



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



**MICHELLE LIZ DE SOUZA PESSÔA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DO FARNESOL EM  
MODELOS ANIMAIS**

**JOÃO PESSOA  
2023**

**MICHELLE LIZ DE SOUZA PESSÔA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DO FARNESOL EM  
MODELOS ANIMAIS**

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

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

**JOÃO PESSOA**  
2023

## MICHELLE LIZ DE SOUZA PESSÔA

### Catálogo na publicação Seção de Catalogação e Classificação

P475a Pessoa, Michelle Liz de Souza.

Avaliação da atividade gastroprotetora do farnesol  
em modelos animais / Michelle Liz de Souza Pessoa. -  
João Pessoa, 2023.  
150 f. : il.

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

1. Farnesol. 2. Sesquiterpenos. 3. Úlcera péptica.  
4. Toxicidade. 5. Gastroproteção. I. Batista, Leônia  
Maria. II. Título.

UFPB/BC

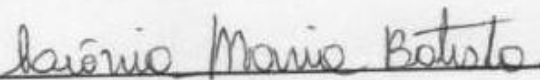
CDU 547.913.3(043)

MICHELLE LIZ DE SOUZA PESSÔA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DO FARNESOL EM  
MODELOS ANIMAIS**

APROVADA EM: 07/06/2023

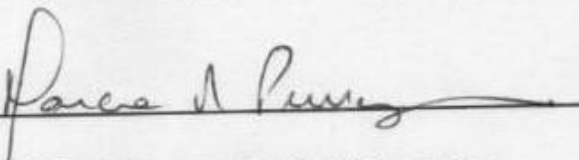
**BANCA EXAMINADORA:**



**Profª. Drª. Leônia Maria Batista**  
Orientadora – UFPB



**Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães**  
Examinador externo – UFPB



**Profª. Drª. Marcia Regina Piuvezam**  
Examinadora interna – UFPB

JOÃO PESSOA

2023

*Dedico este trabalho aos meus pais  
**Marineide e Venicio** por todo o  
incentivo e apoio em mais uma etapa  
da minha caminhada.*

## ***Agradecimentos***

***A Deus*** por ser meu porto seguro em todos os momentos e por todas as graças alcançadas. Obrigada por me tornar a cada dia uma mulher perseverante, forte e corajosa.

***A minha família***, por todo o apoio e incentivo em tudo que eu me proponho a fazer. Obrigada por se suporte em todos os momentos da minha vida.

***A Prof. Leônia***, pela confiança e incentivo. Obrigada por ser um exemplo de profissional e pessoa.

***Aos alunos do Lab. de Farmacologia do TGI*** composto pelo meu colega de mestrado o Matheus Marley, e as alunas de iniciação científica Vitória e Maria Luiza. E aos que já passaram pelo LFTGI também: Elaine e Edvaldo. Sem a ajuda de vocês nada disso seria possível.

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

***Aos Professores da UFPB*** pela contribuição para minha formação profissional.

***À banca examinadora*** composta pelos professores Márcia Piuvezam e Hemerson Iury 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.***

***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.***

***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 fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.*

*(Josué 1:9)*



*Resumo*

## **RESUMO**

O farnesol é um produto de origem natural, pertencente à classe dos sesquiterpenos, sendo encontrado nos óleos essenciais do capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e camomila (*Matricharia camomila*), em frutas cítricas e vegetais. O farnesol apresenta atividades antioxidante, anti-inflamatória, ansiolítica, antinociceptiva, anti-obesidade, antimicrobiana, antitumoral e antidiarreica. Entretanto, não existem estudos na literatura sobre sua atividade gastroprotetora, o que motivou a escolha dessa substância para esse estudo. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda não clínica e o efeito gastroprotetor do farnesol em modelos animais. Para isso foi realizada a avaliação comportamental, estimativa da dose letal 50% (DL50), análise do efeito gastroprotetor com diferentes modelos de indução aguda pelos agentes lesivos (etanol, estresse, AINEs e ligadura do piloro) em diferentes doses e determinação dos mecanismos de ação envolvidos nesse efeito (antissecretores, citoprotetores, antioxidantes e imunorregulatórios). Os resultados obtidos sugerem que o farnesol possui baixa toxicidade, com DL50 igual ou superior a 2.500 mg/kg conforme o guia nº 423 da OECD. No protocolo de úlcera induzida com etanol, o farnesol (25, 50, 100 e 200 mg/kg, v.o.) apresentou efeito gastroprotetor em 73%, 92%, 97% e 98%, respectivamente, reduziu o índice de lesão ulcerativa (ILU) ( $p < 0,001$ ) em comparação ao grupo controle (tween 80 5%). Nas lesões induzidas pelo estresse por contensão e frio, o farnesol nas mesmas doses, reduziu o ILU ( $p < 0,001$ ) em 29%, 38%, 54% e 54%, respectivamente, em comparação com o controle negativo. Na indução das lesões com AINEs (piroxicam), o farnesol (25, 50, 100 e 200 mg/kg, v.o.) reduziu o ILU em 10% ( $p < 0,05$ ), 23%, 46% e 51% ( $p < 0,001$ ) respectivamente, em comparação ao controle negativo. No protocolo experimental de ligadura do piloro (contensão do suco gástrico), o farnesol (100 mg/kg, v.o. e i.d.) reduziu o ILU ( $p < 0,001$ ) pela via oral e intraduodenal, não exerceu alterações no pH em ambas as vias e na concentração de  $H^+$  e volume do suco gástrico por via oral. Entretanto, reduziu a concentração de  $H^+$ , o volume do suco gástrico na via intraduodenal. A administração prévia dos bloqueadores NEM (bloqueador dos grupamentos sulfidrílicos), L-NAME (inibidor da síntese de NO) e glibenclamida (bloqueador do canal  $K_{ATP}$ ) e indometacina (inibidor da ciclo-oxigenase), reduziu a gastroproteção exercida pelo farnesol ( $p < 0,001$ ), sugerindo a participação dessas vias na sua atividade gastroprotetora. O farnesol aumentou o muco gástrico no tecido estomacal sugerindo a participação dessa via na sua atividade gastroprotetora. O farnesol também apresentou efeitos antioxidantes ao aumentar a concentração de GSH e a atividade da SOD e reduzir os níveis de MDA e a atividade da MPO, como também, demonstrou efeito imunomodulador ao reduzir as citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  e aumentar a citocina anti-inflamatória IL-10.

**PALAVRAS-CHAVE:** Farnesol; Sesquiterpeno; Úlcera Péptica; Toxicidade; Gastroproteção.

# *Abstract*

**PESSÔA, M.L.S EVALUATION OF THE GASTROPROTECTIVE ACTIVITY OF FARNESOL IN ANIMAL MODELS. 2023. 158 p. Masters dissertation. Postgraduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, CCS/UFPB.**

**ABSTRACT**

Farnesol is a product of natural origin, belonging to the class of sesquiterpenes, found in the essential oils of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and chamomile (*Matricaria camomila*), in citrus fruits and vegetables. Farnesol has antioxidant, anti-inflammatory, anxiolytic, antinociceptive, anti-obesity, antimicrobial, antitumor and antidiarrheal activities. However, there are no studies in the literature about its gastroprotective activity, which motivated the choice of this substance for this study. Thus, this work aimed to evaluate the non-clinical acute toxicity and the gastroprotective effect of farnesol in animal models. For this, a behavioral assessment was carried out, estimation of the 50% lethal dose (LD50), analysis of the gastroprotective effect with different models of acute induction by harmful agents (ethanol, stress, NSAIDs and pylorus ligation) at different doses and determination of the mechanisms of actions involved in this effect (antisecretory, cytoprotective, antioxidant and immunoregulatory). The results obtained suggest that farnesol has low toxicity, with an LD50 equal to or greater than 2,500 mg/kg according to OECD Guide No. 423. In the ethanol-induced ulcer protocol, farnesol (25, 50, 100 and 200 mg/kg, p.o.) showed a gastroprotective effect in 73%, 92%, 97% and 98%, respectively, reduced the ulcerative lesion index (ILU) ( $p < 0.001$ ) compared to the control group (tween 80 5%). In injuries induced by strain and cold stress, farnesol at the same doses reduced the ILU ( $p < 0.001$ ) by 29%, 38%, 54% and 54%, respectively, compared to the negative control. When inducing lesions with NSAIDs (piroxicam), farnesol (25, 50, 100 and 200 mg/kg, p.o.) reduced ILU by 10% ( $p < 0.05$ ), 23%, 46% and 51% ( $p < 0.001$ ) respectively, compared to the negative control. In the experimental protocol of pylorus ligation (gastric juice containment), farnesol (100 mg/kg, v.o. and i.d.) reduced ILU ( $p < 0.001$ ) by oral and intraduodenal routes, did not change pH in both routes and on H<sup>+</sup> concentration and volume of gastric juice orally. However, it reduced the concentration of H<sup>+</sup>, the volume of gastric juice in the intraduodenal route. Previous administration of NEM blockers (blocker of sulfhydryl groups), L-NAME (NO synthesis inhibitor) and glibenclamide (KATP channel blocker) and indomethacin (cyclooxygenase inhibitor) reduced the gastroprotection exerted by farnesol ( $p < 0.001$ ), suggesting the participation of these pathways in their gastroprotective activity. Farnesol increased gastric mucus in stomach tissue, suggesting the participation of this pathway in its gastroprotective activity. Farnesol also showed antioxidant effects by increasing the concentration of GSH and SOD activity and reducing MDA levels and MPO activity, as well as demonstrating an immunomodulatory effect by reducing the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  and increase the anti-inflammatory cytokine IL-10.

**KEYWORDS:** Farnesol; Sesquiterpene; Peptic Ulcer; Toxicity; Gastroprotection.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação anatômica do TGI humano .....	35
Figura 2 - Divisões anatômicas do estômago .....	36
Figura 3 - Glândulas gástricas .....	37
Figura 4 - Fase cefálica, gástrica e intestinal .....	38
Figura 5 - Célula parietal em repouso e após estímulo .....	40
Figura 6 - Produção de ácido clorídrico nas membranas apicais das células parietais das glândulas principais gástricas .....	41
Figura 7 - Regulação neuro-humoral da secreção de ácido gástrico .....	45
Figura 8 - Mecanismos de defesa da mucosa .....	46
Figura 9 - Mecanismos de ação de enzimas antioxidantes sobre espécies reativas do oxigênio .....	55
Figura 10 - Possíveis vias envolvidas no dano gastrointestinal induzido por AINEs .....	60
Figura 11 - Mecanismos de injúria e proteção gástrica .....	65
Figura 12 - Classes terapêuticas das úlceras pépticas .....	73
Figura 13 - Farnesol (3,7,11-Trimetil-2,6,10-dodecatrien-1-ol), estrutura química e fórmula molecular .....	75
Figura 14 - Animais utilizados em ensaios farmacológicos: (A) camundongo <i>Swiss</i> ( <i>Mus musculus</i> ) e (B) rato <i>Wistar</i> ( <i>Rattus norvegicus</i> ) .....	81
Figura 15 - Fluxograma Experimental do Estudo com o Farnesol .....	83
Figura 16 - Lupa OLYMPUS Optical TL3-SZ40(A) e estômago ulcerado de rato com etanol (B) para determinação do ALU .....	85
Figura 17 - Estômago ulcerado de rato com etanol (A) e quantificação da área de lesão ulcerativa (B) com o programa AVSoft Bioview Spectra 4.0® .....	85
Figura 18 - Esquema da Estimativa da DL50 do Farnesol .....	96
Figura 19 - Aspectos macroscópicos da mucosa gástrica de ratos Wistar pré-tratados (v.o.) com tween 80 5% (A); carbenoxolona 100 mg/kg (B); farnesol 25 mg/kg (C), 50 mg/kg (D), 100 mg/kg (E) e 200 mg/kg (F) no modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol .....	99
Figura 20 - Estômagos de ratos pré-tratados com solução salina 0,9% e tratados com Tween 80 5% (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B) e farnesol 100 mg/kg (C) ou pré-tratados com NEM e tratados com Tween 80 5% (D), carbenoxolona 100	

mg/kg (E) e farnesol 100 mg/kg (F) no modelo de úlceras por etanol para avaliação da participação dos grupamentos sulfídrilas .....	105
Figura 21 - Estômagos de ratos pré-tratados com solução salina 0,9% e tratados com Tween 80 5% (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B) e farnesol 100 mg/kg (C) ou pré-tratados com L-NAME e tratados com Tween 80 5% (D), carbenoxolona 100 mg/kg (E) e farnesol 100 mg/kg (F) no modelo de úlceras induzidas por etanol para avaliação da participação do óxido nítrico.....	107
Figura 22 - Estômagos de ratos pré-tratados com solução salina 0,9% e tratados com Tween 80 5% (A), diazóxido 3 mg/kg (B) e Farnesol 100 mg/kg (C) ou pré-tratados com glibenclamida e tratados com Tween 80 5%, diazóxido 3 mg/kg (E) e Farnesol 100 mg/kg (F) no modelo de úlceras induzidas por etanol para avaliação da participação dos canais de potássio sensíveis a ATP.....	108
Figura 23 - Estômagos de ratos pré-tratados com solução salina 0,9% e tratados com Tween 80 5% (A), Misoprostol 50 µg/kg (B) e Farnesol 100 mg/kg (C) ou pré-tratados com Indometacina e tratados com Tween 80 5%, Misoprostol 50 µg/kg (E) e Farnesol 100 mg/kg (F) no modelo de úlceras induzidas por etanol para avaliação da participação das prostaglandinas .....	111
Figura 24 - Representação esquemática das atividades farmacológicas encontradas para o farnesol .....	135

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e farnesol em úlceras gástricas induzidas pelo etanol em ratos.....	98
Gráfico 2 - Efeito da administração oral da ranitidina e do farnesol em úlceras gástricas induzidas pelo estresse (imobilização e frio) em camundongos em <i>swiss</i> machos .....	100
Gráfico 3 - Efeito da administração oral da ranitidina e farnesol em úlceras gástricas induzidas por anti-inflamatório não esteroidal (Piroxicam) em camundongos.....	101
Gráfico 4 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e farnesol após pré-tratamento com salina e NEM (i.p.) em úlcera gástrica induzida por etanol em ratos .....	104
Gráfico 5 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e Farnesol após pré-tratamento com salina e L-NAME (i.p.) em úlcera gástrica induzida por etanol em ratos .....	106
Gráfico 6 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e farnesol após pré-tratamento com salina e Glibenclamida (i.p.) em úlcera gástrica induzida por etanol em ratos.....	108
Gráfico 7 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e farnesol na concentração de muco aderido à mucosa gástrica após ligadura do piloro	109
Gráfico 8 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e farnesol após pré-tratamento com salina e Indometacina (i.p.) em úlcera gástrica induzida por etanol em ratos.....	110
Gráfico 9 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e farnesol nos níveis de GSH a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos .....	112
Gráfico 10 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e farnesol nos níveis de MDA a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos .....	113
Gráfico 11 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e farnesol nos níveis de MPO a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos .....	114

<b>Gráfico 12 - Efeito da carbenoxolona e do farnesol sobre a atividade da enzima superóxido dismutase a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos.....</b>	<b>115</b>
<b>Gráfico 13 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e farnesol nos níveis de IL-1<math>\beta</math>, partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos .....</b>	<b>116</b>
<b>Gráfico 14 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e farnesol nos níveis de TNF<math>\alpha</math>, partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos .....</b>	<b>117</b>
<b>Gráfico 15 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e farnesol nos níveis de IL-6, partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos</b>	<b>117</b>
<b>Gráfico 16 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e farnesol nos níveis de IL-10, partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos .....</b>	<b>118</b>



## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1 - Efeito da administração oral do farnesol na evolução ponderal, índice de órgãos, consumo de água e ração em camundongos Swiss machos .....</b>	<b>97</b>
<b>Tabela 2 - Efeito da administração oral e intraduodenal da ranitidina e farnesol em úlceras gástricas induzidas por ligadura do piloro em ratos.....</b>	<b>102</b>
<b>Tabela 3 - Efeito da administração oral e intraduodenal da ranitidina e farnesol nos parâmetros do conteúdo gástrico após ligadura do piloro.....</b>	<b>103</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

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

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

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

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

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

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>32</b>
1.1 Considerações Gerais .....	32
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>35</b>
2.1 Anatomofisiologia do trato gastrointestinal .....	35
2.1. Secreção Ácida Gástrica .....	38
2.1.2 Células Parietais .....	39
2.1.3 Mecanismo de secreção ácida gástrica.....	40
2.1.4 Regulação neuro-humoral da secreção de ácido gástrico.....	42
2.1.5 Mecanismos de defesa da mucosa .....	46
2.1.6 Fatores pré-epiteliais .....	47
2.1.7 Fatores epiteliais .....	48
2.1.8 Fatores sub-epiteliais .....	49
2.1.8.1 Fluxo sanguíneo .....	49
2.1.8.2 Inervação Sensorial .....	50
2.1.9 Fatores pós- epiteliais .....	50
2.1.9.1 Óxido Nítrico e Canais de potássio sensíveis a ATP ( $K_{ATP}$ ) .....	50
2.1.9.2 Prostaglandinas.....	52
2.1.9.3 Grupamentos sulfidríla (SHs) .....	53
2.1.9.4 Sistema antioxidante .....	54
2.1.9.5 Citocinas.....	56
2.2 Fatores agressores da mucosa .....	58
2.2.1 Etanol .....	58
2.2.2 Anti-inflamatórios Não Esteroidais (AINEs) .....	59
2.2.3 Estresse .....	60
2.2.4 <i>Helicobacter pylori</i> ( <i>H. pylori</i> ) .....	61
2.3 Microbiota.....	62
2.4 Úlcera Péptica .....	64
2.4.1 Etiologia e Fisiopatologia.....	64
2.4.2 Epidemiologia.....	65
2.4.3 Aspectos Clínicos .....	67
2.4.4 Terapêutica da úlcera péptica .....	68

2.5 Produtos Naturais.....	74
2.5.1 Terpenos .....	74
2.5.2 Farnesol .....	75
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>78</b>
3.1 Objetivo geral .....	78
3.2 Objetivos específicos:.....	78
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>80</b>
4.1 Material.....	80
4.1.1 Local da Pesquisa .....	80
4.1.2 Substância Seleccionada para Estudo: Farnesol.....	80
4.1.3 Animais.....	81
4.1.4 Substâncias Utilizadas .....	82
4.2 Métodos.....	83
4.2.1 Ensaio Toxicológico Não-Clínico Oral Agudo.....	83
4.2.2 Avaliação Da Atividade Gastroprotetora.....	84
4.2.2.1 Protocolos de Indução Aguda de Úlcera Gástrica .....	86
4.2.2.1.1 Úlcera Gástrica Induzida por Etanol Absoluto .....	86
4.2.2.1.2 Úlcera Gástrica Induzida por Estresse (contensão e frio) .....	86
4.2.2.1.3 Úlcera Gástrica Induzida por Anti-inflamatório Não Esteroidal (AINE) .....	87
4.2.2.1.4 Úlcera Gástrica Induzida por Contensão do Suco Gástrico (ligadura do piloro) .....	87
4.2.3 Investigação dos Mecanismos de Ação Envolvidos na Atividade Gastroprotetora .....	87
4.2.3.1 Mecanismo Antissecretório ou Neutralizante.....	88
4.2.3.1.1 Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos do Suco Gástrico após Ligadura do Piloro (v.o./i.d.) (SHAY, 1945) .....	88
4.2.3.2 Mecanismos Citoprotetores.....	89
4.2.3.2.1 Avaliação da Participação dos Grupamentos Sulfidrílicos (SHs) na Gastroproteção (MATSUDA et al., 1999) .....	89
4.2.3.2.2 Avaliação da Participação do Óxido Nítrico (NO) na Gastroproteção (SIKIRIĆ et al., 1997) .....	89
4.2.3.2.3 Avaliação da Participação dos Canais de Potássio ATP-dependentes (KATP) na Gastroproteção (OLINDA et al., 2008).....	89

4.2.3.2.4 Determinação da Concentração de Muco Aderido à Parede Gástrica (RAFATULLAH et al., 1990) com modificações.....	90
4.2.3.2.5 Avaliação da Participação das Prostaglandinas (PGs) na Gastroproteção (RODRIGUES et al., 2010).....	91
4.2.3.3 Atividade Antioxidante .....	91
4.2.3.3.1 Determinação dos Níveis de Glutathione Reduzida (GSH) (FAURE; LAFOND, 1995) .....	91
4.2.3.3.2 Determinação dos Níveis de Malondialdeído (MDA) (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990) – adaptado.....	92
4.2.3.3.3 Determinação da Atividade da Mieloperoxidase (MPO) (KRAWISZ et al., 1984) .....	92
4.2.3.3.4 Determinação da Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) (SUN; OBERLEY; LI, 1988) .....	93
4.2.3.4 Mecanismos Imunorregulatórios.....	93
4.2.3.4.1 Determinação das Interleucinas (KENDALL et al., 1983) .....	93
4.3 Análise Estatística .....	94
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>96</b>
5.1 Ensaio Toxicológico Não-Clínico Oral Agudo .....	96
5.2 Avaliação da Atividade Gastroprotetora do Farnesol.....	97
5.2.1 Úlceras Gástricas Induzidas por Etanol.....	97
5.2.2 Úlceras Gástricas Induzidas pelo Estresse (imobilização e frio).....	99
5.2.3 Úlceras Gástricas Induzidas por Anti-inflamatório Não Esteroidal (Piroxicam) .....	100
5.2.4 Úlceras Gástricas Induzidas por Contensão do Suco Gástrico (ligadura do piloro) .....	101
5.3 Avaliação dos Mecanismos de Ação Envolvidos no Efeito Gastroprotetor do Farnesol .....	102
5.3.1 Mecanismo Antissecretório ou Neutralizante.....	102
5.3.1.1 Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos Contensão do Suco Gástrico (ligadura do piloro) .....	102
5.3.2 Mecanismos Citoprotetores.....	103
5.3.2.1 Avaliação da Participação dos Grupamentos Sulfidríla (SHs) na Atividade Gastroprotetora do Farnesol .....	103



5.3.2.2 Avaliação da Participação do Óxido Nítrico (NO) na Atividade Gastroprotetora do Farnesol .....	105
5.3.2.3 Avaliação da Participação dos Canais para Íons Potássio sensíveis ao ATP (K <sub>ATP</sub> ) na Atividade Gastroprotetora do Farnesol.....	107
5.3.2.4 Quantificação do Muco Aderido à Mucosa Gástrica Após Ligadura do Píloro	109
5.3.2.5 Avaliação da Participação das Prostaglandinas no Efeito Gastroprotetor do Farnesol .....	109
5.3.3 Atividade Antioxidante .....	111
5.3.3.1 Determinação dos Níveis de Grupamentos Sulfidrílicos Não Proteicos (GSH)	111
5.3.3.2 Determinação dos Níveis de Malondialdeído (MDA) .....	112
5.3.3.3 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO).....	113
5.3.3.4 Determinação da Atividade da Superóxido Dismutase (SOD).....	114
5.3.4 Investigação da Atividade Imunorregulatória .....	115
5.3.4.1 Quantificação das Citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 Teciduais .....	115
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	120
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	134
<b>8. PERSPECTIVAS</b> .....	137
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	139
<b>ANEXOS</b> .....	156

# ***Introdução***

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Considerações Gerais

As afecções do gastrointestinal (GI), estão entre os problemas de saúde mais prevalentes em todo o mundo. Dentre essas afecções destacam-se as úlceras pépticas, as doenças inflamatórias intestinais e a diarreia, que constituem um conjunto de doenças de natureza debilitante e recorrente com alto índice de complicações (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, com comprometimento da funcionalidade e integridade das células lesionadas, possuem origem multifatorial e complexa, resultantes de alterações no equilíbrio entre os fatores protetores e agressores da mucosa GI (LANAS; CHAN, 2017; WOODS; CAREY, 2017; ARAGÃO et al., 2018).

A úlcera péptica é considerada um problema de saúde pública, acomete cerca de 10% da população mundial em algum momento de suas vidas, representando custos ao sistema de saúde, bem como ao indivíduo, estando associada à perda de qualidade de vida e de produtividade no trabalho dos indivíduos acometidos (LANAS; CHAN, 2017; ZHOU et al., 2020).

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). Entretanto, a terapêutica disponível até o momento apresenta inúmeros fatores limitantes, a exemplo de alta taxa de recidiva da doença, efeitos colaterais e alto custo (tratamento e internações), o que tem contribuído para a busca de novas alternativas terapêuticas (BOEING et al., 2016; CLARKE et al., 2022).

Os produtos naturais em especial as plantas medicinais, possuem propriedades curativas e são amplamente utilizadas para o tratamento de diversas afecções, sendo uma importante fonte de matérias-primas compostas de moléculas bioativas com grande potencial terapêutico (DIAS et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2017).

Diversos compostos isolados de plantas medicinais têm sido utilizados como matéria-prima para descoberta de novos fármacos ou ferramentas farmacológicas,

como alcaloides, saponinas, glicosídeos, flavonoides, taninos, compostos fenólicos, fenilpropanóides e terpenos (DUTRA et al., 2016).

Os terpenos consistem em uma classe de metabólitos secundários presentes principalmente nos óleos essenciais das plantas medicinais e apresentam atividades antioxidante, analgésica, anti-inflamatória, antimicrobiana e gastroprotetora (SOUSA, 2013; GUIMARÃES et al., 2013; ASBAHANI et al., 2015).

É nesse contexto que o presente trabalho avaliou a atividade gastroprotetora do farnesol, um produto de origem natural, pertencente à classe dos sesquiterpenos, amplamente encontrado na própolis, nos óleos essenciais de plantas aromáticas como capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e camomila (*Matricharia camomila*), em frutas cítricas como pêssegos e vegetais como tomates e milho (DUNCAN; ARCHER, 2008; KHAN; SULTANA, 2011; KU; LIN, 2015; ANDRÉ, 2017). Esta substância apresenta atividade antioxidante (KHAN; SULTANA, 2011), anti-inflamatória (KU; LIN, 2015), ansiolítica, antinociceptiva (SHAHNOURI et al., 2016), anti-obesidade (KIM et al., 2017), antimicrobiana (KIM et al., 2018) antitumoral (WANG, 2018) e antidiarreica (DA COSTA et al., 2020). Entretanto, não existe estudos sobre sua atividade gastroprotetora, o que motivou a escolha dessa substância para o desenvolvimento desse estudo, almejando o desenvolvimento de alternativas terapêuticas de prevenção, tratamento e cura da úlcera gástrica.

# ***Referencial Teórico***

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

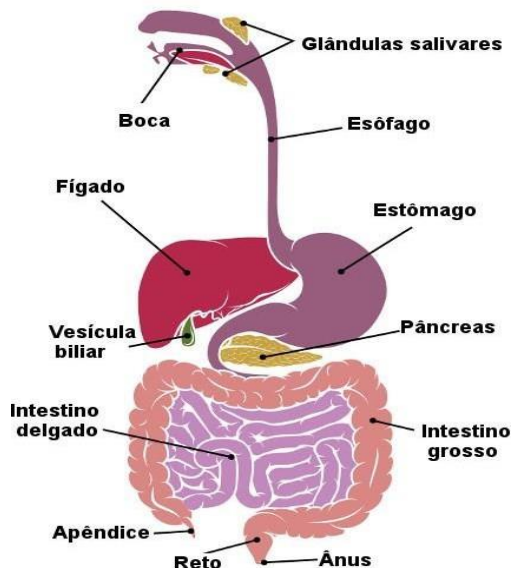
### 2.1 Anatomofisiologia do trato gastrointestinal

O trato gastrointestinal (TGI) é considerado um sistema complexo, composto por órgãos responsáveis pela digestão e metabolismo dos alimentos. O TGI consiste em um tubo muscular oco a partir da cavidade oral, continuando pela faringe, esôfago, estômago e intestinos até o reto e ânus (DUMIC et al., 2019).

Os principais órgãos do TGI são boca, esôfago, estômago, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e intestino grosso (cécum, cólon, reto e ânus), que conta também com órgãos acessórios como as glândulas salivares, pâncreas, fígado e vesícula biliar (**Figura 1**) (CAMPBELL, 2014; DUMIC et al., 2019).

A função do TGI é digerir os nutrientes ingeridos, por meio da secreção de enzimas digestivas, e absorver os nutrientes essenciais (carboidratos, proteínas, gorduras, minerais e vitaminas) (MEERVELD; JOHNSON; GRUNDY, 2017).

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



Fonte: Adaptado de DAVANÇO (2021)

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

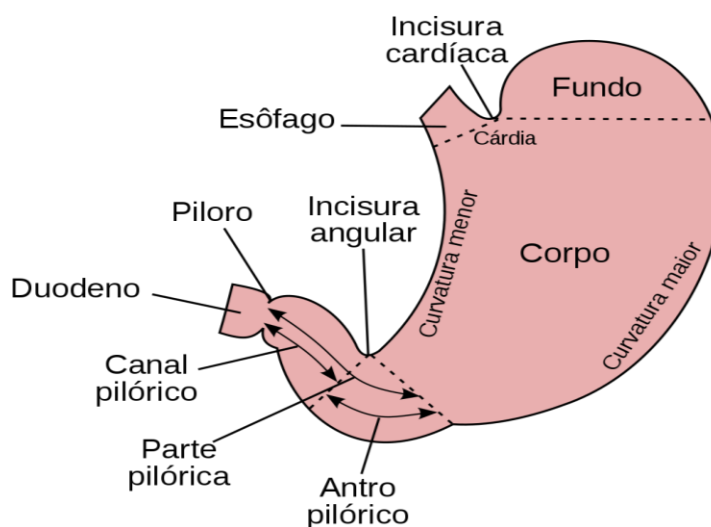
O estômago é o órgão central da degradação do conteúdo alimentar caracterizado por ser um órgão dilatado, situado na cavidade abdominal, abaixo do

diafragma; em continuação ao esôfago e precedendo o intestino, com capacidade contrátil (movimentos peristálticos) e uma mecânica digestiva (ENGEVIK et al., 2020).

Anatomicamente o compartimento estomacal é dividido, principalmente em cárdia (porção inicial interligada ao esôfago), corpo e fundo (segmentos com maior distribuição), e as porções distais, antro e piloro (**Figura 2**). Ele também apresenta uma curvatura maior, na margem esquerda gástrica, e uma curvatura menor (LANDA et al., 2019). A cárdia fica próxima a região da junção gastroesofágica e suas glândulas secretam principalmente muco. O corpo e fundo compreendem cerca de 80% do estômago e contém as glândulas oxínticas (CHOI et al., 2014).

As glândulas oxínticas contêm um grande número de células parietais secretoras de ácido e são caracterizadas pela presença de células enteroendócrinas secretoras de grelina e células enterocromafins semelhantes (ECL) secretoras de histamina, células D secretoras de somatostatina e algumas células enterocromafins (EC) secretoras de serotonina (**Figura 3**) (ENGEVIK et al., 2020).

**Figura 2 - Divisões anatômicas do estômago**



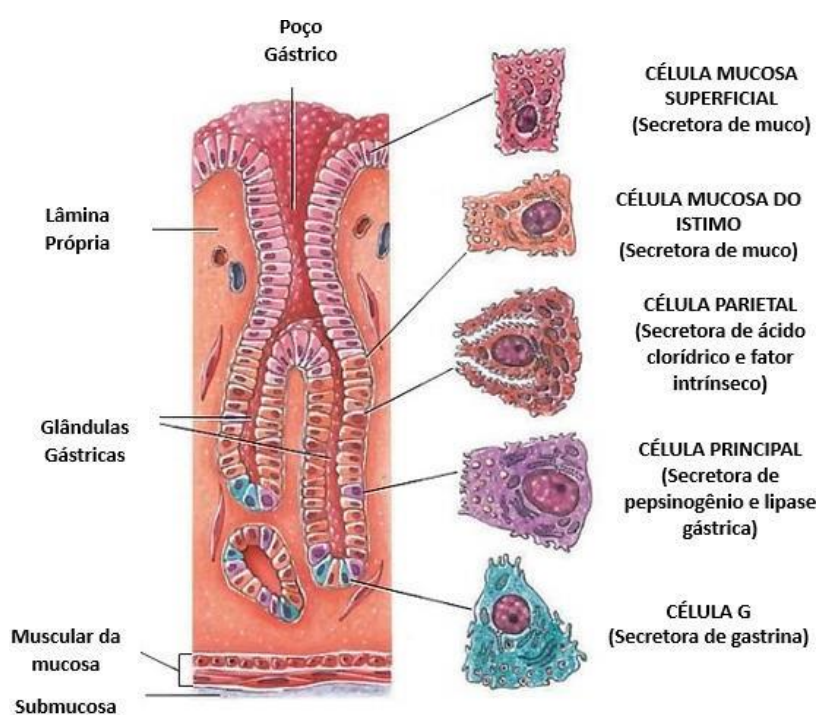
Fonte: Adaptado de SHEN; FOX, 2013.

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

O antro é a região localizada próximo ao esfíncter pilórico, que separa o estômago do duodeno, e contém glândulas pilóricas, presença de células G, células D e células EC (SHEH; FOX, 2013). É importante considerar que, embora a separação discreta das glândulas oxínticas do corpo e das glândulas antrais secretoras de muco

seja bem demarcada no estômago de roedores e coelhos, o antro humano geralmente contém uma mistura de glândulas do tipo oxíntico e antral. As glândulas do tipo oxíntico no antro contêm células parietais e células principais, mas em números significativamente reduzidos em comparação com as glândulas do corpo (CHOI et al., 2018; ENGEVIK et al., 2020). Já a sua constituição histológica é formada por mucosa, submucosa, camada muscular externa e serosa (SOYBEL et al., 2005; RAMSAY, CARR, 2011).

**Figura 3 - Glândulas gástricas**



Fonte: Adaptado de KNIGHT et al. (2019)

Legenda: As glândulas gástricas podem ser divididas em três partes, chamadas de istmo, colo e base, onde estão presentes diferentes tipos de células.

A digestão é a principal função do estômago. Para isso, a mucosa e os músculos estomacais, são responsáveis pelas secreções gástricas para dissolver o alimento e pelas contrações para triturar e empurrar o alimento até o esfíncter pilórico (SENSOY, 2021). O suco gástrico, secretado pelo estômago, é composto principalmente por ácido clorídrico e por enzimas proteolíticas, que fornecem o ambiente necessário para a desnaturação de proteínas e facilitam a absorção de nutrientes. Esse ambiente ácido também desempenha um papel importante auxiliando

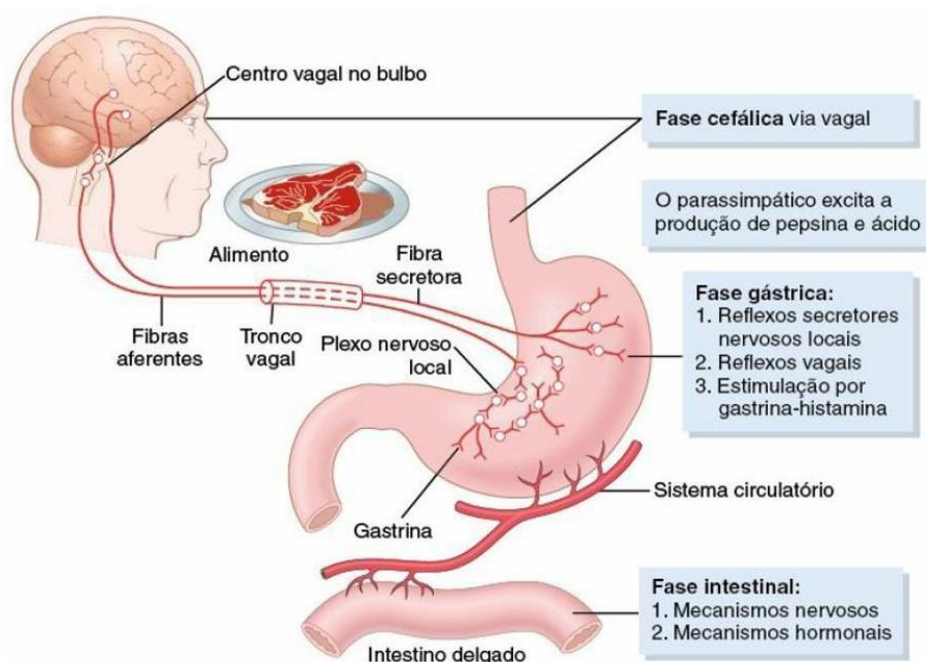


na eliminação de microrganismos patogênicos que podem ser ingeridos (SHEH; FOX, 2013; SENSOY, 2021).

### 2.1.1 Secreção Ácida Gástrica

A mucosa gástrica secreta de 1,2 a 1,5 litros de suco gástrico por dia. Durante a digestão, o pH do lúmen estomacal alcança valores entre 1 e 2 e isso requer células especializadas. As células parietais são as responsáveis por produzir e secretar grandes quantidades de íons  $\text{Cl}^-$  e  $\text{H}^+$  e por manter o ambiente ácido do estômago (SCHUBERT, 2010). O processo de secreção gástrica consiste em três fases: cefálica, gástrica e intestinal. A fase cefálica começa antes que o alimento chegue ao estômago, sendo ativada pelos sentidos da visão, olfato e paladar. (**Figura 4**). A fase gástrica se inicia com a presença dos alimentos, sendo responsável por 70% da secreção. A fase intestinal começa quando o alimento chega ao duodeno, envolvendo principalmente processos inibitórios da secreção (SENSOY, 2021).

**Figura 4 - Fase cefálica, gástrica e intestinal**



Fonte: Adaptado de VELLA; JOSEPH (2017)

Legenda: A fase cefálica da secreção gástrica inicia antes da entrada do alimento no estômago, quando o alimento entra em contato com a mucosa gástrica inicia-se a fase gástrica e a fase intestinal começa quando o alimento entra no duodeno (parte superior do intestino delgado).

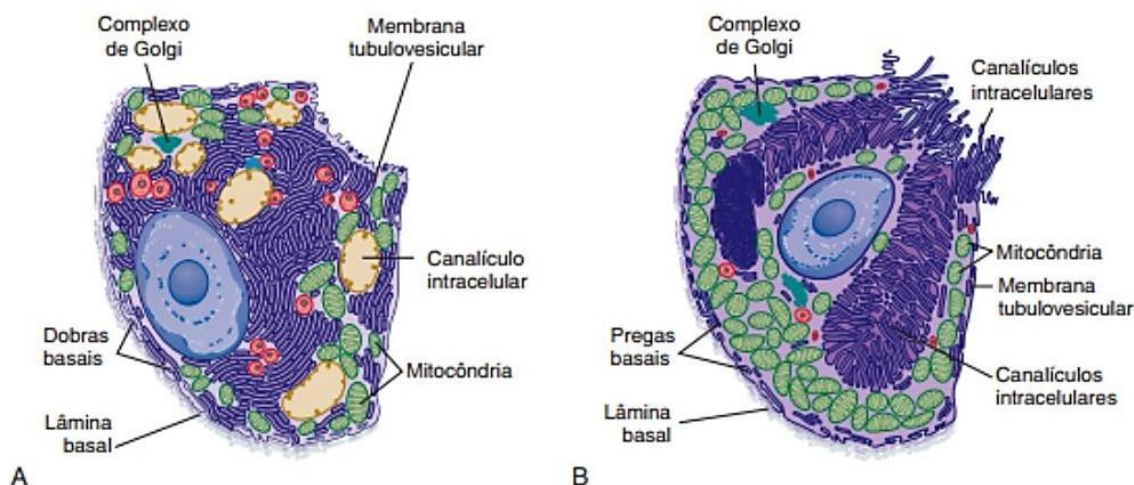
### 2.1.2 Células Parietais

As células parietais apresentam invaginações na membrana plasmática apical que formam os canalículos intracelulares revestidos por microvilosidades, onde será secretado o HCl. Os transportadores  $H^+/K^+$  ATPase (bomba de prótons) são elementos indispensáveis para a secreção de HCl e se encontram em numerosas vesículas tubulares localizadas principalmente na região apical da célula, logo abaixo da membrana plasmática. Quando ocorre um estímulo secretor, o sistema túbulo-vesicular se funde com os canalículos presentes na membrana plasmática aumentando a superfície de secreção e disponibilizando mais bombas  $H^+/K^+$  e canais de cloreto (SENSOY, 2021). Quando o estímulo secretor cessa, o sistema de vesículas tubulares se refaz no citoplasma e os canalículos diminuem sua superfície (**Figura 5**). O citoplasma é rico em mitocôndrias, indicando que a produção de HCl requer considerável uso de energia, já que o íon hidrogênio é secretado contra o gradiente de concentração ( $pH$  da célula=7 x  $pH$  do lúmen =1 a 2) (SHEH; FOX, 2013).

Um bom equilíbrio de ativadores e inibidores da secreção ácida mediada por células parietais é necessário para garantir a digestão adequada dos alimentos, evitando danos à mucosa gástrica e duodenal. Como resultado, a secreção das células parietais é regulada por vários mecanismos, incluindo o nervo vago, gastrina, histamina, grelina, somatostatina, peptídeo 1 semelhante ao glucagon e outros agonistas e antagonistas (EL-SERAG et al., 2014; SENSOY, 2021).

A  $H^+-K^+$ -ATPase expressa nas células parietais regula a troca de  $H^+$  citoplasmático por  $K^+$  extracelular. O  $H^+$  secretado no lúmen gástrico pela bomba de prótons combina-se com o  $Cl^-$  luminal para formar o ácido gástrico, HCl. A inibição da  $H^+-K^+$ -ATPase é o método mais efetivo de controle da secreção de ácido gástrico prejudicial. Além de sua capacidade única de secretar ácido gástrico, as células parietais também desempenham um papel importante na homeostase da mucosa gástrica por meio da secreção de múltiplas moléculas de fator de crescimento. A célula parietal gástrica, portanto, desempenha importantes papéis na secreção e proteção gástrica, bem como na coordenação do reparo fisiológico (BITZIOU; PATEL, 2012).

**Figura 5 - Célula parietal em repouso e após estímulo**



Fonte: Adaptado de HURTADO (2020)

Legenda: A: Célula parietal em repouso, mostrando seu aparato tubulovesicular no citoplasma e os canaliculos intracelulares. B: Célula parietal ativada secretando ácido. As tubulovesículas se fundiram com as membranas dos canaliculos intracelulares, que estão agora abertos para o lúmen da glândula e alinhados com microvilosidades.

### 2.1.3 Mecanismo de secreção ácida gástrica

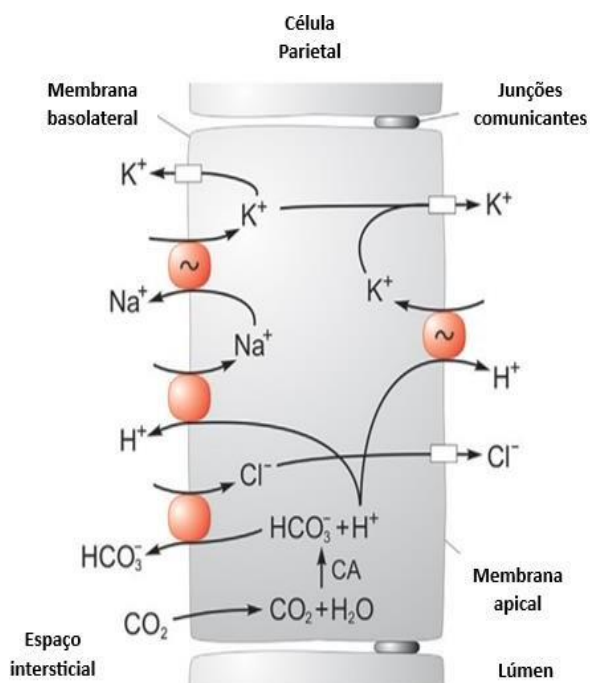
O mecanismo básico para a formação do ácido clorídrico envolve várias etapas. O íon cloreto é transportado do citoplasma da célula parietal para o lúmen do canalículo e os íons sódio são transportados do canalículo para o citoplasma da célula parietal. Ambos os transportes são ativos e em conjunto criam um potencial negativo de - 40 a - 70 milivolts no canalículo, o que promove a difusão de íons carregados positivamente do citoplasma para o interior do canalículo, mais especificamente  $K^+$  e um pequeno número de  $Na^+$ , formando cloreto de potássio e quantidades menores de cloreto de sódio no interior do canalículo. Íons hidrogênio, decorrentes da dissociação da molécula de água em  $H^+$  e  $OH^-$  (hidroxila) no citoplasma celular, são ativamente secretados no canalículo em troca de  $K^+$  (GUYTON; HALL, 2011).

Este processo de troca ativa é catalisado pela bomba de prótons  $H^+ K^+$  - ATPase, que, no estado de repouso está na sua forma inativa dentro de túbulos-vesículas citoplasmáticas. A estimulação da secreção gástrica, no entanto, resulta no aumento intracelular de AMPc e na sinalização dependente de cálcio que promovem

o recrutamento e fusão dessas vesículas com a membrana apical da célula e o início da troca de íons (SCHUBERT, 2010; CHU; SCHUBERT, 2012; SCHUBERT, 2015).

As proteínas envolvidas na translocação e fusão da bomba de prótons  $H^+ K^+$  - ATPase incluem a miosina, actina, Rab GTPases e ezrina. Por outro lado, a cessação do estímulo secretório promove a recuperação e internalização das vesículas (SCHUBERT, 2010, 2014, 2015; CHU; SCHUBERT, 2012). Assim, em decorrência dessa troca iônica, grande parte dos íons  $K^+$  e  $Na^+$  que foi difundido no canalículo é reabsorvida para o citoplasma, e os íons  $H^+$  tomam seu lugar no canalículo. Esse íon  $H^+$  associa-se com os íons  $Cl^-$  presentes no canalículo, gerando uma solução forte de ácido clorídrico, que é, então, secretado para o exterior através da abertura do canalículo no lúmen da glândula (**Figura 6**) (GUYTON; HALL, 2011).

**Figura 6 - Produção de ácido clorídrico nas membranas apicais das células parietais das glândulas principais gástricas**



Fonte: Adaptado de BLANCO (2017)

Legenda: CA: Anidrase carbônica

Devido aos íons extras secretados no canalículo, a água também passa por osmose para o interior deste. Assim, além do ácido clorídrico, em uma concentração aproximada de 150 a 160 mEq/L, a secreção final do canalículo contém água, cloreto

de potássio a uma concentração de 15 mEq/L e uma pequena quantidade de cloreto de sódio. Por fim, ocorre a formação de íons bicarbonato, em decorrência da interação do dióxido de carbono, formado durante o metabolismo celular ou proveniente da entrada na célula pelo sangue, com íons hidroxila sob a influência da anidrase carbônica. Os íons bicarbonato difundem-se para fora do citoplasma para o líquido extracelular em troca de íons cloreto, que são secretados para o canalículo (GUYTON; HALL, 2011).

### **2.1.4 Regulação neuro-humoral da secreção ácida gástrica**

O ácido clorídrico secretado pelas células parietais gástricas gera o ambiente fortemente ácido do lúmen gástrico ( $\text{pH} < 2$ ), que mata bactérias derivadas de alimentos, facilita a digestão e promove a absorção de minerais, incluindo fosfato, cálcio e ferro. Níveis elevados de secreção ácida também representam uma substância potencialmente nociva à integridade da mucosa gástrica. Assim, a mucosa gástrica deve manter um equilíbrio entre a secreção ácida e os mecanismos de proteção da mucosa. O sistema neuroendócrino extrínseco e intrínseco do estômago equilibra as influências dos agonistas e dos antagonistas para manter uma faixa segura de secreção ácida (BITZIOU; PATEL, 2012; SAM; BORDONI, 2022).

A secreção gástrica pode ser regulada por vários mecanismos como: mecanismos parácrinos (histamina), endócrinos (gastrina) e neurais (acetilcolina). Esses mecanismos envolvem a intercomunicação de células parietais com células especializadas da mucosa gástrica (células enterocromafins - ECL no corpo/fundo do estômago, células G no antro e células D no antro e corpo/fundo do estômago) e neurônios (ARIN et al., 2017).

Os moduladores da secreção ácida gástrica podem atuar estimulando ou inibindo a secreção. A acetilcolina, gastrina e histamina são as principais moléculas que atuam estimulando a bomba de prótons e consequentemente controlando a secreção de ácido clorídrico pela célula parietal. Já os inibitórios são a somatostatina, prostaglandinas E2 e I2 e polipeptídeo gástrico inibitório (GIP) (BERRIDGE, 2014; SCHUBERT, 2014; SABER; BAYUMI, 2016). As moléculas estimulatórias interagem com receptores presentes nas células parietais associados a duas grandes vias de transdução de sinal: a via dependente do monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), na qual a histamina age, e a via de sinalização dependente de cálcio, em que agem

acetilcolina e gastrina. As duas vias ativam as proteínas quinases e resultam na ativação da bomba de prótons ( $H^+ / K^+ -ATPase$ ) (BITZIOU; PATEL, 2012).

A acetilcolina possui diversas funções no cérebro e em outros sistemas orgânicos do corpo. Este neurotransmissor é liberado por fibras pós-sinápticas de neurônios do sistema nervoso central (SNC) e entérico principalmente durante a fase cefálica da secreção, estimulando a secreção gástrica por via direta e indireta. A estimulação direta, ocorre via receptor muscarínico M3 na célula parietal, os quais estão acoplados a proteína Gq/11 na superfície das células parietais, as quais ativam a via da fosfolipase C beta-1 ( $PLC-\beta 1$ ). Esta por sua vez hidrolisa fosfolipídios de membrana, produzindo ( $IP_3$ ) e ( $DAG$ ). O  $IP_3$  promove aumento nos níveis intracelulares de cálcio que juntamente com o  $DAG$  ativam a ( $PKC$ ), que regula a fusão das túbulo-vesículas contendo a  $H^+ - K^+ -ATPase$  à membrana apical das células parietais. O aumento das concentrações de  $Ca^{2+}$  é o estímulo para a translocação das vesículas contendo a  $H^+ - K^+ -ATPase$ , inativa, para a região apical das células parietais tornando-a ativa (**Figura 7**) (SCHUBERT, 2014; SABER; BAYUMI, 2016).

Além disso, também age indiretamente, via receptor M1 nas células enterocromafins (ECL) estimulando a secreção de histamina. Os receptores muscarínicos M2 e M4 também estimulam de forma indireta a secreção gástrica por meio da inibição da secreção de somatostatina, um hormônio inibidor da secreção gástrica que age principalmente durante a fase intestinal, inibindo a secreção de gastrina e de histamina e, desta forma, reduzindo a secreção ácida (SAM; BORDONI, 2022).

A gastrina é o principal hormônio envolvido na indução da secreção ácida gástrica, ela age como um estimulador endógeno que também pode induzir a secreção por mecanismos diretos e mecanismos indiretos. A gastrina é liberada tanto durante a fase cefálica, como durante a fase gástrica (CZINN; BLANCHARD, 2011). Este hormônio é secretado pelas células G do estômago e atua de maneira direta ligando-se a receptores de colecistocinina tipo 2 (CCK-2) nas células parietais, e de maneira indireta quando se liga a receptores CCK-2 encontrados nas células enterocromafins (ECL). Esta ligação nas células ECL estimula os receptores a secretarem histamina e induz a secreção de ácido clorídrico pelas células parietais, sendo um dos principais mecanismos envolvidos na secreção de suco gástrico (FOURMY; GIGOUX; REUBI, 2011).

Outra molécula reguladora é a histamina, que medeia inúmeras funções no organismo através de seus quatro subtipos de receptores acoplados à proteína G transmembrana. O receptor de histamina do tipo 2 ( $H_2$ ) está envolvido na produção de ácido gástrico, sendo esse receptor o alvo farmacológico de diversos medicamentos (ALONSO et al., 2015).

A secreção de histamina estimulada pela gastrina é o principal mecanismo de secreção gástrica. A histamina fica armazenada em vesículas secretoras presentes nas células ECL e quando esta célula é estimulada pela gastrina, ocorre a sua liberação e posterior ligação aos receptores  $H_2$  presentes nas células parietais (FALUS; POS; DARVAS, 2011). Este hormônio atuará de forma parácrina nos receptores  $H_2$  (acoplados a proteína  $G_s$ ) das células parietais, ativando a via ciclase de adenilil (AC) para gerar adenosina-3',5'-monofosfato cíclico (AMPC). Este por sua vez, ativa a proteína cinase dependente de AMPC (PKA) que irá fosforilar alvos como ezerina, Lasp-1 e parcorina, que estão envolvidas no transporte e fusão das vesículas contendo a  $H^+$ -  $K^+$ ATPase para a região apical. Após fundir-se com a membrana apical da célula parietal a  $H^+$ -  $K^+$ ATPase encontra-se ativa para promover a extrusão do íon  $H^+$ , e, consequentemente, a formação do ácido clorídrico (HCl) (**Figura 7**) (ZHAO; CHEN, 2012; WALDUM; HAUSO; FOSSMARK; 2014; BERRIDGE, 2014; SCHUBERT, 2014; ALONSO et al., 2015).

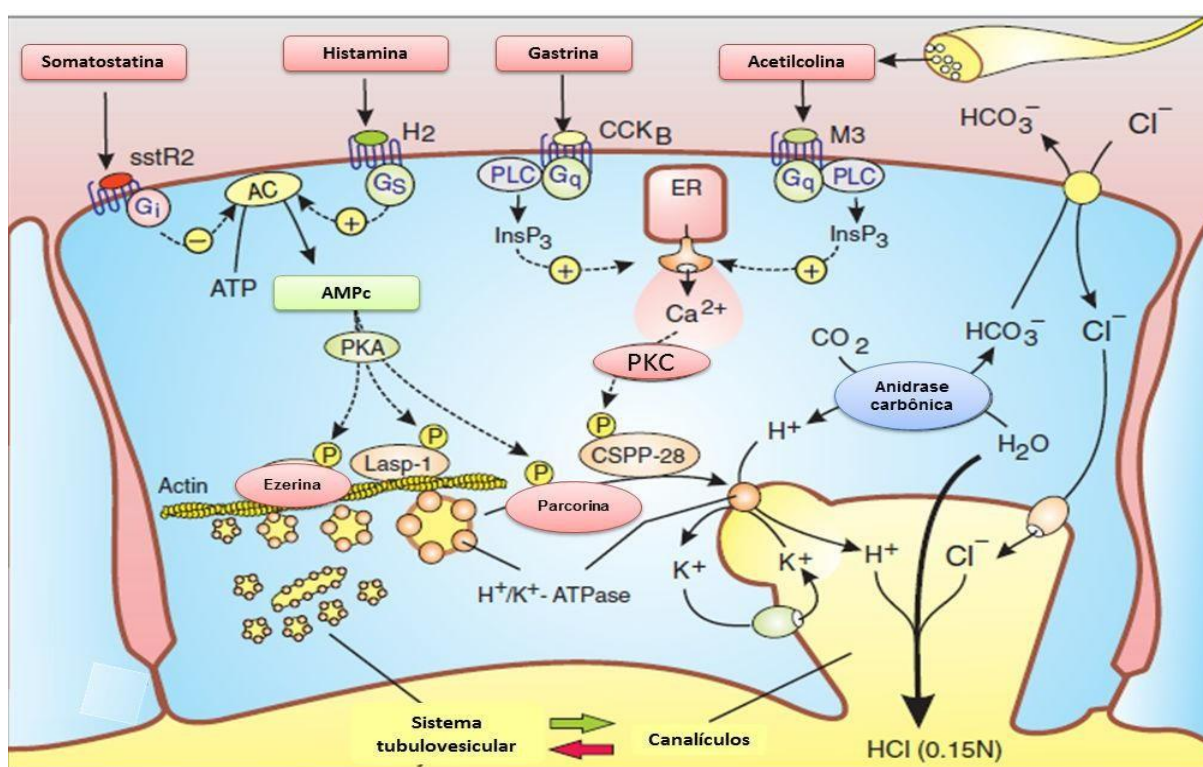
De forma geral, a bomba de prótons ( $H^+$  / $K^+$  -ATPase) pode ser ativada de três maneiras: através da ligação da acetilcolina a receptores M3, por meio da ligação de gastrina a receptores CCK2 e da ligação de histamina aos receptores  $H_2$  (IMHANN et al., 2016; SANTOS; RAO, 2016). A meia-vida da bomba prótons é de apenas 50 horas e estima-se que aproximadamente 25% das bombas de prótons são sintetizadas todos os dias (IMHANN et al., 2016).

A inibição da secreção ácida gástrica inicia-se pelos próprios mecanismos que a estimulam. A gastrina além de atuar como um dos maiores secretagogos, age nas células D induzindo a liberação de somatostatina, inibindo a secreção de gastrina. As células D possuem grandes projeções citoplasmáticas que permitem um contato com as células G e com a célula parietal (ação parácrina). Quando concentração de  $H^+$  está elevada, sensores da célula D estimula a secreção de somatostatina (SCHUBERT, 2014; CALLAGHAN; HOUSTON, 2022).



A somatostatina é um hormônio peptídico, que atua nos receptores SSTR2 – receptor acoplado a proteína  $G_i$  – no qual inibe a formação de AMPc por ciclase adenilil, inibindo a liberação de gastrina, histamina, e conseqüentemente, a secreção ácida gástrica. Além desses, outros mediadores químicos como as prostaglandinas E2 e I2, adrenomedulina e o polipeptídeo gástrico inibitório (GIP) também inibem a secreção ácida gástrica (SCHUBERT, 2014; CALLAGHAN; HOUSTON, 2022).

**Figura 7 - Regulação neuro-humoral da secreção de ácido gástrico**



Fonte: Adaptado de Berridge (2014)

Legenda: sstR2- receptor de somatostatina tipo 2;  $G_i$ -Proteína G inibitória;  $G_s$ -Proteína G estimulatória; AC-ciclase de adenilil;  $G_q$ -Proteína  $G_q$  ou Proteína 11; PLC-fosfolipase C; M3-receptor muscarínico tipo 3; CCKB Receptor de colecistocinina tipo B; PKA- Proteína quinase A; ER-retículo endoplasmático; CSPP-28- Fosfoproteína sensível a concentração de  $Ca^{2+}$ ;  $CO_2$ -dióxido de carbono; ATP-trifosfato de adenosina;  $H^+$ -íonhidrogênio;  $HCO_3^-$  - íon bicarbonato;  $Cl^-$  - íon cloreto;  $IP_3$  - 1,4,5 trisfosfato de inositol; cAMP - monofosfato cíclico de adenosina;  $Ca^{2+}$  íon cálcio; PKC- proteína quinase C;  $H^+/K^+$ -ATPase - bomba de prótons; HCl - ácido clorídrico.

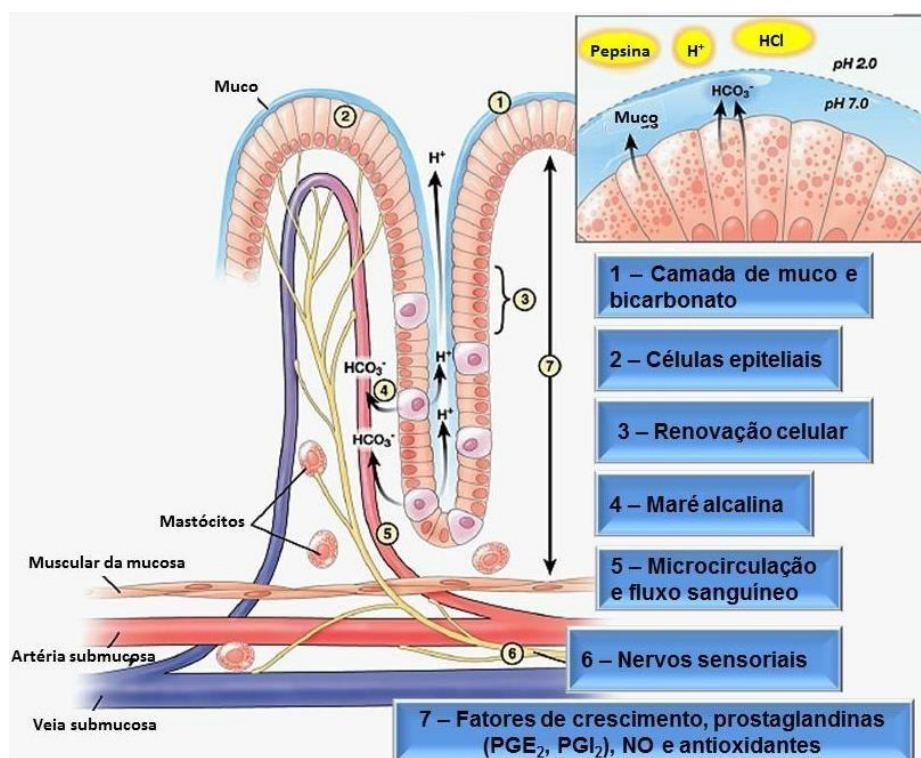


### 2.1.5 Mecanismos de defesa da mucosa

A barreira mucosa serve como uma interface primária entre o ambiente e o hospedeiro. Na vida diária, lesões superficiais na mucosa gástrica ou duodenal ocorrem regularmente, mas cicatrizam rapidamente por um processo chamado “restituição”. A lesão persistente da mucosa gastroduodenal também ocorre, mas inicia uma lesão regenerativa com mecanismos específicos de cicatrização de feridas que tentam reparar a função de barreira. Se não cicatrizadas, essas lesões podem ser o local de desenvolvimento da neoplasia em um cenário inflamatório crônico (HAGEN, 2021).

Os mecanismos de defesa da mucosa gástrica envolvem sistemas locais e neuro-hormonais que compreendem: fatores pré-epiteliais – muco, íons bicarbonato, fosfolipídios de membrana e o ácido gástrico; fatores epiteliais – células epiteliais, fatores de crescimento e renovação celulares; fatores sub-epiteliais – inervação sensorial, fluxo sanguíneo, fatores que atuam na reconstituição do epitélio e os moduladores da barreira gástrica -prostaglandinas, óxido nítrico e o sistema antioxidante (TARNAWSKI; AHLUWALIA; JONES, 2013; TARNAWSKI; AHLUWALIA; JONES, 2014; HAGEN, 2021).

**Figura 8 - Mecanismos de defesa da mucosa**



Fonte: Adaptado de TARNAWSKI; AHLUWALIA, 2012; YANDRAPU; SAROSIEK (2015)

Legenda: CCK, colecistocinina; CRF, fator de liberação da corticotropina; EGF, fator de crescimento epidérmico; HCL, ácido clorídrico; IGF, fator de crescimento semelhante a insulina; TGF- $\alpha$ , fator transformador de crescimento  $\alpha$ ; TRF, fator de liberação de tireotropina.

### 2.1.6 Fatores pré-epiteliais

Os fatores pré-epiteliais compreendem a primeira linha de defesa da mucosa gástrica. Consiste em uma camada de muco e bicarbonato que funciona como uma barreira físico-química para inúmeras moléculas, incluindo os íons de hidrogênio e pepsina (YANDRAPU; SAROSIEK, 2015). Essa camada retém o bicarbonato secretado pelas células epiteliais superficiais para manter um microambiente neutro (pH  $\sim$  7,0) nas células epiteliais superficiais e impede a penetração da pepsina e, portanto, a digestão proteolítica do epitélio superficial (JIN et al., 2017).

A composição da proteína do muco do trato gastrointestinal foi estudada pela proteômica moderna (PELASEYED et al., 2014). O principal componente do muco intestinal é a mucina MUC2 e no estômago é a mucina MUC5AC, ambas produzidas por células caliciformes. A mucina MUC6, encontrada nas glândulas gástricas, não é um componente do muco superficial e passa por canais transitórios formados no muco superficial juntamente com o ácido clorídrico gástrico (PELASEYED et al., 2014).

O gel de muco é secretado por expulsão apical das células epiteliais superficiais e contém cerca de 95% de água e cerca de 5% de glicoproteínas de mucina, produtos dos genes da mucina (MUC). As unidades de mucina formadoras de gel polimerizam em grandes multímeros de mucina essenciais para a formação de gel. No estômago, o MUC5AC é expresso nas células epiteliais superficiais da cárdia, fundo e antro; e o MUC6 é expresso nas células do colo do fundo e nas glândulas antrais (NAMULEMA et al., 2018).

O gel de muco é co-secretado com peptídeos da família do fator trifólio (TFFs) de baixo peso molecular. Os TFFs são parte integrante das vesículas secretoras de muco intracelular e podem desempenhar um papel na montagem intracelular e/ou empacotamento de mucinas. Eles aumentam a viscosidade da mucina gástrica e estabiliza a rede de gel. A secreção de muco é estimulada por hormônios gastrointestinais, incluindo gastrina e secretina, bem como PGE<sub>2</sub> e agentes colinérgicos (NAMULEMA et al., 2018).

O bicarbonato é outro fator pré-epitelial que protege o epitélio gástrico ao neutralizar o ácido gástrico. É secretado pelas células epiteliais na superfície luminal da mucosa gástrica, em fendas gástricas, e na superfície luminal da mucosa duodenal. A secreção de bicarbonato no duodeno serve para neutralizar o ácido que chega ao intestino proveniente do estômago. Uma hipótese que talvez explique esse efeito é que a mucosa é sensível a pressão parcial do CO<sub>2</sub> (pCO<sub>2</sub>) gerado na sua superfície durante a reação de secreção entre H<sup>+</sup> e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> luminal. No estômago, as PGs estimulam diretamente a secreção de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (AMAGASE, 2013; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015; JIN et al., 2017).

A mucosa gástrica também dispõe de uma monocamada de fosfolipídios tensioativa que reveste a camada de muco, repelindo a água e o ácido que se aproximam dela. Os fosfolipídios apresentam a região polar voltada para a camada de muco e a região hidrofóbica de ácidos graxos encontrando-se voltada para o lúmen (YANDRAPU; SAROSIEK, 2015; MCDONALD; MACFARLANE, 2018).

O HCl também desempenha um papel protetor, pois sua acidez elevada é responsável pela inativação de toxinas, eliminação de microrganismos ingeridos, além da desnaturação da imunoglobulina E (IgE) promotora da alergia alimentar (HE et al., 2017).

Quando a barreira pré-epitelial entre o lúmen e o epitélio é sobrecarregada ou decomposta na doença, a próxima série de mecanismos de proteção entra em ação, incluindo a neutralização intracelular do ácido, o rápido reparo epitelial e a manutenção e distribuição do fluxo sanguíneo da mucosa (JIN et al., 2017).

### **2.1.7 Fatores epiteliais**

A segunda linha de defesa da mucosa é formada por uma camada continuamente renovada de células epiteliais superficiais, que secretam muco e bicarbonato e sintetizam prostaglandinas, proteínas de choque térmico, peptídeos TFF, catelicidinas antimicrobianas, e  $\beta$ -defensinas. As células epiteliais de superfície são interconectadas por junções apertadas e junções comunicantes formando uma barreira regulada seletivamente permeável, impedindo a retrodifusão de ácido e pepsina (YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

A permeabilidade das células epiteliais de superfície é regulada principalmente pela junção intercelular apical referida como *junções gap*. Moléculas de junções comunicantes contêm F-actina filamentosa que mantém a integridade da mucosa, e E-caderina que regula a permeabilidade intestinal formando filamentos entre as células. As células epiteliais são hidrofóbicas e repelem o ácido e agentes prejudiciais solúveis em água devido à presença de fosfolipídios em sua superfície (YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

As proteínas de choque térmico (HSP) também contribuem para a barreira epitelial intestinal, sendo que o aumento da temperatura, estresse e agentes citotóxicos estimulam a sua secreção pelas células epiteliais gástricas. As HSP impedem a desnaturação de proteínas e promove a permeabilidade intestinal durante a elevação da temperatura, protegendo assim as células contra lesões (TUSTUMI et al., 2022). Os peptídeos TFF (peptídeos da família do fator trefoil) regulam a reepitelização e desempenham um papel integral nas defesas epiteliais por meio da promoção da restituição da mucosa após lesão do epitélio superficial (HOFFMANN, 2020). As catelicidinas e  $\beta$ -defensinas são peptídeos catiônicos que desempenham papéis no sistema de defesa inato nas superfícies mucosas, impedindo a colonização bacterianas. Eles foram previamente demonstrados em células epiteliais gástricas acelerando a cicatrização de úlceras (YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

### **2.1.8 Fatores sub-epiteliais**

#### **2.1.8.1 Fluxo sanguíneo**

O fluxo sanguíneo contínuo através dos microvasos é muito importante para a função e manutenção da integridade estrutural do trato gastrointestinal. O papel crítico da microcirculação é fornecer oxigênio e nutrientes a todos os tecidos e células e remover metabólitos tóxicos gerados (ZHIQIANG et al., 2021).

Durante a lesão da mucosa gástrica, seja por uma substância irritante ou retrodifusão do ácido, promove o aumento rápido no fluxo sanguíneo da mucosa, bem como da angiogênese, na perspectiva de remover e/ou diluir o ácido e os agentes nocivos. Esta resposta parece ser essencial para a defesa da mucosa porque a supressão por meio da restrição mecânica do fluxo sanguíneo leva a necrose hemorrágica (YANDRAPU; SAROSIEK, 2015). Esse processo envolve tanto ativação dos nervos aferentes sensoriais como também liberação de óxido nítrico (NO) (LAINE;

TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008). Além disso, o endotélio que reveste os vasos sanguíneos, gera substâncias vasodilatadoras, como o NO e prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) que apresentam efeitos protetores na mucosa gástrica (TARNAWSKI; AHLUWALIA; JONES, 2012; ZHIQIANG et al., 2021).

#### 2.1.8.2 Inervação Sensorial

A mucosa gástrica e os vasos submucosos são innervados por neurônios sensitivos aferentes primários e nervos que formam um plexo denso na base da mucosa. Essa inervação consiste em um conjunto de fibras nervosas a partir desse plexo que entram na lâmina própria, acompanham os vasos capilares e terminam abaixo das células epiteliais superficiais. Essas terminações nervosas podem detectar o conteúdo luminal e a entrada de ácido na mucosa via canais sensíveis a ácido (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

Os nervos sensoriais são sensíveis à capsaicina que além de conduzir informações de dor para o sistema nervoso central, atuam liberando neuromoduladores como a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Este último está relacionado com o gene que exerce uma ação protetora da mucosa, provavelmente, pela vasodilatação dos vasos da submucosa mediada pela via do NO/GMPc/PKG/KATP. Essas fibras também são sensíveis ao conteúdo alimentar que se encontra no lúmen estomacal bem como ao aumento da secreção ácida gástrica (KWIECIEN et al., 2012; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

### 2.1.9 Fatores pós- epiteliais

#### 2.1.9.1 Óxido Nítrico e Canais de potássio sensíveis a ATP (K<sub>ATP</sub>)

O óxido nítrico (NO) é uma molécula sinalizadora biológica, que desempenha um papel importante na transdução de sinais humanos. Uma das suas funções mais importantes é atuar nas células musculares lisas dos vasos sanguíneos para relaxar. Devido à extensa pesquisa sobre o NO, alguns estudos mostraram que o seu papel inclui a regulação da vasodilatação e contração dos vasos sanguíneos, participando da resposta inflamatória e do processo de coagulação e regulação do ciclo celular (CACANYIOVA et al., 2013).

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

Na úlcera péptica, o NO assume papel importante na manutenção da mucosa gástrica (TEPPERMAN; SOPER, 1994). O NO pode ser usado como um agente protetor para úlcera gástrica, promovendo o fluxo sanguíneo da mucosa, estimulando a secreção de muco gástrico e reduzindo a infiltração de leucócitos (MCCARTY, 2013; LIANG et al., 2021).

O NO é sintetizado principalmente pela NO sintase (NOS) em três subtipos: NOS neuronal, NOS endotelial e NOS induzível. A NOS neuronal e a NOS endotelial está envolvida na manutenção da integridade da mucosa gastrointestinal por meio da regulação do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica, secreção da mucosa e barreira de defesa. No entanto, o NO sintetizado pela NOS induzível está envolvido no dano tecidual na resposta inflamatória (LIANG et al., 2021).

Após sua produção pelas células endoteliais (e-NOS), o NO se difunde para a camada muscular estimulando a enzima ciclase de guanilil solúvel (CGs). A CGs é um receptor heterodimérico com duas subunidades ( $\alpha$  e  $\beta$ ) e quatro isoformas ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  e  $\beta 2$ ). Esses receptores são ativados pelo NO, convertendo o trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), que ativa a proteína cinase dependente de cGMP (PKG), fosfodiesterases (PDEs) e canais iônicos para obter respostas celulares (como vasodilatação, regulação da apoptose e angiogênese) que irão contribuir para a manutenção da homeostase (BERRIDGE, 2014). Essa sinalização NO/cGMP pode ativar diferentes alvos proteicos, como os canais de potássio ATP-dependentes ( $K_{ATP}$ ).

Os  $K_{ATP}$  são funcionalmente expressos em células do músculo liso e o aumento citosólico de cGMP promove a abertura desses canais favorecendo o efluxo de íons  $K^+$ , alterando o potencial elétrico da membrana, reduzindo a entrada de  $Ca^{2+}$  pelos canais de cálcio dependentes de voltagem ( $Cav$ ), culminando na hiperpolarização da membrana celular, promovendo vasodilatação e aumento da microcirculação gástrica (WALLACE, 2019; LIANG et al., 2021).

### 2.1.9.2 Prostaglandinas

As prostaglandinas endógenas (PGs), produzidas a partir do ácido araquidônico pelas duas isoformas da ciclooxygenase (COX) e várias PG sintases, desempenham um papel importante na regulação de várias ações no trato gastrointestinal (GI), como secreção ácida, secreção de bicarbonato, produção de muco, fluxo sanguíneo da mucosa e manutenção da integridade da mucosa. De fato, a PGE2 exógena protege a mucosa gástrica de uma variedade de estímulos nocivos, como agentes necrotizantes, estresse e da ação dos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) (TAKEUCHI; AMAGAS, 2018).

Existem três isoformas principais da COXs, sendo a COX-1 (constitutiva) responsável por manter os níveis basais de PGs, a COX-2 (induzível) catalisa a conversão de ácido araquidônico em mediadores lipídicos durante a inflamação, e a COX-3 que está envolvida na biossíntese de mediadores anti-inflamatórios endógenos, uma vez que é ativada mais tarde na inflamação (CHANDRASEKHARAN et al., 2002; DAVIES et al., 2004; MURI; SPOSITO, METSAVAHT, 2009).

O AA após clivado é oxidado pela COX transformando-se em prostaglandina G2 (PGG2), um metabolito intermediário instável, reduzido rapidamente a prostaglandina H2 (PGH2). Por fim, esta é substrato para uma série de isomerases e oxidoredutases específicas que irão convertê-la a diferentes tipos de prostaglandinas (PGE2, PGD2, PGF2), prostaciclina (PGI2) e tromboxano (TXA2), que irão atuar em diferentes receptores acoplados a proteína G (GPCRs), receptores da PGE (EP), receptor de PGF (FP), receptor de PGI2 (IP) e receptor de PGD2 (DP), produzindo diferentes respostas biológicas (GARCÍA-MIGUEL, 2016).

As prostaglandinas do tipo E2 (PGE2) são as mais efetivas na proteção da mucosa (TARNAWSKI; AHLUWALIA; JONES, 2013). Estas prostaglandinas possuem a capacidade de estimular uma reação em um tipo de tecido e inibir a mesma reação em outro tipo de tecido. Essa capacidade é determinada pelo tipo de receptor ao qual a prostaglandina se liga. Para exercer suas ações biológicas, essas prostaglandinas se ligam a receptores de prostaglandina E do tipo 1 ao 4. Quando as PGE2, por exemplo, ativam receptores EP3, elas estimulam a secreção de muco e bicarbonato pelas células superficiais da mucosa gástrica. Quando ativam os receptores EP1, elas

estimulam a proliferação celular e favorecem o aumento do fluxo sanguíneo da mucosa (TAKEUCHI, 2014).

As prostaciclinas (PGI<sub>2</sub>) também possuem efeito gastroprotetor por meio da regulação do tônus vascular, causando vasodilatação e opondo-se a ação de leucotrieno C<sub>4</sub>, tromboxano e endotelina, agentes vasoconstritores que prejudicam a mucosa (YANDRAPU; SAROSIEK, 2015). Além disso as prostaglandinas são capazes de ativar canais de potássio sensíveis ao ATP, como as PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub>, e essa ativação também é responsável por mecanismos de proteção da mucosa gástrica (TAKEUCHI; AMAGAS, 2018).

#### 2.1.9.3 Grupamentos sulfidrílica (SHs)

Os grupamentos sulfidrílica (SHs) são formados por grupos químicos tióis que contém um átomo de enxofre que por meio de pontes de dissulfeto são responsáveis por aumentar a produção e manter a estabilidade do muco, além de estarem envolvidos na manutenção da integridade gástrica, particularmente quando as espécies reativas de oxigênio estão envolvidas na formação dos danos teciduais (OUYANG et al., 2018).

Os grupamentos sulfidrílicos tem a capacidade de diminuir a formação de espécies reativas de oxigênio, desse grupo se destacam a glutathione redutase (GSH), peroxidase (GPx) e Transferase (GSTs). A GSH é considerada um excelente nucleófilo, devido a sua capacidade de doar elétrons a outros compostos, o que a torna um bom redutor (WOMERSLEY; UYS, 2016). A diminuição da disponibilidade deste antioxidante não enzimático agrava o estresse oxidativo e resulta no aumento das lesões a mucosa gástrica e as concentrações de grupos SH servem como marcadores de oxidação proteica (NARAYANANKUTTY et al., 2019; ZHANG et al., 2020 ).

De forma geral os SHs desempenham um papel importante na proteção da mucosa gástrica, a glutathione protege a integridade e a permeabilidade da membrana celular e pode atuar como antioxidante sequestrador de radicais livres, na manutenção da função imunológica, na regulação da síntese e degradação de proteínas e na manutenção da estrutura proteica (PÉREZ et al., 2017).



#### 2.1.9.4 Sistema antioxidante

O metabolismo celular é responsável pela produção natural de EROs. No entanto, o acúmulo excessivo destas moléculas pode causar danos as estruturas celulares (GASCHLER; STOCKWELL, 2017). As EROs podem ser radicais livres, que são átomos ou moléculas que possuem uma quantidade ímpar de elétrons, como os radicais superóxido ( $O_2^-$ ) ou agentes oxidantes, que não apresentam elétrons desemparelhados, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o ozônio ( $O_3$ ). Cabe ressaltar que as EROs são essenciais para vários processos fisiológicos, incluindo a fosforilação de proteínas, diferenciação celular, ativação de fatores de transcrição, imunidade celular, dentre outros (HRYCAY; BANDIERA, 2015).

As EROs também são produzidas em resposta a fatores externos, como radiação UV, consumo de bebidas alcoólicas, ingestão de AINEs, poluição, cigarro, dentre outros. A produção de EROs ligadas a fatores externos têm sido implicadas em diversas patologias, incluindo na úlcera gástrica (BHATTACHARYYA et al., 2014; SIES; JONES, 2020).

O Sistema antioxidante é um conjunto de moléculas e enzimas que reagem com espécies reativas de oxigênio (EROs) e inativa-as para prevenir o estresse oxidativo (GOUGH; COTTE, 2011). Este sistema de defesa pode ser enzimático e não enzimático. O sistema de defesa enzimático é composto por proteases que formam a primeira linha de defesa contra o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, como: a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione S-transferase (GST) (KIVRAK et al., 2017; SARANGARAJAN et al., 2017).

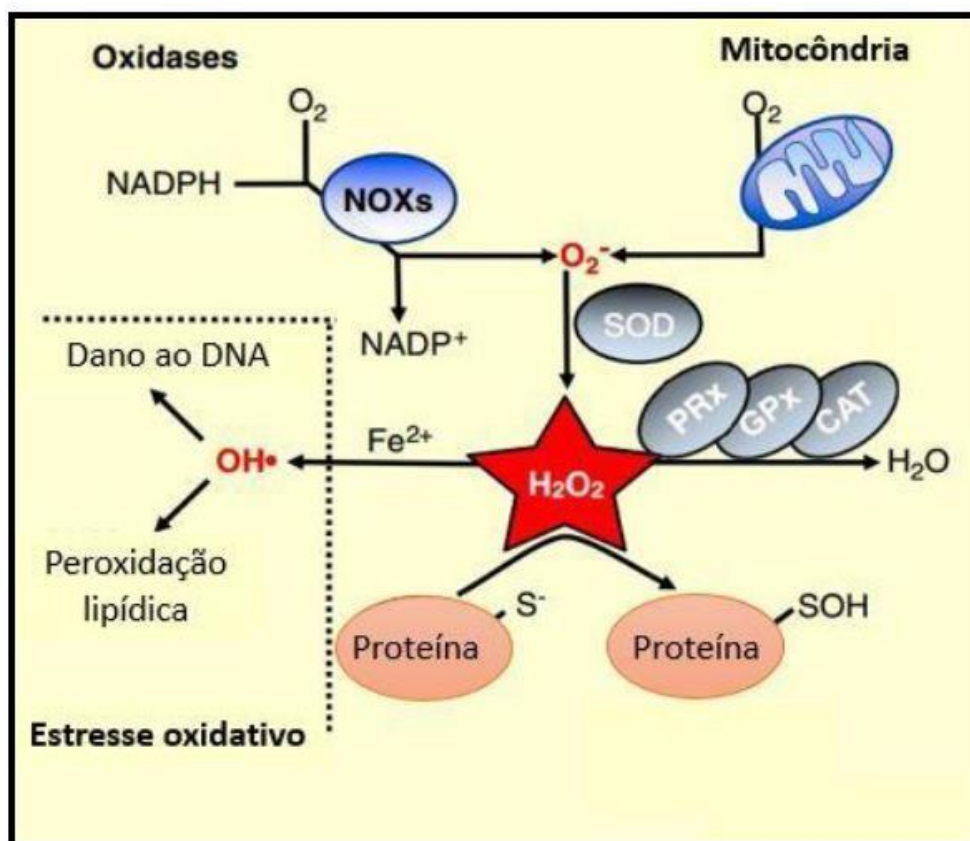
O sistema antioxidante não enzimáticos corresponde a segunda linha de defesa e pode ser de produção endógena ou exógena, com destaque para a glutathione reduzida (GSH), tioredoxinas, ácido úrico e bilirrubina que são antioxidantes endógenos e ácido ascórbico, tocoferóis, vitaminas E C, carotenóides,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

O sistema antioxidante pode agir pelo mecanismo de ruptura da cadeia (no qual o antioxidante primário libera um elétron para o radical livre encontrado nos sistemas) pela eliminação dos iniciadores de espécies de EROS/nitrogênio reativo (antioxidantes secundários) e pela supressão de catalisadores de iniciação de cadeia. Os antioxidantes também podem afetar os sistemas biológicos pela liberação de

elétrons, quelação de íons metálicos, co-antioxidantes ou pela manutenção da expressão de genes (KIVRAK et al., 2017).

A reação espontânea de superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) com óxido nítrico (NO) produz peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). A enzima NADPH oxidases (NOX) e as mitocôndrias são fontes potenciais de superóxido, deste modo, o óxido nítrico é gerado por óxido nítrico sintases (NOS) e o peróxido de hidrogênio pode ser formado diretamente por várias oxidases. Os mecanismos de defesa antioxidante celular incluem enzimas para o metabolismo rápido de EROs (Espécies reativas de oxigênio), proteínas de ligação para metais de transição (ex. Ferritina) e antioxidantes de quebra de cadeia (ex. Vitamina E) para prevenir a peroxidação lipídica (LPO). O superóxido pode ser metabolizado pela superóxido dismutase-1 (Cu/Zn-SOD) e dismutase-2 (Mn-SOD), já o peroxinitrito pode ser eliminado pela glutathiona (GSH) e o peróxido de hidrogênio é reduzido pela glutathiona peroxidase1 (GPx1) ou pela catalase (CAT) como mostrado na **Figura 9** (JAESCHKE; RAMACHANDRAN, 2018).

**Figura 9 - Mecanismos de ação de enzimas antioxidantes sobre espécies reativas do oxigênio**



Fonte: SCHIEBER; CHANDEL (2014)

Legenda: NOXs, NAPH oxidase; SOD, superóxido dismutase; PRx, peroxiredoxinas; GPx, glutathione peroxidase; CAT, catalase.

#### 2.1.9.5 Citocinas

As citocinas são pequenas proteínas secretadas (<40 kDa), que são produzidas por quase todas as células para regular e influenciar a resposta imune (KANY et al., 2019).

As citocinas são moléculas importantes na regulação e manutenção da homeostase, desenvolvimento embrionário, controle e desenvolvimento de processos imunopatológicos, bem como na diferenciação, proliferação e apoptose celular. Podem ser classificadas com base nas propriedades bioquímicas e fisiológicas que apresentam, sendo agrupadas em interleucinas (IL), linfocinas, monocinas, interferons, fatores estimulantes de colônias, quimiocinas e fator de necrose tumoral (TNF) (BURLAKOVSKIY; YEMELYANOV; LUTOVA, 2016).

Com base em sua fonte celular, as citocinas são classificadas em citocinas do tipo 1, produzidas pelo cluster de diferenciação 4 (CD4)<sup>+</sup> T-helper 1, incluindo IL-2, IL-12, *IFN-γ* e TNF- $\beta$ ; e citocinas do tipo 2, produzidas por células CD4<sup>+</sup> Th 2, incluindo IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (LIU et al., 2021). Dependendo do seu papel no processo inflamatório, as citocinas podem ser tidas como pró-inflamatória (IL-1  $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-7 e TNF), ou imunoregulatórias (IL-10, IL-11, e IL-13), aumentando ou atenuando a resposta inflamatória, respectivamente (BLUNDELL, et al., 2015; KANY et al., 2019).

As citocinas pró-inflamatórias contribuem para o início e a propagação da inflamação, enquanto as citocinas anti-inflamatórias facilitam a regressão da inflamação e a recuperação das fases agudas da doença (LIU et al., 2021).

A resposta inflamatória é controlada principalmente por citocinas que induzem uma resposta de fase aguda para proteger o hospedeiro contra irritação, lesão e infecção. Essa reação começa com a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, *IFN-γ* e TNF- $\alpha$  da mesma célula ou de células diferentes. O principal papel dessas citocinas é comunicar aos tecidos circundantes a ocorrência de infecção ou lesão. Além disso, essas citocinas podem entrar na circulação sistêmica, estimulando ativação de células imunes e alterações significativas na fisiologia do

hospedeiro, como febre e reação de fase aguda (BOSHTAM et al., 2017; LIU et al., 2021).

As citocinas pró-inflamatórias têm propriedades imunológicas que podem ser benéficas para o hospedeiro contra a invasão por bactérias e outros microorganismos no ambiente imediato ou na flora endógena da pele e do trato intestinal (BOSHTAM et al., 2017).

Os macrófagos são a primeira linha de defesa do hospedeiro contra a infecção bacteriana, desempenhando papéis importantes no início das respostas imunes adaptativas. Eles são estimulados por produtos bacterianos e liberam várias citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, IFN-  $\alpha$  /  $\gamma$  -  $\alpha$ . Essas citocinas estão relacionadas umas com as outras, pois são liberadas coordenadamente de macrófagos ativados e modulam a resposta imune para proteger o hospedeiro (MUÑOZ-CARRILLO et al., 2018; LIU et al., 2021).

A IL-10 é uma potente citocina anti-inflamatória com funções imunorreguladoras que inibem a produção de várias citocinas pró-inflamatórias. Apresenta efeito anti-inflamatório em eosinófilos, basófilos e mastócitos e, portanto, desempenha um papel importante no controle e regulação da inflamação. Sob condições fisiológicas, essas citocinas limitam os efeitos potencialmente prejudiciais da expressão sustentada ou excessiva de reações pró-inflamatórias (CHEN et al., 2019). Essas citocinas anti-inflamatórias já se mostraram benéficas em várias condições clínicas associadas ao excesso de inflamação. Por exemplo, podem ser usadas como drogas para tratar doenças relacionadas à inflamação (LIU et al., 2021).

A IL-10 desempenha um papel protetor devido a suas propriedades imunomoduladoras, regulando o sistema imunológico da mucosa gástrica, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, inibindo a infiltração neutrofílica e a apresentação antigênica (LIU et al., 2021).

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

maneira geral, as citocinas envolvidas nas afecções do trato gastrointestinal são TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-1, IL-4, IL-6, IL-8 e IL-10 (LIU et al., 2021).

## **2.2 Fatores agressores da mucosa**

### **2.2.1 Etanol**

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

A fisiopatologia da úlcera gástrica induzida por etanol tem sido correlacionada com a interação entre vários fatores, como espécies reativas de oxigênio (ROS), atividade do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e citocinas inflamatórias (SIDAHMED et al. 2013; ALI et al., 2023).

A ingestão de etanol pode contribuir para o estado de estresse oxidativo que é acompanhado pelo aumento dos níveis de malonaldeído (MDA) e diminuição dos níveis de superóxido dismutase (SOD). Isso pode levar à infiltração de neutrófilos/macrófagos e ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. Com isso ocorrerá o aumento na produção de citocinas inflamatórias, como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-1-beta (IL-1 $\beta$ ), e conseqüentemente será desencadeado um aumento do processo inflamatório ulceração e danos à mucosa gástrica (ARAB et al. 2015; ALI et al., 2023). Além disso, a administração de etanol pode reduzir o fluxo sanguíneo gástrico, bicarbonato e secreção de muco, o que perturba o equilíbrio entre os fatores agressivos e defensivos na mucosa gástrica, levando a mais danos à mucosa (RAISH et al. 2021).

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

O etanol também age de modo sistêmico, penetrando rapidamente na mucosa gástrica e na corrente sanguínea, sendo convertido a acetaldeído pela enzima álcool

desidrogenase, diminuindo os níveis dos sistemas antioxidantes e liberação de radicais livres de hidroperóxidos e ânion superóxido. Esses radicais livres causam um aumento no estresse oxidativo nos tecidos e dos níveis de malondialdeído (MDA), um marcador de aumento da peroxidação lipídica (ZAKARIA et al., 2016).

Em geral, o efeito deletério induzido pelo etanol pode se manifestar diretamente via geração de metabólitos reativos ou indiretamente via ativação de outros mecanismos que finalmente desencadeiam o dano oxidativo (ZAKARIA et al., 2016).

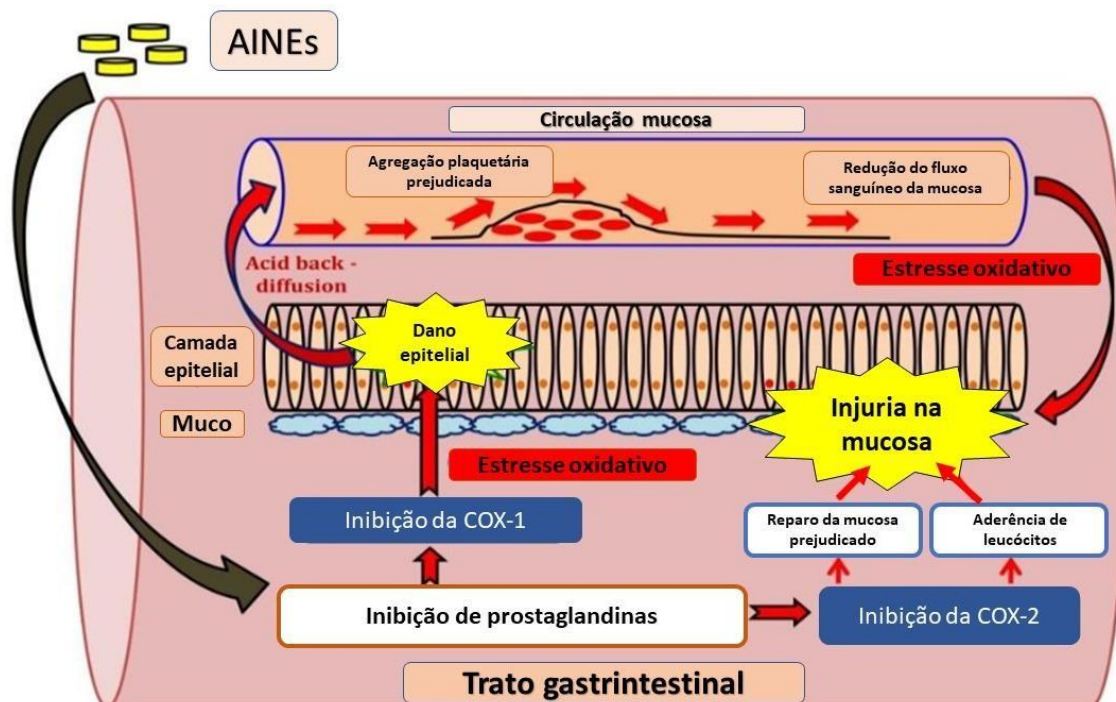
### **2.2.2 Anti-inflamatórios Não Esteroidais (AINEs)**

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

Os AINEs responsáveis pela injúria gástrica podem apresentar uma ação local ou sistêmica. O efeito local está associado com as características químicas da estrutura dessas moléculas, que em geral são ácidos fracos. A propriedade ácida em conjunto com a baixa polaridade desses compostos confere uma ação detergente, que quando em contato com a mucosa gástrica, leva a desestabilização da camada de fosfolípidos e danos a camada de muco, afetando as células epiteliais levando a morte celular (BJARNASON et al., 2018).

De forma sistêmica, leva a redução da síntese de prostaglandinas, como PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub>, pela inibição da atividade da enzima ciclo-oxigenase comprometendo os eventos citoprotetores dessas moléculas. Com a inibição da atividade das enzimas COXs, o seu substrato AA, é desviado para a via da lipoxigenase (LOX) que resulta na formação de leucotrienos B<sub>4</sub> e fatores quimiotáticos para neutrófilos que são importantes agentes liberadores de EROs e interleucinas pró-inflamatórias (KUNA et al., 2019).

**Figura 10 - Possíveis vias envolvidas no dano gastrointestinal induzido por AINEs**



Fonte: Adaptado de KUMAR et al. (2019)

### 2.2.3 Estresse

Vários estudos relatam que o estresse tem sido associado ao aumento do risco de desenvolver úlceras pépticas (KANNO et al., 2013; MELINDER et al., 2015). O estresse pode ser amplamente definido como uma ruptura real ou antecipada da homeostase que desencadeia resposta hormonal, comportamental e fisiológica para lidar com o desafio homeostático, estando envolvido na fisiopatologia de uma variedade de doenças, incluindo ansiedade, depressão, demência, entre outras (BALI; JAGGI, 2015).

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

As úlceras induzidas em condições de estresse estimulam a liberação de catecolaminas, cortisol e ativação do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA)

(LANDEIRA-FERNANDEZ, 2004). Após ativação, o eixo HPA associa-se à desregulação dos hormônios gástricos, geração de radicais livres e aumento do estresse oxidativo na mucosa gástrica. O cortisol aumentado regula positivamente a produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 pelos macrófagos (ELSHAZLY et al., 2018).

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

A prática do tabagismo é um dos hábitos mais difundidos mundialmente e está relacionada às úlceras gástricas (LAZAAR et al., 2015). Estudos sugerem que a sua fumaça modula positivamente agente agressores como a secreção ácida gástrica e de pepsina, além de promover efeitos pró-inflamatórios com recrutamento neutrofílico e produção de EROs. Entretanto sugere-se que a fumaça do cigarro aumenta a secreção de ácido e pepsina, radicais livres e infiltração de neutrófilos e liberação de grelina na circulação (que atua estimulando a liberação do hormônio gastrina e a secreção de ácido gástrico) ao mesmo tempo que reduz fatores protetores como fluxo sanguíneo, secreção de muco, PGs e fatores de renovação e cicatrização celular (LAZAAR et al., 2015; NOBLE, 2017).

#### **2.2.4 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)**

O *H. pylori* é uma bactéria em forma de espiral que cresce no trato digestivo. Segundo Barchi et al. (2018), esta bactéria está presente na mucosa do estômago de 45 a 50% dos seres humanos em todo o mundo. As baixas condições socioeconômicas na infância são os fatores de risco mais importantes para a infecção por *H. pylori* (EUSEBI; ZAGARI; BAZZOLI, 2014; SIDDIQUE et al., 2018). A prevalência de *H. pylori* é maior em países em desenvolvimento, especialmente na África, América Central, Ásia Central e Europa Oriental (HOOI ET AL., 2017). Geralmente é adquirido na infância em ambiente de condições insalubres e aglomeração, principalmente em países com nível socioeconômico mais baixo.



O *H. pylori* causa degeneração e lesão das células epiteliais, que geralmente é mais grave no antro, pela resposta inflamatória com neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos (KUNA et al., 2019).

O mecanismo pelo qual o *H. pylori* induz o desenvolvimento de diferentes tipos de lesões na mucosa gastroduodenal, não está totalmente esclarecido. A infecção por *H. pylori* pode resultar em hipocloridria ou hipercloridria, determinando assim o tipo de úlcera péptica (ZAKI et al., 2013). A infecção por *H. pylori* inibe a produção de somatostatina pelas células D com consequente hipergastrinemia e aumento da secreção ácida. Os fatores de virulência produzidos pela *H. pylori* são essenciais para a colonização do estômago e sobrevivência no ambiente gástrico hostil. O *H. pylori* produz uma grande quantidade de urease, uma enzima intracelular que catalisa a hidrólise da ureia para formar amônia e dióxido de carbono, que neutraliza o ácido gástrico, favorecendo a sobrevivência e colonização do *H. pylori* no estômago. Além disso, a urease induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, migração de células T e expressão de iNOS, que produz inflamação e causam lesão no tecido (ZAKI et al., 2013).

A *H. pylori* expressa várias proteínas que se configuram como importantes fatores de virulência. As principais são: a citotoxina vacuolizante A (VacA), que forma canais na membrana plasmática de células epiteliais e também pode interagir com a membrana mitocondrial e induzir a apoptose; gene associado à citotoxina A (CagA), injetado em células eucarióticas e induz a transdução celular, envolvido na indução de citocinas pró-inflamatórias liberadas pela célula hospedeira, que provoca citotoxicidade epitelial e agravamento da inflamação (KUNA et al., 2019).

## 2.3 Microbiota

O TGI (principalmente intestino) é colonizado por  $1-4 \times 10^{15}$  microrganismos, coexistindo em uma relação equilibrada (SCHULZ et al., 2015). A maioria das bactérias encontradas no intestino dos adultos consiste em *Bacteroides* e *Parabacteroides* (SGAMBATO et al., 2017).

O ambiente anaeróbio do lúmen intestinal não facilita a colonização e o desenvolvimento de patógenos aeróbios em condições normais, embora espécies patogênicas anaeróbicas e facultativas possam invadi-lo e promover doenças. Cada sítio do TGI tem uma distribuição única de microflora. Quando comparada com o

estômago e duodeno, a densidade de bactérias aumenta no jejuno/íleo e cólon. Para produzir as condições ideais para sua interação e sobrevivência comuns, o hospedeiro e os microorganismos desenvolveram mecanismos específicos, a interrupção desses mecanismos desencadeia um desequilíbrio das espécies microbianas, denominada disbiose, que gera uma disfunção da barreira intestinal e indução de resposta inflamatória (LIATSOS et al., 2022).

A microbiota intestinal humana inclui cerca de 100 trilhões de substâncias microbianas, compostas por bactérias e vírus (WALSH et al; 2014). O desenvolvimento do microbioma intestinal durante os estágios iniciais da vida afeta a melhoria do sistema imunológico da mucosa e a suscetibilidade do indivíduo a algumas doenças. O estômago era conhecido por ser um órgão estéril devido à sua forte produção de ácido, entretanto, a descoberta do *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) em 1982, seguido pela identificação de microbiota adicional no estômago, mudou esse entendimento (WALSH et al. 2014; YANG et al., 2016). O interesse e a pesquisa na comunidade microbiana do estômago aumentaram nos últimos anos devido a melhorias nos métodos independentes de cultura (OZBAY et al., 2020).

Dados recentes revelaram que existe uma variedade de microorganismos no estômago com uma densidade de  $10^1$  a  $10^3$  unidades formadoras de colônias/g (LIATSOS et al., 2022). O microbioma gástrico é composto por bactérias ingeridas principalmente pelo trato oro respiratório e secundárias do intestino por refluxo biliar trans pilórico (YU et al., 2017; LIATSOS et al., 2022). O estômago possui uma microbiota única, incluindo cinco filos principais, como Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria e Bacteroidetes. Esses filos são identificados tanto em pessoas infectadas com *H. pylori* e não infectadas (OZBAY et al., 2020).

Técnicas moleculares de laboratório com alta sensibilidade indicaram que *Streptococcus*, *Prevotella*, *Neisseria*, *Veillonella* e *Rothia* representam as principais populações bacterianas no tecido gástrico, sendo *Streptococcus* o gênero mais dominante (SUNG et al., 2016; SCHULZ et al., 2016; LIATSOS et al., 2022). Os principais fatores que influenciam a microbiota gástrica são os hábitos alimentares, idade, etnia, uso de medicamentos (IBPs, antibióticos), inflamação da mucosa gástrica e câncer gástrico (LIATSOS et al., 2022).

A interação entre a microbiota gástrica e diferentes doenças gastrointestinais e extradigestivas é de grande interesse em muitos estudos recentes. Apesar de poucos

estudos abordando o papel de outra microbiota nas doenças gastroduodenais, parece que diferentes comunidades microbianas gástricas, como a super-representação do gênero *Streptococcus* no filo *Firmicutes*, também podem levar à gastrite, mesmo na ausência de *H. pylori*. Consequentemente, bactérias não *H. pyloricas* também podem desempenhar um papel importante na patogênese das doenças gastroduodenais, por meio de mecanismos e interações complexas que ainda precisam ser totalmente esclarecidas (LI et al., 2009; PETRA; RUS; DUMITRAȘCU, 2017; LIATSOS et al., 2022).

## 2.4 Úlcera Péptica

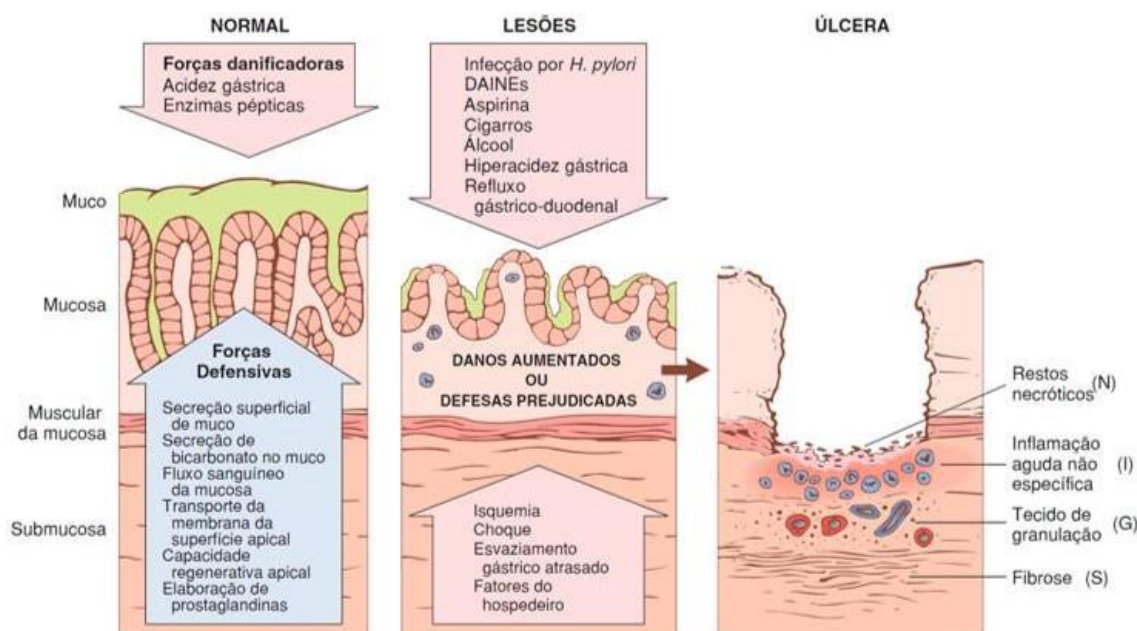
### 2.4.1 Etiologia e Fisiopatologia

A úlcera péptica pode ser definida como sendo lesões de cunho inflamatório e necrotizante a mucosa do trato gastrintestinal, resultando em ulcerações que podem se estender da mucosa até camadas mais profundas como da submucosa, muscular e serosa. São localizadas mais comumente no estômago e duodeno, embora possam também se localizar no esôfago ou divertículo de Meckel (JUSTINA et al, 2016; LANAS; CHAN, 2017; WOOLF; REHMAN; ROSE, 2022).

A úlcera péptica era tradicionalmente considerada como o resultado do aumento da produção de ácido, fatores dietéticos e do estresse. No entanto, a infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* e o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), são as causas mais prevalentes. Outros fatores, como ingestão de álcool, tabagismo, baixo nível socioeconômico (higiene e hábitos alimentares inadequados), ansiedade, deficiência de vitaminas, hiperparatireoidismo, entre outros, também podem contribuir (AMORIM et al, 2016; BJARNASON et al., 2018; KAVITT et al., 2019).

A etiologia da úlcera péptica é complexa e multifatorial, compreendendo um desequilíbrio entre a ação dos agentes agressores da mucosa gastrintestinal (ACTIS; PELLICANO, 2017) e sua capacidade em resistir à agressão por meio de elementos defensivos, como a síntese de prostaglandinas citoprotetoras, muco, bicarbonato, óxido nítrico, sistema antioxidante endógeno e fluxo sanguíneo adequado (**Figura 11**). (MALFERTHEINER; SCHULZ, 2020).

**Figura 11 - Mecanismos de injúria e proteção gástrica**



Fonte: Adaptado de Fisiopatologia da Doença - Uma Introdução à Medicina Clínica - Ganong - 5ª edição (2011)

Legenda: progressão a partir de formas mais brandas de injúria até a ulceração que pode ocorrer com as gastrites aguda e crônica. As úlceras incluem as camadas de necrose, (I) e tecido de granulação (G), mas a cicatriz fibrótica (S), que leva tempo para se desenvolver, está presente somente nas lesões crônicas.

## 2.4.2 Epidemiologia

A úlcera péptica é considerada a principal afecção do trato gastrointestinal (TGI) e atinge cerca de 10% da população mundial em algum momento de suas vidas, com incidência de 0,1 a 0,3% ao ano, equivalente a 4 milhões de pessoas. É uma doença crônica e recidivante, representando altos custos aos indivíduos e ao sistema de saúde (GARCÍA-MARTÍNEZ et al., 2016; BEIRANVAND, 2022; PARK et al., 2019).

Estudos globais indicam que houve aproximadamente 8,09 milhões de casos prevalentes de úlcera péptica em 2019, o que representou um aumento de 25,82% em relação a 1990. Tanto o número de casos prevalentes quanto a taxa de prevalência padronizada por idade foram maiores em homens do que em mulheres em todos os anos do respectivo estudo (XIE et al., 2022).

Dados epidemiológicos apontam que a prevalência mundial da úlcera difere quanto ao seu tipo, sendo a úlcera (BARAZANDEH et al., 2012), 2-4 vezes mais prevalente que a úlcera gástrica (MALIK et al., 2023).

As úlceras pépticas acometem mais adultos de meia-idade ou mais velhos, entretanto, também pode ser diagnosticada na juventude (KUMAR et al., 2019; LEOW et al., 2016). Em relação ao sexo, os homens são mais acometidos pelas úlceras pépticas do que as mulheres, na proporção de 3,5:1 para úlceras duodenais e 2,5:1 para úlceras gástricas, sendo as mulheres mais acometidas durante ou após a menopausa. A úlcera duodenal acomete mais jovens (20-50 anos) enquanto que a úlcera gástrica é diagnosticada mais em idoso (a partir dos 55 anos). Nas últimas décadas foi observado uma redução na incidência de úlceras duodenais, porém a incidência de úlceras gástricas permaneceu quase inalterada (KUMAR et al., 2010; LANAS, CHAN, 2017).

As úlceras pépticas têm como principais complicações o sangramento, perfuração ou obstrução da saída gástrica, sendo que em 50% dos indivíduos, o sangramento pode ocorrer sem nenhum sintoma de alerta. Estas complicações são responsáveis por quase 150.000 hospitalizações anualmente nos Estados Unidos (KEMPENICH; SIRINEK, 2018). A incidência anual de hemorragia digestiva alta secundária a úlcera péptica é estimada entre 19 a 57 casos por 100.000 indivíduos. A idade avançada é um fator de risco, pois 60% dos pacientes com úlcera péptica têm mais de 60 anos (LAU et al., 2011; STERN et al., 2022).

No Brasil, a escassez de dados atuais sobre a prevalência de úlceras pépticas configura uma imprecisão da realidade efetiva. Entretanto, um estudo desenvolvido por Oliveira et al 2015, demonstrou que nos últimos 10 anos a prevalência de úlcera em mulheres e homens foi de 0,1 e 0,2%, respectivamente. A taxa de mortalidade em nível nacional é de 3,0/100 mil habitantes (3,6/100 mil em homens e 2,3/100 mil em mulheres) taxas essas que aumentam com a idade. No mesmo estudo, o Nordeste apresentou índices superiores em comparação com índices nacionais, com taxa de mortalidade de 3,8/100 mil habitantes (4,7/100 mil homens e 2,9/100 mil mulheres) (OLIVEIRA et al., 2015; BEIRANVAND, 2022).

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

### 2.4.3 Aspectos Clínicos

Os sintomas da úlcera péptica são variáveis e inespecíficos incluindo dor epigástrica, náuseas, vômitos, eructações, sensação de plenitude, refluxo e azia. Além disso, têm sido relatados muitos casos assintomáticos de úlceras (HUH; KIM, 2017; NARAYANAN et al., 2018; VOULGARIS et al., 2019).

Em geral, as pessoas acometidas com úlcera gástrica apresentam dor epigástrica pós-prandial, associada a falta de apetite e perda peso. Por outro lado, nas úlceras duodenais ocorre piora da dor epigástrica principalmente em jejum (com o estômago vazio) ou a noite (LANAS; CHAN, 2017; MALIK et al., 2023).

Quando não há um tratamento efetivo, geralmente ocorrem sintomas recorrentes devido a cicatrização espontânea e recidiva das ulcerações enquanto o fator etiológico persistir. Estimam-se que ocorra recidiva em 60% dos casos (STEPHEN et al., 2016), como também, podem ocorrer complicações como sangramento, hemorragia digestiva alta, perfuração, obstrução gastrointestinal e malignidade gástrica (KAVITT et al., 2019). Essas complicações ocorrem em cerca de 10 a 20% dos indivíduos com úlceras pépticas sendo que os usuários de AINEs têm quatro vezes mais risco de desenvolver complicações em comparação com os não usuários (LANAS; CHAN, 2017).

O sangramento é a complicação mais comum, geralmente se manifesta como melena ou hematêmese e ocorre em 1/1000 indivíduos a cada ano. A perfuração é uma emergência cirúrgica e está associada à mortalidade média de 20% (BYRNE et al., 2018).

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

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

#### 2.4.4 Terapêutica da úlcera péptica

O tratamento das úlceras pépticas tem como principais funções diminuir ou neutralizar a secreção ácida e/ou estimular o sistema de citoproteção gástrica (BOEING et al., 2016).

Os principais tratamentos foram durante muito tempo centrados na redução da secreção ácida gástrica, tais como: antiácidos, anticolinérgicos, citoprotetores, antagonista dos receptores H<sub>2</sub> de histamina e inibidores de bomba de prótons (mais utilizados na terapia atual) e os bloqueadores de ácido competitivo do potássio (BOEING et al., 2016; MALIK et al., 2023).

Os antiácidos são um grupo de medicamentos que estão no mercado há muitos anos. Eles foram inicialmente a defesa de primeira linha contra a úlcera péptica; entretanto, a descoberta dos inibidores da bomba de prótons revolucionou o tratamento da úlcera péptica. Atualmente, o uso de antiácido é restrito para aliviar a doença do refluxo gastroesofágico intermitente leve (DRGE) com azia associada (SONTAG, 1990; SALISBURY; TERRELL, 2023). Os antiácidos são uma combinação de vários compostos com vários sais de cálcio, magnésio e alumínio como ingredientes ativos, estes agem neutralizando o ácido do estômago e inibindo a pepsina, que é uma enzima proteolítica. Cada um desses sais catiônicos possui uma propriedade farmacológica característica que determina seu uso clínico. Os principais objetivos terapêuticos dos antiácidos são aliviar a dor epigástrica, reduzir piloroespasmos e evitar a digestão e corrosão pelo quimo ácido (TERRELL, 2023).

Entretanto, esses medicamentos apresentam efeitos indesejáveis como o curto período de duração de seu efeito, diarreia, constipação, alcalose metabólica e interações medicamentosas, devido a alteração do pH e formação de complexos quelatos insolúveis, alterando a biodisponibilidade de algumas drogas, como tetraciclina e fluoroquinolonas. Exemplos desses agentes são bicarbonato de cálcio ( $\text{NaH}_2\text{CO}_3$ ), carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), hidróxido de alumínio ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ) e de magnésio ( $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ) ou associações (SAŁAGA; MOSIŃSKA, 2017).

Os medicamentos citoprotetores, como o sucralfato, bismuto e misoprostol, estimulam os mecanismos de defesa da mucosa. O sucralfato é um sal básico de alumínio de sacarose octassulfato e foi um medicamento usado para tratar úlceras pépticas, feridas epiteliais, mucosite induzida por quimioterapia, proctite por radiação,

úlceras na doença de Behçet e queimaduras. O sucralfato apresenta sua ação formando uma camada protetora, aumentando a produção de bicarbonato, exibindo efeitos antipépticos, promovendo o crescimento, regeneração e reparação tecidual, além disso forma um revestimento protetor e protege a mucosa gástrica da pepsina, ácido péptico e sais biliares. Liga-se a proteínas carregadas positivamente em exsudatos, formando localmente uma substância espessa e viscosa (KUDARAVALLI; JOHN, 2022). A constipação e a interação com alguns medicamentos como antimicrobianos, fenitoína e varfarina, são os seus principais efeitos colaterais. Além disso, o sucralfato deve ser usado com cautela em pacientes com insuficiência renal devido ao risco de toxicidade de alumínio (SIERRA et al., 2018). Outro agente de revestimento são os compostos a base de bismuto, frequentemente utilizados em combinações no tratamento da erradicação do *H. pylori* devido a sua atividade antimicrobiana (ALKIM et al., 2017).

O misoprostol (análogo das PGE e PGI) atua nos receptores de prostaglandinas presentes nas células gástricas, 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 ocasiona diarreias, cólicas abdominais e abortos, o que restringiu o seu uso (BRUNTON et al., 2018; SAŁAGA; MOSIŃSKA, 2017).

A carbenoxolona é um derivado semissintético do ácido glicirrízino presente nas raízes de *Glycyrrhia glabra* (alcaçuz) e sua ação citoprotetora preserva a integridade da camada de muco pela capacidade de alterar a composição e quantidade de mucina além de estimular a produção, secreção e viscosidade do muco. Não é usada na terapêutica por causa da necessidade de altas doses para conseguir o efeito esperado, além de apresentar alguns efeitos colaterais como: hipertensão, retenção de líquidos e hipocalemia, preconizando seu uso como ferramenta farmacológica (DOSSETT et al., 2017; SHARMA et al., 2018).

Outra classe de medicamentos proposta foi a dos anticolinérgicos (antagonistas dos receptores M3), baseada na importância da secreção de acetilcolina pela inervação vagal. Estes foram usados na tentativa de diminuir a secreção ácida gástrica por meio do bloqueio de uma de suas vias, a via neuronal, e foram classificados como antissecretórios, e os protótipos usados foram a atropina e a pirenzepina, logo substituídos pela telenzepina. Por apresentar uma grande interação



com diferentes tipos de receptores muscarínicos aliada a baixa eficácia, vários efeitos colaterais foram detectados como taquicardia, cefaleia, visão turva, constipação severa e confusão mental. Desta forma, o uso dos antagonistas dos receptores  $M_3$  como agente antiulcerogênico se tornou obsoleto (SCHUBERT, 2014; BOEING et al., 2016).

Nessa perspectiva surgiram novos agentes terapêuticos, dentre eles, os antagonistas dos receptores  $H_2$  (cimetidina, ranitidina, famotidina, nizatidina e roxatidina). Esses medicamentos ligam-se ao receptor  $H_2$  e impedem a ligação da histamina, bloqueando o estímulo da secreção ácida gástrica, o que leva a redução do volume do suco gástrico e consequentemente da concentração de íons  $H^+$  (RANG; DALE, 2016; BONADONNA; LOMBARDO, 2022).

Uma grande vantagem dessa classe é a segurança de seu uso e sua eficácia, sobretudo na secreção basal noturna, em que a cimetidina consegue inibir cerca de 50% e ranitidina 70% da secreção ácida, respectivamente, porém sua falta de eficácia frente às úlceras recorrentes limita seu uso, sobretudo em tratamentos prolongados (HSU et al., 2016; SIERRA et al., 2018).

Alguns efeitos colaterais também foram observados nessa classe, a exemplo de cefaleia, tontura, dor muscular, prisão de ventre, náusea, alterações hematológicas, galactorréia (em mulheres) e ginecomastia (em homens), sendo esses dois últimos efeitos associados ao uso da cimetidina (RANG; DALE 2016; BONADONNA; LOMBARDO, 2022).

Os Inibidores de Bomba de Prótons são uma classe medicamentosa que surgiu ao fim da década de 1980, a qual suprime a secreção de ácido gástrico pelas células parietais do estômago. O omeprazol foi o primeiro medicamento desta classe a ser utilizado e após esse surgiram outros fármacos, com propriedades físico-químicas e farmacológicas semelhantes: esomeprazol (isômero geométrico do omeprazol), lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol, dexlansoprazol, dentre outros. (SPECHLER, 2018; OSHIMA, 2018; PÉRICO et al., 2020).

Os fármacos dessa classe são bases fracas que se tornam ativas no baixo pH, entram na célula parietal a partir do sangue e acumulam--se nos canalículos secretores ácidos da célula parietal, onde são ativados por um processo catalisado por prótons, que resulta na formação de uma sulfenamida tiofílica ou ácido sulfênico. Essa forma ativada reage por meio de ligação covalente com o grupo sulfidril de

cisteínas do domínio extracelular da  $H^+ - K^+ -ATPase$ , as quais são essenciais para a inibição da produção ácida. O resultado é a inibição irreversível da secreção ácida da bomba de prótons (HELGADOTTIR; BJORNSSON, 2019; PINTO; FRANCO, 2022).

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

O uso crônico dos inibidores de bomba de prótons, mesmo quando bem indicados, possuem grande impacto sobre alterações cardiovasculares, no metabolismo ósseo e nas funções mentais, principalmente na população idosa. Ademais, podem vir associadas a outras patologias de base e acabar por descompensá-las, como insuficiência cardíaca, diabetes e psicopatologias (SPECHLER, 2018). Esses efeitos adversos estão relacionados, proporcionalmente, à dose e à duração do uso, havendo maior degradação em doses cumulativas e em terapias extensas. Além disso, o uso de inibidores de bomba de prótons pode se tornar perigoso quando associa-se com anticoagulantes orais, como o clopidogrel, mesmo que estável, inclusive em usuários de longa data. Embora os inibidores de bomba de prótons sejam a classe mais usada hoje em dia, vários efeitos colaterais foram relatados na clínica, o que dificulta a adesão ao tratamento além de seu uso possibilitar o surgimento de outros distúrbios (SPECHLER, 2018; PINTO; FRANCO, 2022).

Recentemente foi lançada no mercado uma nova classe, os bloqueadores de ácido competitivo do potássio, representada pelo Vonoprazam, que atua por competição com o  $K^+$ , impedindo-o de passar para a  $H^+ / K^+ ATPase$  gástrica (OSHIMA, 2018).

O fumarato de Vonoprazan inibe a  $H^+ , K^+ -adenosina$  trifosfatase (ATPase) através da ligação iônica competitiva reversível do  $K^+$  que resulta na inibição da secreção ácida gástrica. Como o vonoprazan tem um valor de pKa relativamente alto e é estável em um ambiente ácido, ele pode se acumular no compartimento ácido das

células parietais gástricas, além de não requerer ativação ácida ao contrário dos IBPs. Assim, o vonoprazan pode alcançar uma supressão mais forte e duradoura da secreção de ácido gástrico do que os IBPs (SCOTT et al., 2015; KIYOTOKI; NISHIKAWA; SAKAIDA, 2020). O metabolismo dos IBPs envolve o citocromo P450 (CYP) 2C19, e os efeitos dos IBPs são influenciados pelo polimorfismo farmacogenético CYP2C19. No entanto, o vonoprazan não é afetado pelo CYP2C19, de modo que a inibição suficiente da secreção de ácido gástrico pode ser obtida em todos os indivíduos (KIYOTOKI; NISHIKAWA; SAKAIDA, 2020). Este medicamento foi usado clinicamente no Japão para o tratamento a curto prazo de úlcera péptica e infecção por *H. pylori* com base em sua eficácia na erradicação de cepas de *H. pylori* resistentes à claritromicina (OSHIMA, 2018; PÉRICO et al., 2020). No entanto, quando o tratamento de supressão de ácido de longo prazo é necessário, efeitos colaterais como hipergastrinemia, pneumonia, crescimento excessivo de bactérias no intestino delgado e infecção por *Clostridium difficile* pode ocorrer, com as drogas antiúlcera clássicas, como IBP ou mesmo com vonoprazan (LEHOURS et al., 2019).

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

A terapia clássica inclui o inibidor de bomba associado com amoxicilina e claritromicina ou metronidazol com claritromicina administrados de 7-14 dias (WANG et al., 2017). Estudos recentes relatam uma maior eficácia clínica na erradicação da infecção por *H. pylori*, quando há a substituição dos IBPs na terapia tripla pelo Vonoprazam (SUE, et al., 2023).

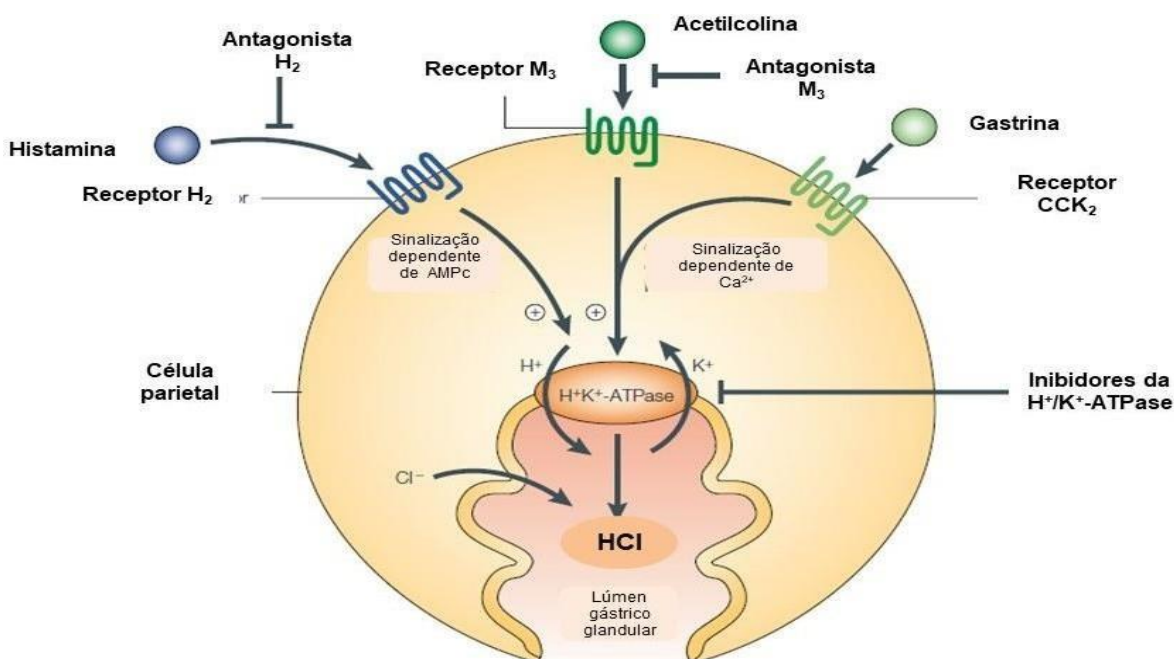
As úlceras relacionadas às infecções por *H. pylori* também podem ser tratadas por uma terapia quádrupla (IBP, bismuto, metronidazol e tetraciclina) ou (IBP, claritromicina, amoxicilina e metronidazol), ambos os regimes têm uma taxa de erradicação de mais de 90% (LANAS; CHAN, 2017) e a duração do tratamento varia

de uma a duas semanas, ocasionando resistência em alguns casos (LANAS; CHAN, 2017).

Assim, os agentes terapêuticos atualmente utilizados no tratamento das úlceras pépticas não são plenamente eficazes e apresentam vários efeitos colaterais e/ou adversos, cicatrização deficiente das úlceras e, por sua vez, a recorrência das ulcerações, gerando um alto impacto econômico para os usuários no tratamento de úlceras pépticas crônicas e para os sistemas públicos de saúde, sobretudo, devido suas complicações (YESILADA et al. 2014; LIJU et al. 2015; SCHUBERT, 2016).

Portanto, é relevante que estudos toxicológicos e farmacológicos, não clínicos e clínicos, sejam realizados para descoberta de novos fármacos seguros e eficazes com atividade gastroprotetora e antiulcerogênica. Os produtos naturais, em especial as espécies vegetais, tem apresentado efeitos promissores nos distúrbios gastrintestinais, a exemplo das úlceras gástricas, se constituindo como uma fonte atrativa para a busca e desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento dessa afecção (KANGWAN et al, 2014; ESCOBEDO-HINOJOSA et al., 2018).

**Figura 12 - Classes terapêuticas das úlceras pépticas**



Fonte: Adaptado de Olbe et al. (2003)

## 2.5 Produtos Naturais

Os produtos naturais são definidos como compostos químicos obtidos de organismos vivos como vegetais, animais, minerais e microrganismos (WANG et al., 2017), que possuem uma diversidade de moléculas bioativas com potencial de tornarem-se novas alternativas terapêuticas (SHEN, 2015; AHN, 2017).

Dentre os produtos naturais as plantas medicinais são frequentemente empregadas para as necessidades primárias de assistência à saúde. Estima-se que cerca de 80% dos indivíduos em países em desenvolvimento utilizam as plantas medicinais como fonte de tratamento para suas afecções (PIMENTEL et al., 2015), isso se dá principalmente devido à dificuldade de acesso aos cuidados médicos e farmacêuticos e falta de recursos para obtenção de medicamentos industrializados (VERRI; MOURA; MOURA, 2017).

As múltiplas atividades biológicas apresentadas pelas espécies vegetais são atribuídas à presença de seus metabólitos secundários (BARBOSA et al., 2017), que são agrupados de acordo com sua via de síntese, em classes, dentre elas tem-se os alcaloides, flavonoides e terpenos (GUO, 2017; SHAO; BAO, 2019).

### 2.5.1 Terpenos

Os terpenos são compostos de ocorrência natural, frequentemente encontrados em óleos essenciais, sendo os monoterpenos e sesquiterpenos encontrados em maior quantidade (LA CRUZ et al., 2014). Substâncias pertencentes a essa classe de metabólitos secundários são utilizadas como aromatizantes, fragrâncias e perfumes cosméticos, adjuvantes alimentares (DE SIQUEIRA et al., 2014) e podem ser utilizadas como bases medicamentosas para fitoterápicos (OLIVEIRA et al., 2014).

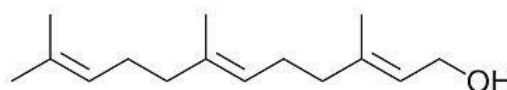
Os terpenos constituem 90% dos óleos essenciais (BARBOSA et al., 2017). Esses metabólitos são biossintetizados a partir da via do mevalonato (via clássica) e da via do metileritritol fosfato (via alternativa). Sua estrutura básica é composta por unidades de isopreno ( $C_5H_8$ ), oriundas do pirofosfato de isopentenila (IPP) e pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP). A partir do arranjo das unidades isoprênicas são definidas classes desses constituintes: monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ) e tetraterpenos ( $C_{40}$ ) (SHARMA, et al., 2015).

O crescente interesse no estudo dos terpenos está associado ao seu potencial de aplicação clínica, pois os terpenos apresentam diferentes propriedades biológicas, que podem ser úteis no tratamento de diversas doenças que afetam os sistemas orgânicos, tais como: efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, analgésicos, antitumorais, antimicrobianos, gastroprotetores, entre outros (WOJTUNIK-KULESZA et al., 2019).

### 2.5.2 Farnesol

Farnesol [fórmula molecular:  $C_{15}H_{26}O$ ; IUPAC: 3,7,11-Trimetil-2,6,10-dodecatrien-1-ol], um álcool encontrado em óleos essenciais. É um terpeno natural formado por 15 carbonos produzido em células vegetais por desfosforilação de farnesil pirofosfato (KHAN E SULTANA, 2011). O nome Farnesol foi dado por ter sido identificado pela primeira vez em flores de *Vachellia farnesiana* (L.) Wight & Arn, conhecida como “acacia farnese”, o sufixo “ol” foi acrescentado por ser quimicamente um álcool (TRIMBLE, 1885; DE ARAUJO DELMODES et al., 2019) (**Figura 13**).

**Figura 13 - Farnesol (3,7,11-Trimetil-2,6,10-dodecatrien-1-ol), estrutura química e fórmula molecular**



Farnesol

$C_{15}H_{26}O$

Fonte: Elaborada pelo autor no Programa de desenho químico (ChemDraw) (2023)

O Farnesol apresenta-se como um óleo líquido incolor de cheiro doce, suave e delicado. Esta substância tem ampla aplicação nas indústrias cosmética e de perfumaria (LAPCZYNSKI et al., 2008; DE ARAUJO DELMODES et al., 2019), é utilizada para melhorar aromas de perfumes doces à base de flores e como cosmético

antibacteriano (BUCHBAUER E ILIC, 2013). Na indústria de alimentos, o farnesol tem sido usado como agente aromatizante e foi identificado em mais de 30 óleos essenciais e outros produtos da flora usados na produção de alimentos. Exemplos desses produtos incluem: damasco, óleos de casca de frutas cítricas, suco de toranja, geléia de morango, gengibre, cravo, óleo de lúpulo, cardamomo, gengibre, tomilho, cerveja, uísque, manjerição, mamão, semente de anis e camomila alemã (BURDOCK, 2010; DE ARAUJO DELMODES et al., 2019).

Tem sido relatado que o farnesol pode ser empregado para tratar obesidade (KIM et al., 2017), diabetes (GOTO et al., 2011), hipercolesterolemia (SZILVASSY et al., 1998), para desencadear apoptose em várias células neoplásicas (PARK et al., 2014; DIZOVA E BUJDAKOVA, 2018; WANG et al., 2019) e atenuar os níveis de os fatores inflamatórios como COX-2, iNOS e óxido nítrico sintase (QAMAR E SULTANA, 2008).

# ***Objetivos***



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral:

Avaliar a atividade gastroprotetora do farnesol em modelos animais por agentes lesivos (etanol, estresse, anti-inflamatório não-esteroidal e contensão do suco gástrico) que mimetizam a úlcera gástrica no homem.

#### 3.2 Objetivos específicos:

- ❖ Realizar estudo comportamental por meio da toxicidade aguda e estimar a dose letal 50% (DL50) do farnesol;
- ❖ Avaliar a atividade gastroprotetora do farnesol em modelos clássicos de indução aguda de úlceras gástricas por agentes lesivos (etanol, estresse, anti-inflamatório não-esteroidal e contensão do suco gástrico);
- ❖ Avaliar o efeito da administração oral e intraduodenal do farnesol sobre os parâmetros da secreção gástrica (pH, concentração de íons  $H^+$  e volume do suco gástrico);
- ❖ Elucidar os prováveis mecanismos de ação relacionados a atividade gastroprotetora frente ao efeito citoprotetor (grupamentos sulfidríla, óxido nítrico, canais de potássio sensíveis ao ATP, muco e prostaglandinas), efeito antioxidante (GSH, MPO, MDA e SOD) e imunorregulatório (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10).

# ***Material e Métodos***

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Local da Pesquisa

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

#### 4.1.2 Substância Selecionada para Estudo: Farnesol

##### Propriedades Gerais

O Farnesol (3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1-ol) é um produto de origem natural, pertencente à classe dos sesquiterpenos, sendo amplamente encontrado na própolis, nos óleos essenciais de plantas aromáticas como capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e camomila (*Matricharia camomila*), em frutas cítricas como pêssegos e vegetais como tomates e milho (DUNCAN; ARCHER, 2008; KHAN; SULTANA, 2011; KU; LIN, 2015; ANDRÉ, 2017).

##### Propriedades Farmacológicas

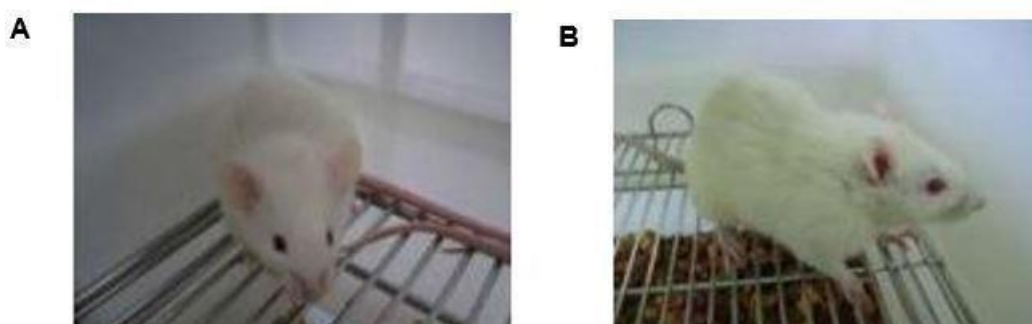
As atividades biológicas relacionadas ao Farnesol, já são bem descritas na literatura como a atividade antioxidante (KHAN; SULTANA, 2011), anti-inflamatória (KU; LIN, 2015), ansiolítica, antinociceptiva (SHAHNOURI et al., 2016), anti-obesidade (KIM et al., 2017), antimicrobiana (KIM et al., 2018) e antitumoral (WANG, 2018).

O farnesol a ser utilizado nesse estudo será adquirido da Sigma-Aldrich Chemical Co, U.S.A. com as seguintes especificações: pureza  $\geq 95\%$ , apresenta fórmula molecular  $C_{15}H_{26}O$ , cuja massa molar é de 222.37 g/mol, se configurando um líquido amarelo claro a temperatura ambiente com ponto de ebulição 111°C e número de CAS 4602-84-0.

### 4.1.3 Animais

Para realização desses experimentos foram utilizados camundongos *Mus musculus*, linhagem Swiss, albinos machos (**Figura 14A**), com 6-8 semanas, pesando 25-35g e ratos *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, albinos machos (**Figura 14B**), com 7-8 semanas, pesando 180-250g, ambos provenientes da Unidade de Produção Animal – UPA/IPeFarM/UFPB.

**Figura 14 - Animais utilizados em ensaios farmacológicos: (A) camundongo Swiss (*Mus musculus*) e (B) rato Wistar (*Rattus norvegicus*)**



Fonte: Arquivo LFTGI (2023)

Os animais foram aclimatados a temperatura de  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e ciclo claro-escuro de 12 h, alimentados com ração industrial do tipo *pellets* e água *ad libium*, submetidos a restrição alimentar, com variação de 4 à 24 h, segundo cada metodologia em que a via oral foi utilizada para a absorção do fármaco ou ação da droga. Esses animais foram distribuídos ( $n= 3-10$ ) ao acaso nos diferentes grupos experimentais: grupo normal ou sadio (animais que não foram submetidos à lesão gástrica), controle negativo (tween 80 5% - veículo que solubiliza a substância teste), controle positivo (droga padrão ou ferramenta farmacológica) ou grupos testes farnesol em doses crescentes ou dose mais efetiva, por via oral – gavagem e acomodados em caixas de plástico com fundo falso para evitar coprofagia ( $n= 5$  animais por caixa), com livre acesso a água até 1 hora antes dos experimentos.

Todos os procedimentos experimentais tiveram início pela manhã, seguiram os princípios internacionais para o estudo com animais de laboratório (Zimmermann, 1983) e foram submetidos a apreciação e aprovação pela Comissão de Ética em Uso Animal institucional (UFPB) sob o seguinte n°: 9667170122 (**Anexo A**). Todos os

esforços foram realizados no sentido de reduzir o número de animais utilizados, a dor, o sofrimento e o estresse dos mesmos.

#### 4.1.4 Substâncias Utilizadas

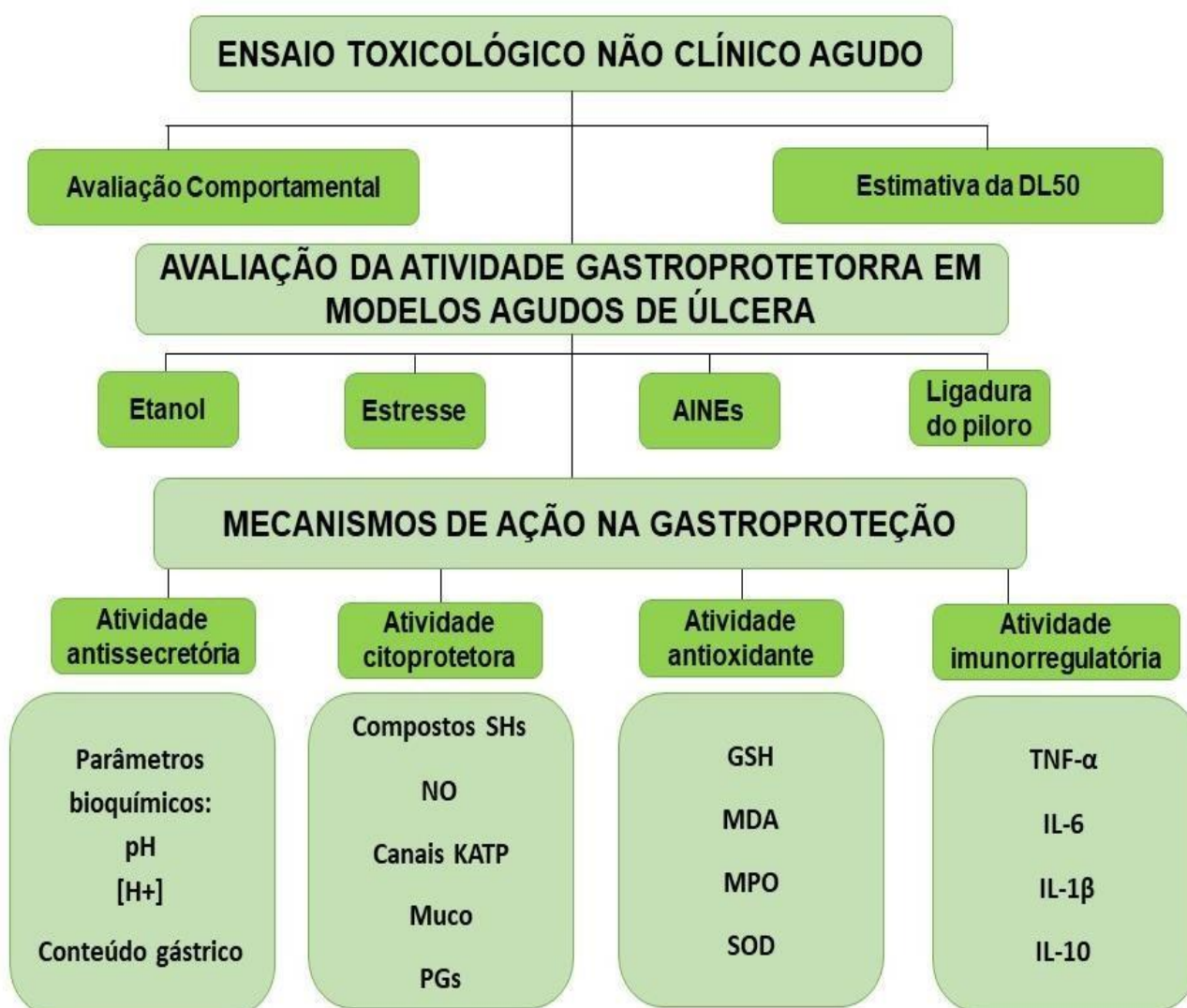
Foram utilizadas as seguintes substâncias e reagentes: acetonitrila (SIGMA-ALDRICH), ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) (SIGMA-ALDRICH), ácido clorídrico (MERCK, Germany), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (SIGMA-ALDRICH), ácido periódico de Schiff (LEICA), ácido sulfúrico (SIGMA-ALDRICH),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

O Farnesol foi solubilizado em solução tween 80 5%. As drogas padrão carbenoxolona, ranitidina, misoprostol, N-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) e N-etilmaleimida (NEM) foram solubilizadas em solução salina 0,9%. A indometacina foi solubilizada em carbonato de sódio 0,5% e a glibenclamida em solução de NaOH 0,02N em solução glicosada 4%.

## 4.2 Métodos

Todas as metodologias utilizadas no presente trabalho estão representadas no fluxograma abaixo (**Figura 15**).

**Figura 15 - Fluxograma Experimental do Estudo com o Farnesol**



Fonte: Arquivo LFTGI (2022)

### 4.2.1 Ensaio Toxicológico Não-Clínico Oral Agudo

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

além de mensurar o consumo de ração e a ingesta de água, o peso e alterações nos órgãos e estimar a dose letal 50% (DL<sub>50</sub>) de acordo com o preconizado pelo guia da OECD 423 (OECD, 2001).

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

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

#### **4.2.2 Avaliação Da Atividade Gastroprotetora**

Para avaliar o potencial efeito gastroprotetor do sesquiterpeno farnesol foram utilizados diferentes protocolos de indução de úlceras: etanol, estresse, anti-inflamatório não esteroidal e retenção do suco gástrico. Para isso, foram administradas quatro doses crescentes (25, 50, 100 e 200 mg/kg) da substância teste. Após a eutanásia dos animais, os estômagos foram retirados e abertos ao longo da grande curvatura para realizar a avaliação das úlceras.

No modelo experimental com camundongos, as lesões ulcerativas foram quantificadas com auxílio de uma lupa (OLYMPUS Optical TL3 – SZ4) e expressas

como Índice de Lesão Ulcerativa (ILU). O cálculo do ILU foi realizado a partir do número de lesões e sua severidade (SZELENYI; THIEMER, 1978), conforme a fórmula a seguir:

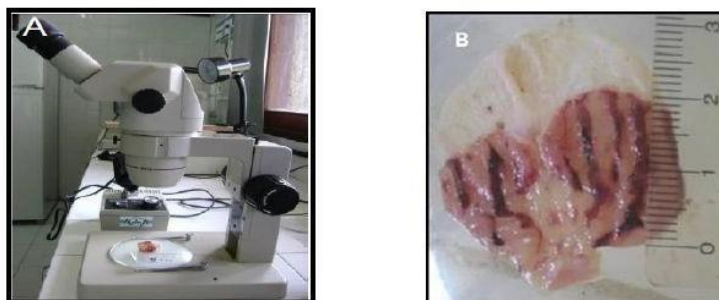
**Nível 1: pontos hemorrágicos e ulcerações até 1 mm;**

**Nível 2: ulcerações com 2 mm;**

**Nível 3: ulcerações profundas a partir de 3 mm.**

$$ILU = \Sigma (\text{n}^\circ \text{ de lesões nível 1} \times 1) + (\text{n}^\circ \text{ de lesões nível 2} \times 2) + (\text{n}^\circ \text{ de lesões nível 3} \times 3)$$

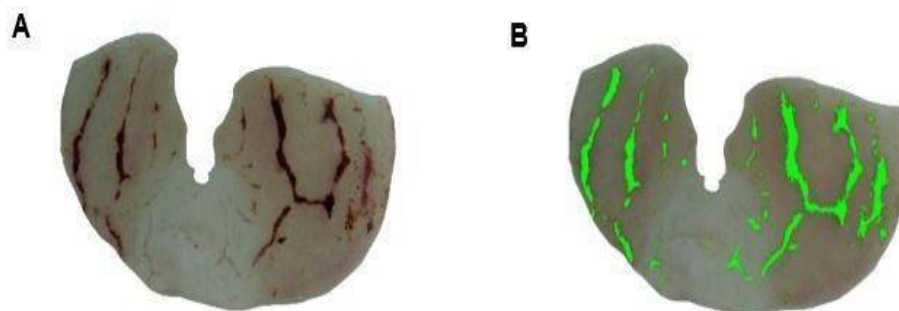
**Figura 16 - Lupa OLYMPUS Optical TL3-SZ40(A) e estômago ulcerado de rato com etanol (B) para determinação do ALU**



Fonte: Arquivo LFTGI (2022)

Nos modelos experimentais realizados com ratos, as lesões gástricas foram expressas como Área de Lesão Ulcerativa (ALU). Para determinar a ALU, os estômagos foram fotografados (dimensão de 12 megapixels) e a área da lesão avaliada com auxílio do programa AVSoft Bioview Spectra 4.0® (**Figura 17**).

**Figura 17 - Estômago ulcerado de rato com etanol (A) e quantificação da área de lesão ulcerativa (B) com o programa AVSoft Bioview Spectra 4.0®**



Fonte: Arquivo LFTGI (2022)



#### **4.2.2.1 Protocolos de Indução Aguda de Úlcera Gástrica**

##### **4.2.2.1.1 Úlcera Gástrica Induzida por Etanol Absoluto**

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

##### **4.2.2.1.2 Úlcera Gástrica Induzida por Estresse (contensão e frio)**

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

#### **4.2.2.1.3 Úlcera Gástrica Induzida por Anti-inflamatório Não Esteroidal (AINE)**

Esse protocolo experimental foi conduzido de acordo com o modelo proposto por Puskas (1997). Para isso, camundongos Swiss ( $n = 7$ ) submetidos a um jejum de 24 horas foram pré-tratados (v.o.) com solução tween 80 5% (10 mL/kg - controle negativo), ranitidina (50 mg/kg - controle positivo) ou farnesol (25, 50, 100 e 200 mg/kg). Após 30 minutos, a úlcera gástrica foi induzida pela administração do agente lesivo piroxicam (30 mg/kg) por via subcutânea (s.c.) e decorrido 4 horas, os camundongos foram eutanasiados, os estômagos retirados e abertos para determinação do ILU.

#### **4.2.2.1.4 Úlcera Gástrica Induzida por Contensão do Suco Gástrico (ligadura do piloro)**

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

#### **4.2.3 Investigação dos Mecanismos de Ação Envolvidos na Atividade Gastroprotetora**

Após comprovar o efeito gastroprotetor do farnesol nos diferentes modelos agudos de indução de úlceras gástricas, o próximo passo, foi avaliar os mecanismos de ação subjacentes a esse efeito. A avaliação dos mecanismos de ação foi iniciada com a investigação da atividade antissecreatória ou neutralizante da secreção ácida

gástrica, utilizando como critérios os parâmetros bioquímicos do suco gástrico (pH, concentração de íons  $H^+$  e volume do suco gástrico), a partir do modelo de ligadura de piloro. Para avaliação de uma possível atividade citoprotetora foi verificada a participação dos grupamentos sulfidrílicos, NO,  $K_{ATP}$ , muco e prostaglandinas utilizando bloqueadores específicos. O efeito antioxidante foi avaliado por meio da atividade da mieloperoxidase (MPO), dos níveis de malonaldeído (MDA), glutathiona reduzida (GSH) e pela atividade da superóxido dismutase (SOD). Já os mecanismos imunorregulatórios foram determinados medindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias fatores de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e a citocina anti-inflamatória interleucina-10 (IL-10) por ELISA a partir das amostras de tecido gástrico.

#### **4.2.3.1 Mecanismo Antissecretório ou Neutralizante**

##### **4.2.3.1.1 Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos do Suco Gástrico após Ligadura do Piloro (v.o./i.d.) (SHAY, 1945)**

Após a eutanásia dos animais, os estômagos foram abertos, o conteúdo gástrico coletado e determinado os seguintes parâmetros bioquímicos: potencial hidrogeniônico (pH), concentração de íons hidrogênio ( $H^+$ ) e volume do suco gástrico (medido indiretamente pela diferença do peso do estômago cheio e vazio). O estômago foi pinçado de forma a evitar perdas de conteúdo gástrico e pesado em balança analítica, em seguida, foi aberto ao longo da grande curvatura e recolhido o conteúdo em um tubo Falcon. O estômago vazio foi novamente pesado e ao conteúdo gástrico foram adicionados 10 mL de água destilada e realizada a centrifugação a 3.000 rpm durante 10 minutos em temperatura ambiente. A partir do sobrenadante, o pH foi verificado com o auxílio de um pHmetro digital PG2000 (GEHAKA, Brasil) e 10 mL desse conteúdo foi retirado, distribuído em alíquotas de 5 mL em dois *erlenmeyers*, para a realização da titulação do suco gástrico (em duplicata) e determinar a concentração de  $H^+$ . A titulação foi realizada com uma bureta de vidro graduada utilizando o hidróxido de sódio (NaOH) 0,01N como agente titulante e a fenolftaleína como solução indicadora. A concentração de  $H^+$  foi calculada conforme equação a seguir:

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

#### **4.2.3.2 Mecanismos Citoprotetores**

##### **4.2.3.2.1 Avaliação da Participação dos Grupamentos Sulfidrílicos (SHs) na Gastroproteção (MATSUDA et al., 1999)**

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

##### **4.2.3.2.2 Avaliação da Participação do Óxido Nítrico (NO) na Gastroproteção (SIKIRIĆ et al., 1997)**

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

##### **4.2.3.2.3 Avaliação da Participação dos Canais de Potássio ATP-dependentes ( $K_{ATP}$ ) na Gastroproteção (OLINDA et al., 2008)**

Nesse modelo, ratos Wistar ( $n = 7$ ) com jejum de 24 horas foram divididos em 6 grupos distintos: 3 grupos receberam previamente solução salina 0,9% (10 mL/kg - i.p.) e os outros 3 grupos receberam glibenclamida (5 mg/kg - i.p.), um agente

bloqueador dos K<sub>ATP</sub>. Decorrido 30 minutos, os animais foram tratados com solução tween 80 5% (10 mL/kg - v.o. - controle negativo), diazóxido (3mg/kg - i.p. - um ativador de K<sub>ATP</sub>) ou com a dose mais efetiva do farnesol (100 mg/kg - v.o.). Após 60 minutos, foram induzidas as lesões ulcerativas pela administração (v.o.) de etanol absoluto (4 mL/kg) e após mais 60 minutos, os animais foram eutanasiados, os estômagos retirados, abertos e fotografados para a determinação da ALU.

#### **4.2.3.2.4 Determinação da Concentração de Muco Aderido à Parede Gástrica (RAFATULLAH et al., 1990) com modificações**

Após jejum de 24 h, ratos Wistar (n = 10), foram distribuídos em três grupos e tratados (v.o.) com solução tween 80 5% (10 mL/kg - controle negativo), carbenoxolona (200 mg/kg - controle positivo) ou a dose mais efetiva do farnesol (100 mg/kg). Após 1 hora, os animais foram anestesiados (quetamina 5% e xilazina 2% - i.m.) e submetidos a um procedimento cirúrgico abaixo da apófise xifoide para realização da ligadura do piloro. Decorrido 4 horas, os animais foram eutanasiados, o estômago pinçado e retirado, lavado em água gelada e aberto ao longo da grande curvatura. A porção glandular do estômago foi separada, pesada e imersa, por duas horas, em 10 mL de solução tampão de *alcian blue* (0,1%), corante que atua complexando-se ao muco. O excesso de *alcian blue* foi removido pelas lavagens do estômago (2 x) com 7 mL de solução sacarose (0,25 mol/L), sendo a primeira por 15 minutos e a segunda por 45 minutos. O corante complexado ao muco aderido à parede do estômago foi extraído com 10 mL de cloreto de magnésio (0,5 mol/L), agitando-se intermitentemente por 1 minuto, a cada 30 min, durante 2 horas com auxílio de um vórtex. Em seguida, os fragmentos de tecidos foram retirados e as soluções emulsificadas foram armazenadas em refrigerador por aproximadamente 18 horas. No dia seguinte, as amostras foram resuspensas durante um minuto, retirada uma alíquota de 4 mL da solução, adicionado 4 mL de éter etílico (P.A.) e agitado por 2 minutos em vórtex. A emulsão obtida foi centrifugada por 10 min a 3.600 rpm e o sobrenadante foi descartado juntamente com o anel de muco. Aliquotas de 200 µL do branco, solução padrão e dos grupos testes foi aliquotada em placas de 96 poços e as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 590 nm (modelo MULTISCA, MARCA LABSYSTEMS®). A determinação da concentração de *alcian blue* das amostras foi feita por interpolação em uma curva padrão com várias concentrações

conhecidas de *alcian blue*. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de *alcian blue*/g detectado.

#### **4.2.3.2.5 Avaliação da Participação das Prostaglandinas (PGs) na Gastroproteção (RODRIGUES et al., 2010)**

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

#### **4.2.3.3 Atividade Antioxidante**

##### **4.2.3.3.1 Determinação dos Níveis de Glutathiona Reduzida (GSH) (FAURE; LAFOND, 1995)**

Os níveis de GSH foram determinados por meio da reação com o ácido 5,5'-ditiobis-2- nitrobenzóico (DTNB). As amostras de tecidos foram suspensas em EDTA 0.02M 1:10 (v/v) e picotadas com tesoura durante 15 segundos sobre uma placa arrefecida com gelo. A suspensão resultante foi homogeneizada durante 2 minutos por meio de um homogeneizador. A partir deste homogenato, foram retirados 400  $\mu\text{L}$  e adicionou-se 320  $\mu\text{L}$  de água destilada e 80  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético 50%, sendo centrifugado a 3.000 rpm a 4 °C por 15 minutos. Em seguida, foram pipetados 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante resultante em microplaca de 96 poços e adicionados 200  $\mu\text{L}$  de Tris e 25  $\mu\text{L}$  de DTNB. Esta microplaca foi encubada a temperatura ambiente e após 15 minutos foi realizada a leitura em espectrofotômetro (*Polaris*) no comprimento de onda de 412 nm. A curva de calibração foi feita com L-glutathiona reduzida. Os valores de GSH das amostras foram calculados pela interpolação dos valores com a curva padrão e expressos em mg de NPHS (grupos de tióis não protéicos)/g tecido.

#### **4.2.3.3.2 Determinação dos Níveis de Malondialdeído (MDA) (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990) – adaptado**

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

#### **4.2.3.3.3 Determinação da Atividade da Mieloperoxidase (MPO) (KRAWISZ et al., 1984)**

Os fragmentos de tecido foram homogeneizados no tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) que tem função de detergente, lisando os grânulos dos neutrófilos que contém a mieloperoxidase. Após a homogeneização, o material foi submetido a ação de um sonicador por 5 minutos. Em seguida, a amostra foi submetida a um duplo processo de congelamento e descongelamento para facilitar o rompimento das estruturas celulares e consequentemente a liberação da enzima. O homogenato foi centrifugado a 5.000 rpm a 4 °C por 20 minutos e congelados por 24 horas. No dia seguinte, foram coletados 7 µL do sobrenadante, ao qual adicionou-se 200 µL da solução de leitura (cloridrato de o-dianisidina, tampão fosfato de potássio e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%). A leitura foi realizada utilizando espectrofotômetro no comprimento de

onda de 450 nm, nos tempos 0 e 1 minuto. Os resultados foram expressos como unidades de mieloperoxidase por grama de tecido.

#### **4.2.3.3.4 Determinação da Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) (SUN; OBERLEY; LI, 1988)**

A quantidade da enzima foi medida por meio da capacidade de inibir a redução fotoquímica do azul de nitro-tetrazólio (NBT). Nesse método experimental, a riboflavina reduzida fotoquimicamente gera o  $O_2^{\cdot-}$  que reduz o NBT e produz o formazan que absorve no comprimento de onda de 546-630 nm. Na presença da SOD a redução do NBT foi inibida. Os resultados foram expressos em unidades da enzima por grama de proteína, que é a quantidade de SOD necessária para inibir a taxa de redução do NBT em 50%. Para isso, as amostras de tecido foram homegeinizadas em tampão fosfato (0,4 M, pH 7,0) e centrifugadas durante 15 minutos a 10.000 rpm em 4 °C. O sobrenadante foi retirado e utilizado no ensaio. As palcas contendo o meio de reação (tampão fosfato 10 mM), L-metionina (1,79 mg/mL, pH 7,8), riboflavina (0,2 mg/mL, pH 7,8), NBT (1,5 mg/mL, pH 7,8) e 10 µL do sobrenadante da amostra foram expostos a lâmpada fluorescente (15 W) durante 10 minutos. Após esse período, levou-se o material ao espectrofotômetro 630 nm. A concentração de proteínas foi medida utilizando o método de Bradford (1976).

#### **4.2.3.4 Mecanismos Imunorregulatórios**

##### **4.2.3.4.1 Determinação das Interleucinas (KENDALL et al., 1983)**

Os níveis de interleucinas foram determinados por meio do ensaio imunoenzimático de ELISA (tipo sanduíche). Os anticorpos de captura de cada interleucina foram sensibilizados em microplaca de 96 poços (fundo chato). Após 18 h, a placa foi lavada com solução de tween 20 0,05% (tampão de lavagem), 3 vezes, bloqueada com uma solução de albumina sérica bovina 1% e lavada novamente por mais 3 vezes com o tampão de lavagem. Logo após, um macerado do tecido foi preparado em tampão fosfato salino (PBS) na proporção 100 mg de tecido para 600 µL de PBS, homogeneizado e centrifugado a 4.000 rpm por 10 minutos a 4° C. Os sobrenadantes (100 µL) foram pipetados em placa de 96 poços, realizada a curva



padrão, incubada por 2 h e lavada com tampão de lavagem por 3 vezes. O anticorpo secundário biotinilado (100 µL) foi adicionado em cada poço, seguido de incubação por 2 horas e 3 lavagens. A placa foi incubada com estreptavidina durante 20 minutos, lavada 3 vezes, adicionado o substrato para revelação (Kit DuoSet® – R & D Systems Catalog – DY999) e incubada por 20 minutos. Decorrido esse tempo, a reação foi interrompida adicionando 50 µL da solução de parada e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450 nm. Os resultados foram obtidos pela interpolação com a curva padrão e expressos em pg de interleucina/mL.

### 4.3 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (d.p.). Para análise dos dados obtidos nos ensaios de toxicidade aguda foi realizado o teste “t” de *Student* não pareado para comparação de 2 grupos. Para os demais protocolos experimentais foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelos pós testes de Dunnett e Tukey para múltiplas comparações. O nível de significância mínimo foi  $p < 0,05$ . Os dados foram digitados em planilha eletrônica Excel (*Microsoft Office 2010®*) e posteriormente exportados para o programa *GraphPad Prism* versão 6.0 (San Diego, CA, EUA), onde foram analisados.

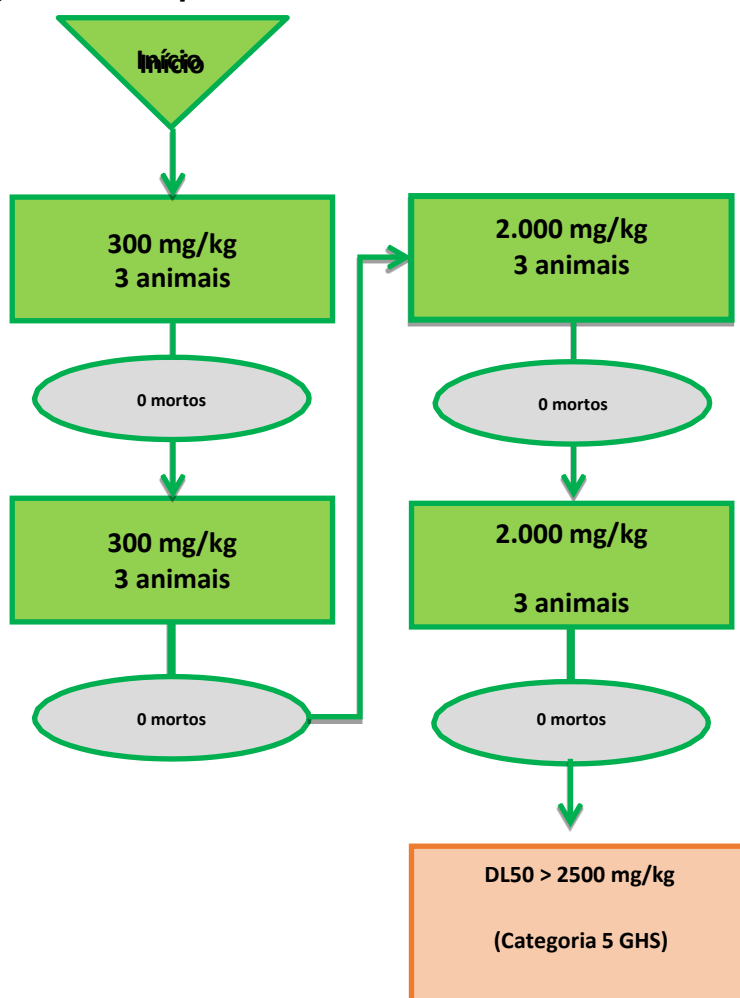
# ***Resultados***

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Ensaio Toxicológico Não-Clínico Oral Agudo

Após análise dos dados, não foram observadas alterações comportamentais dos animais tratados com farnesol nas doses 300 ou 2000 mg/kg (v.o.) quando comparados ao grupo controle (tween 80 5%). Além disso, não foi verificada morte no grupo de animais (n=3) tratados com farnesol (300 mg/kg). Este procedimento foi repetido com a mesma dose, e mais uma vez não foi constatado morte dos animais. A partir disto, o próximo passo foi avaliar o grupo de animais tratados com farnesol (2000 mg/kg), em que não foi verificada a morte de nenhum animal. Após repetição do tratamento sob as mesmas condições, também não foi observada morte de nenhum animal. Com isto, foi possível estimar que a DL50 do farnesol é maior que 2500 mg/kg, se enquadrando na categoria 5 de acordo com Sistema de Classificação Harmonizada Global (GHS), como demonstrado na **figura 18**.

**Figura 18 - Esquema da Estimativa da DL50 do Farnesol**



Fonte: Arquivo LFTGI (2023)

Com relação a evolução ponderal ao índice de órgãos e consumo de água e ração, não foram observadas alterações promovidas pelo farnesol nas doses de 300 e 2000 mg/kg em comparação ao grupo controle (Tween 80 5%) (**Tabela 1**).

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

Parâmetros	Tratamentos		
Evolução ponderal (g)	Tween 80 5%	Farnesol 300 mg/kg	Farnesol 2000 mg/kg
Ganho de massa	8,66 ± 0,51	8,16 ± 0,98	9,33 ± 0,51
<b>Índice de órgãos</b>			
Fígado	61,18 ± 0,15	56,32 ± 0,24	57,17 ± 0,33
Coração	5,40 ± 0,03	4,86 ± 0,01	4,76 ± 0,02
Rins	17,61 ± 0,06	16,65 ± 0,05	17,07 ± 0,05
Baço	3,42 ± 0,01	3,67 ± 0,01	3,48 ± 0,01
<b>Consumo de água (mL)</b>			
	25,38 ± 2,55	24,15 ± 2,66	26,85 ± 2,28
<b>Consumo de ração (g)</b>			
	18,04 ± 1,46	17,18 ± 1,36	19,55 ± 1,55

Os resultados estão expressos como média ± d.p. (n=6). Teste "t" de Student não-pareado comparado ao grupo controle (tween 80 5%), \*p<0,05 e \*\* p<0,01. Para avaliação dos órgãos, os valores foram expressos como índice de órgãos que corresponde a divisão do peso dos órgãos (mg) pelo peso dos animais (g).

## 5.2 Avaliação da Atividade Gastroprotetora do Farnesol

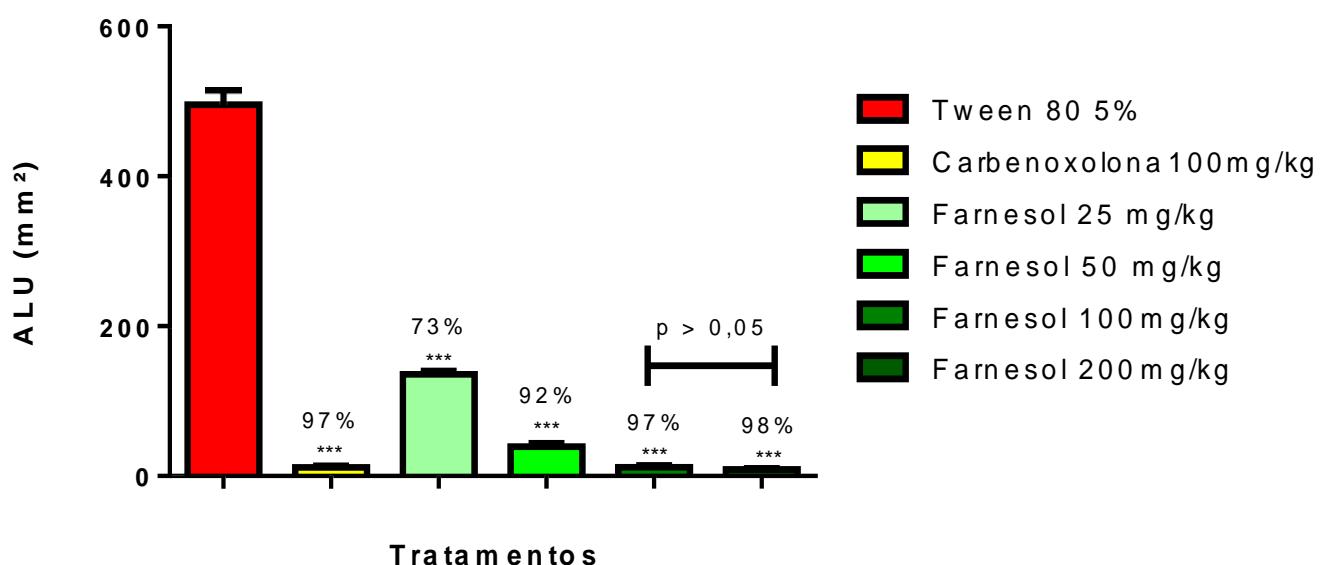
### 5.2.1 Úlceras Gástricas Induzidas por Etanol

De acordo com os resultados, o etanol produziu lesões gástricas significativas ( $495,8 \pm 19,1 \text{ mm}^2$ ) na mucosa dos animais do grupo controle negativo (tween 80 5%). Os animais tratados previamente (v.o.) com a carbenoxolona (100 mg/kg – controle positivo), droga citoprotetora de referência, apresentaram uma redução significativa ( $p<0,001$ ) da área lesionada ( $11,9 \pm 1,9 \text{ mm}^2$ ) em comparação ao controle negativo, com um percentual de inibição da lesão ulcerativa de 97%. De forma semelhante, o farnesol em todas as doses avaliadas (25, 50, 100 e 200 mg/kg v.o.), apresentou uma

redução significativa ( $p < 0,001$ ) da ALU causada pelo etanol quando comprado ao grupo tween 80 5%, com um percentual de inibição da lesão ulcerativa de 73% ( $135,8 \pm 4,5 \text{ mm}^2$ ), 92% ( $39,2 \pm 4,4 \text{ mm}^2$ ), 97% ( $11,9 \pm 2,5 \text{ mm}^2$ ) e 98% ( $8,6 \pm 1,5 \text{ mm}^2$ ) respectivamente.

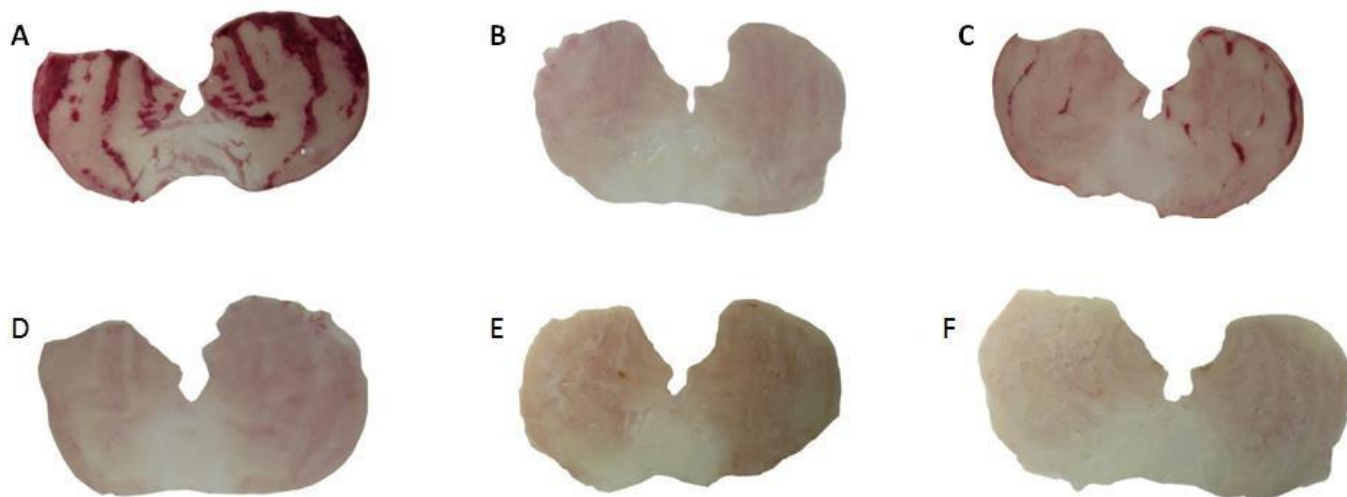
Embora o farnesol tenha apresentado efeito gastroprotetor significativo em todas as doses testadas, a dose de 100 mg/kg foi selecionada como a mais efetiva, já que não apresentou diferença significativa da dose de 200 mg/kg, mas apresentou diferença das demais doses quando avaliadas pelo teste de Tukey de múltiplas comparações. Esses resultados estão expressos no **Gráfico 1** e ilustrados na **Figura 19**.

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



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

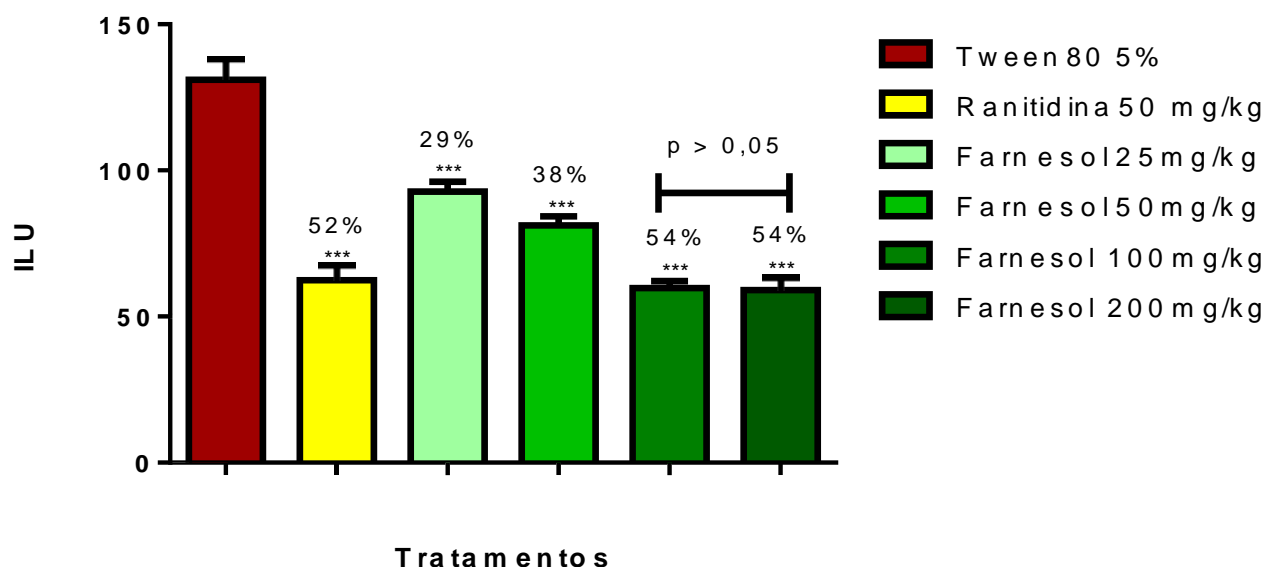
**Figura 19 - Aspectos macroscópicos da mucosa gástrica de ratos Wistar pré-tratados (v.o.) com tween 80 5% (A); carbenoxolona 100 mg/kg (B); farnesol 25 mg/kg (C), 50 mg/kg (D), 100 mg/kg (E) e 200 mg/kg (F) no modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol**



### **5.2.2 Úlceras Gástricas Induzidas pelo Estresse (imobilização e frio)**

No modelo experimental de úlcera gástrica induzida por estresse por imobilização e frio, a ranitidina (50 mg/kg) e o farnesol (25, 50, 100 e 200 mg/kg) administrados por via oral reduziram significativamente ( $p < 0,001$ ) o ILU em 52% ( $62,4 \pm 4,9$ ), 29% ( $92,8 \pm 3,3$ ), 38% ( $81,2 \pm 3,1$ ), 54% ( $59,8 \pm 2,3$ ) e 54% ( $59,0 \pm 4,1$ ), respectivamente, quando comparado ao controle (tween 80 5%) ( $131 \pm 3,0$ ) (**Gráfico 2**).

**Gráfico 2 - Efeito da administração oral da ranitidina e do farnesol em úlceras gástricas induzidas pelo estresse (imobilização e frio) em camundongos em *swiss machos***

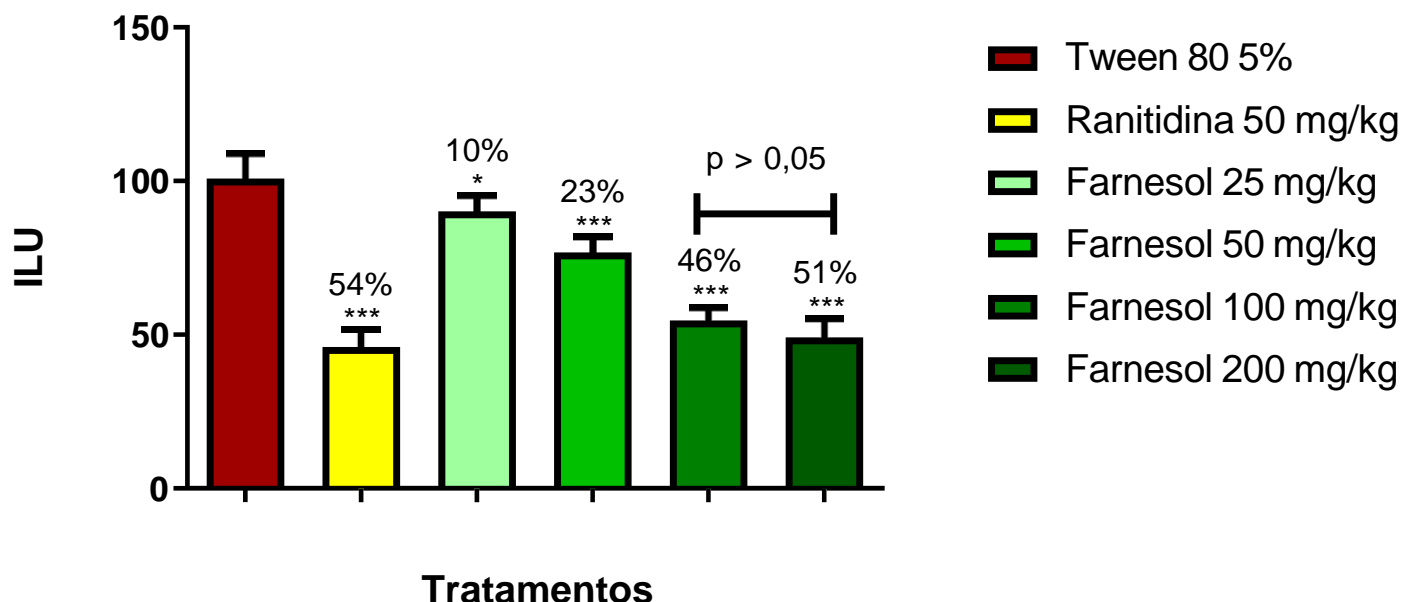


Os resultados estão expressos como média  $\pm$  d.p. ANOVA seguido do teste de Dunnett e Tukey. \*\*\* $p < 0,001$ , comparado com o grupo controle (Tween 80 5%) ( $n=7$ ). As barras acima das doses de 100 e 200 mg/kg indicam a existência ou não de diferenças estatísticas no teste de Tukey. ILU= Índice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

### 5.2.3 Úlceras Gástricas Induzidas por Anti-inflamatório Não Esteroidal (Piroxicam)

Os resultados obtidos do modelo de úlcera gástrica induzida por AINEs (Piroxicam) demonstraram que a administração oral de ranitidina (50 mg/kg) e do farnesol (25, 50, 100 e 200 mg/kg) apresentaram uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) do ILU em 54% ( $46,0 \pm 5,7$ ), 10% ( $90,2 \pm 5,8$ ), 23% ( $76,8 \pm 4,9$ ), 46% ( $54,6 \pm 4,1$ ) e 51% ( $49,2 \pm 5,9$ ), respectivamente, em comparação ao grupo controle negativo (tween 80 5%) ( $100,8 \pm 7,8$ ) (**Gráfico 3**).

**Gráfico 3 - Efeito da administração oral da ranitidina e farnesol em úlceras gástricas induzidas por anti-inflamatório não esteroidal (Piroxicam) em camundongos**



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

#### 5.2.4 Úlceras Gástricas Induzidas por Contensão do Suco Gástrico (ligadura do piloro)

Os resultados obtidos a partir do protocolo de úlcera gástrica induzida por contensão do suco gástrico demonstram que a ranitidina (50 mg/kg) e o farnesol (100 mg/kg) administrados por via oral reduziram o ILU em 48% e 59%, respectivamente, em comparação ao grupo controle negativo (tween 80 5%). Quando administrados intraduodenalmente, a ranitidina e o farnesol reduziram o ILU em 45% e 53%, respectivamente, em comparação ao grupo tween 80 5%. Esses resultados estão expressos na **Tabela 2**.



**Tabela 2** - Efeito da administração oral e intraduodenal da ranitidina e farnesol em úlceras gástricas induzidas por ligadura do piloro em ratos

Tratamento	Via de administração	Dose (mg/kg)	ILU	Inibição (%)
Tween 80 5%	Oral	-	291,7 ± 19,0	-
Ranitidina	Oral	50	150,0 ± 8,42 <sup>***</sup>	48
Farnesol	Oral	100	120,4 ± 9,48 <sup>***</sup>	59
Tween 80 5%	Intraduodenal	-	233,4 ± 8,15	-
Ranitidina	Intraduodenal	50	129,1 ± 3,56 <sup>###</sup>	45
Farnesol	Intraduodenal	100	109,6 ± 7,19 <sup>###</sup>	53

Os resultados estão expressos como média ± d.p. ANOVA seguido do teste de Dunnett: <sup>\*\*\*</sup>p<0,001 comparado ao grupo tween 80 5% via oral e <sup>###</sup>p<0,001 comparado ao grupo tween 80 5% via intraduodenal, (n= 8-10). ILU= Índice de Lesão Ulcerativa.

### 5.3 Avaliação dos Mecanismos de Ação Envolvidos no Efeito Gastroprotetor do Farnesol

#### 5.3.1 Mecanismo Antissecretório ou Neutralizante

##### 5.3.1.1 Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos Contensão do Suco Gástrico (ligadura do piloro)

A partir do protocolo de contenção do suco gástrico por meio ligadura do piloro, foram determinados os parâmetros bioquímicos do conteúdo estomacal de ratos: pH, [H<sup>+</sup>] e volume do suco gástrico após administração de tween 80 5%, ranitidina (50 mg/kg) e farnesol (100 mg/kg) pelas vias oral e intraduodenal.

De acordo com os resultados obtidos em ambas as vias de administração (v.o. e i.d.), em que foram administrados o farnesol, não foram observadas alterações no pH quando comparado ao grupo controle negativo (tween 80 5%). Com relação a [H<sup>+</sup>] não houve alteração nos animais pré-tratados com o farnesol por v.o., no entanto houve uma redução da [H<sup>+</sup>] nos animais pré-tratados com o farnesol via i.d. quando comparado ao grupo controle negativo (tween 80 5%). Com relação ao volume do

suco gástrico, não ocorreu alteração nos animais pré-tratados com o farnesol por v.o., no entanto houve um aumento nos animais pré-tratados com o farnesol via i.d.

Já os animais pré-tratados com o padrão ranitidina (50 mg/kg) independente da via, apresentaram aumento de pH, diminuição da  $[H^+]$  e do volume gástrico quando comparado com os respectivos controles. Os resultados estão expressos na tabela 3.

**Tabela 3** - Efeito da administração oral e intraduodenal da ranitidina e farnesol nos parâmetros do conteúdo gástrico após ligadura do piloro

Tratamento	Via de administração	Dose (mg/kg)	pH	$[H^+]$ (mEq/mL/4)	Volume (mL)
Tween 80 5%	Oral	-	$3,6 \pm 0,3$	$4,5 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,04$
Ranitidina	Oral	50	$6,9 \pm 0,2^{***}$	$0,7 \pm 0,4^{###}$	$0,7 \pm 0,07^{***}$
Farnesol	Oral	100	$3,2 \pm 0,4$	$4,9 \pm 0,4$	$0,9 \pm 0,1$
Tween 80 5%	Intraduodenal	-	$3,4 \pm 0,3$	$7,4 \pm 0,5$	$1,5 \pm 0,07$
Ranitidina	Intraduodenal	50	$5,7 \pm 0,4^{###}$	$3,4 \pm 0,4^{###}$	$0,6 \pm 0,09^{###}$
Farnesol	Intraduodenal	100	$3,8 \pm 0,05$	$2,7 \pm 0,7^{###}$	$1,4 \pm 0,06^{##}$

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

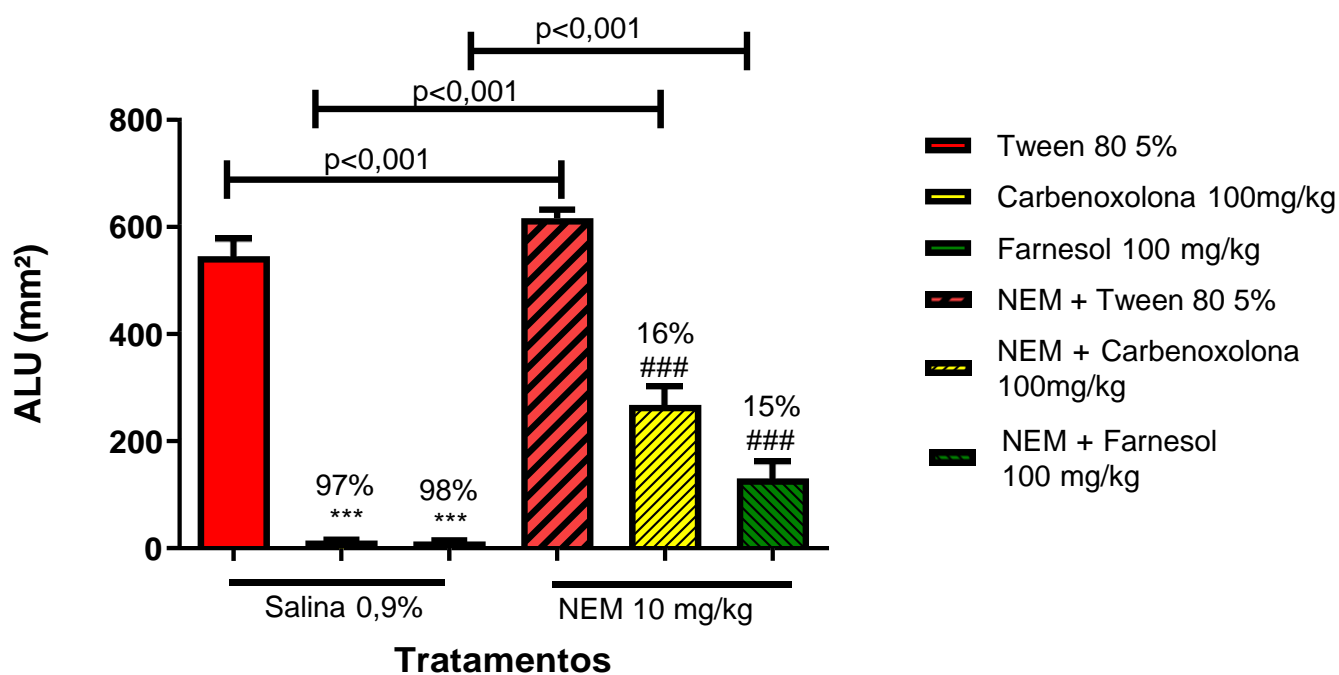
### 5.3.2 Mecanismos Citoprotetores

#### 5.3.2.1 Avaliação da Participação dos Grupamentos Sulfidril (SHs) na Atividade Gastroprotetora do Farnesol

Os grupos previamente tratados com o padrão carbenoxolona (100 mg/kg) e o farnesol (100 mg/kg) exibiram uma redução significativa ( $p < 0,001$ ) da ALU em 97% ( $14,4 \pm 1,1 \text{ mm}^2$ ) e 98% ( $12,1 \pm 2,4 \text{ mm}^2$ ), respectivamente, quando comparado ao grupo controle negativo (tween 80 5%) ( $546,0 \pm 31,4$ ). Entretanto, quando administrado o NEM (10 mg/kg - i.p.), um inibidor dos grupamentos sulfidrilas, houve redução do efeito gastroprotetor da carbenoxolona (100 mg/kg) e do farnesol (100 mg/kg) para 16% ( $458,1 \pm 30,3 \text{ mm}^2$ ) e 15% ( $465,4 \pm 37,1 \text{ mm}^2$ ) respectivamente,

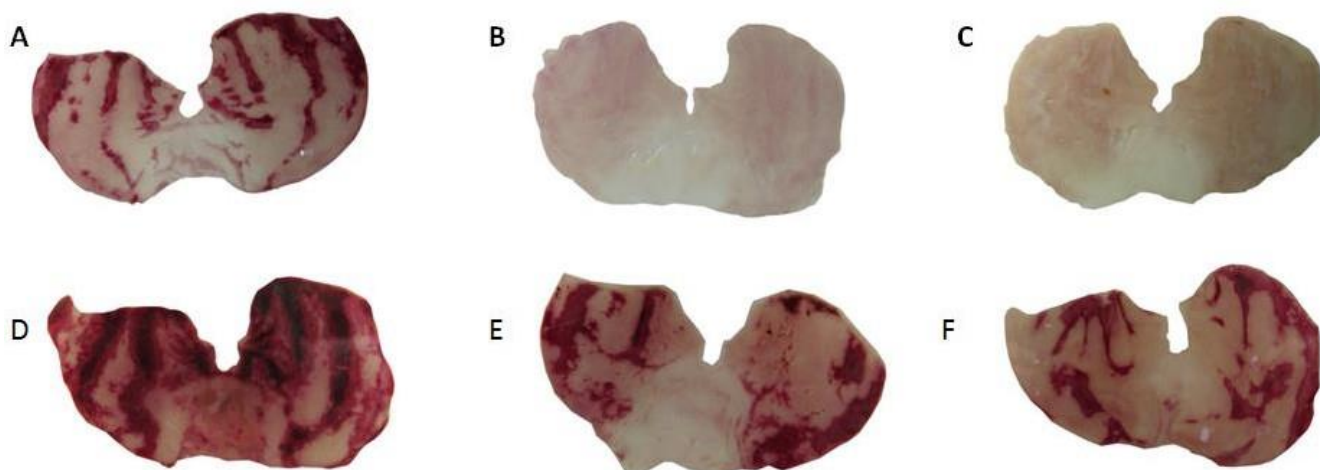
quando comparado aos grupos que não receberam o bloqueador. Os resultados estão expressos no **gráfico 4** e ilustrados na **figura 20**.

**Gráfico 4 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e farnesol após pré-tratamento com salina e NEM (i.p.) em úlcera gástrica induzida por etanol em ratos**



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

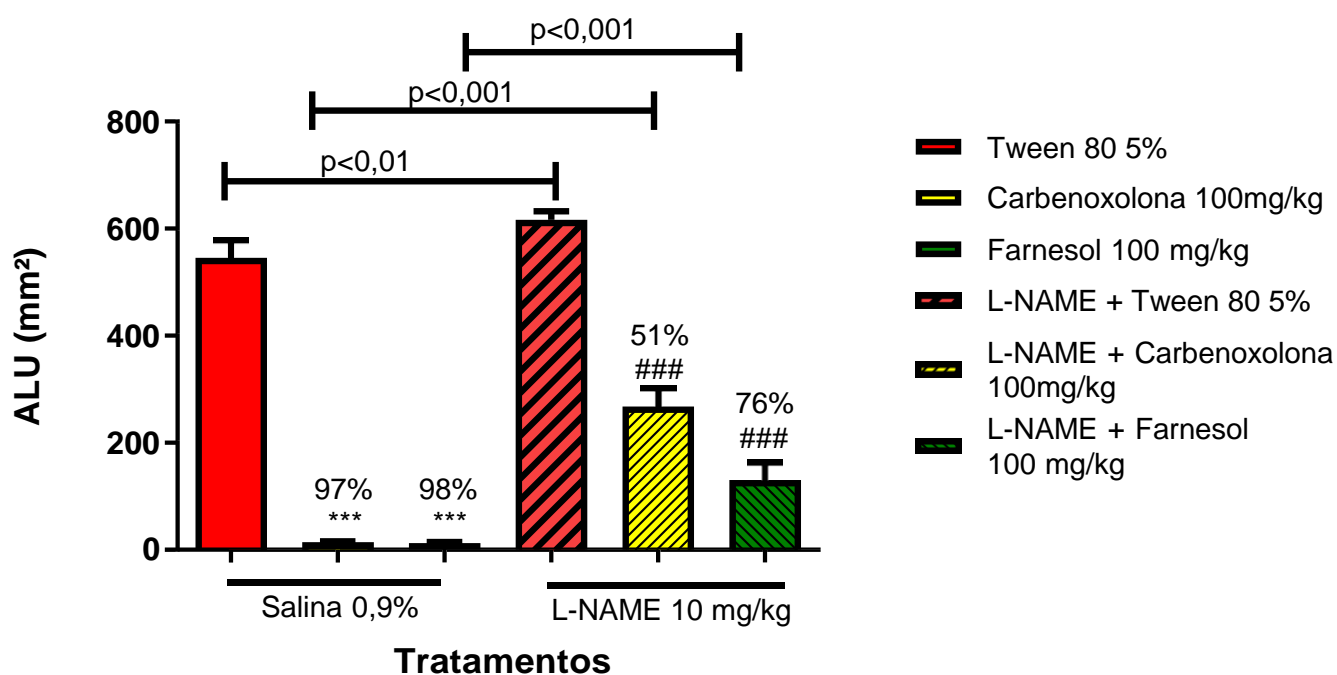
**Figura 20 - Estômagos de ratos pré-tratados com solução salina 0,9% e tratados com Tween 80 5% (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B) e farnesol 100 mg/kg (C) ou pré-tratados com NEM e tratados com Tween 80 5% (D), carbenoxolona 100 mg/kg (E) e farnesol 100 mg/kg (F) no modelo de úlceras por etanol para avaliação da participação dos grupamentos sulfídrilas**



#### **5.3.2.2 Avaliação da Participação do Óxido Nítrico (NO) na Atividade Gastroprotetora do Farnesol**

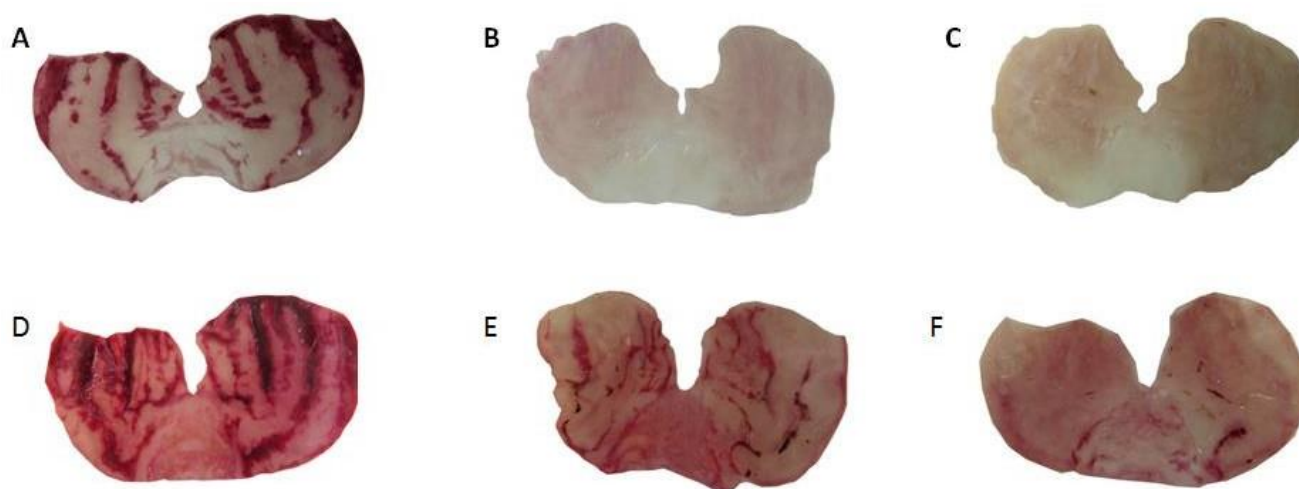
A partir do resultado obtido, foi possível observar que a carbenoxolona (100 mg/kg) e o farnesol (100 mg/kg) exibiram uma redução significativa ( $p < 0,001$ ) da ALU em 97% ( $14,4 \pm 1,1 \text{ mm}^2$ ) e 98% ( $12,1 \pm 2,4 \text{ mm}^2$ ), respectivamente, quando comparado ao grupo controle negativo (tween 80 5%) ( $546,0 \pm 31,4$ ). Porém, nos grupos pré-tratados com L-NAME, um bloqueador da síntese do NO, foi observado a redução da gastroproteção exercida pela carbenoxolona e Farnesol para 50% ( $267,7 \pm 33,9 \text{ mm}^2$ ) e 76% ( $130,5 \pm 31,7 \text{ mm}^2$ ) respectivamente, em comparação aos grupos não bloqueados. Os resultados estão expressos no **gráfico 5** e ilustrados na **figura 21**.

**Gráfico 5 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e Farnesol após pré-tratamento com salina e L-NAME (i.p.) em úlcera gástrica induzida por etanol em ratos**



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

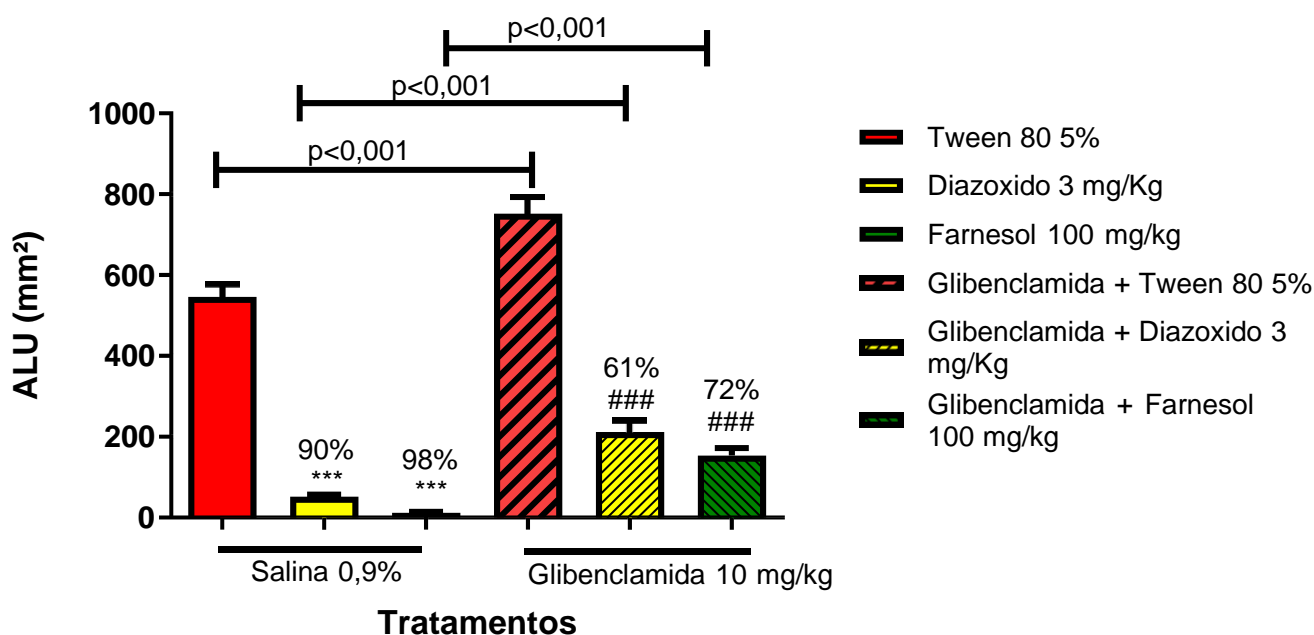
**Figura 21 - Estômagos de ratos pré-tratados com solução salina 0,9% e tratados com Tween 80 5% (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B) e farnesol 100 mg/kg (C) ou pré-tratados com L-NAME e tratados com Tween 80 5% (D), carbenoxolona 100 mg/kg (E) e farnesol 100 mg/kg (F) no modelo de úlceras induzidas por etanol para avaliação da participação do óxido nítrico**



### **5.3.2.3 Avaliação da Participação dos Canais para Íons Potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) na Atividade Gastroprotetora do Farnesol**

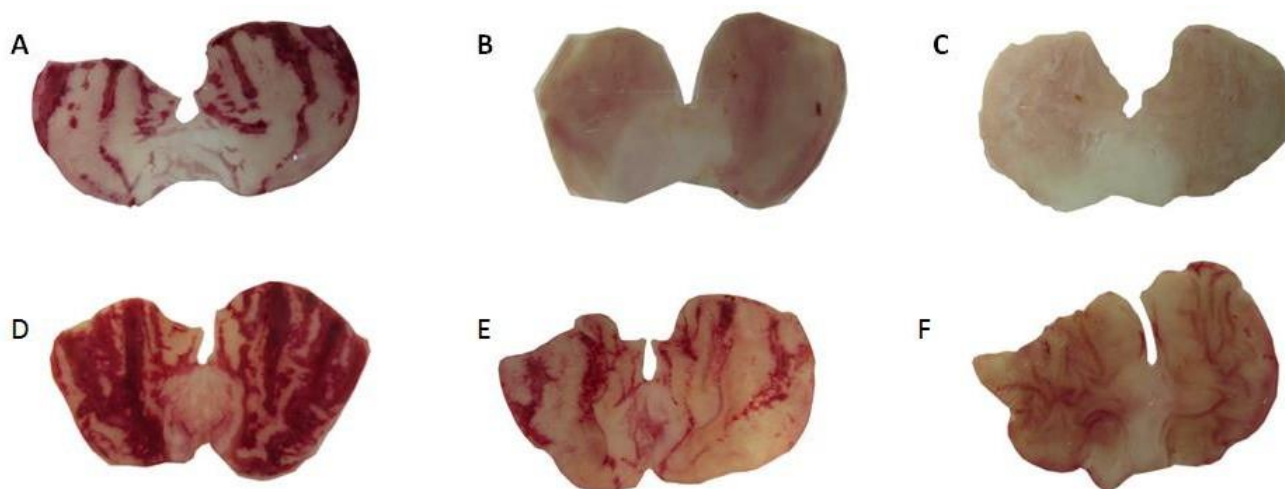
Os resultados obtidos demonstram que a atividade gastroprotetora nos grupos não bloqueados e tratados i.p. com diazóxido (3 mg/kg) ou v.o com farnesol (100 mg/kg) reduziram a ALU em 90 e 98%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle negativo. Quando os animais foram pré-tratados com a glibenclamida (i.p.), um antagonista dos canais de  $K_{ATP}$ , ocorreu a redução do efeito gastroprotetor dos grupos tratados com o farnesol ( $154,1 \pm 17,61$ ) e com o diazóxido ( $212,3 \pm 27,12$ ) para 72% e 61%, ambos comparados aos grupos não bloqueados. Os resultados estão expressos no **gráfico 6** e ilustrados na **figura 22**.

**Gráfico 6 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e farnesol após pré-tratamento com salina e Glibenclamida (i.p.) em úlcera gástrica induzida por etanol em ratos**



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

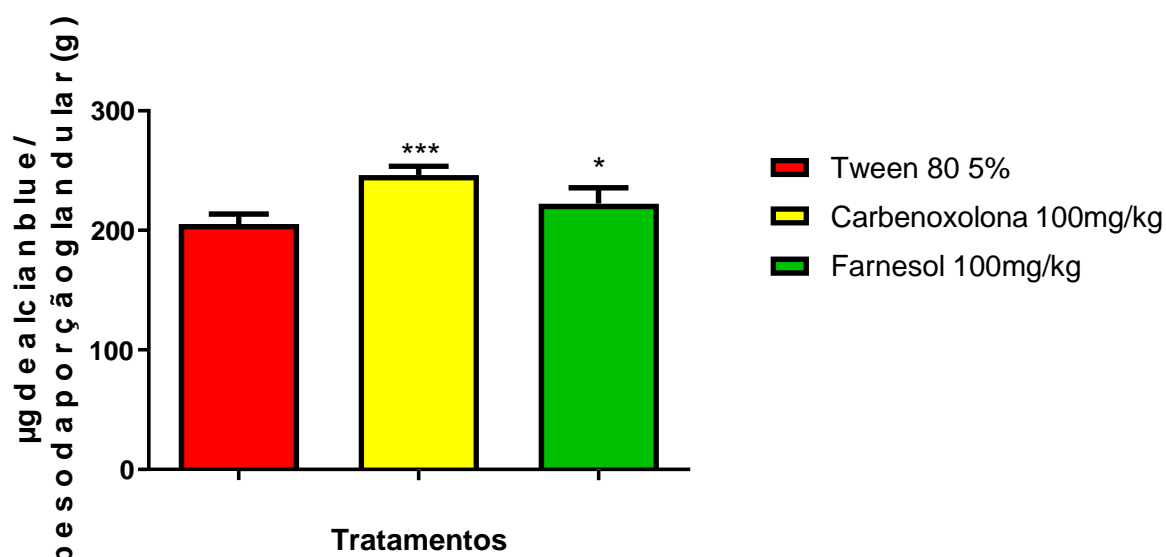
**Figura 22 - Estômagos de ratos pré-tratados com solução salina 0,9% e tratados com Tween 80 5% (A), diazóxido 3 mg/kg (B) e Farnesol 100 mg/kg (C) ou pré-tratados com glibenclamida e tratados com Tween 80 5%, diazóxido 3 mg/kg (E) e Farnesol 100 mg/kg (F) no modelo de úlceras induzidas por etanol para avaliação da participação dos canais de potássio sensíveis a ATP**



### 5.3.2.4 Quantificação do Muco Aderido à Mucosa Gástrica Após Ligadura do Píloro

No modelo experimental para quantificação de muco gástrico, medido indiretamente pela quantidade de *alcian blue* na porção glandular estomacal, a carbenoxolona (200 mg/kg) e o farnesol (100 mg/kg) (v.o) aumentaram a quantidade de muco aderido à mucosa gástrica em  $246,4 \pm 7,2$  e  $222,4 \pm 13,1$   $\mu\text{g}$  de *alcian blue*/peso da porção glandular (g) quando comparada com o grupo controle negativo:  $205,4 \pm 8,2$   $\mu\text{g}$  de *alcian blue*/peso da porção glandular (g). Os resultados obtidos nesse modelo estão expressos no **gráfico 7**.

**Gráfico 7 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e farnesol na concentração de muco aderido à mucosa gástrica após ligadura do píloro**



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

### 5.3.2.5 Avaliação da Participação das Prostaglandinas no Efeito Gastroprotetor do Farnesol

A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que a atividade gastroprotetora nos grupos não bloqueados e tratados v.o com misoprostol (50  $\mu\text{g/kg}$ ) ou farnesol (100 mg/kg) reduziram a ALU em 72 e 73%, respectivamente, quando comparados com o grupo controle negativo. Entretanto, quando no pré-tratamento os

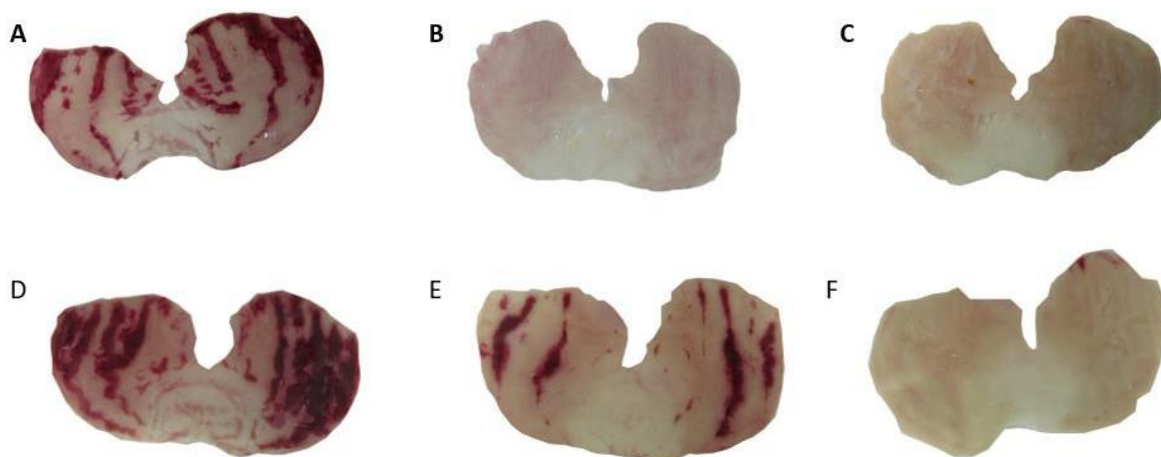


animais receberam indometacina (v.o), um bloqueador das COX, foi observado o aumento da ALU com redução do efeito gastroprotetor do misoprostol (50µg/kg) e farnesol (100mg/kg) para 19 e 69%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle negativo. Os resultados estão expressos no **gráfico 8** e ilustrados na **figura 23**.

**Gráfico 8 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e farnesol após pré-tratamento com salina e Indometacina (i.p.) em úlcera gástrica induzida por etanol em ratos**

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

**Figura 23 - Estômagos de ratos pré-tratados com solução salina 0,9% e tratados com Tween 80 5% (A), Misoprostol 50 µg/kg (B) e Farnesol 100 mg/kg (C) ou pré-tratados com Indometacina e tratados com Tween 80 5%, Misoprostol 50 µg/kg (E) e Farnesol 100 mg/kg (F) no modelo de úlceras induzidas por etanol para avaliação da participação das prostaglandinas**



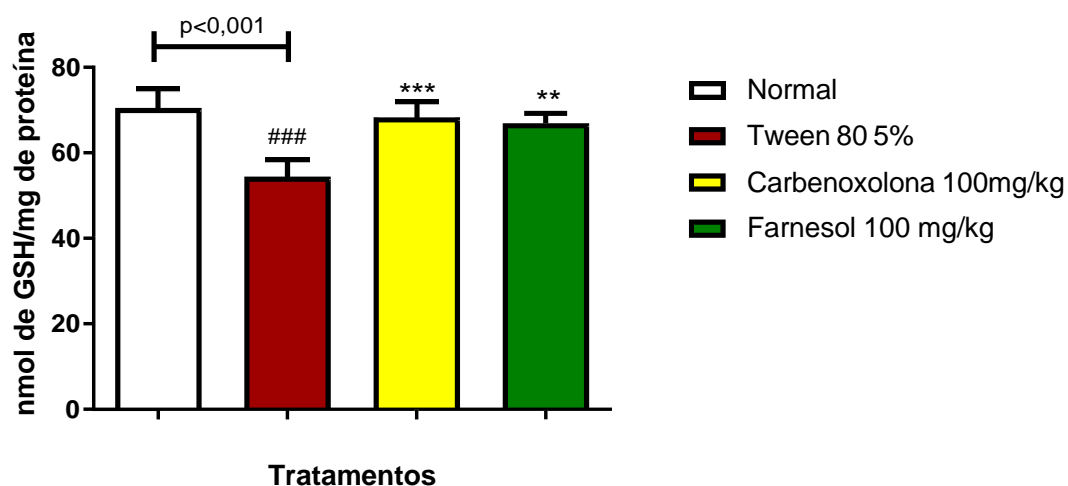
### 5.3.3 Atividade Antioxidante

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

#### 5.3.3.1 Determinação dos Níveis de Grupamentos Sulfidrílicos Não Proteicos (GSH)

De acordo com os resultados obtidos foi observado que o grupo controle negativo ( $54,4 \pm 3,8$  nmol de GSH/mg de proteínas) reduziu os níveis de GSH quando comparados ao do grupo normal ( $70,5 \pm 4,3$  nmol de GSH/mg de proteínas). Entretanto, a carbenoxolona (100mg/kg) e o farnesol (100 mg/kg) administrados por via oral aumentaram os níveis de GSH para  $68,3 \pm 3,7$  e  $66,9 \pm 2,3$  nmol de GSH/mg de proteínas, respectivamente, quando comparado ao grupo controle negativo. Os resultados estão expressos no **gráfico 9**.

**Gráfico 9 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e farnesol nos níveis de GSH a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos**

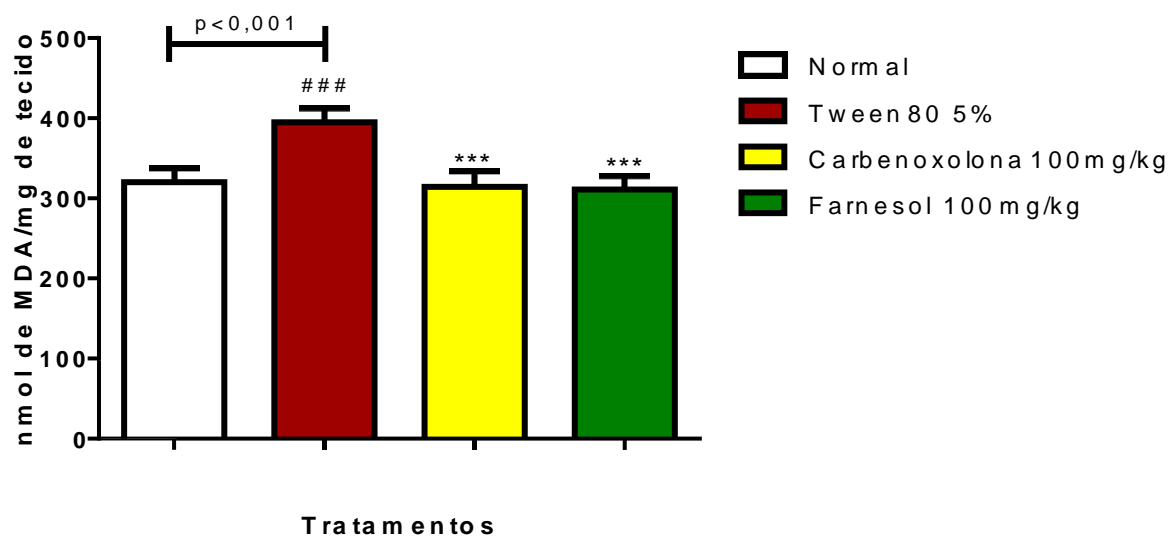


Os resultados estão expressos como média  $\pm$  d.p. ANOVA seguido do teste de Dunnett e Tukey. \*\*\*p < 0,001 comparado ao grupo controle negativo (Tween 80 5%) (n= 6).

### 5.3.3.2 Determinação dos Níveis de Malondialdeído (MDA)

De acordo com os resultados obtidos foi observado que no grupo controle negativo ( $394,7 \pm 16,6$  nmol de MDA/g de tecido) os níveis de MDA aumentaram quando comparados ao do grupo normal ( $320,1 \pm 17,4$  nmol de MDA/g de tecido). Entretanto a carbenoxolona (100 mg/kg) e o farnesol (100 mg/kg) quando administrados via oral reduziram os níveis de MDA para  $314,5 \pm 18,7$ ;  $311,2 \pm 16,5$  nmol de MDA/g de tecido, respectivamente, quando comparado ao grupo controle negativo Tween 80 5%. Os resultados estão expressos no **gráfico 10**.

**Gráfico 10 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e farnesol nos níveis de MDA a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos**



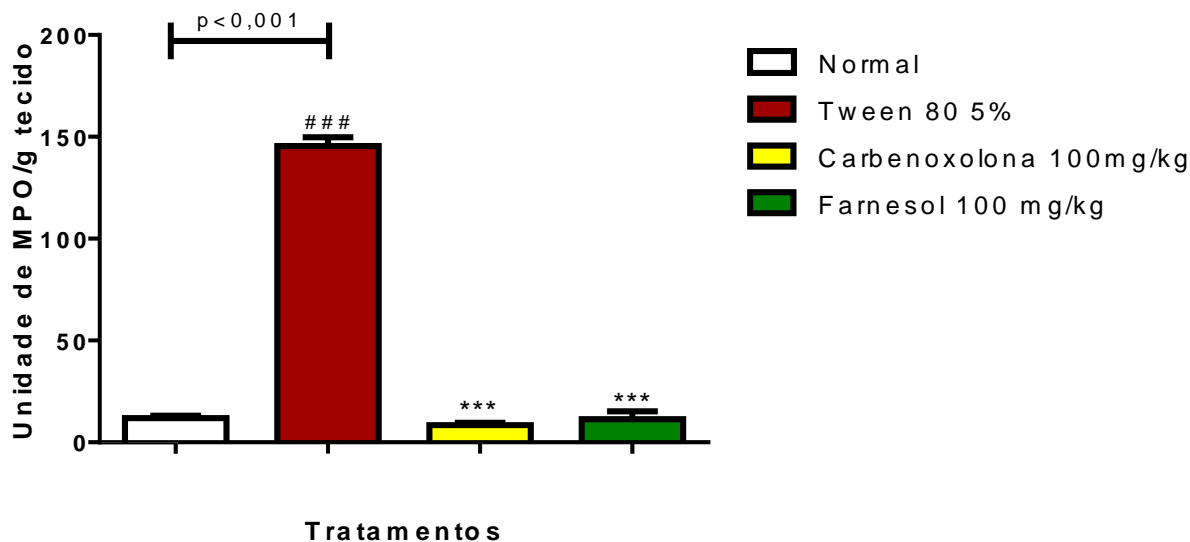
Os resultados estão expressos como média  $\pm$  d.p. ANOVA seguido do teste de Dunnett e Tukey. \*\*\*p < 0,001 comparado ao grupo controle negativo (Tween 80 5%) (n= 6).

### 5.3.3.3 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

Os resultados demonstraram que no grupo controle negativo ( $145,5 \pm 4,2$  unidade de MPO/g de tecido) os níveis de MPO aumentaram quando comparados ao grupo normal ( $11,8 \pm 1,2$  unidade de MPO/g de tecido).

Os grupos tratados v.o com carbenoxolona (100 mg/kg) e farnesol (100 mg/kg), reduziram os níveis de MPO para  $8,3 \pm 1,3$  e  $11,4 \pm 3,7$  unidade de MPO/g de tecido, respectivamente, quando comparado ao grupo controle negativo, Tween 80 5%. Os resultados estão expressos no **gráfico 11**.

**Gráfico 11 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e farnesol nos níveis de MPO a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos**



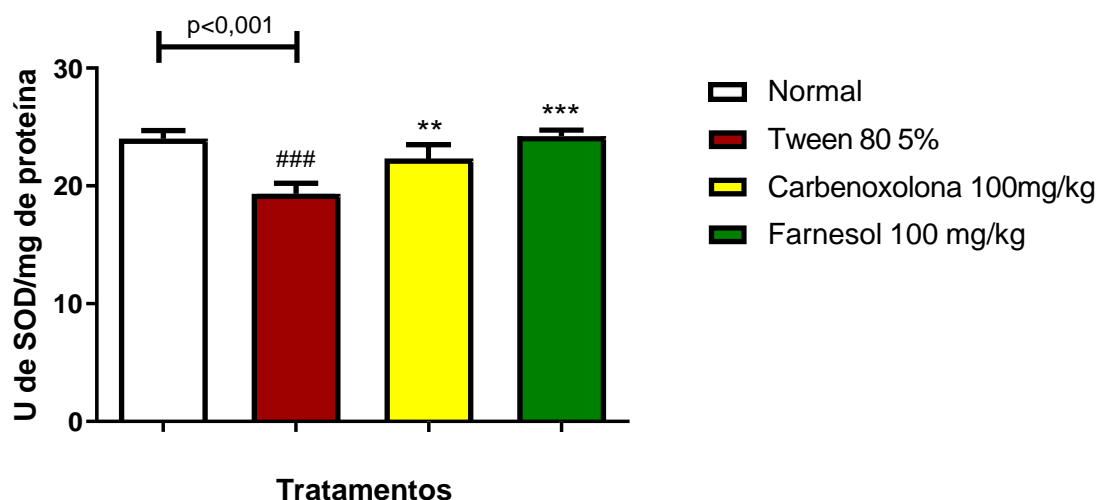
Os resultados estão expressos como média  $\pm$  d.p. ANOVA seguido do teste de Dunnett e Tukey. \*\*\*p < 0,001 comparado ao grupo controle negativo (Tween 80 5%) (n= 6).

#### 5.3.3.4 Determinação da Atividade da Supeóxido Dismutase (SOD)

Os resultados demonstraram que no grupo controle negativo ( $19,3 \pm 0,89$  unidade de SOD/mg de proteína) os níveis de SOD diminuíram quando comparados ao grupo normal ( $24,01 \pm 0,70$  unidade de SOD/mg de proteína).

Os grupos tratados v.o com carbenoxolona (100 mg/kg) e farnesol (100 mg/kg), aumentaram os níveis de SOD para  $22,3 \pm 1,1$ ;  $24,2 \pm 0,49$  unidade de SOD/mg de proteína, respectivamente, quando comparado ao grupo controle negativo, Tween 80 5%. Os resultados estão expressos no **gráfico 12**.

**Gráfico 12 - Efeito da carbenoxolona e do farnesol sobre a atividade da enzima superóxido dismutase a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos**



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

### 5.3.4 Investigação da Atividade Imunorregulatória

#### 5.3.4.1 Quantificação das Citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 Teciduais

De acordo com os resultados obtidos para os níveis de IL-1 $\beta$ , o grupo *Tween* 80 5% aumentaram os níveis da interleucina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  para  $1251 \pm 52,7$  pg de IL-1 $\beta$ /mL em comparação ao grupo normal  $955,6 \pm 53,6$  pg de IL-1 $\beta$ /mL. Os tratamentos v.o com carbenoxolona (100 mg/kg) e com o farnesol (100 mg/kg) reduziu os níveis da IL-1 $\beta$  ( $977,4 \pm 63,7$  pg de IL-1 $\beta$ /mL e  $857,8 \pm 50,7$  pg de IL-1 $\beta$ /mL) respectivamente, quando comparado ao grupo *Tween* 80 5%.

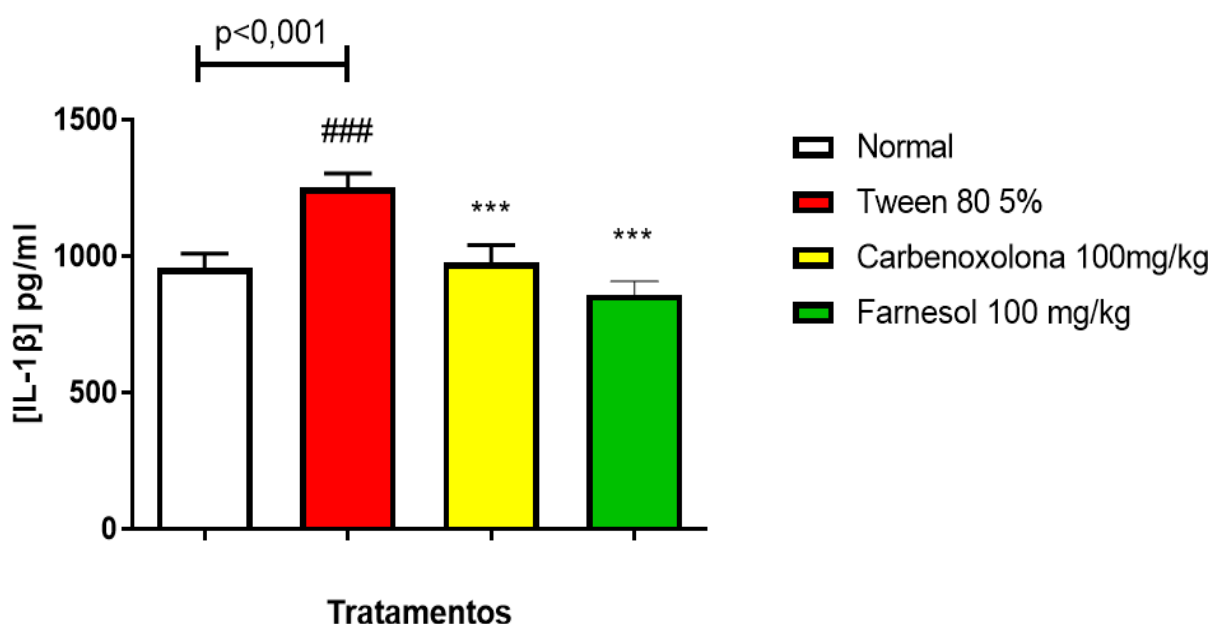
Resultado semelhante foi encontrado para os níveis de TNF- $\alpha$ , no qual, o grupo controle negativo  $1721 \pm 44,2$  pg de TNF- $\alpha$ /mL apresentou um aumento significativo dos níveis de TNF- $\alpha$  quando comparado ao grupo normal  $1237 \pm 64,1$  pg de TNF- $\alpha$ /mL. Os tratamentos com carbenoxolona e o farnesol reduziram os níveis do TNF- $\alpha$  para  $1490 \pm 50,8$ ;  $1038 \pm 51,7$  pg de TNF- $\alpha$ /mL quando comparado ao grupo tratado apenas com *Tween* 80 5%.

O mesmo foi encontrado para os níveis de IL-6, no qual, o grupo controle negativo apresentou um aumento significativo dos níveis de IL-6  $3748 \pm 279,3$  pg de IL-6/ml quando comparado ao grupo normal  $2559 \pm 291,1$  pg de IL-6/mL. Os

tratamentos com carbenoxolona (100 mg/kg) e o farnesol (100 mg/kg) reduziram os níveis do IL-6 para  $2359 \pm 215,1$ ;  $2512 \pm 132,9$  pg de IL-6/mL quando comparado ao grupo tratado apenas com Tween 80 5%.

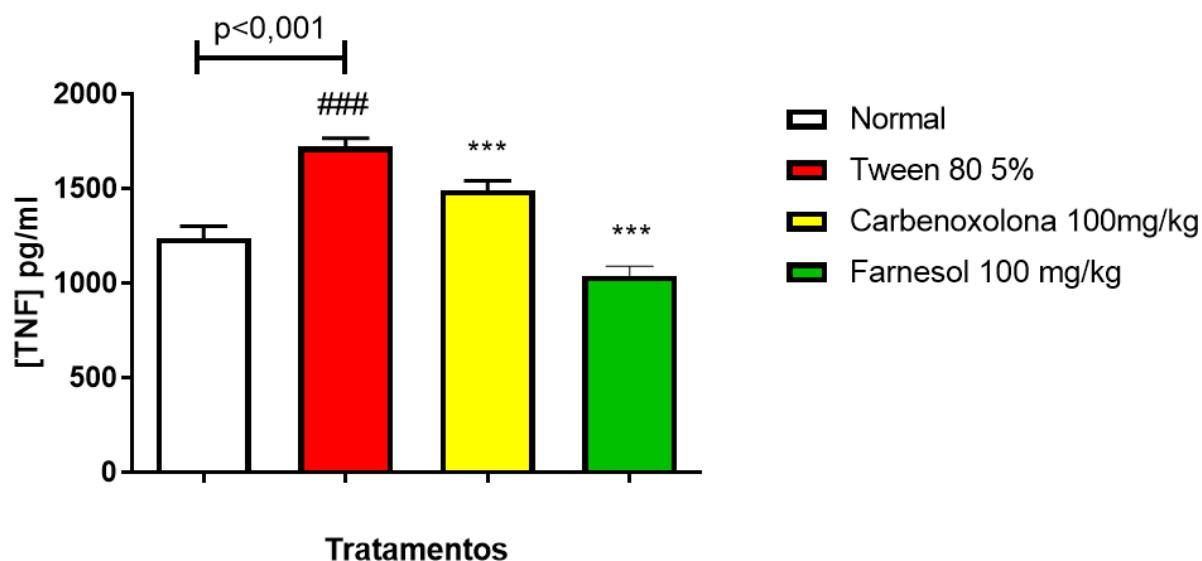
Ao avaliar IL-10, foi observado que o grupo Tween 80 5% apresentou uma redução dos níveis de IL-10 ( $632,8 \pm 45,7$  pg de IL-10/mL) em comparação ao grupo normal ( $928,2 \pm 50,04$ pg de IL-10/mL). Os tratamentos com carbenoxolona ( $961,6 \pm 41,48$ pg de IL-10/mL) e farnesol ( $890 \pm 27,23$ pg de IL-10/mL), promoveram um aumento dos níveis de IL-10 para os níveis basais em comparação com o grupo tratado apenas com Tween. Os resultados correspondentes à imunomodulação estão representados no **gráfico 13, 14, 15 e 16**.

**Gráfico 13 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e farnesol nos níveis de IL-1 $\beta$ , partindo do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos**



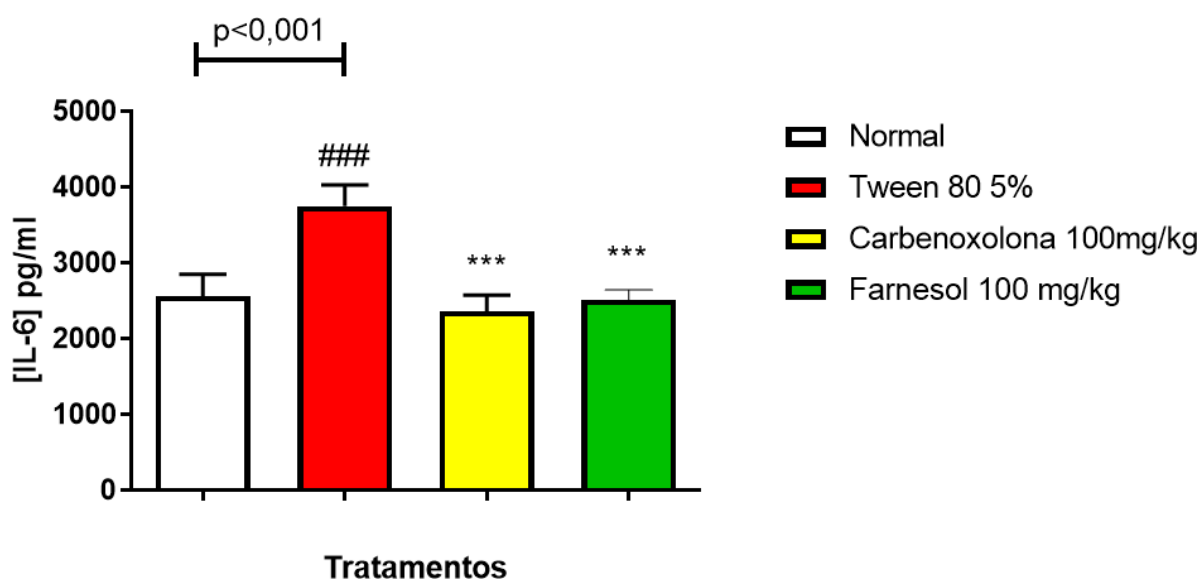
Os resultados estão expressos como média  $\pm$  d.p. ANOVA seguido do teste de Dunnett e Tukey. \*\*\*p < 0,001 comparado ao grupo controle negativo (Tween 80 5%) (n= 6).

**Gráfico 14 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e farnesol nos níveis de  $\text{TNF}\alpha$ , partindo do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos**



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

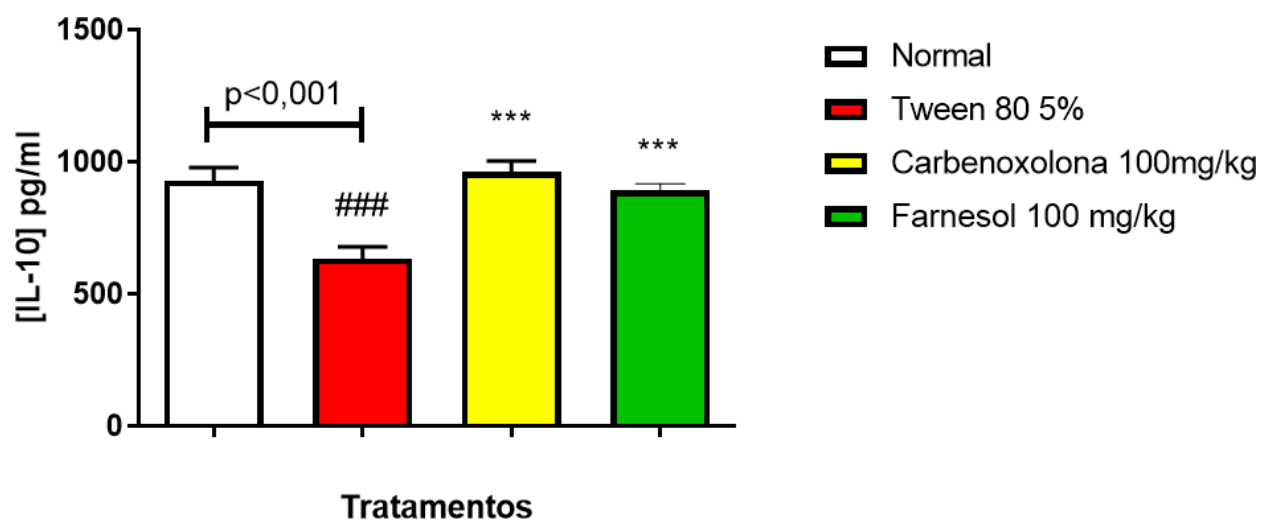
**Gráfico 15 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e farnesol nos níveis de IL-6, partindo do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos**



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



**Gráfico 16 - Efeito da administração oral da carbenoxolona e farnesol nos níveis de IL-10, partindo do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos**



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

# ***Discussão***

## 6. DISCUSSÃO

Por milênios, a humanidade dependeu fortemente da natureza para suprir suas necessidades básicas e para tratar o seu processo de adoecimento. Está bem documentado que as plantas medicinais constituem a base dos sistemas de medicina tradicional. As plantas medicinais continuam sendo utilizadas para o tratamento de diversas afecções por uma grande parte da população, que segundo dados da literatura 70% a 95% dos indivíduos, principalmente nos países em desenvolvimento, ainda usa a medicina tradicional como cuidado primário de saúde (DZUL-BEH et al., 2020).

Desde o início do século XX até hoje, os produtos naturais receberam grande atenção devido à sua importância no desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos (NWOKEJI et al., 2016). Cerca de 70% dos medicamentos e pequenas moléculas aprovados que entraram no mercado no período entre 1981 e 2014 foram derivados de produtos naturais, incluindo produtos naturais inalterados, derivados quimicamente modificados e protótipos sintéticos derivados de um modelo de produto natural (NEWMAN, 2016).

As propriedades farmacológicas dos produtos naturais, em especial das plantas medicinais estão relacionadas a presença de metabólitos secundários como alcaloides, saponinas, glicosídeos, flavonoides, taninos, compostos fenólicos, fenilpropanóides e terpenos (DUTRA et al., 2016).

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).

O crescente interesse no estudo dos terpenos está associado ao seu potencial de aplicação clínica, pois apresentam diferentes propriedades biológicas, tais como: antifúngico, antibacteriano, antiviral, anti-tumoral, antiparasitário, hipoglicemiante, anti-inflamatório, analgésico, antidiarreico e gastroprotetor (PADUCH et al., 2007; PESSÔA et al., 2020; SERAFIM, et al., 2020).

O Farnesol um produto de origem natural, pertencente à classe dos sesquiterpenos, sendo amplamente encontrado nos óleos essenciais de plantas aromáticas como capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e camomila (*Matricharia camomila*), em frutas cítricas e alguns vegetais (LIN, 2015; ANDRÉ, 2017). Possui algumas atividades farmacológicas já descritas na literatura, dentre elas destacam-se a atividade antioxidante (KHAN; SULTANA, 2011), anti-inflamatória (KU; LIN, 2015), ansiolítica, antinociceptiva (SHAHNOURI et al., 2016), anti-obesidade (KIM et al., 2017), antimicrobiana (KIM et al., 2018), antitumoral (WANG, 2018) e antidiarreica (DA COSTA et al., 2020). Entretanto, nenhum estudo realizado com esta substância isolada foi encontrado frente a atividade gastroprotetora, o que motivou a sua escolha para o desenvolvimento desse trabalho.

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

Na busca de novos medicamentos, estudos toxicológicos são imprescindíveis para estabelecer condições seguras de uso de alguma substância isolada ou composto, e para tanto se faz necessário a realização de ensaios pré-clínicos e clínicos (ANVISA, 2013). Nos ensaios pré-clínicos é avaliado a toxicidade das substâncias, a fim de estabelecer a segurança e o comportamento das mesmas em animais, para depois serem testadas com segurança em humanos nos estudos clínicos (OLIVEIRA et al., 2014; HULLEY, et al., 2019).

O estudo de toxicidade aguda é um teste de ensaio não clínico de segurança, em que é possível avaliar a toxicidade produzida por uma substância teste quando esta é administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias após a administração (ADSOM, 2016). Outro parâmetro de toxicidade também avaliado nos ensaios não-clínicos com animais é a estimativa da dose letal 50% (DL50), que é a quantidade da substância capaz de causar a morte de 50% dos animais em experimentação, durante um período especificado (HAYES, 2014; ADAMSON, 2016).

Nessa perspectiva, foi utilizado para o estudo de toxicidade aguda do Farnesol o guia nº 423 de 2001 da OECD (*Organisation for Economic Cooperation and*

*Development*), que preconiza a avaliação de toxicidade aguda em duas etapas, utilizando um número amostral reduzido de três animais do mesmo sexo e identificando se há toxicidade pela constatação de morte ou qualquer debilidade em seu estado fisiológico normal, após a administração da substância teste nas doses de 300 e 2000 mg/kg. Isso visa garantir a reprodutibilidade e confiabilidade do método e auxiliar na escolha das doses para estudos farmacológicos subsequentes (OECD, 2001).

De acordo com os parâmetros avaliados pelo protocolo, pode-se inferir que a DL50 estimada para o farnesol é igual ou superior a 2.500 mg/kg, o que o faz se enquadrar na categoria 5 do Sistema de Classificação Harmonizada Global (GHS). Segundo Kennedy et al., (1986) uma substância com DL50 maior que 2.000 mg/kg (via oral) pode ser considerada de baixa toxicidade, podendo afirmar que o farnesol tem uso seguro, quando administrado nas condições avaliadas. Esse estudo corrobora a outros estudos com terpenos que também possuem DL50 na categoria 5 da OECD, a exemplo do  $\beta$ -caroteno (BURTON et al., 2022), o carveol (SERAFIM et al., 2021), limoneno (KIM et al., 2016), nerolidol (CHAN et al., 2016) e o 1,8 cineol (XU et al., 2014) quando avaliados quanto a sua toxicidade.

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

Com base na avaliação da toxicidade aguda do farnesol em camundongos Swiss, foi possível constatar que não foi observada evidência de toxicidade durante o período de observação de 14 dias, sem alterações significativas no peso, dieta (consumo de água e ração) e comportamento dos animais. Esses parâmetros permitem avaliar a função dos principais sistemas orgânicos e a ausência de toxicidade 14 dias após a administração de 2000 mg/kg, o que sugere que o farnesol tem baixa toxicidade. Os resultados obtidos assemelham-se aos descritos por CHAN et al., 2016, para o sesquiterpeno nerolidol que também demonstrou baixa toxicidade aguda nos ensaios avaliados. Diante deste resultado é possível inferir que o farnesol apresentou baixo grau de toxicidade nas condições avaliadas. Esses resultados

indicam que existe uma relativa margem de segurança para o uso desta substância como possível agente terapêutico, embora estudos toxicológicos adicionais sejam necessários, principalmente o de doses repetidas (ANVISA, 2013). Nessa perspectiva seguiu-se com os estudos envolvendo a atividade gastroprotetora do farnesol.

A úlcera gástrica é uma situação clínica tratável que afeta a qualidade de vida do indivíduo e causa ônus econômico ao sistema de saúde (AYAZ et al., 2022). Ocorre devido a mecanismos de defesa enfraquecidos na mucosa gástrica e a mudanças no estilo de vida, incluindo tabagismo, consumo de álcool, uso de AINEs e infecção *por H. pylori* (BJARNASON et al., 2018).

O consumo excessivo de álcool pode danificar a mucosa gástrica e, a ingestão de etanol causa muitas alterações patológicas da mucosa e submucosa gástrica, incluindo lesões hemorrágicas, edema extenso da submucosa, friabilidade da mucosa e úlceras agudas. Além disso, o etanol é frequentemente empregado em modelo de roedores para provocar úlceras gástricas acarretando em lesão direta das células endoteliais vasculares da mucosa, interrompem a continuidade das células, desencadeiam a formação de radicais reativos de oxigênio e citocinas inflamatórias e contribuem para a isquemia local da mucosa gástrica (ZHANG et al., 2019; SICHEN et al., 2021).

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

Os resultados obtidos com esse modelo mostraram que a administração do farnesol nas doses avaliadas (25, 50, 100 e 200 mg/kg) reduziram a área de lesão ulcerativa quando comparado ao grupo tratado apenas com o veículo. Desta forma é possível sugerir que o farnesol exerce função protetora na mucosa gástrica. Os resultados deste estudo corroboram a outros dados existentes na literatura, em que, os sesquiterpenos guaianolídeo e eudermanolídeo (REPETTO; BOVERIS 2010), álcool patchouli (ZHENG et al., 2014), as lactonas sesquiterpênicas costunolide e dehidrocostuslactona (ZHENG et al., 2016), 2,3-epoxijuanislamina e calealactona B (SÁNCHEZ-MENDOZA et al., 2019) e a lactona sesquiterpênica isoalantolactona

(CHAOYI ZHOU et al., 2023) demonstraram resultados semelhantes. O próximo passo foi avaliar a atividade gastroprotetora frente ao modelo de úlcera induzida por estresse.

O estresse é uma das principais causas de preocupação no desenvolvimento e progressão de muitas doenças, pois é uma força de desequilíbrio contra a homeostase, incluindo adaptações fisiológicas, celulares e moleculares (MUSAB et al., 2022). O estresse fisiológico durante doenças graves causa alterações estruturais fundamentais nos elementos funcionais dos órgãos humanos, afetando diretamente a progressão da doença. Dentre as várias doenças associadas ao estresse, encontra-se a úlcera. A ulceração é frequentemente associada à perturbação da remodelação da matriz extracelular (MEC) dos tecidos gástricos devido à modulação da atividade de um grupo de endopeptidases dependentes de zinco que degradam a matriz, conhecidas como metaloproteinases da matriz (MMPs) (RUTRA et al., 2022).

As lesões gástricas induzidas por estresse por imobilização e frio são conhecidas por estarem associadas a um aumento da secreção gástrica, redução os níveis das prostaglandinas endógenas e da camada protetora de muco, aumenta a contratilidade muscular e diminui o fluxo de sangue da mucosa, levando a hipóxia e isquemia local, geração de EROs e peroxidação lipídica, aumento de citocinas pró-inflamatórias, degranulação de mastócitos e ativação de leucócitos, necrose epitelial e corrosão hemorrágica da mucosa gástrica (ELSHAZLY et al., 2018; ULUCAN, 2020). Nesse modelo de indução, o farnesol (25, 50, 100 e 200 mg/kg) reduziu as lesões ulcerativas, apresentando efeito gastroprotetor possivelmente relacionado a fatores antissecretórios, antioxidantes e anti-inflamatórios. Dados semelhantes foram vistos nos estudos com o sesquiterpeno tricíclico álcool patchouli (ZHENG et al., 2014).

A próxima etapa foi averiguar o efeito do farnesol nas úlceras gástricas induzidas com antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), utilizando o piroxicam (30 mg/kg) como agente lesivo.

Os medicamentos mais comumente prescritos para o tratamento da dor e da inflamação são os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs). Suas propriedades benéficas têm sido utilizadas na prevenção e tratamento de diversos distúrbios inflamatórios devido à percepção geral de sua segurança (TAKEUCHI, 2012). No entanto, os AINEs têm limitações devido aos efeitos colaterais que afetam

principalmente o trato gastrointestinal (GI), como refluxo, sistomas dispépticos e ulcerações (RUIZ-HURTADO et al., 2021).

Sabe-se que indivíduos que fazem uso crônico de AINES, aumentam o risco de desenvolver erosão da mucosa gastroduodenal (35–60%), ulceração (10–25%), hemorragias e perfurações graves (<1%). Esses eventos têm impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes, além disso, as úlceras gástricas são um fator de risco para o desenvolvimento de câncer gástrico (GARCÍA-RAYADO; NAVARRO; LANAS, 2018; RUIZ-HURTADO et al., 2021).

O dano gastrointestinal não é causado apenas pela exposição prolongada ou crônica aos AINEs, os tratamentos agudos podem produzir danos no tecido GI nos primeiros 60 minutos. Uma hipótese propõe que os AINEs induzam a inibição da agregação plaquetária e, portanto, o dano tópico e sistêmico da mucosa do estômago é amplificado. Além disso, diferentes fatores podem aumentar a ocorrência de distúrbios gastrointestinais, como idade, osteoartrite, duração do tratamento com AINEs, doença ulcerosa prévia e co-tratamento atual com corticosteroides (GARCÍA-RAYADO; NAVARRO; LANAS, 2018).

Um fator de risco maior que agrava o potencial de dano gastrointestinal induzido por AINEs é a infecção por *Helicobacter pylori*. Quando esta bactéria infecta a mucosa gástrica, os efeitos deletérios associados a ela na mucosa, como erosão hemorrágica, infiltração de neutrófilos, folículos linfóides e danos ao epitélio são agravados pela indometacina (um AINE), mas não tem efeito sobre o aumento no número de bactérias (RUIZ-HURTADO et al., 2021).

O piroxicam apresenta grande potencial ulcerogênico, sendo amplamente utilizado como ferramenta farmacológica nos protocolos de indução de úlceras em animais. O piroxicam, assim como os outros AINEs, danifica diretamente o epitélio superficial da mucosa (efeito local) e ainda compromete os seus mecanismos de defesa (efeito sistêmico). Devido a sua estrutura ácida, exerce uma ação lesiva local por desestabilizar a camada de fosfolipídios de membrana e lesionar a barreira do muco, favorecendo a difusão de  $H^+$  que lesionam as células superficiais da mucosa. Por via sistêmica, inibem a enzima ciclo-oxigenase (COX) de forma não seletiva, reduzindo a síntese das prostaglandinas citoprotetoras ( $PGE_2$  e  $PGI_2$ ), que atuam estimulando a produção do muco e do bicarbonato, fluxo sanguíneo e a regulação negativa da secreção gástrica. Nesse modelo, também ocorre o recrutamento de



neutrófilos, perturbação no plexo vascular e peroxidação lipídica (BJARNASON et al., 2018).

O farnesol reduziu as injúrias gástricas induzidas por piroxicam (30 mg/kg), sugerindo que esse sesquiterpeno pode atuar por um mecanismo citoprotetor. Esses resultados assemelham-se aos citados na literatura para a o extrato metanólicos obtidos das partes aéreas de *Vernonia polyanthes* (BARBASTEFANO et al., 2007), e as fases clorofórmica e acetato de etila de *Praxelis clematidea* (Griseb.) (FALCÃO et al., 2013) ricas em sesquiterpenos, os quais demonstraram resultados semelhantes frente ao modelo avaliado.

O próximo passo foi verificar o efeito protetor do farnesol (100 mg/kg) frente ao modelo de contensão do suco gástrico pela via oral e intraduodenal. Para isso, foi realizado o protocolo de ligadura do piloro, um método bem estabelecido na avaliação das ulcerações após obstrução mecânica.

A ligadura do piloro é um procedimento importante que mostra as possíveis alterações dos parâmetros do conteúdo gástrico, (volume do suco gástrico, acidez total e pH). As úlceras causadas pela ligadura pilórica são devidas ao aumento do acúmulo de ácido gástrico e pepsina, levando à autodigestão da mucosa gástrica. A inibição da acidez gástrica elevada é um dos importantes fatores de proteção, uma vez que a sobrecarga dos mecanismos de defesa da mucosa pelo nível de ácido leva à formação de úlceras (AHMED; NEDI; YIMER, 2022).

O farnesol (100 mg/kg) reduziu a lesão ulcerativa quando administrado por via oral e intraduodenal quando comparado ao grupo controle, sugerindo que esse fitoconstituente exerce efeito gastroprotetor tanto por ação local como sistêmica. Esses resultados corroboram com o estudo de Yang e colaboradores, 2019 que evidenciaram que o extrato de *Aucklandia lappa* (Asteraceae), rico majoritariamente em lactonas sesquiterpenicas, diminuiu significativamente o índice de dano da mucosa gástrica no modelo de ligação pilórica .

Determinado o efeito gastroprotetor do farnesol frente aos diferentes agentes lesivos que mimetizam a úlcera gástrica no homem, a etapa seguinte foi elucidar os mecanismos de ação relacionados a esse efeito gastroprotetor.

Inicialmente foi avaliado o efeito do farnesol sobre os parâmetros bioquímicos da secreção gástrica (pH, concentração de  $H^+$  e volume do suco gástrico) utilizando o modelo de ligadura do piloro pela via oral (efeito local) e intraduodenal (efeito

sistêmico). Esse modelo permite que a secreção gástrica seja acumulada no estômago, facilitando desta forma, a análise do conteúdo estomacal.

O farnesol não exerceu alterações no pH em ambas as vias, na concentração de  $H^+$  e volume do suco gástrico por via oral. Entretanto, reduziu a concentração de  $H^+$  o volume do suco gástrico via intraduodenal. Dessa forma, pode-se inferir que a gastroproteção promovida pelo farnesol está associada a mecanismos antissecreitórios sistêmicos. Resultados semelhantes foram observados nos estudos com o sesquiterpeno  $\alpha$ -humuleno, que diminuiu a secreção de ácido gástrico nas úlceras gástricas induzidas pela ligadura do piloro (YEO et al., 2021).

Outros produtos naturais também já foram avaliados frente a esses parâmetros, como a *Cissampelos sympodialis* que não modulou os parâmetros bioquímicos do suco gástrico (pH, volume e  $[H^+]$ ) (DE SALES et al., 2018), o polifenol ácido rosmarínico que também não apresentou alterações no pH e concentração de  $H^+$  (DO NASCIMENTO et al., 2020), o fenilpropanoide estragol que não promoveu alteração no pH, na concentração de  $H^+$  e no volume do suco gástrico por via oral, mas reduziu o conteúdo gástrico por via intraduodenal (ALVES JÚNIOR et al., 2020) e o monoterpene (-)-carveol que não exerceu alterações no pH e na concentração de  $H^+$ , entretanto, reduziu o volume do suco gástrico em ambas as vias (SERAFIM et al., 2021).

Ao considerar os resultados promissores e inéditos apresentados pelo farnesol na gastroproteção, na sequência, foi avaliada a participação dos mecanismos citoprotetores envolvidos nesse efeito, como os grupamentos sulfidrílicos, NO,  $K_{ATP}$ , muco e prostaglandinas.

Os grupos sulfidrílica protegem a mucosa gástrica mantendo o muco gástrico estável por meio da formação de pontes dissulfeto e eliminação de radicais livres. Estes últimos são capazes de causar peroxidação lipídica (SÁNCHEZ-MENDOZA et al., 2020).

Os grupamentos sulfidrílicos são responsáveis pelo aumento e pela manutenção da estabilidade da camada de muco, principalmente quando as EROs participam da formação dos danos teciduais. No processo de desenvolvimento das lesões gástricas, as EROs são liberadas e iniciam uma reação de peroxidação lipídica, culminando em morte celular. Os grupamentos sulfidrílicos se ligam as espécies

reativas e auxiliam na diminuição da gravidade das lesões gástricas, impedindo a morte celular (LIANG et al., 2018).

O mecanismo de ação gastroprotetor do farnesol envolve grupos sulfidríla, tendo em vista que o NEM, um inibidor dos grupamentos sulfidrílicos, conseguiu reverter seu efeito gastroprotetor.

Muitos produtos naturais exercem atividades gastroprotetoras por meio da modulação de grupamentos sulfidrílicos a exemplo do extrato hidroalcoólico das folhas de *Senna multiglandulosa* (PACHECO et al., 2022). Estudos com 1,8-cineol (CALDAS et al., 2015),  $\beta$ -mirceno (BONAMIN et al., 2014) mentol (ROZZA et al., 2014), (-)-carveol (SERAIM et al., 2021) mostraram que a atividade gastroprotetora desses terpenos também está relacionada à participação de grupamentos sulfidrílicos.

Dando continuidade a elucidação do mecanismo citoprotetor do farnesol a próxima etapa desse estudo foi investigar a participação do óxido nítrico e dos canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) no seu efeito gastroprotetor.

Fisiologicamente, o NO produzido pela isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico (eNOS) está envolvido nos mecanismos que controlam a integridade do epitélio gástrico. O NO regula o fluxo sanguíneo gástrico, diminui a infiltração de neutrófilos, estimula a angiogênese e a integridade da mucosa, induzindo a secreção de muco e inibindo a secreção de ácido gástrico (NASCIMENTO et al., 2020).

Os resultados sugerem que o NO participa do efeito gastroprotetor do farnesol, já que a administração do L-NAME, um inibidor não seletivo da NO-sintase, interferiu reduzindo sua gastroproteção. Estes achados corroboram com o estudo realizado por ZHENG e colaboradores, 2016 com as lactonas sesquiterpênicas costunolide e dehidrocostuslactona que também demonstraram uma redução da gastroproteção quando administrado o L-NAME.

Além desses resultados, foi possível observar que o farnesol (100 mg/kg) em combinação com a glibenclamida (10 mg/kg) teve seu efeito protetor gástrico diminuído, sugerindo que os canais  $K_{ATP}$  estão envolvidos na atividade gastroprotetora desse fitoconstituente. Esses dados se assemelham aos resultados obtidos com o farnesol complexado a  $\beta$ -ciclodextrina sugerindo a possível participação do canal de  $K^+$  sensível ao ATP no seu mecanismo de ação (SILVA et al., 2017).

Os canais de potássio sensíveis a ATP ( $K_{ATP}$ ) foram identificados em vários tecidos, como pâncreas, coração, fígado e estômago, onde regulam o fluxo de

potássio na membrana celular. A ativação dos canais  $K_{ATP}$  pode ocorrer por duas vias principais: pela via  $NO/cGMP/K_{ATP}$ , em que o NO ativa a guanilato ciclase solúvel e aumenta os níveis de monofosfato de guanosina cíclica (cGMP) ativando o  $K_{ATP}$ ; e também pela atividade de prostanóides endógenos, que ao ativar os receptores EP3, estimulam o  $K_{ATP}$ . Assim, a ativação dos  $K_{ATP}$ s está relacionada à contratilidade, regulação do fluxo sanguíneo e secreção de ácido gástrico (ARARUNA et al., 2021).

A próxima etapa foi avaliar se o farnesol exerce influência na secreção do muco gástrico. Nas úlceras gástricas, apesar da baixa secreção ácida, os mecanismos protetores enfraquecidos podem levar a lesões da mucosa.

O muco é considerado a primeira linha de defesa contra esses agentes nocivos; protege a mucosa gástrica formando um revestimento insolúvel semelhante a um gel sobre as células epiteliais e junto com o bicarbonato atua como um escudo. Também contribui para a inibição da destruição mecânica, fornecendo um microambiente sobre os locais expostos, onde pode ocorrer uma cicatrização rápida pela regeneração das células epiteliais (CHANDRA; KISHORE; GHOSH, 2015; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015; MCDONALD; MACFARLANE, 2018).

A mucosa gástrica é continuamente exposta a agentes nocivos físicos e químicos, incluindo ácido gástrico, pepsina, toxinas microbianas, substâncias abrasivas, refluxo biliar, suco pancreático e drogas irritantes (MCDONALD; MACFARLANE, 2018).

A partir dos dados obtidos com esse modelo foi observado que o farnesol aumentou o muco aderido à mucosa gástrica, sugerindo que o efeito desse sesquiterpeno envolve o estímulo desse agente citoprotetor. Esses resultados corroboram aos achados com os sesquiterpenos  $\alpha$ -humuleno e nerolidol que no mesmo modelo avaliado aumentou o conteúdo de muco (YEO et al., 2021; DE SOUZA et al., 2021).

Na avaliação das prostaglandinas na gastroproteção mediada pelo farnesol, as úlceras gástricas foram induzidas por etanol em ratos pré-tratados ou não com indometacina, um inibidor inespecífico da COX e conseqüentemente da síntese de prostaglandinas. A manutenção da homeostase da mucosa gástrica depende da geração contínua de prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) e prostaciclina ( $PGI_2$ ). Essas PGs protegem o epitélio gástrico aumentando a secreção de muco e bicarbonato,

reduzindo a migração de leucócitos, mantendo o fluxo sanguíneo para a mucosa e aumentando a resistência das células epiteliais (AMAGASE, 2018).

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

Dados semelhantes foram observados com os sesquiterpenos  $\beta$ -cariofileno (FRANCOMANO et al., 2021), O -diacetilbritannilactona, 1- O -acetilbritannilactona, neobritannilactona A e neobritannilactona B, principais componentes da *Inula britannica* L. (Inulae Flos) (KIM et al., 2020).

Visando caracterizar o provável efeito antioxidante do farnesol frente aos danos gástricos, a próxima etapa foi avaliar os marcadores do estresse oxidativo como a glutathiona reduzida (GSH), malondialdeído (MDA), a atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) e mieloperoxidase (MPO) em tecido gástrico a partir do modelo agudo de úlcera induzida por etanol, já que o estresse oxidativo é considerado um dos mais importantes fatores da fisiopatologia das úlceras induzidas por etanol (KIM et al., 2020).

Os oxidantes reativos são criados em muitos compartimentos dentro da célula a partir de uma variedade de fontes, naturalmente ou como resultado de agressões tóxicas ou patológicas. Pesquisas anteriores demonstraram que a exposição ao etanol causa o desenvolvimento de ROS, o que causa ainda mais lesões no estômago. Portanto, aumentar a sinalização antioxidante pode proteger a mucosa gástrica contra a ulceração (BONAMIN et al., 2024; ASAAD; MOSTAF, 2022).

O GSH é um peptídeo contendo grupos tiol e caracterizado como a principal linha de defesa celular contra o dano oxidativo. Em situação de estresse oxidativo, o GSH volta à sua forma oxidada pela ação da glutathiona peroxidase durante a eliminação do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A quantidade intracelular de GSH pode ser rapidamente reduzida pela glutathiona redutase completando seu ciclo (GAUCHER et al. 2018).

A superóxido dismutase (SOD) é uma metaloproteinase que catalisa a dismutação do ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), uma das principais EROs, em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O peróxido de hidrogênio formado na reação com a SOD não é um

radical livre, é um composto com forte capacidade oxidante, sendo também uma EROs. Dessa forma entram as enzimas catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx), para eliminar esse peróxido de hidrogênio do organismo (JONES, 2020).

O Malondialdeído (MDA) é um marcador biológico da peroxidação lipídica e do estresse oxidativo que pode ser quantificado em lesões inflamatórias do trato gastrointestinal. Além disso, juntamente com outras moléculas pró-oxidantes, o MPO é uma enzima crucial e um alvo terapêutico que desencadeia o estresse oxidativo e a inflamação, sendo encontrado em neutrófilos infiltrados. Sua ativação pode catalisar a liberação de ERO, alterando as vias de sinalização inflamatória (CHEN et al., 2020).

Neste estudo o farnesol elevou os níveis de GSH e SOD nas amostras de tecido gástrico e reduziu os níveis de MDA e MPO, o que sugeri que a atividade antioxidante está envolvida no efeito gastroprotetor desse composto. Esses resultados corroboram com os resultados apresentados pelos sesquiterpenos (-)- $\alpha$ -bisabolol (ROCHA et al., 2011) e epóxido de patchoulene (LIANG et al., 2018), sesquiterpeno  $\beta$ -cariofileno (FRANCOMANO et al., 2021).

Após comprovar o efeito antioxidante do farnesol, passou-se a avaliar os possíveis efeitos imunorregulatórios e anti-inflamatórios desse constituinte.

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

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

De acordo com os resultados apresentados ocorreu uma redução dos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , enquanto, a citocina anti-inflamatória IL-10 aumentou significativamente no grupo tratado com o farnesol. Resultados semelhantes foram encontrados com os sesquiterpenos  $\alpha$ -humuleno (YEO et al., 2021) e  $\beta$ -cariofileno (FRANCOMANO et al., 2021) que também reduziram

os níveis de citocinas, como interleucina IL-1 $\beta$ , IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), e o sesquiterpeno costunolide (KIM; CHOI, 2019) que reduziu os níveis das citocinas IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ). Além disso, ocorreu um aumento dos níveis de IL-10 demonstrado nos estudos envolvendo o extrato hidroalcóolico de *Aquilaria* spp. (Thymelaeaceae) rica em sesquiterpenos (WANG et al., 2021) a lactona sesquiterpenica antractilona (LI et al., 2022) e isoalantolactona (CHAOYI ZHOU et al., 2023).

Diante dos resultados obtidos, foi possível verificar que o Farnesol possui um grande potencial frente as atividades gastroprotetoras que encontra-se relacionada a mecanismos citoprotetores (participação dos grupamentos sulfidrila, ativação dos canais K<sub>ATP</sub>, aumento da produção de muco e prostaglandinas), antioxidante pelo aumento dos níveis de GSH e da atividade da enzima SOD e redução da peroxidação lipídica (diminuição dos níveis de MDA) e da infiltração neutrofílica (atividade da MPO); e imunorregulatório observado por meio da diminuição dos níveis das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e aumento dos níveis da citocina reguladora IL-10.

## **Considerações Finais**

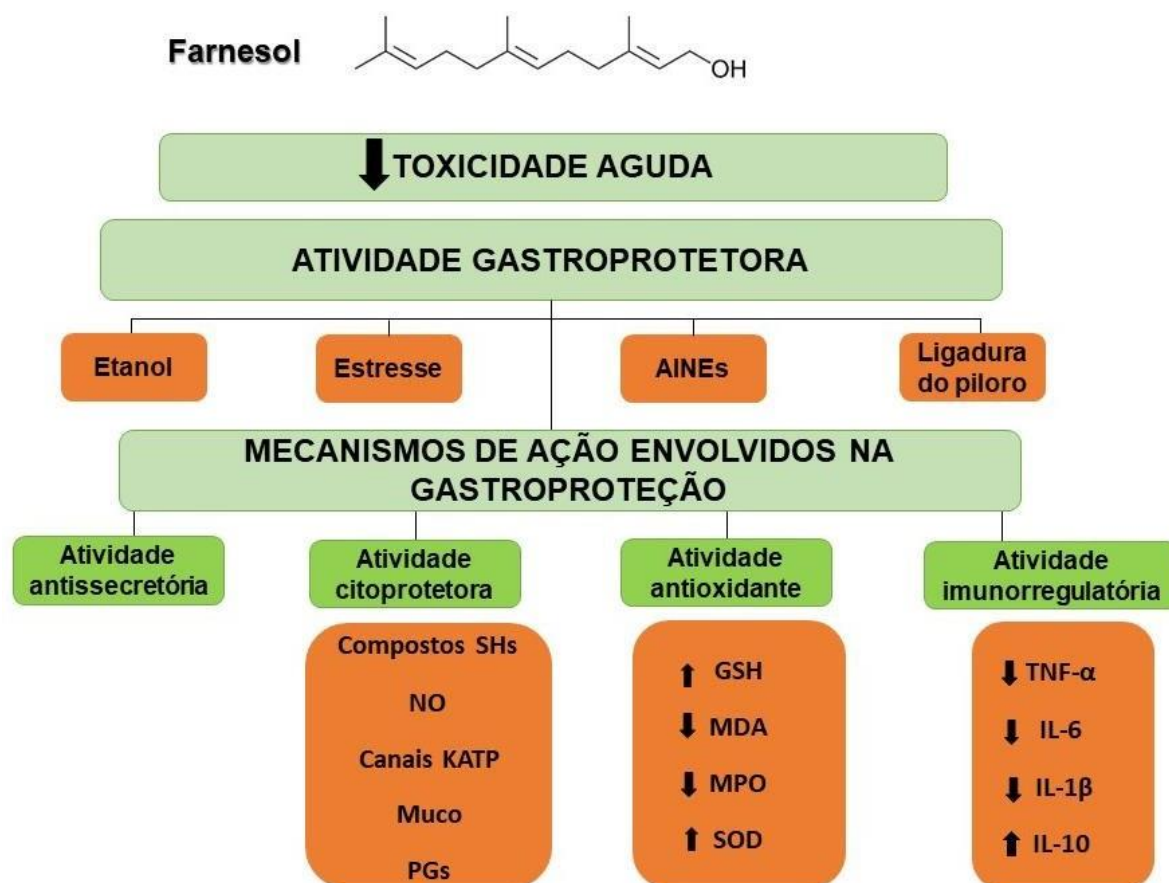


## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da avaliação do sesquiterpeno farnesol frente aos diferentes modelos experimentais de indução que mimetizam as úlceras gástricas no homem, pode-se concluir que:

- ❖ O farnesol apresentou baixo grau de toxicidade aguda quando administrado por via oral nas condições experimentais avaliadas;
- ❖ Apresentou atividade gastroprotetora, nas diferentes doses testadas, frente aos modelos de indução aguda de úlceras (etanol, estresse e AINEs);
- ❖ O efeito gastroprotetor do farnesol pode envolver mecanismos inibitórios da secreção ácida gástrica (antissecretórios).
- ❖ O efeito gastroprotetor do farnesol está associado a mecanismos citoprotetores, com a participação dos grupamentos sulfidrílicos, óxido nítrico, canais  $K_{ATP}$ , aumento de muco e prostaglandinas;
- ❖ O efeito gastroprotetor do farnesol envolve mecanismos antioxidantes, demonstrado por meio do aumento dos níveis de GSH e da atividade da enzima SOD e redução da peroxidação lipídica (diminuição dos níveis de MDA) e da infiltração neutrofílica (atividade da MPO);
- ❖ O farnesol possui potencial em minimizar a resposta inflamatória, observado por meio da diminuição dos níveis das citocinas pró-inflamatórias ( $IL-1\beta$ ,  $IL-6$  e  $TNF-\alpha$ ) e aumento dos níveis da citocina imunorregulatória  $IL-10$ .

**Figura 24 - Representação esquemática das atividades farmacológicas encontradas para o farnesol**



Legenda: AINEs, Anti-inflamatórios Não Esteroidais; GSH, Glutathione reduzida; SOD, Superóxido dismutase; MDA, Malondialdeído; MPO, Mieloperoxidase; IL-1β, Interleucina 1 beta; TNF-α, Fator de necrose tumoral alfa; IL-6, Interleucina 6; IL-10, Interleucina 10;

***Perspectivas***

## 8. PERSPECTIVAS

Apesar do farnesol apresentar baixa toxicidade no modelo agudo pré-clínico, é necessário avaliar a toxicidade dessa substância em modelos de toxicidade de doses repetidas e avaliar ensaios bioquímicos e hematológicos, afim melhor investigar a segurança do uso desse sesquiterpeno.

Considerando os resultados promissores encontrados para a atividade gastroprotetora desenvolvida pelo farnesol, faz-se necessário investigar outros mecanismos de ação envolvidos nesse efeito farmacológico, como:

- ❖ Investigar o efeito cicatrizante no modelo de indução de úlceras gástricas por ácido acético e buscar os fatores envolvidos no processo de cicatrização da úlcera;
- ❖ Investigar o efeito antiulcerogênico do farnesol no modelo de úlcera duodenal induzida por cisteamina;
- ❖ Análise histológica e imunohistoquímica dos cortes da mucosa gástrica;

Além disso, investigar a capacidade terapêutica desse sesquiterpeno em outros modelos experimentais de doenças que acometem o trato gastrointestinal, uma vez que os mecanismos envolvidos encontrados também são importantes na terapêutica de outras enfermidades, como na colite ulcerativa.

- ❖ Avaliar o efeito anti-inflamatório intestinal do farnesol 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.

# **Referências** **Bibliográficas**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACTIS, G. C. and Pellicano, R. Inflammatory bowel disease: Efficient remission maintenance is crucial for cost containment. **World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics**, vol. 8 no.2, pp.114, 2017.
- AHN, K. The worldwide trend of using botanical drugs and strategies for developing global drugs. v. 50, n. 3, p. 111–116, 2017
- ALI, D. E. et al. Gastroprotective and anti-Helicobacter pylori potentials of essential oils from the oleoresins of *Araucaria bidwillii* and *Araucaria heterophylla*. **Inflammopharmacology**, Feb; v. 31, p. 465-483, 2023.
- ALKIM, H., KOKSAL, A. R., BOGA, S., SEN, I., ALKIM, C. Role of Bismuth in the Eradication of *Helicobacter pylori*. **American Journal of Therapeutics**, v. 24, n. 6, p. 751–757, 2017.
- AMORIM M.M.; PEREIRA J.O.; MONTEIRO K.M.; RUIZ A.L.; CARVALHO J.E.; PINHEIRO H.; PINTADO M. Antiulcer and antiproliferative properties of spent brewer's yeast peptide extracts for incorporation into foods. **Food Funct.** v. 18, n.7(5), p.2331-7, 2016.
- ANANTHAKRISHNAN, A. N. et al. Lifestyle, behaviour, and environmental modification for the management of patients with inflammatory bowel diseases: an International Organization for Study of Inflammatory Bowel Diseases consensus. **The Lancet Gastroenterology & Hepatology**, v. 7, p. 666-678, 2022.
- ARAB, H. H. et al. Diosmin protects against ethanol-induced gastric injury in rats: novel anti-ulcer actions. **PLoS ONE**. V. 10p. 17, 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.
- ASAAD, G. F.; MOSTAFA, R. E. Lactoferrin mitigates ethanol-induced gastric ulcer via modulation of ROS/ICAM-1/Nrf2 signaling pathway in Wistar rats. **Iran J Basic Med Sci.** V. 12, p. 1522-1527, 2022.
- AYAZ, A. et al. Antioxidant and Gastroprotective Activity of *Suaeda fruticosa* Forssk. **Ex J.F.Gmel. Molecules**. V. 14 p. 4368, 2022.

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

BARAZANDEH et al. Epidemiology of peptic ulcer disease: endoscopic results of a systematic investigation in iran. Middle East **Journal of Digestive Diseases**, v. 4 (2), p. 90, 2012.

BARBASTEFANO, V. et al. *Vernonia polyanthes* as a new source of antiulcer drugs, based cohort study. **Lancet** p. 1–12, 2016.

BARBOSA, H. Abordagem fitoquímica de metabólitos secundários em *Solanum acanthodes* (SOLANACEAE) HOOK. **Journal of Basic Education**, v. 4, n. 1, p. 30-41, 2017.

BERRIDGE, M. Cellular processes. **Cell Signalling Biology**, v. 2014 (1), 2-124 pp., 2014.

BHALA, N. et al. Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Meta-analyses of individual participant data from randomised trials. **Lancet**. v. 382, p. 769–779, 2013.

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

BHATTACHARYYA, A. et al. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of **biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 110, p. 554-560, 2019.

BJARNASON, I. et al. Mechanisms of Damage to the Gastrointestinal Tract From Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. **Gastroenterology**, Feb; v. 154, p. 500-514, 2018.

BLANCO; BLANCO. Digestion - Absorption. **Medical Biochemistry**, p. 251–273, 2017.

BLUNDELL, S. et al. Chronic fatigue syndrome and circulating cytokines: A systematic review. **Brain Behav. Immunit.**, v. 50, p. 186–195, 2015.

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.

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.

BONAMIN, F. et al. The effect of a minor constituent of essential oil from *Citrus aurantium*: The role of  $\beta$ -myrcene in preventing peptic ulcer disease. **Chem Biol Interact**. V. 212, p. 11–19, 2014.

BOSHTAM, M. et al. Aptamers Against Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines: A Review. **Inflammation** v. 40, p. 340–349, 2017.

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

BRUNEL et al. Oxygen activation in NO synthases: Evidence for a direct role of the substrate. **FEBS Open Bio**, v. 6, n. 5, p. 386–397, 2016.

BRUNTON, L. L. *Bases Farmacologicas Da Terapeutica De Goodman E Gilman*. Artmed, ed. 13<sup>a</sup>, 2018.

BURLAKOVSKIY, M. S.; YEMELYANOV, V. V.; LUTOVA, L. A. Plant Based Bioreactors of Recombinant Cytokines (Review). **Prikl. Biokhim. i Mikrobiol.**, v. 52, n. 2, p. 149–167, 2016.

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

CACANYIOVA, S.; DOVINOVA, I.; KRISTEK, F. The role of oxidative stress in acetylcholine-induced relaxation of endothelium-denuded arteries. **J Physiol Pharmacol**, Pharmacol. V. 64, p. 241–247, 2013.

CALLAGHAN, G. O.; HOUSTON, A. Prostaglandin E2 and the EP receptors in malignancy: **Cells**. v. 17, p. 2664, 2022.



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

CHANDRA, P.; KISHORE. K.; GHOSH, A. K. Avaliação do potencial antissecretor, gastroprotetor e antiácido in vitro de *Daucus carota* em ratos experimentais. **Osong. Res. de Saúde Pública Perspectiva**. V. 6, p. 329–335, 2015.

CHANDRASEKHARAN, N. V. et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, n. 21, p.13926-31, 2002.

CHEN, S. et al. Targeting myeloperoxidase (MPO) mediated oxidative stress and inflammation for reducing brain ischemia injury: Potential application of natural compounds. **Front Physiol**. V. 11, p. 1–16, 2020.

CHEN, X. et al. Effects of Genetically Modified Milk Containing Human Beta-Defensin-3 on **Gastrointestinal Health of Mice**. p. 1–18, 2019.

CHOI et al., Ligustilide attenuates vascular inflammation and activates Nrf2/HO-1 induction and, NO synthesis in HUVECs. **Phytomedicine**, v. 38, p. 12–23, 2018.

CLARKE, K. et al., Indications for the Use of Proton Pump Inhibitors for Stress Ulcer Prophylaxis and Peptic Ulcer Bleeding in Hospitalized Patients. **The American Journal of Medicine**. v. 135, 313-317, 2022.

COSTA, D. S. et al. Antidiarrheal activity of farnesol in rodents: Pharmacological actions and molecular docking, **European Journal of Pharmacology**, v. 874, 2020.

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

DAVIES, N. M. et al. Cyclooxygenase-3: axiom, dogma, anomaly, enigma or splice error? -Not as easy as 1, 2, 3. **J. Pharm. Pharm. Sci.**, v.7, n. 2, p. 217-26, 2004.

DE SOUZA et al. O complexo de inclusão de nerolidol-beta-ciclodextrina aumenta a atividade anti-inflamatória no modelo de artrite e melhora a proteção gástrica. **Ciências da Vida**, v.11, p.8742, 2020.

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

DRINI, M. Peptic ulcer disease and non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Australian prescriber**. volume 40 : number 3 : june 2017.

DUMIC, et al., Gastrointestinal tract disorders in older age. **Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, 2019, 2019.

DZUL-BEH, A. J. et al. Mulinane- and Azorellane-Type Diterpenoids: A Systematic Review of Their Biosynthesis, Chemistry, and Pharmacology. **Biomolecules**. V. 9, p. 1333, 2020.

ECKL, P. M.; BRESGEN, N. Genotoxicity of lipid oxidation compounds. **Free Radical Biology & Medicine**, 2017.

EL-SERAG, H. B. Systematic review: The global incidence and prevalence of peptic ulcer disease. **Aliment. Pharmacol. Therap.**, v. 29, n. 9, p. 938–946, 2014.

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

ESCOBEDO-HINOJOSA, W. I., GOMEZ-CHANG, E., GARCÍA-MARTÍNEZ, K., GUERRERO ALQUICIRA, R., CARDOSO-TAKETA, A. AND ROMERO, I. Gastroprotective Mechanism and Ulcer Resolution Effect of *Cyrtocarpa procera* Methanolic Extract on Ethanol-Induced Gastric Injury. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2018.

EUSEBI, L. H.; ZAGARI, R. M.; BAZZOLI, F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection experimentally in ovariectomized rats. **Int J Pharm Pharm Sci**. V. 8, p. 237–242, 2016.

FALCÃO, H.S.. et al. Gastroprotective mechanisms of the chloroform and ethyl acetate phases of *Praxelis clematidea* (Griseb.) R.M.King & H.Robinson (Asteraceae). **J Nat Med**. V. 67, p. 480–491, 2013.

FRANCOMANO et al.  $\beta$ -Cariofileno: Um Sesquiterpeno com Inúmeras Propriedades Biológicas. **Appl. ciência**, v. 9, p. 5420, 2019.

GARCÍA-MIGUEL, O. M. Papel de las prostaglandinas producidas por la ciclooxigenasa-2 en la resistencia a la insulina asociada a la enfermedad hepática grasa no alcohólica. 2016. 154 p. Tese de doutorado – Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica, Madrid, 2016.

GARCÍA-RAYADO, G.; NAVARRO, M.; LANAS, A. NSAID induced gastrointestinal damage and designing GI-sparing NSAIDs. **Expert Rev. Clin. Pharmacol.** v. 11, p. 1031–1043, 2018.

GAUCHER, C. et al. Glutathione: antioxidant properties dedicated to nanotechnologies. **Antioxidants**. V. 7, p. 1–21, 2018.

GIRALDEZ, M.D. et al. New insights into IL-6 family cytokines in metabolism, hepatology and gastroenterology. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**. V. 18, p. 787–803, 2021.

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

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

GYIRES, K; TOTH, V. E., ZADORI Z. S. Gastric mucosal protection: from the periphery to the central nervous system. **J Physiol Pharmacol**. v. 3, p. 319-29, 2015.

HAGEN, S. J. Mucosal defense: gastroduodenal injury and repair mechanisms. **Curr Opin Gastroenterol**. v. 6, p. 609-614, 2021.

HAMAGUCHI, M. et al. Mechanisms and Roles of Neutrophil Infiltration in Stress-Induced Gastric Injury in Rats. **Lancet** v. 46, n. 12, p. 2708–2715, 2001.

HAMEED, E. Z, et al. Gastroprotective effect of *Zinnia elegans* extracts against ethanol-induced gastric mucosal damage through downregulation of TLR4 and inflammatory cytokines, **Lancet** v. 11, p. 1260, 2022.

HE, J. et al. Ca<sup>2+</sup> signaling in HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion and protection of upper GI tract. **Oncotarget**, v. 8, n. 60, p. 102681–102689, 2017.

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

HOFFMANN, W. TFF2, a MUC6-binding lectin stabilizing the gastric mucus barrier and more (Review). **International Journal of Oncology**, v. 47, n. 3, p. 806–816, 2020.

HOOI, J. K. Y. et al. Global prevalence of Helicobacter pylori infection: systematic review and meta-analysis. **Gastroenterology**, v. 153, p. 420–429, 2017.

HRYCAY, E. G.; BANDIERA, S. M. Involvement of cytochrome p450 in reactive oxygen species formation and cancer. **Lancet** p. 35–84. 2015.

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

JANKO, C. et al. Redox modulation of HMGB1-related signaling. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 7, p. 1075–1085, mar. 2014.

JIN et al. Structural Diversity of Human Gastric Mucin Glycans. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 16, n. 5, p. 743–758, 2017.

JUSTINA, E. Y. D. et al. Levantamento de dados de internações por Úlcera Gástrica e Duodenal na 8ª Regional de Saúde de Francisco Beltrão. **Biosaúde**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 21–26, 2016.

KAMIMURA, D. et al. IL-6 and inflammatory diseases Cytokine Front. **Springer**. V. 23, p. 53-78, 2014.

KANGWAN, N.; PARK, J. M.; KIM, E. H.; HAHM, K. B. Quality of healing of gastric ulcers: natural products beyond acid suppression, **World Journal Gastrointestinal Pathophysiology**, v. 5, p. 40-47, 2014.

KANNO, T. et al. Peptic ulcers after the Great East Japan earthquake and tsunami: Possible existence of psychosocial stress ulcers in humans. **J. Gastroenterol.**, v. 48, n. 4, p. 483–490, 2013.

KANY, S.; VOLLRATH, J. T.; RELJA, B. Cytokines in Inflammatory Disease. **Int. J. Mol. ciência**, v. 20, p. 6008, 2019.

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

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

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.

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

KUNA, L. et al. Peptic ulcer disease: a brief review of conventional therapy and herbal treatment options. *J Clin Med.*, v. 3, p. 179, 2019.

KWIECIEN, S. et al. Lipid peroxidation, reactive oxygen species and antioxidative factors in the pathogenesis of gastric mucosal lesions and mechanism of protection against oxidative stress - induced gastric injury. *Journal of physiology and pharmacology*, v. 65, n. 5, p. 613– 22, out. 2014.

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

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

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

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

LEHOURS P, FERRERO RL Review: Helicobacter: Inflammation, immunology, and vaccines. *Helicobacter*. 2019 Sep; 24 Suppl 1():e12644.

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

LIANG, T-Y et al. The role of nitric oxide in peptic ulcer: a narrative review. **Med Gas Res**, v.1, p. 42-45, 2021.

LIU, C. et al. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. **Adv Sci (Weinh)**. V. 15, p. 2004433, 2021.

LYLE, N. et al. Stress modulating antioxidant effect of Nardostachys jatamansi. v. 46, n. February, **Med Gas Res**, p. 93–98, 2009.

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

MCCARTY, M. F. Dietary nitrate and reductive polyphenols may potentiate the vascular benefit and alleviate the ulcerative risk of low-dose aspirin. **Med Hypotheses**. v. 80, p. 186–190, 2013.

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

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

MELINDER, C. et al. Decreased stress resilience in young men significantly increases the risk of subsequent peptic ulcer disease - A prospective study of 233 093 men in Sweden. **Alim. Pharmacol. Therap.**, v. 41, n. 10, p. 1005–1015, 2015.

MOUSA et al., Antiulcerogenic effect of Cuphea ignea extract against ethanol-induced gastric ulcer in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 1, p. 1–13, 2019.

MUÑOZ-CARRILLO, J. L. et al, Immune Response Activation and Immunomodulation, **IntechOpen**, Londres, Reino Unido: 2018.

MURI, E. M. F.; SPOSITO, M. M. de M.; METSAVAHT, L. Artigo de revisão: Anti-inflamatórios não-esteroidais e sua farmacologia local. **ACTA FISIATR**, v.16, n. 4, p. 186 – 190, 2009.

MUSAB, I. et al. Effects of the probiotic, Lactobacillus rhamnosus GG, on ulcer pathogenesis, HSP70 stress protein and nitric oxide levels in stress induced ulcer, **Biotechnic Histochemistry**, v. 97, p. 449-460, 2022.

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

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

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

NASCIMENTO, R.F.; FORMIGA, R. O.; MACHADO, F.D.F. et al. Rosmarinic acid prevents gastric ulcers via sulfhydryl groups reinforcement, antioxidant and immunomodulatory effects. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.** v. 393, p. 2265–2278, 2020.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Produtos naturais como fontes de novos medicamentos de 1981 a 2014. **J. Nat. Prod.** V. 79, p. 629–661, 2016.

NOBLE, M. J. The New Dangers of Electronic Cigarettes PT NU SC. **Clinical Pediatric Emergency Medicine**, 2017.

NWOKEJI, et al. A Química do produto natural: metabólitos secundários vegetais. **Int. J. Technol. Aprimorar Fusão Eng. Res.** V. 4, p. 1–9, 2016.

OLIVEIRA, A. F., CARVALHO, J. R., COSTA, M. F. S., LOBATO, L. C. P., SILVA, R. S., SCHRAMM, J. M.A. Estimativa da prevalência e da mortalidade por complicações da úlcera péptica, Brasil, 2008: uma proposta metodológica. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, n. 1, p. 383–394, 2014

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.

OSHIMA T, MIWA H We Are Using Too Many PPIs, and We Need to Stop: A European Perspective. **J Neurogastroenterol Motil.** 2018 Jul 30; 24(3):334-344. 2018.

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

PALOMINO-PACHECO, M. et al. Antiulcer Effect of *Senna multiglandulosa* via Increased Secretion of Mucus and Nonprotein Sulfhydryl Groups in an Experimental Murine Model, **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 21, p. 8, 2022.

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

PELASEYED, T. et al. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. **Immunol Rev.**, Jul; v. 260, p. 8-20, 2014.

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

PÉRICO et al. Systematic analysis of monoterpenes: Advances and challenges in the treatment of peptic ulcer diseases. **Biomolecules**, v. 10, n. 2, 2020.

PÉRICO LL, EMÍLIO-SILVA MT, OHARA R, et al. Systematic Analysis of Monoterpenes: Advances and Challenges in the Treatment of Peptic Ulcer Diseases. **Biomolecules**. 2020;10(2):265. Published 2020.

PIMENTEL, V. et al. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança? **Rev. BNDES**, v. 43, p. 41–89, 2015.

RAISH, M. et al. Gastroprotective effect of sinapic acid on ethanol-induced gastric ulcers in rats: involvement of Nrf2/HO-1 and NF-κB signaling and antiapoptotic role. **Frontiers in Pharmacology**. V. 12, p. 101, 2021.

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

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

REPETTO, M. G.; BOVERIS, A. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, **Bentham Science Publishers**, v. 10, n. 7, p. 615-623, 2010.



ROCHA, N. F. M. et al. Gastroproteção do (-)- $\alpha$ -bisabolol em lesões agudas da mucosa gástrica em camundongos: Os possíveis mecanismos farmacológicos envolvidos. fundam. **Clin. Pharmacol.** v. 24, p. 63–71, 2010.

RUDRA, D. S. et al. Omeprazole prevents stress induced gastric ulcer by direct inhibition of MMP-2/TIMP-3 interactions, **Free Radical Biology and Medicine**, v. 181, p. 221-234, 2022.

SABER, A.; BAYUMI, E. K. Age - Related Gastric Changes. **J. Surg.** v. 4, n. 2-1, p. 20-26, 2016.

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

SÁNCHEZ-MENDOZA, M.E. et al. Gastroprotective Effect of Juanislamin on Ethanol-Induced Gastric Lesions in Rats: Role of Prostaglandins, Nitric Oxide and Sulfhydryl Groups in the Mechanism of Action. **Molecules** v. 25, p. 2246, 2020.

SÁNCHEZ-MENDOZA, M.E. et al. Gastroprotection of Calein D against Ethanol-Induced Gastric Lesions in Mice: Role of Prostaglandins, Nitric Oxide and Sulfhydryls. **Molecules** v. 24, p. 622, 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.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion, **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 30, n. 6, p. 578-582, 2014.

SHAO, Y.; BAO, J. **8 - Rice phenolics and other natural products**. [s.l.] AACCI. Published by Elsevier Inc. in cooperation with AACC International, 2019.

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

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

SHEN, B. A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery. **Cell**, [s.l.], v. 163, n. 6, p.1297-1300, Elsevier, 2015.

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

SICHEN, R. et al. Mechanism of rutaecarpine on ethanol-induced acute gastric ulcer using integrated metabolomics and network pharmacology, **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 138, p. 111490, 2021.

SIDDIQUE, O. et al. Helicobacter pylori infection: an update for the internist in the age of increasing global antibiotic resistance. **Am. J. Med.**, v. 131, p. 473–479, 2018.

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

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

SILVA et al. Docking, characterization and investigation of  $\beta$ -cyclodextrin complexed with farnesol, an acyclic sesquiterpene alcohol, produces orofacial antinociceptive profile in experimental protocols, **Process Biochemistry**, v. 62, p. 193-204, 2017.

SIMÕES, S. et al. Animal models of acute gastric mucosal injury: Macroscopic and microscopic evaluation. **Animal Model Experimental Medicine.**, v. 2, p. 121–126, 2019.

SINGH, A. K. et al. Aspectos biotecnológicos dos metabólitos vegetais no tratamento da úlcera: uma nova perspectiva. **Biotecnologia. Rep.** v. 18, p. 00256, 2018.

SPECHLER, S. J. P ro t o n P u m p I n h i b i t o r s What the Internist Needs to Know. **Medical Clinics of NA**, p. 1–14, 2018.

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

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.

SUE, S. et al. Vonoprazan and high-dose amoxicillin dual therapy for *Helicobacter pylori* first-line eradication: A single-arm, interventional study. **JGH Open**. Dec v. 8;7, p. 55-60, 2020.

TAKEUCHI, K. Patogênese do dano gástrico induzido por AINE: Importância da inibição da ciclooxygenase e hipermotilidade gástrica. **World J. Gastroenterol. WJG**, v. 18, p. 2147, 2012.

TAKEUCHI, K.; AMAGASE, K. Roles of Cyclooxygenase, Prostaglandin E2 and EP Receptors in Mucosal Protection and Ulcer Healing in the Gastrointestinal Tract. **Current**

TANYELI, A. et al. The biochemical and histopathological effects of salusin alpha and salusin beta on cold restricted stress induced gastric injury. **Med Gas Res**, v. 6, n. 2, p. 236–241, 2017.

TARNAWSKI, A. S.; AHLUWALIA, A.; JONES, M. K. The mechanisms of gastric mucosal injury: Focus on microvascular endothelium as a key target. **Curr. Med. Chem.**, v. 19, n. 1, p. 141 4–15, 2012.

TEPPERMAN, B. L.; SOPER, B. D. Nitric oxide synthase induction and cytoprotection of rat gastric mucosa from injury by ethanol. **Can J Physiol Pharmacol**. V. 72, p. 1308–1312, 1994.

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

TUSTUMI, F. et al. The Role of the Heat-Shock Proteins in Esophagogastric Cancer ulcer agents. **Ulcers**, v. 2013, p. 1–12, 2013.

ULUCAN, A. Etiopatogenia das úlceras pépticas e relação com as prostaglandinas . **Van Tip Derg**. V. 27, p. 238 – 245, 2020.

VELLA; CAMILLERI. Trato Gastrointestinal como Integrador da Resposta Mecânica e Hormonal à Ingestão de Nutrientes. **Diabetes**, v. 66, p. 2729 – 2737, 2017.

VERRI, A.; MORA, A.; MOURA, V. Cytogenetic tests in evaluation of natural products genotoxicity stemmed of medical plants. **UNINGÁ Review** ISSN, v. 30, n. 1, p. 55-61, 2017.

VOULGARIS et al., High prevalence of asymptomatic peptic ulcers diagnosed during screening endoscopy in patients with cirrhosis. **Annals of Gastroenterology**, v. 32, n. 5, p. 451–456, 2019.

WALDUM, H. L.; HAUSO, O.; FOSSMARK, R. The regulation of gastric acid secretion - clinical perspectives. **Act. Physiol.**, v. 210, n. 2, p. 239–256, 2014.

WALLACE, J. L. Nitric oxide in the gastrointestinal tract: opportunities for drug development. **British Journal of Pharmacology**, v. 176, n. 2, p. 147–154, 2019.

WANG C, et al. Agarwood Alcohol Extract Protects against Gastric Ulcer by Inhibiting Oxidation and Inflammation. **Evid Based Complement Alternat Med**. V. 18, p. 9944685, 2021.

WOJTUNIK-KULESZA, K. A., KASPRZAK, K., ONISZCZUK, T., ONISZCZUK, A. Natural Monoterpenes: Much More than Only a Scent. **Chemistry & Biodiversity**, v. 16, n. 12, 2019.

WOMERSLEY, J. S.; UYS, J. D. S-Glutathionylation and Redox Protein Signaling in Drug Addiction. **Prog. Mol. Biol. Trans. Sci.**, v. 137, p. 87–121, 2016.

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

YANDRAPU, H.; SAROSIEK, J. Protective Factors of the Gastric and Duodenal Mucosa: An Overview. **Curr. Gastroenterol. Rep.**, v. 17, n. 6, p. 1–8, 2015.

YANG,M.H.; CHANG, K.J.; B. LI, W.S. Chen Arsenic trioxide suppresses tumor growth through antiangiogenesis via Notch signaling blockade in small-cell lung cancer. **Biomed Research International**, v. 12, p. 1-9, 2019.

YE, B. et al. Absence of NF-κB subunit p50 ameliorates cold immobilization stress-induced gastric ulcers. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 434, n. 3, p. 547-551, 2013.

YEO et al. Humulene Inhibits Acute Gastric Mucosal Injury by Enhancing Mucosal Integrity. **Antioxidants** v. 10, p. 761, 2021.

ZAKARIA, Z. A. et al. Mechanism ( s ) of action underlying the gastroprotective effect of ethyl acetate fraction obtained from the crude methanolic leaves extract of *Muntingia calabura*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–17, 2016.

ZAKI, M. et al. H. pylori acutely inhibits gastric secretion by activating CGRP sensory neurons coupled to stimulation of somatostatin and inhibition of histamine secretion. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 304, p. G715–G722, 2013.

ZHANG, K. et al. Evaluation of the gastroprotective effects of 20 (S)-ginsenoside Rg3 on gastric ulcer models in mice. **J. Ginseng Res.**, v. 4, p. 550-561, 2019.

ZHANG, Y. et al.. Role of Selenoproteins in Redox Regulation of Signaling and the Antioxidant System: A Review. **Antioxidants** v. 9, p. 383, 2020.

ZHAO, C.-M.; CHEN, D. The ECL cell: relay station for gastric integrity. **Curr. Med. Chem.**, v.19, n. 1, p. 98–108, 2012.

ZHENG, H. et al. Evaluation of protective effects of costunolide and dehydrocostuslactone on ethanol-induced gastric ulcer in mice based on multi-pathway regulation, **Chemico-Biological Interactions**, v. 250, p. 68-77, 2016.

ZHENG, Y-F. et al. Gastroprotective effect and mechanism of patchouli alcohol against ethanol, indomethacin and stress-induced ulcer in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 222, p. 27-36, 2014.

ZHIQIANG, Y. Role of the posterior mucosal defense barrier in portal hypertensive gastropathy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 144, 2021.

ZHOU, C. et al. Isoalantolactone protects against ethanol-induced gastric ulcer via alleviating inflammation through regulation of PI3K-Akt signaling pathway and Th17 cell differentiation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 160, p. 114315, 2023.

**Anexos**

## ANEXOS

## ANEXO A



Universidade  
Federal da  
Paraíba

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

Reitoria



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DO FARNESOL EM MODELOS ANIMAIS", protocolada sob o CEUA nº 9667170122 (ID 001718), 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 29/07/2022.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE GASTROPROTECTIVE ACTIVITY OF THE FARNESOL IN ANIMAL MODELS", utilizing 135 Heterogenics mice (135 males), 289 Heterogenics rats (289 males), protocol number CEUA 9667170122 (ID 001718), 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 07/29/2022.

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

Vigência da Proposta: de **08/2022 a 04/2023**

Área: **Ciências Farmacêuticas**

Origem:	Biotério Convencional do laboratório de Imunopatologia Keizo Asami		
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo:	Machos
Linhagem:	Mus musculus - Swiss	idade:	6 a 8 semanas
		Peso:	25 a 35 g
Origem:	Biotério Convencional do laboratório de Imunopatologia Keizo Asami		
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Machos
Linhagem:	Rattus Norvegicus - Wistar	idade:	6 a 8 semanas
		Peso:	180 a 250 g

Local do experimento: Os estudos de investigação da atividade gastroprotetora serão desenvolvidos no Laboratório de Farmacologia do Trato Gastrointestinal (LFTGI), no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IpeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

João Pessoa, 04 de outubro de 2022

Profa. Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ivã Carmem Talieri  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba

## ANEXO B

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos				
	(0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	0 min	15 min	30 min	60 min	4 h
<b>1 – SNC</b>					
<b>a – Estimulante</b>					
Hiperatividade					
Iritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras _____					
<b>b – Depressora</b>					
Hipnose					
Plúsc					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
<b>c – Outros comportamentos</b>					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotípia					
<b>2 – SN AUTÔNOMO</b>					
Diarréia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tônus muscular					
Força para agarrar					
<b>3 – MORTE</b>					
<b>Observações</b>					
complementares: _____					