2016.
- ANANTHAKRISHNAN, A. N. Epidemiology and risk factors for IBD. **Rev. Gastroenterology and Hepatology**, v. 12, n. 4, p. 205–217, 2015.
- ANANTHAKRISHNAN, A.N.; XAVIER, R.J. *Gastrointestinal Diseases. Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases* (Tenth Edition), p. 16-26, 2020.
- ANNAHÁZI, A.; MOLNÁR, T. Optimal Endpoint of Therapy in IBD: An Update on Factors Determining a Successful Drug Withdrawal. **Gastroenterology Research and Practice**, 2015.

ARAGÃO, T. P. et al. Contribution of secondary metabolites to the gastroprotective effect of aqueous extract of *Ximenia americana* L. (Olacaceae) Stem Bark in Rats. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 1-18, 2018.

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

ATEUFACK, Gilbert et al. Ulcer Protective and Ulcer Healing Activities of Aqueous and Methanolic Extracts of Leaves of *Rumex Bequaertii* De Wild (Polygonaceae) in Rats. **Journal of Biology and Life Science**, v. 6, n. 2, p. 61-80, 2015.

AZIZ, R.S. et al. 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**, v. 110, p. 554-560, 2019.

BANIHANI, S. A. Histamine-2 Receptor Antagonists and Semen Quality. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 118, n. 1, p. 9-13, 2017.

BAPTISTA, R. et al. Antioxidant and Antimycotic Activities of Two Native *Lavandula* Species from Portugal. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v. 2015.

BARBALHO, S.M. et al. Inflammatory bowel disease: Can omega-3 fatty acids really help? **Ann. Gastroenterol.** v. 29, p. 37–43, 2016.

BARBOSA, H.M. et al. Abordagem fitoquímica de metabólitos secundários em *Solanum acanthodes* (Solanaceae) Hook. **South Am. J. Bas. Educ. Tech. Technol.** v.4, p. 30–41, 2017.

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

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

BAUMGART, D.C. Crohn's Disease and Ulcerative Colitis: From Epidemiology and Immunobiology to a Rational Diagnostic and Therapeutical Approach. **Cham – Switzerland**: Springer, 2017.

BISWAS, S. K. Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? **Oxid. Med. Cell. Longev.**, 2019.

BONCAN, D. A. T.; TSANG, S. S. K.; LI, C.; LEE, I. H. T.; LAM, H. M.; CHAN, T. F.; HUI, J. H. L. Terpenes and terpenoids in plants: Interactions with environment and insects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21(19), p. 1–19, 2020.

- BOCKERSTETT, K. A.; DIPAOLO, R. J. Regulation of Gastric Carcinogenesis by Inflammatory Cytokines. v. 4, n. 1, p. 47-53, 2017.
- BOEING, T. et al. Antiulcer mechanisms of *Vernonia condensata* Baker: A medicinal plant used in the treatment of gastritis and gastric ulcer. **Journal of ethnopharmacology**, v. 184, p. 196–207, 2016.
- BOUTEMINE, I.M. et al. Gastro-protective, therapeutic and anti-inflammatory activities of *Pistacia lentiscus* L. fatty oil against ethanol-induced gastric ulcers in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 224, p. 273–282, 2018.
- BOOTH, J. K.; PAGE, J. E.; BOHLMANN, J. Terpene synthases from *Cannabis sativa*. **PLoS ONE**, 12(3), 2017.
- BOY, H.I.A. et al. Recommended Medicinal Plants as Source of Natural Products: A Review. **Digital Chinese Medicine**. v. 1, p. 131-142, 2018.
- BROWNING, K. N.; RAVAGLI, R. A. Central control of gastrointestinal motility. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v.26(1): p. 11–16, 2019.
- BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. United States of America: Mc Graw-Hill Companies, Inc., 2011.
- BRZOZOWSKI, B. et al. Mechanisms by which Stress Affects the Experimental and Clinical Inflammatory Bowel Disease (IBD): Role of Brain-Gut Axis. **Current Neuropharmacology**, v. 14, n. 8, p. 892-900, 2016.
- CAMMAROTA, G. et al. The involvement of gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: Potential for therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 149, n. 1, p. 191–212, 2015.
- CAMPBELL, I. The mouth, stomach and intestines. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 16, n. 1, p. 37–39, 2015.
- CHANG, S.; HANAUER, S. Optimizing pharmacologic management of inflammatory bowel disease. **Expert review of clinical pharmacology**, v. 10, n.6, p.595–607, 2017.
- CHEN, X. et al. Comparisons Between Bacterial Communities in Mucosa in Patients With Gastric Antrum Ulcer and a Duodenal Ulcer. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, n. 8, 2018.
- CHEUNG, K. S. et al. Long-term proton pump inhibitors and risk of gastric cancer development after treatment for *Helicobacter pylori*: a populationbased study. **Gut**, v. 67, p. 28-35, 2017.
- CHIBBAR, R. et al. The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology: Implications for Human Health, **Probiotics, and Dysbiosis.**, p. 442, 2017.

COWARD, S. et al. Past and future burden of inflammatory bowel diseases based on modeling of population-based data. v. 156, p. 1345–1353, e4, **Gastroenterology**, 2019.

COSKUN, M. et al. Novel Targeted Therapies for Inflammatory Bowel Disease. **Trends in Pharmacol. Sciences**, v. 38, n. 2, p. 127–142, 2017.

DANESE, S. et al. Randomised trial and open-label extension study of an anti-interleukin-6 antibody in Crohn's disease (ANDANTE I and II). **Gut**, 2017.

DA SILVA, D. M. et al. Effect of allantoin on experimentally induced gastric ulcers: Pathways of gastroprotection. **European Journal of Pharmacology**, 821, 68–78, 2018.

DARGAHI, N. et al. Immunomodulatory effects of probiotics: Can they be used to treat allergies and autoimmune diseases? **Maturitas**, v. 119, p. 25- 38, 2019.

DE FAZIO, L. et al. Longitudinal analysis of inflammation and microbiota dynamics in a model of mild chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. **World J. Gastroenterol**, v. 20, p. 2051–2061, 2014.

DE SANTANA SOUZA, M.T. et al. Protective effect of carvacrol on acetic acid-induced colitis. **Biomed Pharmacother**. v. 96, p. 313-319, 2017.

DHILLON, S. S. et al. Higher activity of the inducible nitric oxide synthase contributes to very early onset inflammatory bowel disease. **Clinical and Translational Gastroenterology**, v. 5, n. 1, p. 1–7, 2014.

DONG, L.-N., et al. Role of intestinal microbiota and metabolites in inflammatory bowel disease. **Chinese Med. J.**, 132(13), 1610–1614, 2019.

DORÉ J. et al. The human gut microbiome as source of innovation for health. **Therapie**., 2017.

DUDZIŃSKA, E. et al. Oxidative Stress and Effect of Treatment on the Oxidation Product Decomposition Processes in IBD. Hindawi - Oxidative Medicine and Cellular Longevity v. 2018, Article ID 7918261, p.7, 2018.

DUTRA, R. C., CAMPOS, M. M., SANTOS, A. R. S., & CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, 112, 4–29, 2016.

ESCOBEDO-HINOJOSA, W. I. et al. Gastroprotective Mechanism and Ulcer Resolution Effect of Cyrtocarpa procera Methanolic Extract on EthanolInduced Gastric Injury. **Evidence-Based Comp. and Alt. Medicine**, v. 2018, 2018.

FAN, W.T. et al. Close association between intestinal microbiota and irritable bowel syndrome . **Eur J Clin Micro. Infect Dis**. v. 36, p. 2303- 2317, 2017.

FALLAH, S. et al. Proliferation in the Gastrointestinal Epithelium. Editor(s): Leonard R. Johnson, **Encyclopedia of Gastroenterology**, Elsevier, 2018.

GAO, X. et al. Chronic stress promotes colitis by disturbing the gut microbiota and triggering immune system response. **PNAS**, v. 115, n. 13, 2018.

GEREMIA, A. et al. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. **Autoimmun.** v. 13, p. 3–10, 2014.

Global Burden of Diseases –Injuries, and Risk Factors Study 2016. Disponível em: <<https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/>>. Acesso em abril de 2020.

GOMOLLON, F. et al. European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn’s disease 2016: part 1: diagnosis and medical management. **Journal Crohns Colitis**, v.11, p. 3–25, 2017.

GONZÁLEZ-RAMÍREZ, A.E, et al. Nerol alleviates pathologic markers in the oxazolone-induced colitis model. **Eur J Pharmacol.** v. 776, p. 81-89, 2016.

GUEDES, J.M. Avaliação da atividade gastroprotetora do isômero (-)-fenchona. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2018.

GUO, Z. The modification of natural products for medical use. **Acta Pharmaceutica Sinica B** v. 7, n. 2, p. 119–136, 2017.

HAN, G.; CEILLEY, R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. **Adv Ther**, v.34, p. 599–610, 2017.

HARBORD, M. et al. Third European evidence-based consensus on diagnosis and management of ulcerative colitis. Part 2: current management. **Journal Crohns Colitis**. v.11, n.7, p. 769–784, 2017.

HIM, A. et al. Antinociceptive activity of alpha-pinene and fenchone. **Pharmacol. online.**, v. 3, p. 363-369, 2008.

HO, G.T. et al. Ulcerative colitis. **Medicine**. v. 43(5), p. 276-281, 2015.

HOUDKOVA, M. et al. Evaluation of antibacterial potential and toxicity of plant volatile compounds using new broth microdilution volatilization method and modified MTT assay. **Fitoterapia**, 118, 56–62, 2017.

HOLLE, G. E. Pathophysiology and modern treatment of ulcer disease. **International journal of molecular medicine**, v. 25, p. 483–491, 2010.

HUSSEIN, S.A. et al. Evaluation of Gastroprotective Effect and AntiInflammatory Role of Resveratrol against Gastric Mucosal Alterations in Experimental Model of Gastritis in Rats. **International Journal of Pharma Sciences**, v. 6, n. 3, p. 1559-1570, 2016.

INSAWANG, S, et al. Essential Oil Compositions and Antibacterial and Antioxidant Activities of Five Lavandula stoechas Cultivars Grown in Thailand. **Chem Biodivers**, v.16, e1900371, 2019.

JÄGER, W. Metabolism of Terpenoids in Animal Models and Humans. In BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. Handbook of essential oils: science, technology, and applications. New York: Taylor & Francis Group, 2010, cap. 8, p.209.-234.

KANDULA, M. et al. Discovery and preclinical development of a novel prodrug conjugate of mesalamine with eicosapentaenoic acid and caprylic acid for the treatment of inflammatory bowel disease. **International Immunopharmacology**, v. 40, p. 443–451, 2016.

KANGWAN, N. Quality of healing of gastric ulcers: Natural products beyond acid suppression. **World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology**, v. 5, n. 1, p. 40, 2014.

KARRASCH, T. et al. Gnotobiotic IL-10^{-/-};NF-kappa B(EGFP) mice reveal the critical role of TLR/NF-kappa B signaling in commensal bacteria-induced colitis. **J Immunol.**, v. 178, n. 10, p. 6522-6532, 2007.

KAVITT, R.T. et al. Diagnosis and Treatment of Peptic Ulcer Disease. **The American Journal of medicine**, v. 132, n. 4, 2019.

KAZMI, M.; ALI, H.; AZIZ, S. Gastroesophageal Reflux Disorder: Difficulties in Diagnosis and Treatment in Infants. *Annals Abbasi Shaheed Hospital & Karachi Medical & Dental College*, v. 22, n.1, p. 54-59, 2017.

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

KHULBE, P. et al. Nsaids related gastrointestinal side effects and their management: **Na Updated Review**. 2017.

KIM, D. H.; CHEON, J. H. Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease and Recent Advances in Biologic Therapies. **Immune Network**, v. 17, n. 1, p. 25, 2017.

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

KOTLARZ, D. et al. Loss of interleukin-10 signaling and infantile inflammatory bowel disease: implications for diagnosis and therapy. **Gastroenterology.**, v. 143, p.347–55, 2012.

- KOUNTOURAS, J. et al. 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.
- LAN, A. et al. Mucosal Healing in Inflammatory Bowel Diseases: Is There a Place for Nutritional Supplementation? **Inflammatory Bowel Disease**, Oxford, v. 21, p. 198–207, 2015.
- LANAS, A.; CHAN, F. K. L. Peptic ulcer disease. **The Lancet**, v. 390, n. 10094, p. 613–624, 2017.
- LI, J. et al. Functional impacts of the intestinal microbiome in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases**. v. 21, n. 1, p.139–153, 2015.
- LI, R. et al. Effect of PI3K gene silencing on growth, migration and related proteins expression of CD40 signalmediated gastric cancer cells. **Mol. Biol. Rep**, v. 40, p. 999–1008, 2013.
- LIMKETKAI, B.N. et al. Nutritional Interventions in the Patient with Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology Clinics of North America**, Maryland Heights, v. 47, n. 1, p.155–177, 2017.
- LINDLEY, L.E. et al. Biology and Biomarkers for Wound Healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 138, p.18S–28S, 2016.
- LOFTUS, E. V. Update on the Incidence and Prevalence of Inflammatory Bowel Disease in the United States. **Gastroenterology & hepatology**, v. 12, n. 11, p. 704–707, 2016.
- LIU, T.; STAPPENBECK, T.S. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Annu Rev Pathol.**, v. 11, p. 127–148, 2016.
- LOFTUS, E. V. Update on the Incidence and Prevalence of Inflammatory Bowel Disease in the United States. **Gastroenterology & hepatology**, v. 12, n. 11, p. 704–707, 2016.
- LUCERI, C. et al. Analysis of Oxidative Stress-Related Markers in Crohn’s Disease Patients at Surgery and Correlations with Clinical Findings. **Antioxidants**, v. 8, p. 378, 2019.
- MAKKI, K. et al. The impact of dietary fiber on gut microbiota in host health and disease. **Cell Host & Microbe**, v. 23, p. 705–715, 2018.
- MALFERTHEINER, P. et al. Management of Helicobacter pylori infection—the Maastricht V/Florence consensus report. **Gut**, v. 66, n. 1, p. 6–30, 2017.
- MAO, R.; HU, P. The Future of IBD Therapy: Where Are We and Where Should We Go Next? **Digestive Diseases**. v.34, p. 175–179, 2016.

- MARANHÃO, D. et al. Características e diagnóstico diferencial das doenças inflamatórias intestinais. **J. bras. med**, v. 103, n. 1, p. 9–15, 2015.
- MARCEN, B.; SOSTRES, C.; LANAS, A. AINE y riesgo digestivo. *Aten Primaria*, v. 48, n. 2, p. 73-76, 2016.
- MARTON, L.T, et al. Omega Fatty Acids and Inflammatory Bowel Diseases: An Overview. **Int J Mol Sci.**, v. 20, n. 19, p. 4851, 2019.
- MEHTA, D. Ulcer - Review on types, anti-ulcer drugs, anti-ulcer medicinal plants, anti-ulcer drug market, diagnostics and current global clinical trials status. *Pharmacy Practice*, v. 2016, n. 2, p. 1-8, 2016.
- MIELE, E. et al. Nutrition in Paediatric Inflammatory Bowel Disease: A Position Paper on Behalf of The Porto IBD Group of ESPGHAN. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 66, n. 4, p. 687-708, 2018.
- MIN, J.; MIN, K. Cumulative exposure to nighttime environmental noise and the incidence of peptic ulcer. **Environment International**, n.1, p. 0–1, 2018.
- MINER-WILLIAMS, W.M.; MOUGHAN, P.J. Intestinal barrier dysfunction: implications for chronic inflammatory conditions of the bowel. **Nutrition Research Reviews**, 2016.
- MIYAZAWA, M.; MIYAMOTO, Y. Biotransformation of (+) –(1R) –and (–) –(1S) - fenchone by the larvae of common cutworm (*Spodoptera litura*). *J. Mol. Cat. B: Enz.*, v. 5, p. 123– 130, 2005.
- MIYOSHI, J.; CHANG, E, B. The Gut Microbiota and Inflammatory Bowel Diseases. **Transl Res.**, v. 179, p. 38–48, 2017.
- MOLODECKY, N.A. et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. **Gastroenterology**, v. 142 n. 1, p. 46-54, 2012.
- MOTAMEDIRAD, N. et al. Association of IL-1B+3954 and IL-1RN Polymorphisms in Chronic Gastritis and Peptic Ulcer. **Iran J Public Health**. n. 47, v. 9, p. 1364-1370, 2018.
- NEJATI, S. et al. Influence of *Helicobacter pylori* virulence factors CagA and VacA on pathogenesis of gastrointestinal disorders. **Microbial Pathogenesis**, 2018.
- NG, S.C. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. **Lancet**. v. 390, p. 769–78, 2018.
- NI, J. et al. Gut microbiota and IBD: causation or correlation? **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.**, v. 14, n.10, p. 573–584, 2017.
- NIETO, Y. B. Úlcera péptica. **Medicine**, v. 11, n. 3, p. 137-141, 2012.

NIKKHAH-BODAGHI, M. et al. The effects of *Nigella sativa* on quality of life, disease activity index, and some of inflammatory and oxidative stress factors in patients with ulcerative colitis. **Phytother Res.**, v. 33, n. 4, p. 1027-1032, 2019.

NORMAN, J.M. et al. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. **Cell.**, v.160, p. 447–460, 2015.

NOVAK, E.A.; MOLLEN, K.P. Mitochondrial dysfunction in inflammatory bowel disease. **Frontiers in Cell and Development Biology**, v. 3, p. 62, 2015.

O'Neill, S. J. et al. Genetic disorders coupled to ROS deficiency. **Redox Biology**, v. 6, p. 135–156, 2015.

O'SHEA, J. et al. Cytokines and Cytokine Receptors. **Atheneu**, 2019.

OCVIRK S. et al. Surface-Associated Lipoproteins Link *Enterococcus faecalis* Virulence to Colitogenic Activity in IL-10-Deficient Mice Independent of Their Expression Levels. **PLoS Pathog.**, v. 11, n. 6, 2015.

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.

PAPAMICHAEL, K. et al. Infliximab concentration thresholds during induction therapy are associated with short-term mucosal healing in patients with ulcerative colitis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v, 14, n. 4, p.543-549, 2016.

PASSOS, M.D.C.F. et al. Intestinal microbiota in digestive diseases. **Arq Gastroenterol**, v. 54, p. 255-262, 2017.

PASTORELLI, L. et al. Central role of the gut epithelial barrier in the pathogenesis of chronic intestinal inflammation: lessons learned from animal models and human genetics. **Front Immunol.**, v. 4, p. 280, 2013.

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

PÉREZ, S. et al. Redox signaling in the gastrointestinal tract. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 104, p. 75-103, 2017.

PETRYSZYN, P. W.; WITCZAK, I. Costs in inflammatory bowel diseases. **Przegląd Gastroenterologiczny**, v. 11, n. 1, p. 6–13, 2016.

PESSOA, M.L.S. et al. Antifungal activity and antidiarrheal activity via antimotility mechanisms of (-)-fenchone in experimental models. **World J Gastroenterol.** n. 21, v. 26(43), p. 6795-6809, 2020.

PETRYSZYN, P. W.; WITCZAK, I. Costs in inflammatory bowel diseases. **Przegląd Gastroenterologiczny**, v. 11, n. 1, p. 6–13, 2016.

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.

PUBCHEN. Fenchone. Disponível em:

<<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14525#section=Top>>>. Acesso em 2020.

QUARESMA, A.B. et al. The globalization of inflammatory bowel disease: the incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Brazil. v. 35, n.4, p. 259-264 **Curr Opin Gastroenterol**, 2019.

RANA, S.V. et al, Role of oxidative stress & antioxidant defence in ulcerative colitis patients from north India. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 139, n. 4, p. 568–571, 2014.

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.

RAPHAEL, I. et al. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. **Cytokine**, v. 74, p. 5–17, 2015.

REMACLE, A.G.; SHIRYAEV, S.A.; STRONGIN, A.Y. Distinct interactions with cellular Ecadherin of the two virulent metalloproteinases encoded by a *Bacteroides fragilis* pathogenicity island. **PLoS One**, v. 9, n. 11, 2014.

RIBEIRO, A. R. S. et al. 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.

ROBACZEWSKA, J. et al. Role of glutathione metabolism and glutathione related antioxidant defense systems in hypertension. **Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 67, n. 3, p. 331–7, 2016.

ROLIM T.L., et al. Toxicity and antitumor potential of *Mesosphaerum sidifolium* (Lamiaceae) oil and fenchone, its major componente. **BMC Complement Altern Med.**, v. 17, n. 1, p. 364, 2017.

ROM, O. et al. Cigarette smoking and inflammation revisited. **Respir Physiol Neurobiol.** v. 187, n. 1, p. 5-10, 2013.

ROY, D. N. et al. Current trend of utilization of new generation proton pump inhibitors in gastric disorders among people in Jessore city. **Bangladesh**, 2016.

SÁ, S.C.R.; ANDRADE, L. N.; DE SOUSA, D. P. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 1227–1254, 2013.

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

SALIM, S.Y.; SÖDERHOLM, J.D. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. **Inflamm Bowel Dis**, v. 17, n. 1, p. 362–381, 2011.

SANAIL, A. et al. Role of Th22 cells in Helicobacter pylori-related gastritis and peptic ulcer diseases. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 6, p. 5703–5712, 2019.

SARANGARAJAN, R. et al. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 12, p. 1111–1116, 2017.

SENDER, R., FUCHS, S., MILO, R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. **PLoS Biol.** v.14, n.8, 2016.

SHAWKI, A.; MCCOLE, D.F. Mechanisms of Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Adherent-Invasive *Escherichia coli*. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 3, n. 1, 2017.

SHAO, Y.; BAO, J. 8-Rice Phenolics and Other Natural Products. **Rice Chemistry and Technology**, p. 221–271, 2019.

SIES, H; BERNDT, C, JONES, D.P. Oxidative Stress. **Annu Rev Biochem**, n. 86, p. 715–748, 2017.

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

SILVA, F. et al. Efficacy of levofloxacin, amoxicillin and a proton pump inhibitor in the eradication of Helicobacter pylori in Brazilian patients with peptic ulcers. **Clinics**, v. 70, n. 5, p. 318–321, 2015.

SLAVCHEV, I. et al. Antimycobacterial activity generated by the amide coupling of (-)-fenchone derived aminoalcohol with cinnamic acids and analogues. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 24, n. 21, p. 5030–5033, 2014.

SONG, X. et al. Geniposide plays an anti-inflammatory role via regulating TLR4 and downstream signaling pathways in lipopolysaccharide-induced mastitis in mice. **Inflammation**, v. 37, p. 1588–1598, 2014.

SOUZA, H.S.; FIOCCHI, C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.**, v. 13, p. 13–27, 2016.

SRIKANTA, B.M. et al. Alterations of matrix metalloproteinases, gastric mucin and prostaglandin E2 levels by pectic polysaccharide of swallow root (*Decalepis hamiltonii*) during ulcer healing. **Biochimie**, v. 92, p. 194–203, 2010.

SUBUDHI, B. B. et al. Updates in Drug Development Strategies against Peptic ulcer. **J. of Gastrointestinal & Digestive System**, v. 6, n. 2, p. 1-6, 2016.

SUNTRES, ZE, et al. The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55 n. 3, p. 304-318, 2014.

SURDEA-BLAGA, T. et al. Mucosal Protective Compounds in the Treatment of Gastroesophageal Reflux Disease. A Pos. Paper Based on Evid. of the Romanian **Society of Neurogastroenterology**. v. 25, n. 4, p. 537–546, 2016.

SÝKORA, J. et al. Current global trends in the incidence of pediatric-onset inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, v. 7, n. 24(25), p. 2741-2763, 2018.

TABAS, I; GLASS C.K. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. **Science**. v. 339, n. 6116, p.166-172, 2013.

TAMADDONFARD, E. M et al. Safranal, a constituent of saffron, exerts gastro-protective effects against indomethacin-induced gastric ulcer. **Life Sci.**, v. 224, p. 88-94 2019.

TAN, B.L. et al. Antioxidant and Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1162, 2018.

TARNAWSKI, A. S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, n. SUPPL. 1, p. 24–33, 2005.

TARNAWSKI, A. S.; AHLUWALIA, A.; JONES, M. K. Angiogenesis in gastric mucosa: An important component of gastric erosion and ulcer healing and its impairment in aging. **Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)**, v. 29, n. S4, p. 112–123, 2014.

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

TEIXEIRA, F.V. et al. Management of ulcerative colitis: a clinical update. **Journal of Coloproctology**, v. 35, n. 4, p. 230–237, 2015.

THEOCHARI, N. A. et al. Antibiotics exposure and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review. **Scand J Gastroenterol**. v. 12, p. 1-7, 2017.

TIAN, T.; WANG, Z.; ZHANG, J. Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies. **Hindawi - Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2017, Article ID 4535194, p. 18, 2017.

TOLEDO, T. K. Severe contiguous perianal Crohn's disease. **JAAD Case Reports**. v.2, p. 144-5, 2016.

TORRES, J. et al. Crohn's disease. **The Lancet**, v. 389, n. 10080, 1741–1755, 2017.

TRAN, L. S. et al. Regulation and functions of inflammasome-mediated cytokines in *Helicobacter pylori* infection. **Elsevier**, v. 19, n. 9-10, p. 449-458, 2017.

TREUTING, P. M.; ARENDS, M. J.; DINTZIS, S. M. Upper Gastrointestinal Tract. **Comparative Anatomy and Histology**, p. 191–211, 2018.

TURNER, M. D. et al. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 11, p. 2563–2582, 2014.

UNGARO, R. et al. Ulcerative colitis. **Lancet**, v. 389, p. 1756–70, 2017.

WALJEE, A. K. et al. Corticosteroid use and complications in a US inflammatory bowel disease cohort. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1–14, 2016.

VALLE, J. D. Doenças ulcerosa péptica e distúrbios relacionados. In LONGO, D. L. et al. Gastrenenterologia e hepatologia de Harrison. Porto Alegre: AMGH, 2 eds. cap.14, p. 99-121, 2015.

VANCAMELBEKE, M.; VERMEIRE, S. The intestinal, barrier: a fundamental role in health and disease. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 11, n. 9, p. 821-834, 2017.

VARGAS-ROBLES, H. et al. Beneficial effects of nutritional supplements on intestinal epithelial barrier functions in experimental colitis models in vivo. **World J. Gastroenterol**, v. 25, n. 30, p. 4181–4198, 2019.

VENZON, L. et al. 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.

VERMA, R. et al. A network map of Interleukin-10 signaling pathway. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 10, n. 1, p. 61–67, 2016.

VINDIGNI, S. M. et al. The intestinal microbiome, barrier function, and immune system in inflammatory bowel disease: a tripartite pathophysiological circuit with implications for new therapeutic directions. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 9, n. 4, p. 606–625, 2016.

VIANA, A.F.S.C. et al. (–)-Myrtenol accelerates healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats and in human gastric adenocarcinoma cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 854, p. 139-148, 2019.

WALLACE, J. L.; SHARKEY, K. A. As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman: Farmacoterapia da acidez gástrica, úlceras pépticas e doença do refluxo gastroesofágico Artmed, 12ª edição, pág 1309, 2012.

WALLER, D. G., SAMPSON, A. P. Dyspepsia and peptic ulcer disease. **Medical Pharmacology and Therapeutics**, 401–410, 2018.

WANG, K. et al. Natural Products as Targeted Modulators of the Immune System. **Journal of Immunology Research**, p. 1–2, 2018.

WHITE, J. R.; WINTER, J. A.; ROBINSON, K. Differential inflammatory response to *Helicobacter pylori* infection: etiology and clinical outcomes. **J. Inflam. Res.**, v. 8, p. 137, 2015.

WINDSOR, J.W.; KAPLAN, G.G. Evolving Epidemiology of IBD. **Current Gastroenterology Reports**. v.21, n. 40, 2019.

WILSON, R. L.; STEVENSON, C. E. Anatomy and Physiology of the Stomach. **Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract**, 2 volume Set. volume 1, p 634-646, 2019.

WOODS, Y. L.; CAREY, F. A. Pathology and histology of the oesophagus and stomach. **Surgery**, v. 35, n. 11, p. 612-618, 2017.

WU, X. Paeoniflorin Prevents Intestinal Barrier Disruption and Inhibits Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammation in Caco-2 Cell Monolayers. **Inflammation**, 2019.

XIE, W. et al. 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.

YADAV, P. et al. Genetic Factors Interact With Tobacco Smoke to Modify Risk for Inflammatory Bowel Disease in Humans and Mice. **Gastroenterology**, v. 153, n. 2, p. 550–565, 2017.

YAMADA, A. et al. Role of regulatory T cell in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**. v. 22, n. 7, p. 2195-2205, 2016.

YANDRAPU, H.; SAROSIEK, J. Protective Factors of the Gastric and Duodenal Mucosa: Overview. **Curr Gastroenterol Rep**, v. 17, p. 24, 2015.

YANG, R. et al. Effects of hydrotalcite combined with esomeprazole on gastric ulcer healing quality: A clinical observation study. **World J Gastroenterol**, v. 21, n.23, p. 1268-1277, 2017.

YU, L. et al. D-limonene exhibits anti-inflammatory and antioxidant properties in an ulcerative colitis rat model via regulation of iNOS, COX-2, PGE2 and ERK signaling pathways. **Molecular Medicine Reports**, v. 15, n. 4, p. 2339–2346, 2017.

YU, L.C. Microbiota dysbiosis and barrier dysfunction in inflammatory bowel disease and colorectal cancers: exploring a common ground hypothesis. **Journal of Biomedical Science**, v. 25, n. 79, 2018.

YUN, S. et al. Gastroprotective effect of mature silkworm , Bombyx mori against ethanol-induced gastric mucosal injuries in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 39, n. October, p. 279–286, 2017.

YUKSEL, M. et al. Is oxidative stress associated with activation and pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease? **Journal of medical biochemistry**, v. 36, p. 341–348, 2017.

CONCLUSÃO

A partir da análise dos resultados obtidos para a (-)-fenchona, frente a modelos que mimetizam a úlcera gástrica, duodenal e a colite ulcerativa, é possível concluir que essa substância apresenta:

- Atividade anti-úlcera duodenal;
- Baixa toxicidade por doses repetidas durante 14 dias a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por ácido acético;
- Atividade cicatrizante gástrica relacionada a mecanismos antioxidantes (restauração dos níveis de GSH e SOD e redução dos níveis MDA e MPO), imunomoduladores (redução dos níveis de IL-1 β e TNF- α e aumento de IL-10; redução da imunomarcação para NF κ B e aumento para TGF β);
- Atividade anti-inflamatória intestinal (modelo agudo e sub-crônico com recidiva do processo inflamatório induzido por TNBS) relacionada a mecanismos antioxidantes (restauração dos níveis de GSH e SOD e redução dos níveis MDA e MPO), imunomoduladores (redução dos níveis de IL-1 β e TNF- α ; aumento de IL-10; redução da imunomarcação para NF κ B e aumento para TGF β) e citoprotetores da barreira intestinal epitelial (aumento da expressão de ZO-1).

APÊNDICES



Review

Intestinal Anti-Inflammatory Activity of Terpenes in Experimental Models (2010–2020): A Review

Maria Elaine Araruna ¹, Catarina Serafim ¹, Edvaldo Alves Júnior ¹, Clelia Hiruma-Lima ²,
Margareth 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 18618970, 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

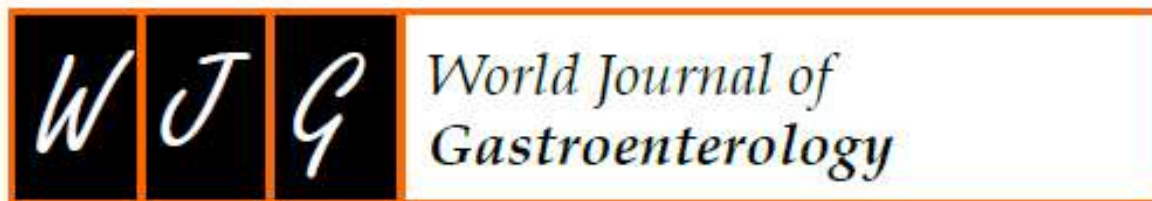
Academic Editors: Maurizio Battino, Jesus Simal-Gandara and Esra Capanoglu

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 keep symptoms in remission over the long term. Natural products emerge as an alternative for the development of new drugs; bioactive compounds are promising in the treatment of several disorders, among them those that affect the gastrointestinal tract, due to their wide structural diversity and biological activities. This review compiles 12 terpenes with intestinal anti-inflammatory activity evaluated in animal models and in vitro studies. The therapeutic approach to IBDs using terpenes acts basically to prevent oxidative stress, combat dysbiosis, restore intestinal permeability, and improve the inflammation process in different signaling pathways.

Keywords: terpenes; intestinal anti-inflammatory; ulcerative colitis; cytokines; natural products



Submit a Manuscript: <https://www.fupublishing.com>

World J Gastroenterol 2020 November 21; 26(43): 6795-6809

DOI: 10.3748/wjg.v26.i43.6795

ISSN 1007-9327 (print) ISSN 2219-2840 (online)

ORIGINAL ARTICLE

Basic Study

Antifungal activity and antidiarrheal activity *via* ant motility 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

ORCID number: Michelle Liz de Souza Pessoa 0000-0003-4111-3258; Leiliane Macena Oliveira Silva 0000-0002-3932-1464; Maria Elaine Cristina Araruna 0000-0001-7317-7446; Catarina Alves de Lima Serafim 0000-0002-2464-5840; Edvaldo Balbino Alves Júnior 0000-0002-3311-1247; Alessa Oliveira Silva 0000-0002-9573-3869; Matheus Marley Bezerra Pessoa 0000-0002-4086-946X; Hermes Diniz Neto 0000-0003-2878-1737; Edeltrudes de Oliveira Lima 0000-0002-9547-0886; Leônia Maria Batista 0000-0002-5001-2486.

Author contributions: Pessoa MLS, Silva LMO, Araruna MEC, Serafim CAL, Alves Júnior EB, Silva AO, Pessoa MMB, and Batista LM contributed to the conception and design of the study, performed the *in vivo* experiments, coordinated the study, participated in writing the manuscript and approved the final version to be published; Diniz Neto H and de Oliveira Lima E

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, Hermes Diniz Neto, Edeltrudes de Oliveira Lima, Department of Pharmaceutical Sciences, IPEFarM, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-970, Paraíba, Brazil

Matheus Marley Bezerra Pessoa, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-970, Paraíba, Brazil

Leônia Maria Batista, Postgraduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 58051-900, Brazil

Corresponding author: Leônia Maria Batista, PharmD, Associate Professor, Professor, Postgraduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, s/n - Castelo Branco III, João Pessoa 58051-900, Brazil. leoniab@uol.com.br

Abstract

BACKGROUND

(-)-Fenchone is a bicyclic monoterpene present in essential oils of plant species, such as *Foeniculum vulgare* and *Peumus boldus*, used to treatment of gastrointestinal diseases. Pharmacological studies report its anti-inflammatory, antioxidant, and antinociceptive activity.

AIM

To investigate antidiarrheal activity related to gastrointestinal motility, intestinal secretion and antimicrobial activity.



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, new approaches to complementary treatments are needed to prevent the development of ulcers and their recurrence. Natural products such as medicinal plants and their isolated compounds have been widely used in experimental models of peptic ulcers. Flavonoids are among the molecules of greatest interest in biological assays due to their anti-inflammatory and antioxidant properties. The present study is a literature review of flavonoids that have been reported to show peptic ulcer activity in experimental models. Studies published from January 2010 to January 2020 were selected from reference databases. This review refers to a collection of flavonoids with antiulcer activity in vivo and in vitro models.

Keywords: flavonoids; peptic ulcer; review



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 Araujo Junior^c, Giciane Carvalho Vieira^a, Marianna Vieira Sobral^a, Leônia Maria Batista^{b,*}

^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 *Ravensara amisata* (madeira), *Ocimum basilicum* (manjericao/alfavaca) and *Croton zehneri* (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 guide 423 in mice. Ethanol, stress, piroxicam and pylorus ligation-induced gastric ulcer models were used to investigate antiulcer properties. The related mechanisms of action were using the ethanol-gastric lesions protocol.

Results: In the acute oral toxicity assay, doses of 300 or 2000 mg/kg of estragole administered orally in Swiss mice did not induce any behavioral changes. However, the dose of 2000 mg/kg showed a decrease in water and feed intake. Lethal dose 50 % (LD50) was set to be equal to or greater than 2500 mg/kg, according to OECD. In all evaluated protocols, estragole (31.25, 62.5, 125 and 250 mg/kg) significantly reduced the area of ulcerative lesion when compared to control groups. To investigate the mechanisms involved in the gastroprotective activity, the antisecretory or neutralizing of gastric secretion, cytoprotective, antioxidant and immunoregulatory effects were evaluated. Results showed that treatment with estragole (250 mg/kg) reduced ($p < 0.05$) the volume of the gastric juice. Besides, sulfhydryl groups, nitric oxide, mucus and prostaglandins seems to be involved in the gastroprotective property. Treatment also increased ($p < 0.001$) levels of reduced glutathione (GSH), interleukin-10 (IL-10) and positive cells marked for glutathione peroxidase (GPx) and cyclooxygenase 2



(-)-Carveol Prevents Gastric Ulcers via Cytoprotective, Antioxidant, Antisecretory and Immunoregulatory Mechanisms in Animal Models

Catarina Alves de Lima Serafim¹, Maria Elaine Cristina Araruna¹,
Edvaldo Balbino Alves Júnior¹, Leiliane Macena Oliveira Silva¹, Alessa Oliveira Silva¹,
Marcelo Sobral da Silva¹, Adriano Francisco Alves², Aurigena Antunes Araújo³ and
Leônia Maria Batista^{1*}

¹Postgraduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba (UFPB), João Pessoa, Brazil, ²Department of Physiology and Pathology, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba (UFPB), João Pessoa, Brazil, ³Department of Morphology, Histology and Basic Pathology, Biosciences Center, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Gautam Sethi,
National University of Singapore,
Singapore

Reviewed by:

Gökçe Şeker Karatoprak,
Erciyes University, Turkey
Wenyi Kang,
Henan University, China

*Correspondence:

Leônia Maria Batista
leonieb@uol.com.br

Specialty section:

This article was submitted to
Gastrointestinal and Hepatic

Background: (-)-Carveol (*p*-Mentha-6,8-dien-2-ol) is a monocyclic monoterpenic alcohol, present in essential oils of plant species such as *Cymbopogon giganteus*, *Illicium pachyphyllum* and in spices such as *Carum carvi* (cumin). Pharmacological studies report its antitumor, antimicrobial, neuroprotective, vasorelaxant, antioxidant and anti-inflammatory activity.

Hypothesis/Purpose: The objective of this study was to evaluate the acute non-clinical oral toxicity, gastroprotective activity of monoterpene (-)-Carveol in animal models and the related mechanisms of action.

Methods: Acute toxicity was assessed according to OECD guide 423 in mice. Ethanol, stress, NSAIDs and pylorus ligation-induced gastric ulcer models were used to investigate antiulcer properties. The related mechanisms of action were using the ethanol-gastric lesions protocol.

ANEXO

ANEXO A- Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA E ANTI-INFLAMATÓRIA INTESTINAL DO ISÔMERO (-) FENCHONA EM MODELOS ANIMAIS", protocolada sob o CEUA nº 7216040119 (ID 000529), 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 15/03/2019.

We certify that the proposal "ANTI-ULCEROGENIC AND INTESTINAL ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF ISOMER (-) FENCHONE IN ANIMAL MODELS", utilizing 160 Heterogenics rats (160 males), protocol number CEUA 7216040119 (ID 000529), 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 03/15/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **02/2019** a **06/2022** Área: **Ciências Farmacêuticas**

Origem: **Unidade de Produção Animal IpeFarM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **7 a 8 semanas**

N: **160**

Linhagem: **Rattus Norvegicus - Wistar**

Peso: **180 a 250 g**

Local do experimento: Os experimentos agudos (até 7 dias) serão conduzidos com alojamento dos animais Unidade de Produção Animal IpeFarM/UFPB e realização dos experimentos no Laboratório de Farmacologia do Trato Gastrointestinal. Para os experimentos crônicos (mais 7 dias) os animais serão alojados no Biotério do Unipê Centro Universitário de João Pessoa e realização dos experimentos no Laboratório de Farmacologia do Trato Gastrointestinal.

João Pessoa, 30 de junho 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