

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

GEDSON RODRIGUES DE MORAIS LIMA

**MECANISMOS ANTIULCEROGÊNICOS E ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA INTESTINAL DE *Combretum duarteanum* CAMBESS.
(COMBRETACEAE) EM MODELOS ANIMAIS**

**João Pessoa - PB
2015**

GEDSON RODRIGUES DE MORAIS LIMA

**MECANISMOS ANTIULCEROGÊNICOS E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA INTESTINAL DE *Combettum duarteanum* CAMBESS.
(COMBRETACEAE) EM MODELOS ANIMAIS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Leônia Maria Batista

**João Pessoa - PB
2015**

L732m Lima, Gedson Rodrigues de Moraes.

Mecanismos antiulcerogênicos e atividade anti-inflamatória intestinal de *Combretum duarteanum* Cambess. (Combretaceae) em modelos animais / Gedson Rodrigues de Moraes Lima.- João Pessoa, 2015.

183f. : il.

Orientadora: Leônia Maria Batista

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS

1. Produtos naturais. 2. *Combretum duarteanum*.
3. Antiulcerogênica. 4. Antioxidante. 5. Citoprotetor. 6. Anti-inflamatória intestinal.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

GEDSON RODRIGUES DE MORAIS LIMA

**MECANISMOS ANTIULCEROGÊNICOS E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA INTESTINAL DE *Combretum duarteanum* CAMBESS.
(COMBRETACEAE) EM MODELOS ANIMAIS**

APROVADO EM 20/02/2015

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE

Leônio Maria Batista

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

Teresinha G. Silva

**Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva
Avaliador Externo – UFPE**

Liana Clébia de Morais Pordeus

**Profa. Dra. Liana Clébia de Morais Pordeus
Avaliador Externo – UFPB**

Márcia R. Piuvezam

**Profa. Dra. Márcia Regina Piuvezam
Avaliador Interno – UFPB**

Marianna Vieira Sobral

**Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral
Avaliador Interno- UFPB**

A Deus e minha família, pelo amor e dedicação que auxiliaram no desenvolvimento do meu caráter e crescimento humano.

AGRADECIMENTOS

- ✓ A **Deus** por ter me proporcionado a vida e todas as oportunidades e desafios que me impulsionaram até hoje;
- ✓ À minha **família** pelo apoio que contribuiu para o desenvolvimento das minhas potencialidades.
- ✓ À **Profa. Dra. Leônia Maria Batista** pela oportunidade oferecida, ensinamentos e valiosa amizade que contribuíram não só para o desenvolvimento desse trabalho, mas também para o aprendizado nos vários âmbitos da vida.
- ✓ Ao **Prof. Dr. Josean Fechine Tavares** pela atenção e fornecimento das amostras vegetais utilizadas nos ensaios *in vivo* desse trabalho.
- ✓ A **Dra. Heloína de Sousa Falcão** pela amizade e disponibilidade em auxiliar em diferentes pontos do desenvolvimento desse trabalho.
- ✓ Aos **colegas do Laboratório de Farmacologia do Trato gastrintestinal**, em especial a **Flávia Danniele Frota Machado**, pelo auxílio técnico que foram essenciais para a conclusão deste trabalho.
- ✓ À equipe da Profa. **Dra. Clélia Akiko Hiruma Lima** em especial a doutoranda **Larissa Lucena Périco**, pela parceria que proporcionou o desenvolvimento de parte deste trabalho de pesquisa;
- ✓ À Profa. **Cláudia Helena Pellizzon** e toda sua equipe, assim como, o **Laboratório de Histologia UNIPEX- FMB (UNESP)** pela importante colaboração que viabilizou a realização de parte deste trabalho;
- ✓ À equipe da Profa. **Dra. Alba Regina de Sousa Brito** em especial Felipe Meira de Faria, Eduardo Rabello Socca e Anderson Luiz Ferreira pelo auxílio no desenvolvimento de parte deste trabalho de tese;
- ✓ Aos **professores do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos** pela contribuição na minha formação profissional.
- ✓ Às alunas de pós-graduação **Ana Lúcia Guedes e Isis Fernandes** pela disponibilidade na preparação das amostras vegetais utilizadas neste trabalho.
- ✓ À **Coordenação** do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela atenção concedida sempre que necessário.

- ✓ Aos **funcionários** do Programa de Produtos Naturais e Sintéticos Biativos da Universidade Federal da Paraíba.
- ✓ Ao **José Crispim Duarte** pela disponibilidade e auxílio técnico que sempre foram proporcionados ao Laboratório de Farmacologia do Trato Gastrintestinal.
- ✓ À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) pelo apoio financeiro na concessão da minha bolsa.

LIMA, G. R. M. Mecanismos antiulcerogênicos e atividade anti-inflamatória intestinal de *Combettum duarteanum Cambess.* (Combettaceae) em modelos animais. 2015. 183p. Tese (Programa de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2015).

RESUMO

Combettum duarteanum Cambess é uma espécie arbustiva exclusiva da América do Sul com registros na Bolívia, Paraguai e Brasil. É popularmente conhecida como “mufumbo”, “cipiúba” ou “cipaúba”. Encontrada na caatinga, é utilizada pela população para o tratamento de úlceras, inflamação e infecções, sendo os seus efeitos relacionados aos triterpenos pentacíclicos. O extrato etanólico bruto (EEtOH-Cd) e a fase hexânica (FaHex-Cd) obtidos das folhas de *C. duarteanum*, foram avaliados quanto aos mecanismos antiulcerogênicos e atividade anti-inflamatória intestinal em ratos. A administração (v.o.) do EEtOH-Cd (250 mg/kg) ou FaHex-Cd (250 mg/kg) por 14 dias resultou em um processo de cicatrização da úlcera gástrica induzida por ácido acético. Foi demonstrado que esse efeito possivelmente está relacionado ao aumento do número de células totais na lesão ($p<0,05$), aumento do número de vasos ($p<0,01$), bem como produção de muco e reorganização das estruturas morfológicas do tecido gástrico. O EEtOH-Cd (250 mg/kg) ou FaHex-Cd (250 mg/kg) foram avaliados quanto ao efeito antioxidante e citoprotetor envolvidos na gastroproteção. Foi observado o envolvimento do sistema antioxidante com participação da superóxido dismutase (SOD), catalase e glutationa (GSH) ($p<0,01$) na proteção gástrica. Também foi demonstrado o efeito antiulcerogênico do EEtOH-Cd (31,25; 62,5 e 125 mg/kg) ($p<0,01$) e FaHex-Cd (31,25 e 62,5 mg/kg) ($p<0,01$) em úlceras duodenais induzidas pela cisteamina. Nos modelos de indução aguda da colite ulcerativa por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS), EEtOH-Cd ou FaHex-Cd foram avaliados nas doses 31,25; 62,5; 125 e 250 mg/kg. EEtOH-Cd (62,5 e 125 mg/kg) ou FaHex-Cd (62,5 e 125 mg/kg) promoveram redução significativa no escore de lesão macroscópica ($p<0,05$) e área de lesão ulcerativa ($p<0,01$). Isso foi refletido na redução do índice de diarreia para os tratados com EEtOH-Cd (125 mg/kg) ($p<0,01$) e FaHex (62,5 mg/kg) ($p<0,05$). O efeito anti-inflamatório intestinal também foi avaliado em modelo de colite ulcerativa com recidiva. O EEtOH-Cd (125 mg/kg) ou FaHex-Cd (62,5 mg/kg) reduziram significativamente a lesão macroscópica ($p<0,05$ e $p<0,01$, respectivamente). A FaHex-Cd (62,5 mg/kg) foi capaz de reduzir significativamente a relação peso/comprimento do cólon ($p<0,01$), a diarreia ($p<0,05$), diminuição do consumo de água e ração ($p<0,01$) e consequente perda de peso corporal ($p<0,05$). O EEtOH-Cd (125 mg/kg) ou FaHex-Cd (62,5 mg/kg) diminuíram significativamente a mieloperoxidase (MPO) ($p<0,001$), assim como as citocinas pró-inflamatórias TNF- α ($p<0,01$) e IL-1 β ($p<0,01$). Foi observado o aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 nos animais tratados com as amostras vegetais avaliadas ($p<0,05$). O efeito anti-inflamatório intestinal está relacionado à diminuição da expressão da cicloxigenase-2 (COX-2) ($p<0,001$), do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) ($p<0,001$) e aumento da SOD ($p<0,001$). Portanto, estes dados indicam que *C. duarteanum* apresenta atividade cicatrizante e anti-inflamatória intestinal que pode envolver a participação do sistema antioxidante, bem como, das principais citocinas relacionadas aos processos inflamatórios intestinais.

Palavras chave: *Combettum duarteanum*, antiulcerogênica, antioxidante, citoprotetor e anti-inflamatória intestinal.

LIMA, G. R. M. **Antiulcerogenic mechanisms and intestinal anti-inflammatory activity of *Combretum duarteanum* Cambess. (Combretaceae) in animal models.** 2015. 183p. Thesis (Programa de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2015).

ABSTRACT

Combretum duarteanum Cambess, is a unique shrub species from South America, and is found in Bolivia, Paraguay, and Brazil, popularly known as mufumbo, cipiúba or cipaúba. It is associated with the caatinga environments, and is popularly used for treat ulcers, inflammation, and infections. Such effects are usually associated with pentacyclic triterpenes. Crude ethanol extract (EEtOH-Cd), and hexane phase (FaHex-Cd) obtained from the leaves of *C. duarteanum* were evaluated for mechanisms of action involved in its antiulcerogenic and intestinal anti-inflammatory activity in rats. The administration (p.o.) of FaHex-Cd or EEtOH-Cd for 14 days promoted healing of gastric ulcer induced by acetic acid. It has been demonstrated that its effect is related to increases in the total number of cells in the lesion ($p<0.05$), increasing the number of vessels ($p<0.01$) and mucus production, and rearrangement of the morphological structures of the gastric tissue. EEtOH-Cd (at 250 mg/kg) or FaHex-Cd (at 250 mg/kg) were evaluated for their antioxidant and cytoprotective effects involved in gastroprotection. Involvement of the antioxidant system with the participation of superoxide dismutase (SOD), catalase, and glutathione (GSH) ($p<0.01$) in gastric protection against ischemia and reperfusion-induced ulcers was observed. The antiulcerogenic effect of EEtOH-Cd (at 31.25, 62.5, and 125 mg/kg) ($p<0.01$) or FaHex-Cd (31.25 and 62.5 mg/kg) ($p<0.01$) was also shown against to the cysteamine induced duodenal ulcers. In models of acute ulcerative colitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS), EEtOH-Cd or FaHex-Cd were evaluated (at 31.25, 62.5, 125 and 250 mg/kg). EEtOH-Cd (62.5 to 125 mg/kg) or FaHex-Cd (62.5 to 125 mg/kg) caused significant reductions in macroscopic lesion scores ($p<0.05$) and ulcerative lesion area ($p<0.01$). This was reflected in reduced rates of diarrhea for animals who received EEtOH-Cd (125 mg/kg) ($p<0.01$) or FaHex (62.5 mg/kg) ($p<0.05$). Intestinal anti-inflammatory effect was also evaluated in a relapsed ulcerative colitis model. EEtOH-Cd (125 mg/kg) or FaHex-Cd (62.5 mg/kg) significantly reduced the macroscopic damage ($p<0.05$, $p<0.01$, respectively). FaHex-Cd (62.5 mg/kg) was able to significantly reduce the weight/length ratio of the colon ($p<0.01$), diarrhea ($p<0.05$), decreased water and food consumption ($p<0.01$), and consequent weight loss ($p<0.05$). EEtOH-Cd (125 mg/kg) or FaHex-Cd (62.5 mg/kg) were able to inhibit a increase in myeloperoxidase (MPO) ($p<0.01$), as well as of proinflammatory cytokines TNF- α ($p<0.01$), and IL-1 β ($p<0.01$). There was increased anti-inflammatory cytokine IL-10 in animals treated with the tested plant sample ($p<0.05$). Intestinal anti-inflammatory effect is related to decreased expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) ($p <0.001$), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) ($p <0.001$) and increase in SOD ($p <0.001$). Therefore, these data indicate that *C. duarteanum* has gastroprotective, and intestinal ulcerogenic anti-inflammatory activity. Such effects may involve participation of the antioxidant system and those cytokines principally related to inflammatory bowel disease.

Key Words: *Combretum duarteanum*, antiulcerogenic, antioxidant, intestinal anti-inflammatory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fotos de <i>Combretum duarteanum</i> Cambess.....	31
Figura 2 Úlcera péptica e acometimento tecidual por lesões	32
Figura 3 Representação esquemática dos fatores agressores e mecanismos de defesa da mucosa gástrica	34
Figura 4 Enzimas envolvidas na geração e eliminação de ROS	40
Figura 5 Representação da lesão na mucosa gástrica.....	44
Figura 6 Terapêutica da úlcera péptica	47
Figura 7 Diferenças entre a Doença de Crohn e a Colite Ulcerativa	50
Figura 8 Patogênese das Doenças Inflamatórias Intestinais	52
Figura 9 Genes de susceptibilidade ao desenvolvimento de Doenças Inflamatórias Intestinais	53
Figura 10 Resposta imune inata no intestino.....	58
Figura 11 Resposta imune adaptativa no intestino.....	63
Figura 12 Citocinas na patogênese das DII.....	67
Figura 13 Marcha fitoquímica para obtenção do EEtOH e da FaHex obtidos das folhas de <i>Combretum duarteanum</i>	77
Figura 14 Fluxograma do protocolo experimental	80
Figura 15 Fotomicrografias de cortes histológicos estomacais corados com HE após animais serem submetidos à úlcera gástrica crônica induzida com ácido acético 100% e tratados durante 14 dias.	93
Figura 16 Fotomicrografia de amostras de estômagos dos ratos submetidos à úlcera por ácido acético após 14 dias de tratamento e coradas com ácido período de Schiff (PAS).	94
Figura 17 Estômagos de ratos em modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão dos grupos Normal (A), tween 80 12% (B) Rutina (C), EEtOH-Cd (D), FaHex-Cd (E).	96
Figura 18 Duodenos de ratos em modelo de indução de úlcera por cisteamina hidroclorídrica e tratados com Tween 80 12% (A), Lansoprazol 30 mg/kg (B), EEtOH-Cd 31,25 mg/kg (C), EEtOH-Cd 62,5 mg/kg (D), EEtOH-Cd 125 mg/kg (E), EEtOH-Cd 250 mg/kg (F), FaHex-Cd 31,25 (G), FaHex-Cd 62,5 (H), . FaHex-Cd 125 (I), FaHex-Cd 250 (J).....	98

Figura 19 Estômagos de ratos ulcerados por etanol absoluto ou etanol/indometacina tratados oralmente com Tween 80 12% (A) Misoprostol (B), EEtOH-Cd (C) ou FaHex-Cd (D), Tween 80 12%+Indometacina (E), Misoprostol+Indometacina (F), EEtOH-Cd+Indometacina (G), FaHex-Cd+Indometacina (H).....	99
Figura 20 Fotos de intestinos de ratos não-colíticos (A) Colíticos (B), EEtOH-Cd 31,25 mg/kg (C), EEtOH-Cd 62,5 mg/kg (D), EEtOH-Cd 125 mg/kg (E), EEtOH-Cd 250 mg/kg (F).....	105
Figura 21 Fotos de intestinos de ratos não-colíticos (A) Colíticos (B) FaHex-Cd 31,25 (C), FaHex-Cd 62,5 (D), FaHex-Cd 125 mg/kg (E), FaHex-Cd 250 mg/kg (F).	105
Figura 22 Fotos de intestinos de ratos não-colíticos (A) Colíticos (B), EEtOH-Cd 125 mg/kg (C), FaHex-Cd 62,5 mg/kg (D).....	107
Figura 23 Fotomicrografias de cortes histológicos do cólon corados com HE após animais serem submetidos ao modelo de retocolite ulcerativa com recidiva e tratados durante 21 dias. A- grupo não-colítico, B- grupo colítico, C -EEtOH-Cd 250 mg/kg, D- FaHex-Cd. aumento 40X (* células caliciformes; → região de ulceração; Barra: 50 µm).....	110
Figura 24 Fotomicrografia de amostras de cólon dos ratos submetidos ao modelo de retocolite ulcerativa com recidiva após 21 dias de tratamento. A- grupo não-colítico, B- grupo colítico, C- EEtOH-Cd 125 mg/kg, D-FaHex-Cd 62,5 mg/kg. Linha I-marcação imunohistoquímica para COX-2 ; Linha II- marcação imunohistoquímica para PCNA; Linha III marcação imunohistoquímica para SOD (→COX-2, PCNA e SOD, respectivamente; Barra: 50 µm).....	116

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Efeito da administração oral do EEtOH-Cd, FaHex-Cd ou misoprostol em úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com indometacina.....	99
Gráfico 2 Efeito da administração oral do veículo, rutina, EEtOH-Cd ou FaHex-Cd sobre os níveis da superóxido dismutase na mucosa gástrica de ratos sob isquemia e reperfusão.....	100
Gráfico 3 Efeito da administração oral do veículo, rutina, EEtOH-Cd ou FaHex-Cd sobre os níveis da superóxido dismutase na mucosa gástrica de ratos sob isquemia e reperfusão.....	101
Gráfico 4 Efeito da administração oral do veículo, rutina, EEtOH-Cd ou FaHex-Cd sobre os níveis de GSH na mucosa gástrica de ratos sob isquemia e reperfusão.....	102
Gráfico 5 Efeito da administração EEtOH-Cd e FaHex-Cd sobre os níveis de mieloperoxidase em ratos com colite experimental recidiva induzida por TNBS.....	111
Gráfico 6 Efeito da administração EEtOH-Cd e FaHex-Cd sobre os níveis de TNF- α em ratos com colite experimental recidiva induzida por TNBS.....	112
Gráfico 7 Efeito da administração EEtOH-Cd e FaHex-Cd sobre os níveis de IL-1 β em ratos com colite experimental recidiva induzida por TNBS.....	112
Gráfico 8 Efeito da administração EEtOH-Cd e FaHex-Cd sobre os níveis de IL-10 em ratos com colite experimental recidiva induzida por TNBS.....	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Características diferenciais entre Doença de Crohn e a Retocolite ulcerativa	51
Tabela 2 Critério de determinação de escore de lesão colônica.....	88
Tabela 3 Percentual de células totais em lesões ulcerativas induzidas por ácido acético em estômagos de ratos tratados com EEtOH-Cd e FaHex-Cd durante 14 dias	95
Tabela 4 Número de vasos sanguíneos em estômagos de ratos ulcerados com ácido acético e tratados com EEtOH-Cd ou FaHex-Cd durante 14 dias ...	95
Tabela 5 Efeitos da administração oral do EEtOH-Cd, FaHex-Cd e rutina nas lesões gástricas induzidas por isquemia e reperfusão em ratos.....	96
Tabela 6 Efeitos da administração oral do EEtOH-Cd, da FaHex-Cd e do lansoprazol nas lesões duodenais induzidas por cisteamina em ratos.....	97
Tabela 7 Efeitos da administração oral do EEtOH-Cd ou FaHex-Cd na fase aguda do processo inflamatório intestinal induzido por trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos	104
Tabela 8 Efeitos da administração oral de EEtOH-Cd e FaHex-Cd, na colite recidiva induzidas por TNBS em ratos.....	106
Tabela 9 Efeito da administração oral do EEtOH-Cd e da FaHex-Cd durante 21 dias sobre o consumo de água e ração dos ratos no modelo de colite ulcerativa com recidiva induzida por TNBS em ratos	108
Tabela 10 Efeito da administração oral do EEtOH-Cd e da FaHex-Cd durante 21 dias sobre o peso corporal dos ratos no modelo de colite ulcerativa com recidiva induzida por TNBS em ratos.....	109
Tabela 11 Efeito da administração oral do EEtOH-Cd e da FaHex-Cd durante 21 dias sobre o peso dos órgãos de ratos no modelo de colite ulcerativa com recidiva induzida por TNBS em ratos	109
Tabela 12 Efeito da administração oral do EEtOH-Cd e da FaHex-Cd durante 21 dias sobre a expressão da ciclo-oxigenase 2 (COX-2), antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e enzima superóxido dismutase (SOD) no modelo de colite ulcerativa com recidiva induzida por TNBS em ratos ...	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINE	Anti-inflamatório não esteroidal
ALU	Área de Lesão Ulcerativa
bFGF	Fator de crescimento fibroblástico básico
Ca²⁺	Íon cálcio
CAT	Catalase
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene de calcitonina
Cl⁻	Íon cloreto
COX	Enzima cicloxigenase
EEtOH-Cd	Extrato etanólico bruto de <i>Combretum duarteanum</i>
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGR-F	Receptor do fator de crescimento epidermal
FaHex-Cd	Fase hexânica de <i>Combretum duarteanum</i>
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FGH	Fator de crescimento hepático
GCs	Ciclase guanilil solúvel
GPx	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa
GSH-Rd	Glutationa redutase
GSSG	Glutationa oxidada
H⁺	Próton
H⁺,K⁺-ATPase	Bomba de prótons
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HCO₃⁻	Íon bicarbonato

HIF	Fator induzido por hipóxia
i.p.	Intraperitoneal
IGF	Fator de crescimento ligado a insulina
IL-1β	Interleucina 1 beta
iNOS	Sintase do óxido nítrico induzida
K⁺	Íon potássio
LFTGI	Laboratório de Farmacologia do Trato Gastrintestinal
MDA	Malondialdeído
MMPs	Metaloproteinases
MPO	Mieloperoxidase
NADP⁺	Fosfato de dinucleotídeo adenina nicotinamida
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídio-fosfato-hidrogênio
nNOS	Sintase do óxido nítrico neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintase do óxido nítrico
O₂⁻	Ânion superóxido
-OH	Radical hidroxil
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PGE₂	Prostaglandina da série E
PGI₂	Prostaciclina 2
PGs	Prostaglandinas
PgPNSB	Programa de pós-graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos
pH	Potencial hidrogeniônico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SHs	Grupamentos sulfidrilas
SOD	Superóxido dismutase
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

TrX	Tiorredoxina
Trx S-S	Tiorredoxina oxidada
TrXR	Tiorredoxina redutase
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
v.o.	Via oral
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

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

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	25
2.1	Produtos Naturais.....	25
2.2	Plantas medicinais	26
2.2.1	Família Combretaceae	28
2.2.2	<i>Combretum duarteanum</i> Cambess.....	30
2.3	Úlcera péptica	32
2.3.1	Fisiopatologia da úlcera péptica	32
2.3.1.1	Etiologia.....	32
2.3.2	Úlcera duodenal.....	37
2.3.3	Estresse oxidativo e a formação da úlcera péptica.....	38
2.3.4	Cicatrização da úlcera péptica.....	42
2.3.5	Epidemiologia da úlcera péptica	46
2.3.6	Terapêutica da úlcera péptica.....	47
2.4	Doenças Inflamatórias Intestinais	49
2.4.1	Fisiopatologia das doenças inflamatórias intestinais	49
2.4.1.1	Etiologia.....	49
2.4.1.2	Fatores Genéticos	52
2.4.1.3	Fatores ambientais	54
2.4.1.4	Fatores imunológicos	56
2.4.2	Respostas imunes nas Doenças Inflamatórias Intestinais	57
2.4.2.1	Imunidade inata na DII	57
2.4.2.2	Imunidade adaptativa nas DII.....	62
2.4.3	Citocinas na patogênese das DII	65
2.4.4	Cicloxygenase-2 (COX-2) e inflamação.....	68
2.4.5	Epidemiologia	69
2.4.6	Terapêutica das DII	70
3	OBJETIVOS.....	74
3.1	Objetivo Geral	74
3.2	Objetivos Específicos	74
4	MATERIAL E MÉTODOS	76
4.1	Material	76

4.1.1	Local da pesquisa	76
4.1.2	Material botânico	76
4.1.3	Obtenção do extrato etanólico bruto e da fase hexânica de <i>Combretum duarteanum</i> Cambess	77
4.1.4	Animais	78
4.1.5	Substâncias utilizadas	79
4.2	Métodos	79
4.2.1	Avaliação da atividade cicatrizante do EEtOH-Cd e FaHex-Cd em modelo de indução aguda de úlcera por ácido acético	81
4.2.1.1	Análises morfológicas	81
4.2.1.1.1	Imunohistoquímica	82
4.2.2	Úlcera gástrica induzida por isquemia e reperfusão	83
4.2.3	Investigação do efeito do EEtOH-Cd e FaHex-Cd sobre às lesões duodenais induzidas por cisteamina em ratos	83
4.2.4	Mecanismos de ação envolvidos na gastroproteção	84
4.2.4.1	Avaliação do mecanismo citoprotetor	84
4.2.4.1.1	Síntese de prostaglandina na mucosa gástrica	84
4.2.4.2	Avaliação do mecanismo antioxidante	84
4.2.4.2.1	Quantificação das proteínas totais	84
4.2.4.2.2	Quantificação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)	85
4.2.4.2.3	Quantificação da catalase	85
4.2.4.2.4	Quantificação de grupamentos sulfidrila não protéicos (GSH)	85
4.2.5	Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal	86
4.2.5.1	Modelo de retocolite ulcerativa	86
4.2.5.1.1	Investigação do efeito de EEOH-Cd e FaHex-Cd na fase aguda do processo inflamatório intestinal induzido por trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos	86
4.2.5.1.2	Avaliação do efeito do EEOH-Cd e FaHex-Cd na recidiva do processo inflamatório intestinal induzido por trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos	87
4.2.5.1.3	Parâmetros avaliados na retocolite ulcerativa	88
4.2.5.2	Análise morfológica	88
4.2.5.3	Quantificação da atividade da mieloperoxidase (MPO)	89
4.2.5.4	Avaliação do envolvimento de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e anti-inflamatórias (IL-10)	89

4.2.5.5 Análise imunohistoquímica.....	90
4.3 Análise estatística	90
5 RESULTADOS	92
5.1 Avaliação da atividade cicatrizante do EEtOH-Cd e FaHex-Cd no modelo de indução de úlcera por ácido acético	92
5.1.1 Análise morfológica de cortes da área ulcerativa corados com hematoxilina e eosina (HE).....	92
5.1.2 Análise da secreção de muco pela coloração com ácido período de Schiff (PAS)	92
5.1.3 Percentual de células totais na lesão ulcerativa	95
5.1.4 Quantificação de vasos sanguíneos	95
5.2 Úlcera gástrica induzida por isquemia e reperfusão	96
5.3 Investigação do efeito de EEtOH-Cd e FaHex-Cd sobre às lesões duodenais induzidas por cisteamina em ratos	97
5.4 Mecanismos de ação envolvidos na gastroproteção.....	98
5.4.1 Avaliação do mecanismo citoprotetor	98
5.4.1.1 Síntese de prostaglandina na mucosa gástrica.....	98
5.4.2 Avaliação dos mecanismos antioxidantes	100
5.4.2.1 Quantificação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)	100
5.4.2.2 Quantificação da Catalase	100
5.4.2.3 Quantificação dos grupamentos sulfidrilas não-proteicos (GSH)	
101	
5.5 Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal.....	102
5.5.1 Modelo de retocolite ulcerativa	102
5.5.1.1 Investigação do efeito do EEOH-Cd e FaHex-Cd na fase aguda do processo inflamatório intestinal induzido por trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos.....	102
5.5.2 Avaliação do efeito do EEOH-Cd e FaHex-Cd na fase crônica com recidiva do processo inflamatório intestinal induzido por trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em rato.....	106
5.5.2.1 Avaliação do consumo de água e ração.....	107
5.5.2.2 Avaliação ponderal	108
5.5.2.3 Avaliação do peso dos órgãos	109
5.5.2.4 Análise morfológica de cortes do cólon corados com hematoxilina e eosina (HE)	110
5.5.2.5 Quantificação da atividade da mieloperoxidase (MPO).....	111

5.5.2.6 Avaliação das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e anti-inflamatória (IL-10)	111
5.5.2.6.1 Determinação do nível tecidual de TNF- α	111
5.5.2.6.2 Determinação do nível tecidual de IL-1 β	112
5.5.2.6.3 Determinação do nível tecidual de IL-10	113
5.5.2.6.4 Análise imunohistoquímica da expressão da COX-2	113
5.5.2.6.5 Quantificação de células positivas para PCNA	113
5.5.2.6.6 Avaliação imunohistoquímica da expressão da enzima superóxido dismutase (SOD)	114
6 DISCUSSÃO.....	118
7 CONCLUSÕES.....	140
REFERÊNCIAS.....	142
APÊNDICE	173
APÊNDICE A- Artigo publicado na revista International Journal of Molecular Science	174
APÊNDICE B- Artigo publicado na revista International Journal of Molecular Science	175
APÊNDICE C- Artigo publicado na revista Journal of Natural Medicines	176
APÊNDICE D- Artigo publicado na revista Molecules Journal.....	177
APÊNDICE E- Artigo publicado na revista International Journal Molecular Science	178
APÊNDICE F- Artigo publicado na revista Records Natural Products.....	179
APÊNDICE G- Artigo publicado na revista Pharmacy and Pharmacology.	180
APÊNDICE H- Artigo publicado na revista Journal of Ethnopharmacology.	181
ANEXO	182
ANEXO A- Certidão de aprovação do projeto pelo comitê de ética em pesquisa animal (LTF/UFPB)	183

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

É crescente a demanda por produtos naturais, em todo o mundo, especialmente devido aos problemas que são atribuídos aos produtos sintéticos tanto para a saúde humana quanto para o meio ambiente (BANDONI; CZEPAK, 2008). A diversidade de estruturas e sua capacidade de apresentarem atividades biológicas específicas e seletivas justificam a relevância do uso de produtos naturais para a terapêutica (CORDELL; COLVARD, 2012; CRAGG; NEWMAN, 2013). Os produtos naturais fornecem modelos para modificações estruturais e otimização das propriedades farmacológicas e bioquímicas além de possibilitar a construção sintética de novas arquiteturas moleculares naturais (BRAZ-FILHO, 2010).

O crescimento exponencial do uso de terapias naturais, em especial de plantas medicinais no tratamento de doenças agudas e crônicas, tem ocorrido de forma paralela ao progresso científico e tecnológico da medicina moderna ocidental, despertando assim interesse de usuários, pesquisadores, profissionais e gestores de serviços de saúde (SPADACIO et al., 2010).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), entre 65-80% da população de países em desenvolvimento, devido à pobreza ou ao difícil acesso à medicina moderna, dependem essencialmente de plantas para os primeiros cuidados em saúde (CALIXTO, 2005). Mesmo fazendo parte de um contexto cultural em que existe uma ampla aceitação do uso de plantas medicinais em práticas populares, apenas 10% das plantas existentes no Brasil apresentam estudos científicos comprovados (VEIGA JUNIOR; MELLO, 2008).

Contudo, se faz necessário avançar nas pesquisas para validação da eficácia, segurança e qualidade de espécies vegetais utilizadas em inúmeras afecções, em especial as que acometem o trato gastrintestinal (TGI).

Entre as doenças que acometem o trato gastrintestinal as úlceras pépticas e as doenças inflamatórias intestinais (DII), são exemplos de agravos à saúde.

A úlcera péptica, termo utilizado para se referir à úlcera gástrica e duodenal, afeta um número considerável de pessoas no mundo. Essa doença se desenvolve a partir do desequilíbrio entre os fatores agressores (aumento da secreção ácido-péptica, anti-inflamatórios não esteroidais, isquemia, hipóxia, tabagismo, álcool e a infecção pelo *H. pylori*) e protetores da mucosa gástrica (muco, bicarbonato, fluxo sanguíneo, prostaglandina e fatores de crescimento) (HAROLD; GRANT; MITCHEL, 2007). Pessoas acometidas por essa enfermidade apresentam sintomas comuns que incluem sensação de plenitude, dor, desconforto abdominais e vômitos (MALAGELADA; KUIPERS; BLASER, 2007).

As doenças inflamatórias intestinais são desordens inflamatórias crônicas e podem se apresentar em dois tipos principais, a doença de Crohn (DC) e retocolite ulcerativa (RCU). Esta última afeta a mucosa colônica, podendo acometer toda a extensão do cólon ou ocorrer de uma forma restrita no reto (DIPIRO et al., 2002).

A causa dessa doença ainda não está totalmente esclarecida, mas fatores genéticos, agentes imunológicos e ambientais (infecções, tabagismo, medicações) são postulados como possíveis agentes etiológicos (BERARDI, 2000). Pacientes com RCU apresentam sintomas como diarreia sanguinolenta, secreção mucosa e purulenta e cólicas abdominais durante os movimentos intestinais (BAUMGART; SANDBORN, 2007).

A terapêutica da úlcera péptica é baseada na inibição da secreção ácida gástrica ou no reforço dos fatores de proteção da mucosa. Portanto, classes de agentes farmacológicos como anti-histamínicos para receptores H₂, inibidores da bomba de prótons e fármacos antimuscarínicos são utilizados no intuito de inibir a secreção ácida. Além disso, podem-se citar os sais de bismuto e sucralfato como parte da terapia ácido independente (BIGHETTI et al., 2005). Para as doenças inflamatórias intestinais o tratamento convencional está voltado para redução da inflamação anormal e consequente alívio dos sintomas. Pacientes com colite ulcerativa são tratados com aminossilicílicos, corticosteroides e drogas imunomoduladoras (AWAAD; EL-MELIGY; SOLIMAN, 2013).

Ainda não existe uma terapia totalmente eficaz para a cura das doenças que afetam o trato gastrintestinal. Além disso, os fármacos comumente utilizados na terapêutica atual são responsáveis por desencadear um amplo

espectro de efeitos colaterais (BANDYOPADHYAY; CHATTOPADHYAY, 2006; RANG et al., 2012).

Os produtos naturais estão em contínua expansão em todo o mundo e tornaram-se a fonte mais atraente de novos medicamentos para o tratamento e prevenção de muitas doenças. Uma grande variedade de fitoterápicos tem demonstrado produzir resultados promissores no tratamento da úlcera péptica e doenças inflamatórias intestinais (AWAAD; EL-MELIGY; SOLIMAN, 2013).

De acordo com os estudos realizados por De Moraes Lima (2011) com o extrato etanólico bruto (EEtOH-Cd) e a fase hexânica (FaHex-Cd) da *Combretum duarteanum* foi possível observar que esta espécie apresentou uma baixa toxicidade e um efeito gastroprotetor frente aos diferentes modelos de indução aguda de úlcera gástrica (etanol acidificado, etanol absoluto, estresse, anti-inflamatórios não esteroidais e ligadura do piloro). Além disso, foi observado que após o tratamento crônico dos animais (ratos) com as amostras vegetais ocorreu uma redução da área de lesão ulcerativa no modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético e a proteção gástrica foi atribuída a participação da via do óxido nítrico e dos grupamentos sulfidrilas.

Considerando os resultados iniciais sobre a *C. duarteanum* propomos dar continuidade aos estudos da planta objetivando elucidar os mecanismos de ação envolvidos na atividade antiulcerogênica, avaliar o efeito anti-inflamatório intestinal em modelo agudo e com recidiva da retocolite ulcerativa. Dessa forma, buscou-se contribuir para o uso seguro de plantas medicinais, colaborando com o conhecimento científico e validação dos produtos naturais com atividade farmacológica sobre o trato gastrintestinal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Produtos Naturais

Os produtos naturais (derivados de plantas, animais e micro-organismos) têm sido utilizados com fins medicinais pela humanidade há milhares de anos (BAKER et al., 2007).

Antes do desenvolvimento dos medicamentos sintéticos, 80% dos medicamentos disponíveis no mercado eram obtidos de folhas, cascas e raízes de plantas (MCCHESNEY; VENKATARAMAN; HENRI, 2007).

O desenvolvimento tecnológico impulsionado pela segunda guerra mundial alavancou principalmente a indústria farmacêutica, que investiu no planejamento de novos fármacos. Isso gerou a confiança de que todos os males da sociedade seriam combatidos pela possibilidade de descoberta de novas moléculas ativas (VIEGAS; DA SILVA BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Pesquisas envolvendo o desenvolvimento de fitofármacos passaram a ser guiadas ou inovadas pelos estudos de relação estrutura-atividade, química combinatória, desenvolvimento de fármacos *in silico*, dentre outras técnicas (SCHMIDT et al., 2008). Entretanto, segundo dados divulgados pela indústria farmacêutica em 2004, o investimento na química computacional não correspondeu ao lançamento de fármacos inovadores. Além disso, os custos desses fármacos ou medicamentos não as tornaram acessíveis pela maioria da população (VIEGAS; DA SILVA BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Quando se trata de fontes de novos fármacos, os produtos naturais se destacam por serem fontes de substâncias potencialmente aplicáveis com propriedades terapêutica, biológicas ou como ferramenta farmacológica (KINGSTON, 2011).

Para a indústria farmacêutica, a importância da utilização de moléculas de origem vegetal é refletida no percentual de produção de medicamentos. A cocaína, codeína, digoxina, quinina e morfina resultaram do isolamento de substâncias a partir de plantas superiores (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000; BUTLER, 2004). É estimado que entre 25% a 50% dos medicamentos atualmente comercializados devem suas origens aos produtos naturais (CALIXTO, 2005; FOGLIO et al., 2006; KINGSTON, 2011).

Entre 1981 e 2002, 28% das novas entidades químicas foram obtidas de produtos naturais ou de derivados e outros 24% criados a partir de um grupo farmacóforo obtido de um produto natural (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000). Entre 2001 e 2005, foram introduzidas 23 novas drogas, derivadas de produtos naturais, para o tratamento de infecções, câncer, diabetes, dislipidemia, dermatite atópica, doença de Alzheimer e doenças genéticas (LAM, 2007).

Os produtos naturais também são importantes para identificação de novos receptores na investigação de funções fisiopatológicas e de sítios de ação de fármacos. A nicotina, fisostigmina, muscarina, pilocarpina e atropina são utilizadas nos estudos de receptores nicotínicos e muscarínicos (SIMMONDS, 2003; KATIYAR et al., 2012).

Nesse contexto, os produtos naturais, em especial as plantas medicinais, ressurgiram como promissora fonte para descoberta de novos fármacos, além de estimular a produção de medicamentos fitoterápicos, respaldados pelas pesquisas científicas, que buscam a validação dos efeitos observados empiricamente pela população (BALUNAS; KINGHORN, 2005; SIXEL; PECINALLI, 2005; SCHMIDT et al., 2008; BRAZ FILHO, 2010).

2.2 Plantas medicinais

As plantas medicinais foram utilizadas, ao longo da história, devido ao seu caráter alimentar, como também devido às suas propriedades curativas ou ritualísticas (SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010).

Fatores como facilidade da coleta, condições ambientais favoráveis para sustentabilidade, o amplo espectro de substâncias orgânicas naturais e a possibilidade da descoberta de novos princípios ativos permitem as plantas brasileiras serem consideradas como importantes fontes renováveis para o surgimento e desenvolvimento de novos fármacos (BRAZ-FILHO, 2010).

Devido a suas riquezas naturais (aproximadamente 20% do número total de espécies catalogadas do planeta), o Brasil destaca-se pelo grande potencial para produção de fitomedicamentos. Em países desenvolvidos, como o Reino Unido, cerca de 50% da população fez uso de plantas medicinais pelo menos uma vez na vida e quase 100% dos pacientes com HIV no país usaram plantas medicinais (CAMILA HOMAR, 2005).

Em países em desenvolvimento, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que 65-80% utilizam plantas como fonte primária de tratamento e esses dados corroboraram as estimativas feitas para o Brasil em que 65% da população não tem acesso aos serviços de saúde pública (TROJAN-RODRIGUES et al., 2012).

A fitoterapia vem se destacando visivelmente na prática médica. As agências reguladoras tornaram-se mais exigentes quanto à segurança, eficácia e qualidade tornando necessário que a inserção de fitoterápicos no mercado esteja vinculada aos estudos científicos, para que a população tenha acesso a uma terapia de qualidade e custo financeiro acessível (PUPO; GALLO; VIEIRA, 2007).

Em janeiro de 2009, foi publicada a Relação Nacional de Plantas Medicinais (RENISUS) de interesse para o Sistema Único de Saúde (SUS), em que estão listadas plantas que apresentam potencial para gerar produtos de interesse para o SUS. Posteriormente, uma série de plantas poderá ser incluída na RENISUS, a partir do relato de uso frequente na medicina popular. Isto torna necessário que as pesquisas investiguem as propriedades farmacológicas dessas plantas, validando seu uso e tornando possível sua indicação para o uso na rede pública de saúde (BRASIL, 2009).

Extratos ou compostos isolados de plantas são muito utilizados por pesquisadores em seus trabalhos, no intuito de investigar seus efeitos sobre diversas afecções em especial as que acometem o trato gastrintestinal (AWAAD; EL-MELIGY; SOLIMAN, 2013).

Diferentes tipos de constituintes fitoquímicos são responsáveis pela a atividade gastroprotetora tais como terpenos, flavonoides, alcaloides, saponinas, compostos fenólicos entre outros (AWAAD; EL-MELIGY; SOLIMAN, 2013). Espécies pertencentes a família Combretaceae e Eriocaulaceae podem ser destacadas, tais como: *Terminalia chebula* (MISHRA et al., 2013), *Terminalia belerica* (JAWANJAL et al., 2012), *Combretum leprosum* (NUNES et al., 2009), *Pteleopsis suberosa* (GERMANÒ et al., 2008), *Anogeissus latifolia* (GOVINDARAJAN et al., 2006), *Guiera senegalensis* (ANIAGU et al., 2005), *Syngonanthus arthrotrichus* (BATISTA et al., 2004), *Syngonanthus macrolepsis* (BATISTA et al., 2013), *Syngonanthus bisulcatus* (BATISTA et al., 2013).

Trabalhos recentes publicados por nosso grupo de pesquisa tem demonstrado o efeito gastroprotetor e antiulcerogênico de espécies vegetais

coletadas no nordeste brasileiro, entre as quais podemos destacar: *Praxelis clematidea* (FALCÃO et al., 2013), *Herissantia crispa* (LIMA, 2008), *Maytenus rígida*, que é referência como atividade gastroprotetora, inclusive como medicamento do Sistema Único de Saúde (SUS) (SANTOS, 2008), *M. obtusifolia* (MOTA, 2009), *Combretum duarteanum* (DE MORAIS LIMA et al., 2013), *Xylopia Langsdorffiana* (MONTENEGRO, 2011), *Hyptis suaveolens* (JESUS et al., 2013) e *Maytenus distichophylla* (CALDAS FILHO, 2013). Essas espécies promovem seus efeitos gastroprotetores por meio de mecanismos de ação antioxidantes, anti-secretórios, citoprotetores e anti-inflamatórios.

Trabalhar com plantas medicinais significa estar envolvido por uma vasta área de conhecimentos em que é necessário obter informações da botânica, química, farmacologia e toxicologia. É relevante a integração do conhecimento, pois todas essas áreas juntas contribuem para o melhor entendimento dos efeitos farmacológicos promovidos pelas diferentes amostras vegetais (RATES, 2001).

2.2.1 Família Combretaceae

Combretaceae é uma grande família de ervas, arbustos e árvores distribuída em aproximadamente 20 gêneros e 600 espécies. Os maiores gêneros desta família são *Combretum* e *Terminalia* com 370 e 200 espécies, respectivamente (PIETROVSKI et al., 2006). Os outros gêneros que podem ser destacados são: *Anogeissus*, *Buchenavia*, *Bucida*, *Calopyxis*, *Calycopteris*, *Conocarpus*, *Dansiea*, *Guiera*, *Laguncularia*, *Lumnitzera*, *Macropteranthes*, *Melostemon*, *Pteleopsis*, *Quisqualis*, *Strephonema*, *Terminaliopsis* e *Thilo* (KLOPPER et al., 2006).

Espécies dessa família ocorrem em ambientes quentes de todos os continentes, com centros de diversidade na África e Ásia (STACE, 2004; LOIOLA et al., 2009). Foi estimada a ocorrência de 78 espécies subordinadas a seis gêneros no Brasil (SILVA; VALENTE, 2005).

Em levantamento realizado para espécies de Combretaceae no estado da Paraíba foi mostrado o registro de 11 espécies distribuídas em diferentes biomas como manguezais, caatinga e floresta atlântica. É possível destacar as espécies *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard, *C. fruticosum* (Loefl.) Stuntz, *C. glaucocarpum* Mart., *C. hilarianum* D. Dietr., *C. lanceolatum* Eichler,

C. laxum Jacq., *C. leprosum* Mart., *C. pisonioides* Taub., *Conocarpus erectus* L., *Laguncularia racemosa* (L.) C. F. Gaertn. e *Combretum duarteanum* Cambess., que é objeto do presente estudo (LOIOLA et al., 2009).

Estudos fitoquímicos realizados com espécies de *Combretum* tem demonstrado a ocorrência de muitas classes de metabólitos secundários incluindo triterpenos, flavonoides, lignanas, aminoácidos não protéicos dentre outras (PIETROVSKI et al., 2006).

Desde a década de 1970 vários compostos foram isolados a partir do gênero *Combretum* a exemplo dos dihidrofenantrenos e do bisbenzil substituído isolados de *C. molle* (ROGERS; VERTOTTA, 1996); Bisoli et al. (2008) obteve 11 triterpenos e seus glicosídeos de *C. laxum*, entre eles os do tipo oleanano, ursano e lupano, tais como: ácido arjunólico, arjunglicosídeo II, chebulosídeo II, quadranosídeo IV, ácido asiático e ácido betulínico; o terpeno Fridelina foi isolada de *Combretum duarteanum* (QUINTANS et al., 2014), alcaloides (combretina e betonicina) foram obtidos das folhas de *C. micranthum* (OGAN, 1972).

Alguns flavonoides como ramnacitrina, quercetina, ramnazina e canferol foram isoladas de *C. erythrophyllum* (MARTINI; KATERERE; ELOFF, 2004), assim como quercetina, canferol e pinocembrina (flavanona) de *C. apiculatum*. A cardamonina (chalcona) foi isolada de *C. apiculatum* (ADEROGBA et al., 2012) e derivados do ácido elágico de *C. kraussii* (CHAABI et al., 2008). Combretastatinas (estilbenoide) já foram obtidas de várias espécies de *Combretum* (DE MORAIS LIMA et al., 2012).

Levantamentos etnofarmacológicos mostram que as espécies do gênero *Combretum* são utilizadas na medicina popular para o tratamento de distúrbios gastrintestinais (diarreia, disenteria, úlcera gástrica), doenças cardiovasculares (hipertensão), infecções bacterianas, hemorragias, doenças dermatológicas, pneumonia, sífilis, dentre outras (BRAGA, 1960; OLIVER-BEVER, 1986; AGRA, 1995; HUTCHINGS et al., 1996; NEUWINGER, 1996; FYHRQUIST et al., 2002).

Estudos mostram a utilização de *Combretum leprosum* em populações da região da caatinga no interior do estado da Paraíba para o tratamento de azia, bronquite, difteria e gripe (MARINHO; SILVA; ANDRADE, 2011).

Um levantamento da literatura realizado por De Moraes Lima et al (2012) listou 36 diferentes espécies que possuíam amplo espectro de atividades

biológicas obtidas a partir de extratos ou princípios ativos isolados de espécies de *Combretum*. Entre os efeitos farmacológicos citados pode-se destacar o gastroprotetor (DE MORAIS LIMA et al., 2013), imunomodulador (SCHEPETKIN et al., 2013), antioxidante (TOURÉ et al., 2011; ADEROGBA et al., 2012; NSUADI MANGA et al., 2012), antiproliferativo, anti-inflamatório (HORINOUCHI et al., 2013), antinociceptivo (QUINTANS et al., 2014), anti-helmíntico (SIMON et al., 2012), antidiabéticos (CHIKA; BELLO, 2010), anticancerígeno (VIAU et al., 2014), citotóxico (MOOSOPHON et al., 2013), antifúngico (OKWUOSA et al., 2012), antibacteriano (NJUME et al., 2011; REGASSA; ARAYA, 2012), anti-HIV (MUSHI et al., 2012), dentre outros.

As espécies *Combretum dolichopetalum* (ASUZU; ADIMORAH, 1998) e *Combretum leprosum* (NUNES et al., 2009) apresentaram atividades gastroprotetora frente aos modelos de indução aguda de úlcera gástrica (etanol absoluto e AINEs), assim como, aqueles que avaliam mecanismos antissecrétórios e citoprotetores (ligadura de piloro e muco).

2.2.2 *Combretum duarteanum* Cambess

Combretum duarteanum Cambess, espécie selecionada para este estudo, é conhecida popularmente como mufumbo, cipiúba, cipaúba, caatinga-branca ou vaqueta. Trata-se de uma espécie arbustiva exclusiva da América do Sul com registro na Bolívia, Paraguai e Brasil. No Brasil ocorre nas regiões norte e nordeste estando associada ao bioma caatinga (GOUVEIA et al., 2011; DE MORAIS LIMA et al., 2013)

Na medicina popular é utilizada para o tratamento de dores, inflamações e desordens do trato gastrintestinal o que justifica a escolha dessa espécie para realização do trabalho utilizando as indicações etnofarmacológicas como critério de escolha. Estudos fitoquímicos realizados apontam a presença de triterpenos e flavonoides, a quem são atribuídos os efeitos farmacológicos (DE MORAIS LIMA et al., 2013; QUINTANS et al., 2014).

Combretum duarteanum apresentou atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante em estudos *in vitro* e *in vivo* (GOUVEIA et al., 2011). Estudos realizados por De Morais Lima et al (2011) demonstraram forte atividade gastroprotetora e antiulcerogênica frente aos diferentes modelos de indução aguda de úlcera (etanol acidificado, etanol, AINES, estresse, ligadura

de piloro, ácido acético). Mais recentemente foi demonstrada a atividade anti-nociceptiva orofacial promovida pela fase hexânica e o terpeno fridelina, isolados da espécie em estudo (QUINTANS et al., 2014).

Diante dessas considerações e da necessidade de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da úlcera péptica e inflamações intestinais, o presente estudo é de grande relevância, uma vez que busca comprovar a atividade antiulcerogênica, esclarecendo os mecanismos de ação envolvidos, e a atividade anti-inflamatória intestinal promovida pela espécie *Combretum duarteanum*, validando o seu uso popular e contribuindo na busca de modalidades terapêuticas para doenças que acometem o trato gastrintestinal.

Figura 1 Fotos de *Combretum duarteanum* Cambess



Foto: Josean Fechine Tavares, 2010

2.3 Úlcera péptica

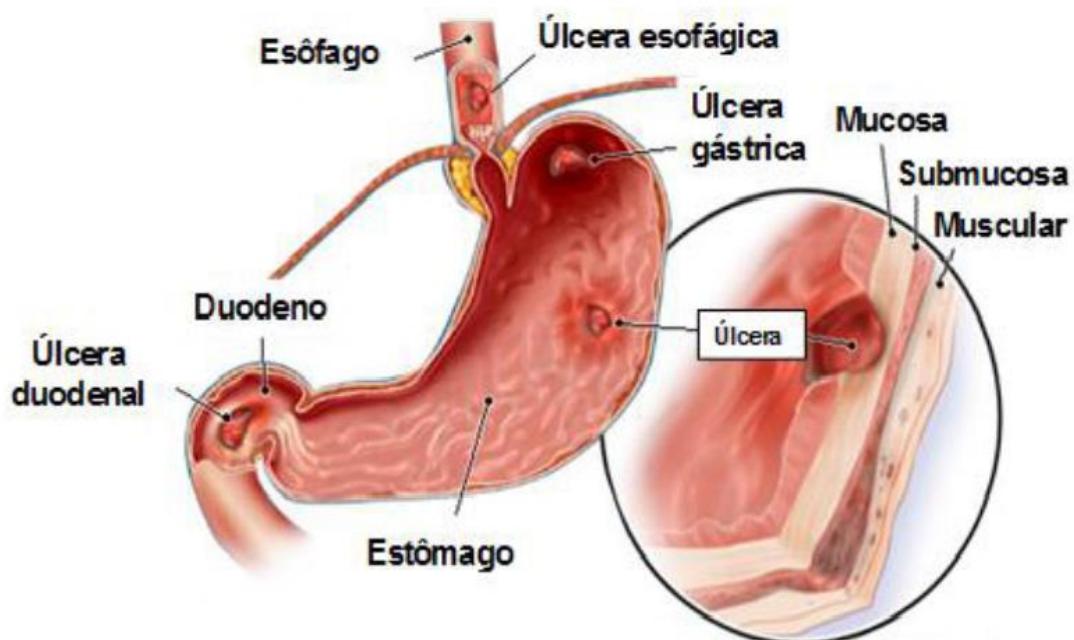
2.3.1 Fisiopatologia da úlcera péptica

2.3.1.1 Etiologia

As úlceras esofágicas, gástricas e duodenais são as mais comuns das doenças ulcerativas, caracterizadas pela ocorrência de lesões na mucosa do esôfago, estômago e duodeno respectivamente. Apresentam alto índice de mortalidade e morbidade, sendo alvo para diversas estratégias terapêuticas (BARKUN; LEONTIADIS, 2010; PRABHU; SHIVANI, 2014).

De uma forma geral, estas afecções são caracterizadas por alterações fisiológicas como inflamações graves, pontos hemorrágicos e lesões necrotizantes (CALAM; BARON, 2001). As lesões ulcerativas podem acometer a camada mucosa, submucosa e alcançar a muscular da mucosa da parede do trato gastrintestinal (TARNAWSKI, 2005; BARKUN; LEONTIADIS, 2010; URS; NARULA; THOMSON, 2014) (Figura 2).

Figura 2 Úlcera péptica e acometimento tecidual por lesões



Fonte : Modificado de <http://hopkinsgi.nts.jhu.edu/imagens>

Os sintomas típicos da úlcera gástrica (80% -90% dos pacientes) incluem dor epigástrica, náuseas, vômitos, sensação de plenitude e refluxo

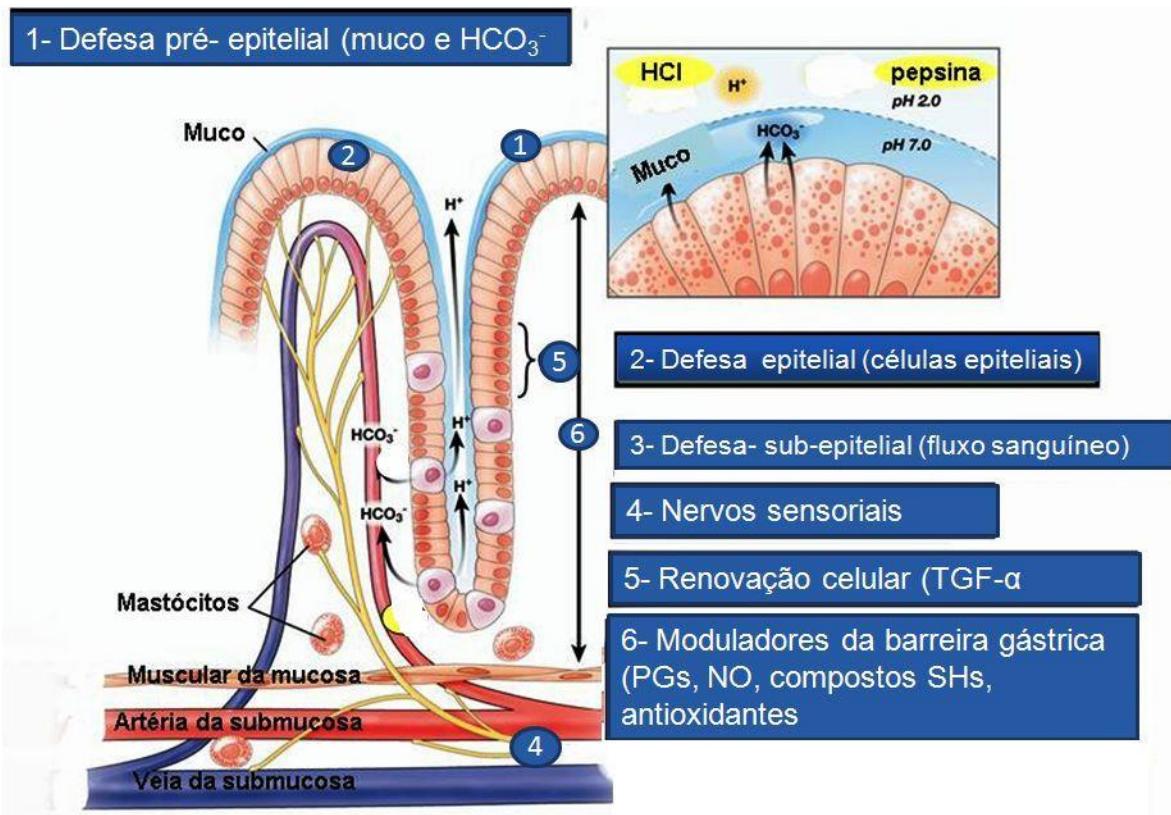
gástrico. A dor muitas vezes é localizada e ocorre quando o estômago está vazio, 2-5 horas após as refeições, ou à noite (BARKUN; LEONTIADIS, 2010).

Pessoas acometidas pela úlcera duodenal relatam dores epigástricas que são aliviadas por meio da ingestão de alimentos ou medicamentos antiácidos. A dispepsia está presente em um terço dos pacientes que em sua maioria não apresentam esofagite erosiva (RAMAKRISHNAN; SALINAS, 2007; MALFERTHEINER; CHAN; MCCOLL, 2009).

A dor é descrita em três tempos (doi-come-passa), para úlcera duodenal ou em quatro tempos (bem-come-dói-passa) para úlcera gástrica. O aparecimento de dor durante a madrugada, fazendo com que o paciente acorde e obtenha alívio com a ingestão de leite, alimentos ou antiácidos é sugestivo de úlcera duodenal. Períodos de acalmia ou assintomáticos por meses ou mesmo anos, são intercalados por outros de atividade, são mais frequentes para úlcera duodenal que para gástrica. Pirose e azia são comuns nos pacientes com úlcera duodenal, em virtude da associação com doença por refluxo gastroesofágico (CHENTER; RODRIGUES JÚNIOR, 2002).

A fisiopatologia da úlcera péptica está relacionada ao desequilíbrio entre fatores agressores (aumento da secreção ácido-péptica, presença de *Helicobacter pylori*, refluxo biliar, liberação de leucotrienos e espécies reativas de oxigênio (EROs) e fatores protetores (secreção de bicarbonato, barreira de muco, fosfolipídeos de membrana, prostaglandinas, óxido nítrico, fluxo sanguíneo da mucosa, renovação e migração celular, sistema antioxidante enzimático, não enzimático e fatores de crescimento) da mucosa gástrica (BANDYOPADHYAY; CHATTOPADHYAY, 2006; BANDYOPADHYAY et al., 2001; LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008) (Figura 3).

Figura 3 Representação esquemática dos fatores agressores e mecanismos de defesa da mucosa gástrica



Fonte: (Adaptado de LAINÉ; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

As úlceras pépticas são causadas por múltiplos fatores, endógenos e exógenos, que se inter-relacionam. Entre os fatores predisponentes tem-se a ingestão excessiva de álcool, tabagismo, estresse produzido pelo dia-dia, condições socioeconômicas, deficiências nutricionais, fatores genéticos, doença de Behcet, Doença de Crohn, uso de medicamentos antiplaquetários, cirrose e traumas, infecções pelo citomegalovírus, *Helicobacter heilmanii*, *H. pylori* e uso contínuo de anti-inflamatórios não esteroidais, sendo estes dois últimos considerados como as principais causas de lesões ulcerativas (SAXENA; KRISHNAMURTHY; SINGH, 2011; NAJM, 2011; OVERMIER; MURISON, 2013; RICARDO et al., 2013; ASMARI et al., 2014).

O consumo excessivo de álcool tem sido relacionado ao desenvolvimento da úlcera péptica, bem como tem sido apontado como fator responsável pela mortalidade do indivíduo em decorrência dessa doença. Por outro lado, pesquisas apontam que a ingestão moderada de álcool tem tido pouca relação com o desenvolvimento da afecção. No entanto, estudos

epidemiológicos prospectivos continuam identificando o álcool como fator de risco (OVERMIER; MURISON, 2013).

O etanol é um dos agentes ulcerogênicos que induz dano intenso a mucosa gástrica por promover distúrbios na microcirculação, isquemia, produção de radicais livres, liberação de endotelina, degranulação de mastócitos, inibição de prostaglandina com decrescente produção de muco (PARK et al., 2004; ZHAO et al., 2009; ARAWWAWALA; ARAMBEWELA; RATNASOORIYA, 2014).

Os indivíduos quando submetidos a condições de estresse físicos (trauma, dor, etc) ou psicológicos (ansiedade, insegurança, mau relacionamento social) podem ser acometidos de processos ulcerativos (MINEKA; KIHLSTROM, 1978 apud KOOLHAAS et al., 2011). Estudos pré-clínicos e clínicos tem demonstrado que o estresse psicológico aumenta o risco de infecção e colonização pelo *H. pylori* no estômago (OVERMIER; MURISON, 2013). O estresse psicológico associado aos maus hábitos alimentares, ingestão de álcool, tabagismo e automedicação pode tornar a mucosa gástrica mais vulnerável a lesões e infecção pelo *H. pylori* (OVERMIER; MURISON, 2013).

Os fatores estressantes (ansiedade, insegurança, condições socioeconômicas, relações interpessoais, dentre outros) ativam o eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (eixo HPA) e a via simpaticomimética (BHATIA; TANDON, 2005) alterando a circulação na mucosa gástrica, a liberação de histamina pelos mastócitos estomacais, a produção de ácido, trânsito e motilidade estomacal afetando a integridade da mucosa gástrica (GUO et al., 2009).

As úlceras gástricas são mais frequentes em grupos de baixa condição socioeconômica. Em geral estão associadas a fatores relevantes como higiene (aumentando o índice de infecção por *H. pylori*), tabagismo, alcoolismo péssimas condições de trabalho e moradia, causando uma predisposição ao indivíduo (LEVENSTEIN, 1998; MCEWEN; LASLEY, 2003; OVERMIER; MURISON, 2013).

Pesquisas tem demonstrado que fumantes são mais susceptíveis ao desenvolvimento de úlceras pépticas. O hábito de fumar está associado à deficiência do fluxo sanguíneo da mucosa, aumento da secreção ácido-péptica, diminuição da produção de muco e bicarbonato e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. O tabagismo também aumenta o risco de

infecção pela bactéria *H. pylori* e aumenta o risco de ulceração associado ao álcool e analgésicos (PARASHER; EASTWOOD, 2000; MAITY et al., 2003; VERMA, 2010; OVERMIER; MURISON, 2013).

Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) estão entre os medicamentos mais prescritos no mundo, em função dos seus efeitos sobre processos inflamatórios e sobre a dor (LIM et al., 2014). Eles são considerados cofator predisponentes ao desenvolvimento de úlcera por estresse (OVERMIER; MURISON, 2013). Esses agentes farmacológicos podem causar efeitos nocivos ao trato gastrintestinal incluindo erosão, ulceração, hemorragias e perfuração. Esses medicamentos causam o desequilíbrio entre os fatores protetores e agressores da mucosa gástrica (OVERMIER; MURISON, 2013).

Muitos estudos têm investigado os mecanismos pelos quais os AINES causam lesões na mucosa gástrica. A depleção de prostaglandinas endógenas (PGE₂) ocasionada por inibição da via da cicloxygenase é conhecida por ser o principal elemento patogênico no desenvolvimento dessas lesões. Porém, existem outros mecanismos além da prostaglandina incluindo ativação de neutrófilos, hipermotilidade, geração de espécies reativas de oxigênio e liberação de citocinas pró-inflamatórias (LEONG, 2009).

Outro fator atribuído às causas da úlcera gastroduodenal é o *H. pylori*, que é uma bactéria gram-negativa encontrada no lúmen superficial gástrico. Essa bactéria induz inflamação crônica na mucosa. A infecção é contraída nos primeiros anos de vida via oral-oral e oral-fecal e persiste definitivamente, se não for tratada. A prevalência varia com a idade e outros fatores tais como a condição socioeconômica nos diferentes países (MARSHALL; WARREN, 1984; EVERHART, 2000 apud MALNICK et al., 2014).

Para que possa infectar e colonizar a mucosa gástrica (antro gástrico), a bactéria *H. pylori* dispõe de fatores de virulência. Na colonização gástrica pode-se citar como fatores importantes: os flagelos, a enzima urease e fatores de adesão que são codificados pelos genes BabA e BabB; por outro lado, existem os fatores relacionados a formação de lesões na mucosa como os produtos da urease, lipopolissacarídeos, quimiocinas, citotoxinas (CagA e VagA), proteínas pró-inflamatórias, proteínas do choque térmico ("heat shock protein" - HspA e HspB), proteases que hidrolisam proteínas do muco e produção de NO, todos contribuindo para o desenvolvimento de lesões nas células do hospedeiro (KONTUREK et al., 2006).

Essa bactéria se adapta ao ambiente hostil do estômago. A alta atividade da enzima urease produz amônia que é responsável por manter um microambiente neutro em sua volta. A bactéria *H. pylori* enfraquece a barreira de muco no estômago e duodeno, tornando-os sensíveis a ação do ácido estomacal. A presença tanto da bactéria quanto do ácido irrita a mucosa e leva a um processo de lesão ulcerativa (VERMA, 2010).

Vários mecanismos adicionais já foram caracterizados na tentativa de esclarecer as vias ulcerogênicas dessa bactéria. Dentre eles pode-se destacar o aumento na secreção de gastrina e consequentemente da secreção ácida, aumento da expressão e liberação de citocinas pró-inflamatórias a exemplo da interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 8 (IL-8) e fator de necrose tumoral α (TNF- α), alteração na atividade secretora das células mucosas (produtoras de muco/HCO₃⁻) e a qualidade de aderência da camada de muco, resultando em gastrites agudas que evoluem para a úlcera gástrica (VERMA, 2010).

2.3.2 Úlcera duodenal

A úlcera duodenal acomete aproximadamente 10% da população mundial sendo de duas ou quatro vezes mais prevalente do que úlcera gástrica (CHOI et al., 2012). A úlcera duodenal é mais presente em homens que mulheres em uma proporção de 4:1 sendo mais prevalente em jovens (JAIN et al., 2007; GROENEN et al., 2009). A sua patogênese está relacionada aos fatores agressores incluindo *Helicobacter pylori* e o excesso de ácido e pepsina culminando na perda da resistência da mucosa. Além disso, a produção deficiente de bicarbonato também desempenha papel fundamental na ulcerogênese duodenal (HOLLE, 2010).

Apesar de uma forte associação estabelecida entre úlceras duodenais e infecção pelo *Helicobacter pylori*, os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento dessas úlceras e na cura das mesmas permanecem pouco esclarecidos. Os modelos animais de investigação da úlcera duodenal tem fornecido informações importantes sobre o início da doença, eventos pré-ulcerogênicos, alterações celulares e bioquímicas (KHOMENKO et al., 2009).

O modelo mais utilizado para investigar a úlcera duodenal é o baseado na indução de úlcera por cisteamina, um composto aminotiol de baixo peso molecular (HS-CH₂-CH₂-NH₂, mercaptoetilamina) produto natural da coenzima

A, presente em organismos desde a Drosófila até os humanos. Essa substância produz úlceras perfurantes no duodeno proximal de rato dentro de 24-48 h (SZABO, 1978; KHOMENKO et al., 2009). Os mecanismos moleculares pelos quais a cisteamina induz as ulcerações não são totalmente compreendidos. Entretanto, estudos demonstraram que a cisteamina reduz a biodisponibilidade da somatostatina, o que eleva os níveis de gastrina, com subsequente aumento da secreção ácida, diminuindo significativamente a neutralização de ácido no duodeno proximal e inibe o esvaziamento e a motilidade gástrica (KHOMENKO et al., 2009).

2.3.3 Estresse oxidativo e a formação da úlcera péptica

Espécies reativas de oxigênio (ROS) também referidas como intermediários reativos de oxigênio (ROI), são subprodutos do metabolismo normal celular. Baixas e moderadas quantidades de ROS tem efeitos benéficos em vários processos biológicos incluindo a destruição de patógenos invasores, cicatrização de ferimentos e processo de reparação tecidual (BHATTACHARYYA et al., 2014). Entretanto, a geração desproporcional de ROS acarreta desequilíbrio e consequentemente sérios problemas a homeostase corporal o que leva a ocasionar danos oxidativos teciduais (BHATTACHARYYA et al., 2014).

As ROS são produzidas em resposta a radiação ultravioleta (UV), tabagismo, consumo de álcool, ingestão de AINES, infecções, injúrias por isquemia-reperfusão (I/R) e processos inflamatórios (VALKO et al., 2007; BHATTACHARYYA et al., 2014).

O TGI é uma importante fonte geradora de ROS. Apesar da existência de uma barreira de proteção fornecida pela camada epitelial, substâncias ingeridas e patógenos podem causar a inflamação no epitélio, ativando neutrófilos e macrófagos que infiltram na mucosa gerando grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio e citocinas inflamatórias que contribuem ainda mais para ocorrência do estresse oxidativo. Várias condições patológicas, incluindo as úlceras gastroduodenais, o câncer e as inflamações crônicas como as doenças inflamatórias intestinais surgem a partir da formação excessiva de ROS (BHATTACHARYYA et al., 2014).

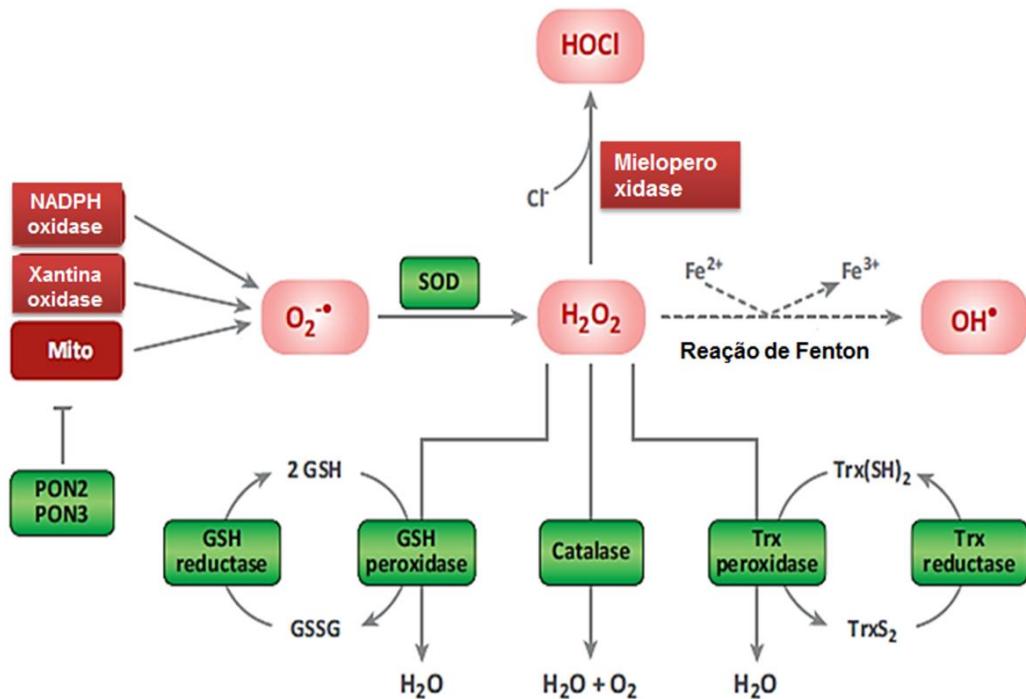
Todos os fatores ulcerogênicos levam a agregação neutrofílica e danos vasculares. Danos celulares e redução da angiogênese na mucosa gástrica afetam a proliferação celular e induz a ulceração. As ROS aumentam a peroxidação lipídica, baixam os níveis de GSH o que pode afetar todo sistema antioxidante para formação da lesão gástrica (DAS; BANERJEE, 1993; BHATTACHARYYA et al., 2014).

A úlcera gástrica induzida por etanol está associada ao aumento de O_2^- , assim como, na isquemia-reperfusão são produzidas grandes quantidades de O_2^- e H_2O_2 (BRIDGES; FU; REHM, 1985; MILLER, 1987; HERNÁNDEZ-MUÑOZ; MONTIEL-RUÍZ; VÁZQUEZ-MARTÍNEZ, 2000; MAITY et al., 2003 apud BHATTACHARYYA et al., 2014).

A exposição do organismo a fatores indutores de ROS pode ativar uma série de mecanismos de defesa. Os mecanismos protetores contra radicais livres envolvem mecanismos preventivos e de reparo, defesas físicas e antioxidantes. O sistema enzimático antioxidante inclui a superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx), glutationa redutase (GR) e catalase (CAT). A SOD e a CAT proporcionam a principal defesa antioxidante contra as ROS (CADENAS, 1997; VALKO et al., 2007) (Figura 4).

Os antioxidantes não enzimáticos são representados por ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), glutationa (GSH), carotenoides, flavonoides entre outros antioxidantes. Sob condições normais, existe um equilíbrio entre a atividade e os níveis intracelulares destes antioxidantes. Esse equilíbrio é crucial para sobrevivência de um organismo saudável (VALKO et al., 2007).

Figura 4 Enzimas envolvidas na geração e eliminação de ROS



Fonte: (Adaptado de LI; HORKE; FÖRSTERMANN, 2013)

As SOD são enzimas que requerem cofatores metálicos e catalisam a dismutação do O_2^\cdot em O_2 e H_2O_2 . São conhecidas três isoformas dessa enzima existentes em humanos (NOZIK-GRAYCK; SULIMAN; PIANTADOSI, 2005): a citosólica contendo cobre e zinco (Cu-Zn-SOD); a mitocondrial que requer manganês (Mn-SOD) e a extracelular (Cu-Zn-SOD). De acordo com a Figura 4, o O_2^\cdot formado na mitocôndria é dismutado em H_2O_2 pela Cu-Zn-SOD presente nos espaços intermembranares mitocondriais e pela Mn-SOD presente na matriz mitocondrial (OKADO-MATSUMOTO; FRIDOVICH, 2001). O H_2O_2 pode cruzar a membrana mitocondrial e ser eliminado pela catalase (POYTON; BALL; CASTELLO, 2009). Tecidos intestinais inflamados apresentam os níveis aumentados de todas essas isoformas, particularmente no epitélio (KRUIDENIER et al., 2003).

A catalase é uma heme enzima. Entretanto, a catalase com manganês é encontrada em procariócitos (ZÁMOCKÝ; KOLLER, 1999). Sua função antioxidativa está em dismutar H_2O_2 em H_2O e O_2 . Esta enzima é encontrada principalmente nos peroxissomos (SCHRADER; FAHIMI, 2006). Em humanos, todos os órgãos apresentam essa enzima (Figura 4). Alguns estudos afirmam

que a função da catalase não é detoxificar H_2O_2 , mas sim, proteger as células da apoptose (NENOI et al., 2001). Entender o verdadeiro papel da catalase ajudaria no desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes para doenças do TGI (BHATTACHARYYA et al., 2014).

As isoenzimas da GPx são encontradas nos compartimentos citoplasmáticos, mitocondriais e extracelulares. Essa enzima converte glutationa reduzida (GSH) em glutationa oxidada (GSSH) e durante esse processo reduz H_2O_2 em H_2O e hidroperóxidos lipídicos (ROOH) correspondente a álcoois estáveis. A reação da GPx é acoplada a glutationa redutase (GR) que mantém os níveis de GSH reduzidos (TOPPO et al., 2008) (Figura 4).

A glutationa é abundante no citosol, núcleo e mitocôndria sendo o principal antioxidante solúvel nesses compartimentos. O tripeptídeo glutationa reduzido (GSH) é o principal antioxidante tiol e tampão redox da célula (MASELLA et al., 2005).

As principais funções de proteção de glutationa contra o estresse oxidativo são: (I) a glutationa é um cofator para várias enzimas desintoxicantes contra o estresse oxidativo, por exemplo glutationa peroxidase (GPx), glutationa-transferase e outros; (II) a GSH participa do transporte de aminoácidos através da membrana; (III) por meio da ação catalítica da glutationa peroxidase o radical hidroxila é detoxificado; (IV) a glutationa é capaz de regenerar os mais importantes antioxidantes, vitaminas C e E, fato este relacionado com o estado redox da glutationa dissulfeto - glutationa conjugada (GSSG / 2GSH) (PASTORE et al., 2003; VALKO et al., 2007).

Pode-se citar também o sistema tiorredoxina que é formado pela tiorredoxina (TrX) e tiorredoxina redutase (TrXR). A TrX é uma oxirredutase contendo dissulfeto que modula a atividade redox de fatores transpcionais. Está presente no citoplasma, membranas, mitocôndrias e espaço extracelular (KOHÁRYOVÁ; KOLÁROVÁ, 2008). A TrX oxidada (TrX S-S) é reduzida por uma flavoenzima TrXR e NADPH a sua forma ativa ditiol que elimina ROS e ajuda a manter proteínas em seu estado reduzido (ARNÉR; HOLMGREN, 2000; LU; HOLMGREN, 2014).

2.3.4 Cicatrização da úlcera péptica

A cicatrização é uma resposta a uma lesão tecidual, aos processos inflamatórios nos órgãos internos ou a necrose celular em órgãos incapazes de regeneração. É um processo complexo e orquestrado para o preenchimento dos defeitos da mucosa, com células epiteliais e tecido conjuntivo, que envolve a migração celular, a proliferação, a re-epitelização, reconstrução glandular, angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes) e deposição de matriz. Todos estes processos são controlados por fatores de crescimento, citocinas, hormônios e fatores de transcrição que atuam via autócrina e parácrina (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; TARNAWSKI; AHLUWALIA; K. JONES, 2012).

A estrutura da úlcera gástrica consiste de uma margem a qual é formada por tecido epitelial (mucosa não necrótica adjacente) e tecido de granulação formado por tecido conjuntivo (KANGWAN et al., 2014), conforme visualizado na Figura 5.

No processo de cicatrização gástrica, as células epiteliais proliferam e migram a partir da margem para o tecido de granulação provocando a re-epitelização da base da úlcera (Figura 5). Este processo é essencial na formação de uma barreira epitelial contínua, que protege o tecido de granulação de lesões provocadas por agentes químicos, físicos ou de infecções. Além disso, células epiteliais pertencentes à base da margem da úlcera formam tubos que invadem o tecido de granulação, proliferam e migram em direção à superfície, ramificam-se e transformam-se em glândulas gástricas na cicatriz da úlcera (TARNAWSKI, 2005; TARNAWSKI; AHLUWALIA; JONES, 2012).

O processo de re-epitelização e reconstrução das estruturas glandulares são controlados por fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento epitelial (EGF), fator de crescimento do hepatócito (FGH), fator de crescimento ligado a insulina-1 (IGF-1) (Figura 5). Esses fatores atuam por meio da ligação aos seus receptores específicos (EGF a EGF-R) na superfície da célula, o que provoca uma série de eventos intracelulares culminando na migração e proliferação celular (TARNAWSKI, 2005; TARNAWSKI; AHLUWALIA; K. JONES, 2012).

O antígeno de proliferação celular (PCNA) é um cofator para enzima DNA polimerase relevante para a síntese do DNA. Durante a diferenciação celular o PCNA é expresso em células em processo de proliferação, ocorrendo em altos níveis a partir da fase G1 do ciclo celular. Seu pico ocorre na fase S, com diminuição a partir da fase G2, apresentando-se muito baixos na fase M assim como em células quiescentes (HUANG et al., 1994; MARTÍNEZ-LARA et al., 1996).

Assim como os fatores de crescimento, a prostaglandina gerada a partir da ativação da cicloxigenase-2 (COX-2) e outras citocinas (TNF- α e IL-1 β) produzidas localmente pelas células em regeneração agem de maneira ordenada e integrada para promover a cicatrização (TARNAWSKI et al., 1992; TARNAWSKI, 2005; TARNAWSKI; AHLUWALIA, 2012).

O tecido de granulação desenvolve-se na base da úlcera de 48-72 h após a ulceração (Figura 5) e consiste de células proliferativas do tecido conjuntivo (macrófagos, fibroblastos e células endoteliais, responsáveis pela formação de microvasos no processo de angiogênese). A migração de fibroblastos para o tecido de granulação e sua proliferação é desencadeada por fatores como TGF β , PDGF, EGF, FGF e citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-8) derivadas de células inflamatórias e endoteliais (Figura 5) (TARNAWSKI; JONES, 1998; TARNAWSKI, 2005; TARNAWSKI; AHLUWALIA; K. JONES, 2012).

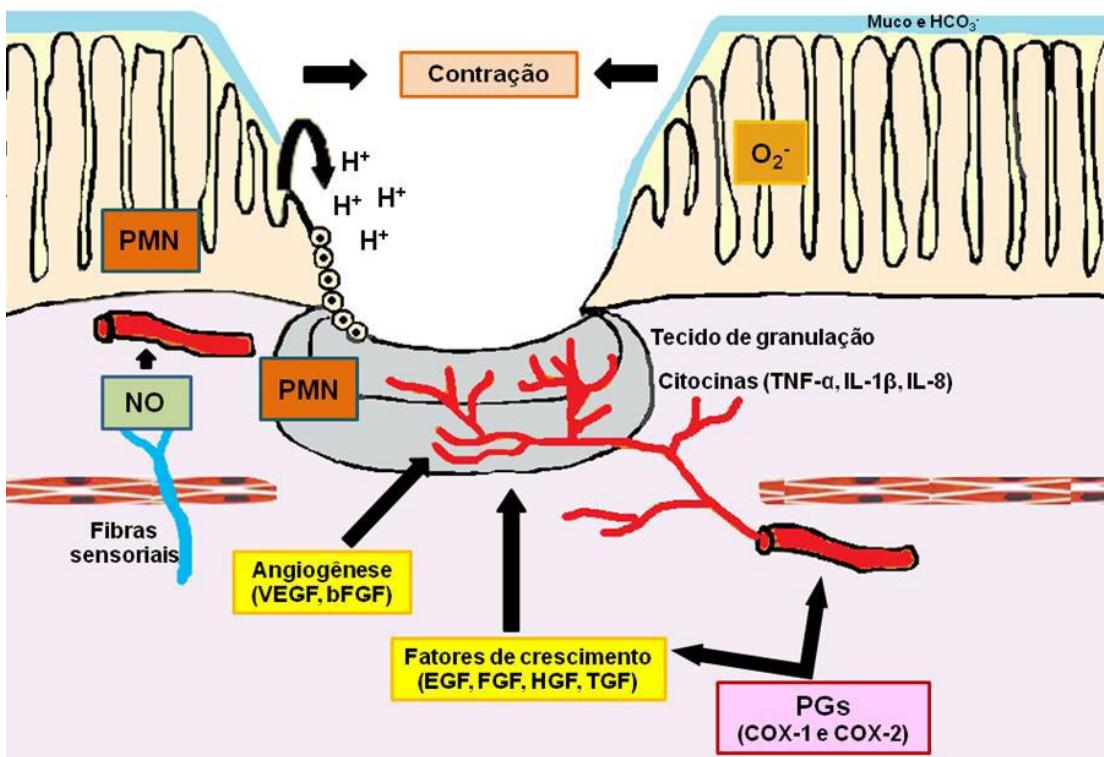
O tecido de granulação é um componente importante para o processo de cicatrização da úlcera porque fornece células do tecido conjuntivo (necessárias na síntese de matriz extracelular para restaurar a lâmina) e mais importante, os microvasos essenciais para a restauração da microvasculatura dentro da cicatriz (TARNAWSKI; AHLUWALIA; K. JONES, 2012).

A matriz extracelular é composta por proteínas estruturais fibrosas, tais como os colágenos e elastina, glicoproteínas adesivas incluindo fibronectina e laminina e um gel amorfo composto de proteoglicanos e ácido hialurônico (TARNAWSKI; AHLUWALIA; K. JONES, 2012). A substituição de tecido de granulação por tecido conjuntivo (fibrose) envolve mudanças na composição da matriz extracelular. Os fatores de crescimento que estimulam a síntese de colágeno e outros componentes do tecido conjuntivo também modulam a síntese e ativam as metaloproteinases, enzimas que degradam esses componentes (TARNAWSKI, 2005).

As metaloproteinases (MMPs) são um grupo de enzimas dependentes de zinco que digerem especificamente colágeno e outras moléculas da matriz. As MMPs são produzidas por várias células como fibroblastos, neutrófilos, macrófagos e células epiteliais (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Em condições de inflamação crônica a secreção de MMPs contribui substancialmente para destruição dos tecidos estromais (tecido de sustentação de um órgão) (OKABE; AMAGASE, 2005).

Uma vez ativadas, as MMPs são rapidamente controladas por inibidores específicos de metaloproteinase (TIMPs), que são produzidos por células mesenquimais, prevenindo assim a ação descontrolada dessas proteinases. Eles são essenciais na remodelação de tecido conjuntivo necessário para a reparação e formação de cicatriz (CALABRÒ et al., 2004; TARNAWSKI, 2005).

Figura 5 Representação da lesão na mucosa gástrica



Fonte: Adaptado de TARNAWSKI et al., 2005

A angiogênese é essencial para a restauração da microcirculação sanguínea na mucosa e é, portanto, fundamental na oxigenação e na nutrição da mucosa (TARNAWSKI et al., 1992; PAI et al., 1998, 2002; TARNAWSKI, 2005; TARNAWSKI; AHLUWALIA; JONES, 2012; TARNAWSKI; AHLUWALIA,

2012). A angiogênese envolve: 1-degradação das membranas da capilaridade basal pelas metaloproteinases; 2-migração e proliferação das células endoteliais para o espaço perivascular; 3-formação dos tubos microvasculares seguidas de anastomose; 4- estabelecimento de uma lâmina basal; e 5-formação da rede de capilares (S. TARNAWSKI; AHLUWALIA, 2012).

O crescimento do tecido de granulação e a geração de novos microvasos por meio da angiogênese são estimulados por bFGF, VEGF, PDGF e angiopoietinas e possivelmente outros fatores de crescimento como IL-1 β e TNF- α (Figura 5). O principal mecanismo subjacente a ativação dos fatores de crescimento angiogênicos e expressão de seus receptores é a hipóxia, que ativa o fator de transcrição induzível pela hipóxia (HIF-1 α), que por sua vez supra regula a expressão transcrional do VEGF aumentando sua produção e por consequência angiogênese (TARNAWSKI, 2005; TARNAWSKI; AHLUWALIA, 2012).

As prostaglandinas desempenham um papel importante na qualidade da cicatrização da úlcera visto que participam da regulação da secreção ácida e manutenção da integridade da mucosa (KANGWAN et al., 2014).

As prostaglandinas exógenas revertem a recorrência de úlcera, da resposta inflamatória, do retardo na cicatrização e defeitos na angiogênese (KANGWAN et al., 2014). Foi observado que o aumento da expressão da cicloxigenase 2 (COX-2) acarreta a produção da prostaglandina E₂ e isso está diretamente correlacionado com o aumento da proliferação celular e dos fatores de crescimento (TARNAWSKI; AHLUWALIA; JONES, 2012).

O resultado final do processo de cura da úlcera péptica reflete uma interação dinâmica entre os componentes epiteliais a partir da zona de cura, à margem da úlcera e os componentes do tecido conjuntivo (incluindo microvasos) originário do tecido de granulação, assim como, a partir de células derivadas da medula óssea atraídas para o local de lesão (KANGWAN et al., 2014).

O modelo de úlcera induzido por ácido acético em ratos é uma importante metodologia para avaliar a atividade cicatrizante de drogas testes. O processo de cicatrização, nesse modelo, consiste na proliferação do tecido conjuntivo da base da úlcera e regeneração da camada epitelial da borda da lesão. Portanto, a cicatrização da lesão promovida por agentes terapêuticos

estimula a re-epitelização ou a granulação do tecido estomacal e assim acelera o processo (OKABE; AMAGASE, 2005).

2.3.5 Epidemiologia da úlcera péptica

A úlcera péptica tende a apresentar um curso crônico remitente com relação imperfeita entre os sintomas e a presença de uma lesão ulcerativa. Este fato conduz a uma limitação na capacidade de documentar com precisão a sua incidência e prevalência. Fazer um levantamento preciso exige técnicas difíceis, tais como pesquisas endoscópicas de base populacional de alto custo (NAJM, 2011). O único estudo publicado com esta abordagem relatou uma prevalência de 4,1% de úlceras pépticas (2% para úlceras gástricas e 2,1% para úlceras duodenais) (ARO et al., 2006).

A úlcera péptica apresenta-se como uma das doenças mais prevalentes (aproximadamente 10% da população mundial) no mundo, seguida pelas doenças inflamatórias intestinais (colite ulcerativa e doença de Crohn) (KOMEN et al., 2008; CASALI et al., 2012)

A úlcera duodenal é mais prevalente nos países ocidentais e as úlceras gástricas prevalecem nos países do oriente. No Brasil a real incidência da úlcera péptica é estimada em cerca de 1 a 20% (BERSTAD; BERSTAD, 1993; D'ACAMPORA et al., 2008; CASTRO et al., 2009), isso devido à subnotificação existente no Brasil.

Com relação ao acometimento por gênero pode-se citar taxas de aproximadamente 11 a 20% para os homens e 8 a 11% para as mulheres, tendo uma proporção de 3:1 do gênero masculino para o feminino em úlceras duodenais e 2:1 para as úlceras gástricas (LIU; CRAWFORD, 2005).

Existe uma maior incidência de úlcera gástrica em idosos por serem os maiores usuários dos AINEs (destacando-se o ácido acetilsalicílico) (SUNG; KUIPERS; EL-SERAG, 2009). Além disso, tem sido observado que a infecção por *H. pylori* é uma relevante causa para o desenvolvimento da úlcera péptica. Tal bactéria está presente em aproximadamente 25% dos adultos nos países mais desenvolvidos e ultrapassa 80% nos países em desenvolvimento. Apesar disso, apenas 15% das pessoas infectadas desenvolvem a úlcera péptica em algum momento de sua vida (MAJUMDAR; BEBB; ATHERTON, 2011). A

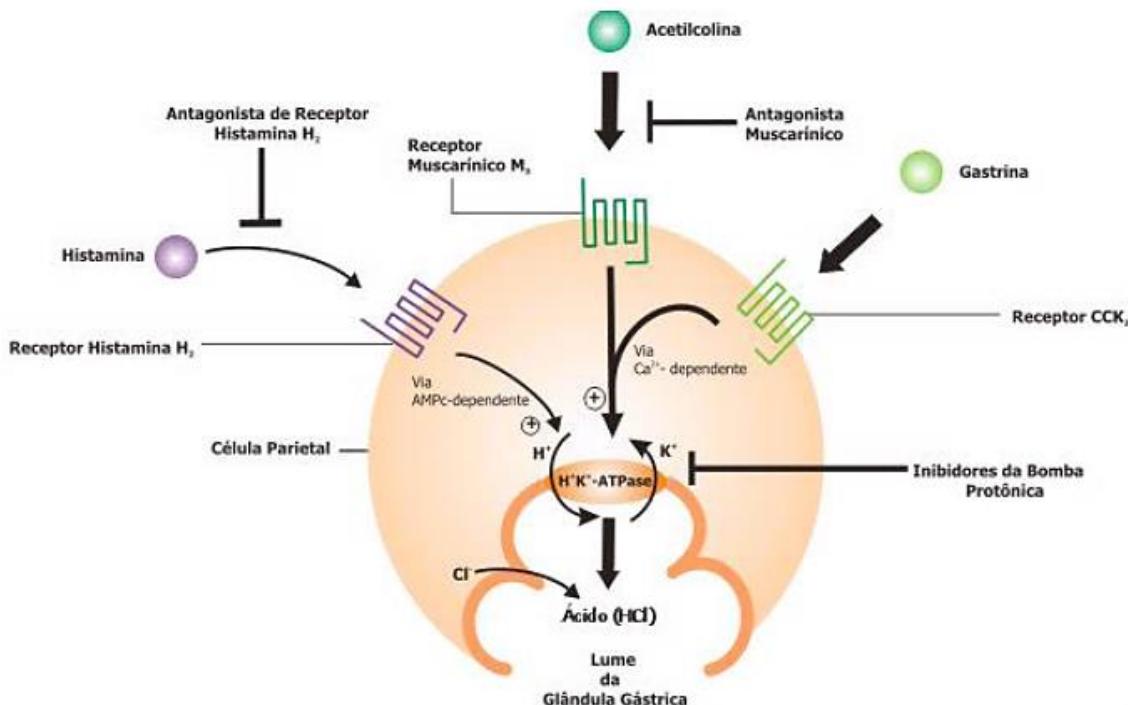
infecção está se tornando menos frequente nos países desenvolvidos, assim, o uso de AINEs é apontado como a causa mais comum da lesão (NAJM, 2011).

2.3.6 Terapêutica da úlcera péptica

O tratamento da doença ulcerosa péptica no homem consiste na cicatrização das lesões ulcerativas. Todos os procedimentos terapêuticos devem incluir o controle dos fatores de risco relacionados ao desenvolvimento da doença como interrupção do uso de cigarros, evitar o estresse, o uso contínuo de AINES e abuso de álcool (NAJM, 2011).

A terapêutica da úlcera gástrica está centrada no controle da secreção ácida gástrica ou no fortalecimento dos fatores protetores da mucosa gastroduodenal (AIHARA et al., 2003). Entre as classes de fármacos que compõe a história da terapêutica da úlcera péptica encontra-se os antiácidos, os antagonistas muscarínicos M₁, os antagonistas do receptor H₂ e mais recentemente, os inibidores da bomba de prótons e os agentes citoprotetores (Figura 6) (VERMA, 2010).

Figura 6 Terapêutica da úlcera péptica



Fonte: Adaptado de OLBE; CARLSSON; LINDEBERG, 2003

Os antiácidos são utilizados no intuito de neutralizar o ácido estomacal. Os sais de magnésio, alumínio, o bicarbonato de sódio e carbonato de cálcio são mais utilizados. Essas drogas elevam de forma rápida e transitória o pH intragástrico auxiliando o tratamento das úlceras (RANG et al., 2012). Devido aos seus efeitos adversos (diarreia, prisão de ventre, interferência na absorção de drogas e raros distúrbios ácido-base) e por acarretar interações medicamentosas, esses medicamentos são raramente utilizados como terapia primária nos transtornos ocasionados pela acidez gástrica (SCHUBERT; PEURA, 2008).

Com o objetivo de inibir a secreção ácida gástrica, surgiram os antagonistas muscarínicos (pirenzepina e telenzepina). Entretanto, fatores como, baixa eficácia e efeitos colaterais acentuados (taquicardia, secura na boca, cefaléia e confusão mental) tornaram o uso dessas drogas pouco usual (HOOGERWERF; PASRICHA, 2006).

O desenvolvimento dos antagonistas para os receptores H₂ da histamina surgiram como forma de inibir completamente a interação da histamina com os receptores H₂ reduzindo assim, o volume e a concentração de íons H⁺ do suco gástrico. O uso dessas drogas levou a uma importante mudança na terapêutica da úlcera, diminuindo os índices de cirurgias em até 80% (ARO et al., 2006).

O tratamento foi aperfeiçoado com a introdução dos inibidores de bomba de prótons (IPPs). Embora os antagonistas H₂ fossem eficazes na redução da secreção ácida, com um tratamento que conduz uma cura de 80 a 90%, eles não impediam que a gastrina e a estimulação vagal pudesse ainda induzir a secreção de ácido pelas células parietais (NAJM, 2011)

A H⁺/K⁺-ATPase situada na membrana apical da célula parietal gástrica proporciona um efeito comum para a via da secreção ácida e é completa e irreversivelmente inibida pelos inibidores de bomba levando a cicatrização mais rápida quando comparado aos que utilizam somente antagonistas dos receptores H₂ (LEONG, 2009; NAJM, 2011)

O manejo de pacientes com úlcera péptica requer detecção e erradicação da infecção por *H. pylori* e a administração da terapia antissecradora. Em geral a terapia tríplice (IPP + claritromicina + azitromicina) durante 14 dias tem sido demonstrada ser mais eficaz na erradicação de *H pylori* (MALFERTHEINER et al., 2007; LUTHER et al., 2010).

Apesar dos grandes avanços na terapêutica da úlcera gástrica e duodenal nos últimos anos com o desenvolvimento de novos fármacos, ainda existem fatores limitantes quanto à eficácia, produção de efeitos adversos e alta taxa de recorrência de úlcera péptica (40-80 %) um ano após o tratamento com os antagonistas dos receptores H₂ e os inibidores da bomba de prótons (IPPs) (SZABO; VINCZE, 2000). Por isso, torna-se importante investir na pesquisa de novos alvos terapêuticos, a exemplo de produtos naturais, em especial plantas medicinais, na perspectiva de garantir alta eficácia, poucos efeitos colaterais e ausência de recidiva.

2.4 Doenças Inflamatórias Intestinais

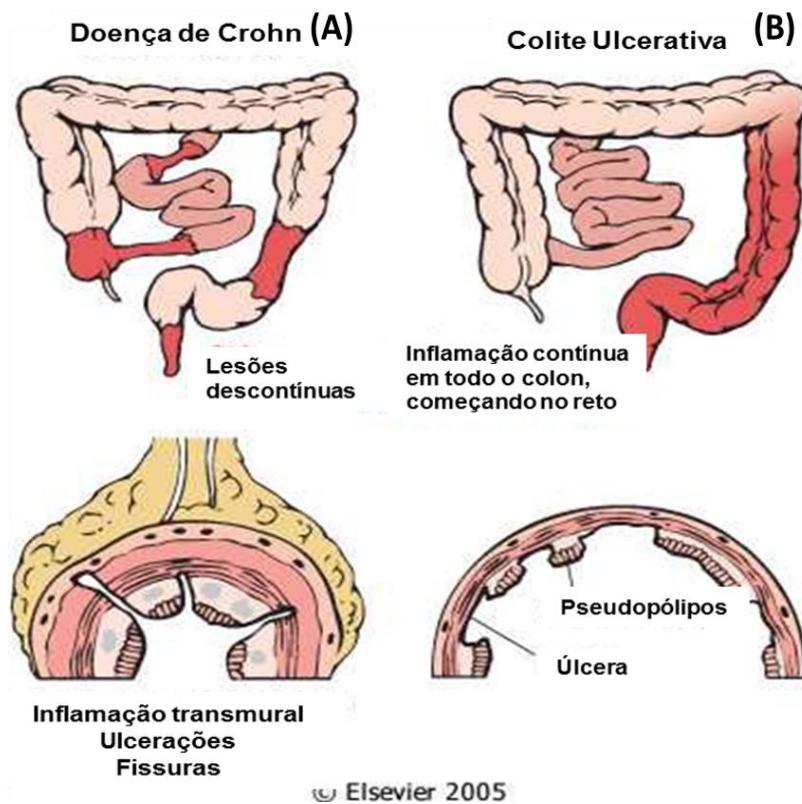
2.4.1 Fisiopatologia das doenças inflamatórias intestinais

2.4.1.1 Etiologia

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são desordens crônicas do trato gastrintestinal (TGI) caracterizadas por períodos alternantes de remissão e recidiva (LOFTUS; SANDBORN, 2002). Essas doenças constituem um grande grupo de desordens inflamatórias, entretanto, as mais comuns são Doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa (RCU) (HENDRICKSON; GOKHALE; CHO, 2002; YEN; PARDI, 2012).

A doença de Crohn (DC) pode afetar qualquer parte do trato gastrintestinal e apresenta como sintomas clássicos a fadiga, diarreia prolongada (com ou sem sangramentos), dor abdominal, perda de peso e febre (KONDAMUDI et al., 2013; WALLACE et al., 2014). Essa doença pode afetar todos os segmentos do TGI, com lesões descontínuas, acometendo mais comumente a porção do íleo terminal. Sua anatomia patológica é caracterizada por agregados linfoides transmurais, não necróticos, fibrose, espessamento da parede intestinal, ulcerações e fissuras como é possível visualizar Figura 7A e Tabela 1.

Figura 7 Diferenças entre a Doença de Crohn e a Colite Ulcerativa



Fonte : Adapatado de <http://www.pathology.com.br/>

A DC pode ser diferenciada em três fenótipos: o inflamatório (mais comum), a fistulizante e a estenosante. O tipo fistulizante é mais frequente em povos hispânicos do que em caucasianos ou afro-americanos (LANGHOLZ, 2010). A forma estenosante pode ser a mais sutil em desenvolvimento, com um curso de longo tempo. A função intestinal apresenta-se relativamente normal antes do surgimento de dor, inchaço e obstrução (PALMON; MAYER, 2006).

A retocolite ulcerativa (RCU) é um tipo de inflamação contínua restrita ao cólon. Entretanto, todo o intestino grosso pode ser afetado conforme descrito na Figura 7B e na Tabela 1 (LANGHOLZ, 2010). É caracterizada por inflamações e ulcerações somente nas paredes da mucosa e submucosa do cólon, abscessos de criptas, depleção de mucina e distorção glandular (CHO; ABRAHAM, 2007). Pacientes acometidos apresentam sintomas como sangramento retal, evacuações frequentes, tenesmo, descarga de muco retal e dor abdominal (WALLACE et al., 2014).

Tabela 1 Características diferenciais entre DC e a RCU (CHO; ABRAHAM, 2007)

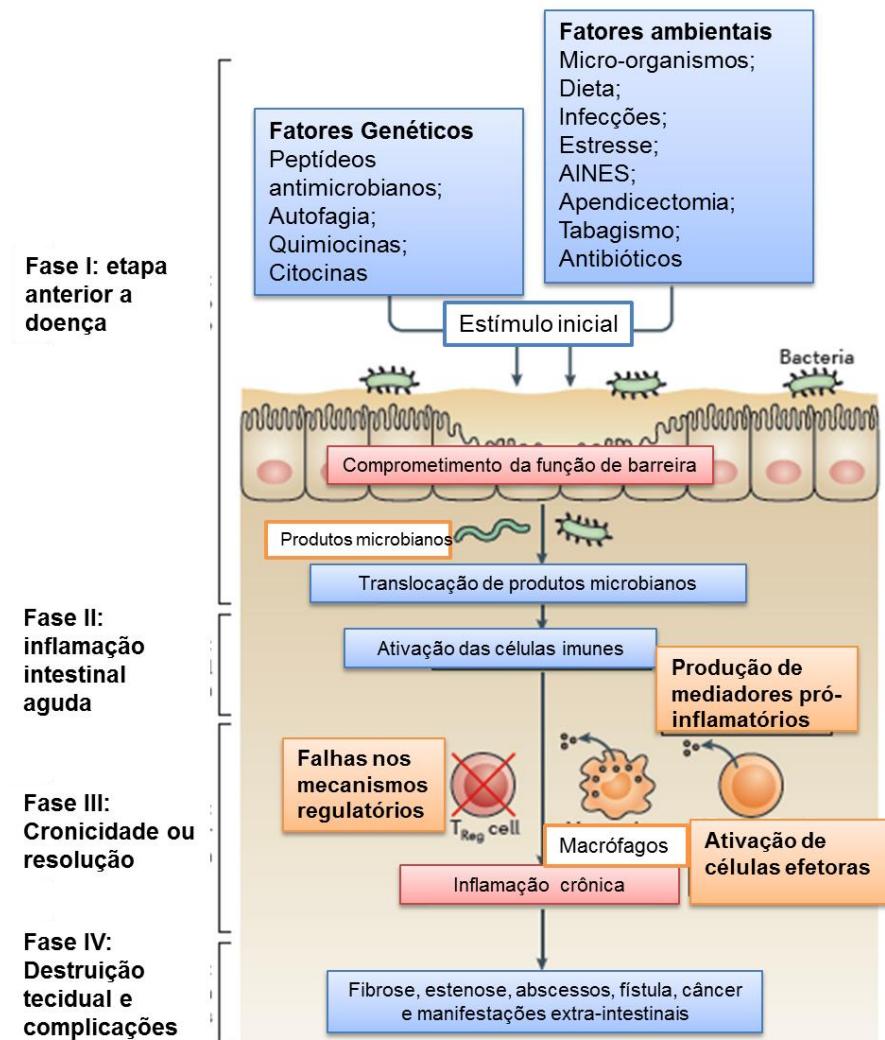
<i>Doença de Crohn</i>	<i>Retocolite ulcerativa</i>
Desde a boca até o ânus	Reto +/-cólon
Distribuição descontínua	Distribuição contínua
Transmural (afeta todas as camadas do intestino)	Afeta apenas a mucosa e submucosa
Fístulas e estenose intestinais frequentes	Estenoses intestinais infrequentes
<i>Anatomia patológica</i>	<i>Anatomia patológica</i>
Granulomas	Abcessos de criptas
Agregados linfoides	Depleção de mucina
Fibrose	Distorção glandular

A etiologia das DII ainda não está totalmente esclarecida, no entanto, acredita-se que fatores ambientais, genéticos e imunológicos assim como a utilização de algumas drogas tem um papel importante na ocorrência e progressão das DII (DHARMANI; CHADEE, 2008; KONDAMUDI et al., 2013).

Modelos emergentes no estudo da patogênese da DII sugerem três fatores essenciais para o desenvolvimento da doença: 1- a quebra na função de barreira intestinal; 2- a exposição do conteúdo luminal as células imunes da lâmina própria; e 3- a exacerbação da resposta imunológica. Entretanto, não está claro o fator responsável pelo inicio e perpetuação do ciclo que leva a exacerbação da doença (CLAYBURGH; SHEN; TURNER, 2004; GROSCHWITZ; HOGAN, 2009).

A combinação de fatores genéticos e ambientais provocam alterações na função de barreira da mucosa intestinal permitindo a translocação de抗ígenos luminais (bactérias comensais ou produtos microbianos) para dentro da parede intestinal. Isso leva a ativação de células imunes e excessiva produção de citocinas, causando a fase aguda da inflamação. Se o processo inflamatório agudo não for resolvido por mecanismos anti-inflamatórios e de supressão de citocinas pró-inflamatórias, desenvolve-se a inflamação intestinal crônica. Tal fato pode acarretar destruição dos tecidos e complicações da doença (NEURATH, 2014), conforme demonstrado na Figura 8.

Figura 8 Patogênese das Doenças Inflamatórias Intestinais



Fonte: Adaptado de NEURATH et al., 2014

2.4.1.2 Fatores Genéticos

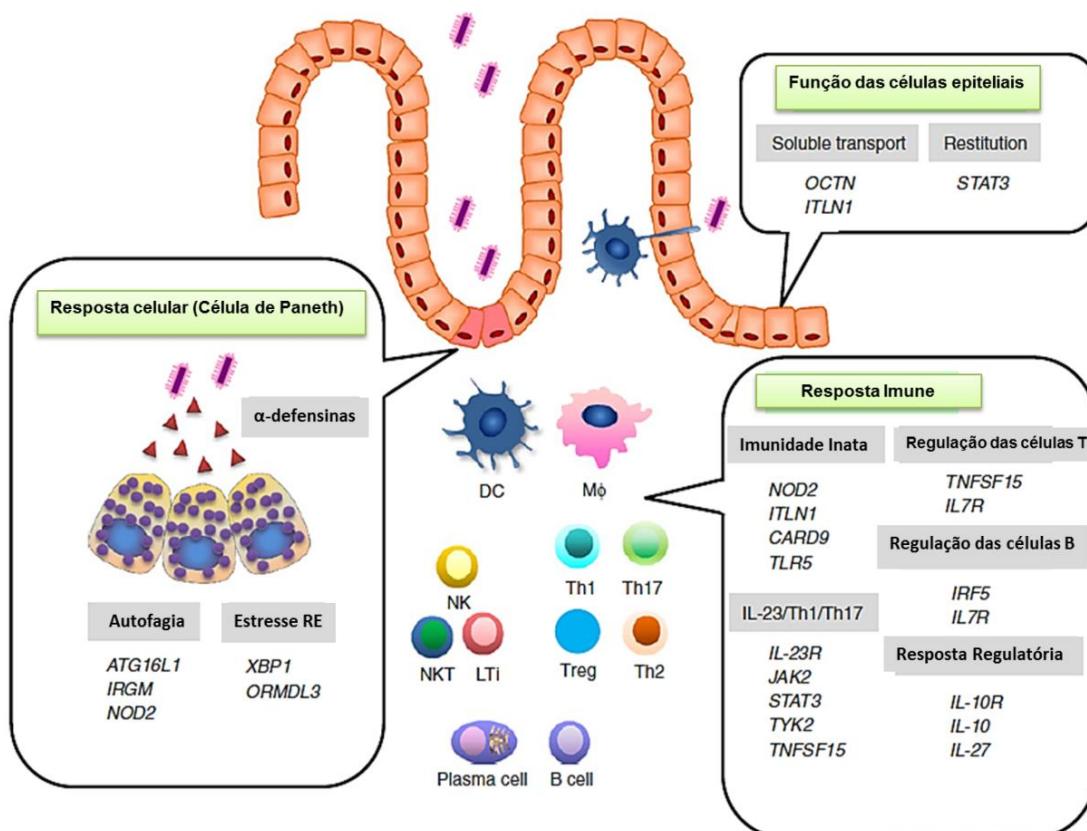
As DII ocorrem em indivíduos geneticamente susceptíveis a uma resposta imune anormal aos microrganismos da flora intestinal. A desregulação nas respostas imunes inata e adaptativa ativa as vias imunológicas que contribuem para uma resposta inflamatória acentuada em pacientes acometidos. Também é importante ressaltar que fatores genéticos determinam a composição da microflora e são responsáveis pela manutenção da homeostase intestinal (GEREMIA et al., 2013).

Os genes de susceptibilidade estão associados com funções de defesa do organismo, incluindo a barreira epitelial (função das células epiteliais), a

resposta imune (imunidade inata e regulação das células T, B e T regulatórias) e as respostas celulares (autofagia e estresse do retículo endotelial) (Figura 9) (HISAMATSU et al., 2013). As variantes genéticas que conferem susceptibilidade a DC são primariamente relacionadas à imunidade inata, autofagia e fagocitose (XAVIER; PODOLSKY, 2007). Para retocolite ulcerativa as variantes genéticas são principalmente relacionadas para função de barreira (CORRIDONI; ARSENEAU; COMINELLI, 2014).

Recentemente foram identificados vários genes de susceptibilidade às doenças inflamatórias intestinais. Mutações genéticas em *loci* de receptores do tipo NOD2 (domínio de ligação da oligomerização de nucleotídeos 2) (também chamado de CARD15 ou IBD1) e intelectinas 1 (ITLN1) afetam as células imunes inatas danificando suas funções, o que pode causar mudanças na microflora intestinal (CADWELL, 2010; HISAMATSU et al., 2013; SOBCZAK et al., 2014) (Figura 9). Outros genes como E-cadherin, Muc2, IRGM e MDR1 também estão envolvidos no desenvolvimento das DII (MUISE et al., 2009).

Figura 9 Genes de susceptibilidade ao desenvolvimento de Doenças Inflamatórias Intestinais



Fonte : Adaptado de HISAMATSU et al., 2013

2.4.1.3 Fatores ambientais

Dentre os fatores ambientais envolvidos no desenvolvimento das DII pode-se citar a dieta, o tabagismo, fármacos, fatores geográficos, sociais, dentre outros (DANESE; SANS; FIOCCHI, 2004).

A dieta quando pobre em proteínas, frutas e legumes e rica em gordura animal e açúcar pode constituir um fator de risco significativo para o desenvolvimento da DII (SAKAMOTO et al., 2005; JANTCHOU et al., 2010).

O tabagismo parece ter um efeito divergente nas duas formas de DII, causando proteção na RCU e aumentando os riscos para DC (SILVERSTEIN et al., 1989). Os diferentes impactos do tabagismo nessas doenças estão relacionados ao duplo efeito da nicotina sobre os intestinos delgado e grosso (COSNES, 2004; MCGRATH; MCDONALD; MACDONALD, 2004; HIGUCHI et al., 2012).

Na doença de Crohn como consequência do tabagismo foi observado um aumento no influxo de neutrófilos para mucosa intestinal, resultando em aumento das ROS assim como diminuição da produção da IL-10, uma citocina anti-inflamatória, no intestino delgado (ELIAKIM; KARMELI, 2003; COSNES, 2004) Esses fatores provocam o agravo na evolução da doença, promovendo aumento de fistulas e estenoses bem como a necessidade de utilização de corticosteroides e realização de processos cirúrgicos (COSNES, 2004; HIGUCHI et al., 2012). Os benefícios na colite ulcerativa são provenientes do aumento na produção de muco, reforço na barreira epitelial intestinal, decréscimo na produção de citocinas pró-inflamatórias e do óxido nítrico (NO) (COSNES, 2004).

Tem sido relatado que o estresse psicológico é capaz de aumentar a expressão das DII por desencadear ou aumentar a cascata inflamatória por meio da interação neuro-imunológica. A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) inibe o sistema imune e danifica as funções digestivas induzindo uma reação inflamatória em pacientes com DII (MAWDSLEY; RAMPTON, 2005). Além disso, observa-se uma diminuição dos microrganismos que atuam de forma benéfica. Essas mudanças levam a distúrbios no ambiente e na microflora intestinal, o que causa um processo inflamatório (SÖDERHOLM; PERDUE, 2001; TRIANTAFILLIDIS; MERIKAS; GIKAS, 2013).

No estresse oxidativo, leucócitos polimorfonucleares, assim como linfócitos T e B acumulam-se no intestino no intuito de erradicar o patógeno, gerando o aumento na quantidade de ROS (radical hidroxila, superóxido) (SOBCZAK et al., 2014) o que pode provocar despolimerização do muco nas células do intestino grosso, erradicando a sua proteção natural. Simultaneamente, ocorre a liberação de quantidades significantes de proteases (elastase, colagenase e catepsina G) o que leva a quebra de conexões intercelulares e ocasiona danos ao epitélio intestinal e aumento da infiltração bacteriana para lâmina própria intestinal, estimulação das células T e superprodução de citocinas pró-inflamatórias (INF- γ , TNF- α , IL-1 β e IL-6) que agravam a doença inflamatória intestinal (KUNO et al., 2002; DEMAUDE et al., 2006; FURLAN et al., 2006; SOBCZAK et al., 2014).

O uso contínuo de AINES, contraceptivos orais ou antibióticos está associado com o aumento do risco para DII (KONDAMUDI et al., 2013). Os AINES agem inibindo a cicloxigenase (COX) e consequentemente a redução na produção de PGE₂ (protetora da mucosa intestinal). Além disso, a sua circulação êntero-hepática danifica os fosfolipídios de membrana levando a perda da sua integridade e aumento da permeabilidade intestinal (CIPOLLA et al., 2002). O uso de contraceptivos orais, por sua vez, pode afetar a evolução das DII por acarretar eventos tromboembólicos e efeitos imunomoduladores relacionados à supressão do fator nuclear κB (NF-κB) (ALSTEAD, 1999; EVANS et al., 2001). Os antibióticos, a exemplo do metronidazol, podem alterar a microbiota intestinal e contribuir para o desenvolvimento da DII enquanto que a penicilina não está relacionada a essa doença (SHAW; BLANCHARD; BERNSTEIN, 2010).

As DII são mais frequentes depois de casos de infecções gastrintestinais. As concentrações bacterianas aumentam progressivamente com a severidade da doença tanto no cólon inflamado quanto no não inflamado (SWIDSINSKI et al., 2002; GARCIA RODRIGUEZ; RUIGOMEZ; PANES, 2006).

Vários estudos conduzidos em pacientes e modelos animais tem mostrado o papel central de bactérias na patogênese das DII. A microflora intestinal de pacientes com DC exibe uma relativa carência de *Firmicutes* e *Bacteroidetes* e uma super-representação de *Enterobacteria*. A redução de *Clostridium* spp e aumento de *Escherichia coli* tem sido relatado para RCU (ECKBURG et al., 2005; FRANK et al., 2007). Além disso, existe um forte

aumento de *E. coli* associado a mucosa no íleo e cólon, particularmente em pacientes com DC, sugerindo o seu papel patogênico (BARNICH; DARFEUILLE-MICHAUD, 2007). Vários outros microrganismos como *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia tracomatis*, *Escherichia coli*, *Citomegalovírus*, *Saccharomyces cerevisiae*, além de outros, têm sido propostos como agentes etiológicos nas DII (KAMADA et al., 2013).

A reatividade imunológica sistêmica contra抗ígenos é observada na maior parte dos pacientes. A flagelina bacteriana é demonstrada como抗ígeno dominante (LODES et al., 2004; TARGAN et al., 2005). Em condições normais há uma relação equilibrada e tolerante entre a microbiota intestinal e o sistema imune que na DII é perdida por motivos ainda não esclarecidos (MACPHERSON; HARRIS, 2004; KELLY; CONWAY; AMINOV, 2005). No entanto, a descoberta de que a DC é geneticamente associada a mutações do gene NOD2/CARD15, cujo produto é uma proteína citoplasmática reconhecedora de bactérias, demonstram defeitos nos mecanismos de reconhecimento bacteriano (GIRARDIN; HUGOT; SANSONETTI, 2003).

2.4.1.4 Fatores imunológicos

Em condições fisiológicas, o trato gastrintestinal encontra-se em contínuo estado de leve inflamação, sendo o sistema imune responsável tanto pela manutenção do estado anérgeo (perda de resposta frente a alguns抗ígenos que normalmente ocorrem na flora comensal) quanto no controle dos mecanismos regulatórios (SOBCZAK et al., 2014).

Pacientes que falham na resolução do processo inflamatório agudo desenvolvem inflamação crônica que é induzida por ativação descontrolada do sistema imune da mucosa (NEURATH, 2014). Estudos têm demonstrado que tanto as respostas imunes inatas quanto as adaptativas, contribuem para o processo inflamatório alterado no intestino de pacientes com DII.

As respostas (inata e adaptativa) envolvem a participação das células epiteliais do intestino, macrófagos, células dendríticas, células natural killer (NK), células linfóides inatas e células T e B (HISAMATSU et al., 2013).

A quebra da homeostase e a ativação prolongada da resposta imune local no intestino levam ao aumento na produção de citocinas e quimiocinas responsáveis pela ativação da resposta humoral ou celular, cronificando o

processo inflamatório no trato gastrintestinal e estimulando as DII (KOELINK et al., 2012).

A mucosa de pacientes com DC estabelecida apresenta predominância de linfócitos CD4⁺ com o fenótipo Th1, caracterizada pelo aumento na síntese de TNF- α e INF- γ . Em contraste, a mucosa dos pacientes acometidos com RCU pode ser dominada por linfócitos CD4+ do tipo Th2, caracterizado pela produção de TGF- β e IL-5. Os linfócitos Th17 também desempenham importante papel, ocorrendo sua proliferação em resposta a interleucina pró-inflamatória IL-23 (HISAMATSU et al., 2013).

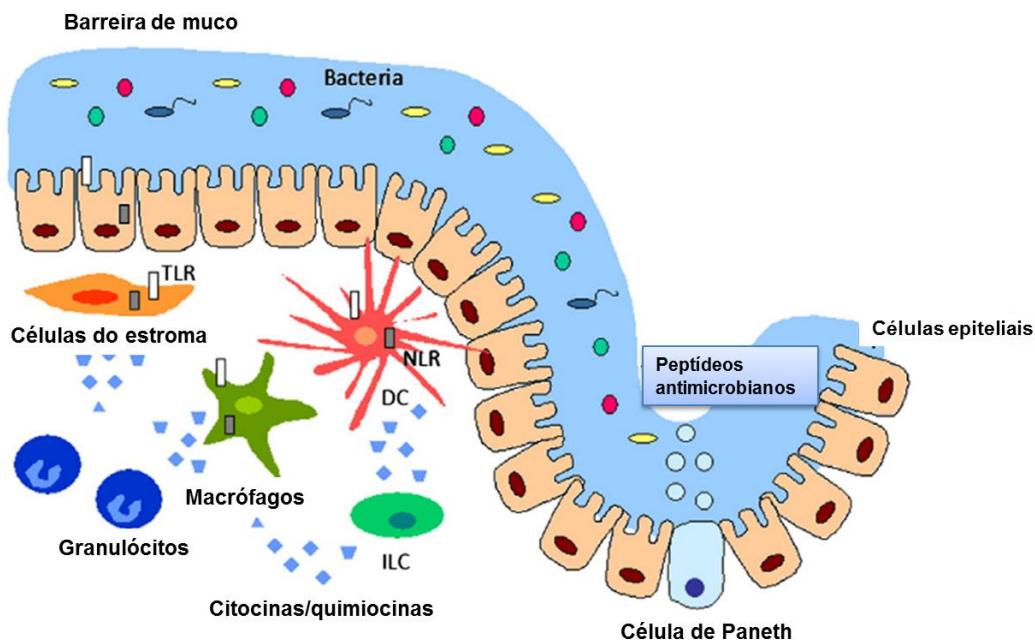
2.4.2 Respostas imunes nas Doenças Inflamatórias Intestinais

O sistema imunológico intestinal enfrenta uma tarefa muito delicada, proporcionar uma resposta imune rápida e eficaz contra bactérias patogênicas e manter a tolerância em relação aos alimentos e antígenos bacterianos da microbiota. Pequenos desequilíbrios podem ser suficientes para resultar em respostas inflamatórias exacerbadas, culminando em uma inflamação crônica intestinal (GEREMIA et al., 2013). Essa doença crônica e recidivante pode resultar de um defeito na resposta imune inata da mucosa tais como integridade da barreira epitelial, sensibilidade microbiana inata e autofagia (KAMADA et al., 2008).

2.4.2.1 Imunidade inata na DII

O sistema inato é a primeira linha de defesa contra patógenos. É conhecido por promover uma resposta protetora imediata frente às infecções, além de iniciar a resposta imune adaptativa. Esse sistema não é específico e não confere memória imunológica, sendo constituído pela barreira epitelial, macrófago, monócitos, células dendríticas (DCs), células natural killer (NK), eosinófilos e basófilos (GEREMIA et al., 2013; WALLACE et al., 2014) (Figura 10).

Figura 10 Resposta imune inata no intestino



Fonte: Adaptado de GEREMIA et al., 2013

As células do sistema imune inato atuam de forma sincronizada para iniciar a inflamação pela secreção de citocinas, quimiocinas e agentes antimicrobianos. Estes fatores levam a fagocitose de células infectadas e microrganismos, apresentação de抗ígenos e ativação do sistema imune adaptativo (GEREMIA et al., 2013; WALLACE et al., 2014).

A sensibilidade a抗ígenos microbianos pelas células imunes inatas e células epiteliais é mediada por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que reconhecem padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs). Os PRRs incluem receptores TLR (receptores *toll-like*) bem como receptores intracelulares com domínio de ligação a nucleotídeos e oligomerização (NOD). A cascata de sinalização PRR resulta em ativação do fator nuclear κB (NF-κB) e produção de mediadores pró-inflamatórios (Ex: TNF-α e IL-1β) assegurando uma resposta inata efetiva contra patógenos (GEREMIA et al., 2013).

As vias de sinalização TLR induz a produção de citocina pró-inflamatórias (TNF-α e IL-1β), moléculas antimicrobianas e também afetam a integridade epitelial (MEDZHITOV et al., 1998; ABREU; ARDITI, 2004; HISAMATSU et al., 2013).

As células epiteliais intestinais (IEC) desempenham um papel de barreira para prevenir a invasão de patógenos e o influxo de抗ígenos. Além disso, tais

células produzem mucinas e fatores trefoil (TFF) que são importantes componentes da parede de muco que recobre a superfície do lúmen intestinal. Pode-se destacar também a produção de peptídeos antimicrobianos que fazem parte do mecanismo clássico da imunidade inata (HISAMATSU et al., 2013).

As IEC podem sofrer alterações no seu funcionamento, devido as DII. Essas células tem a capacidade de apresentar抗ígenos. Em condições normais estimulam células supressoras, entretanto nas DII, ativam e amplificam o processo inflamatório intestinal. Pode-se citar também que pelo fato de expressar inapropriadamente moléculas co-estimulatórias, aumentam seus precursores inflamatórios na inflamação intestinal. Portanto, as IEC possuem relevância na patogênese da DII, que precisa ser melhor esclarecida (NAKAZAWA et al., 2004; DANESE; FIOCCHI, 2006).

As células de Paneth localizadas na parte inferior da cripta possuem grânulos intracelulares que produzem peptídeos antimicrobianos (Ex: α-defensina). Quando esses peptídeos antimicrobianos funcionam de maneira anormal, alteram a microbiota intestinal e então participam do desenvolvimento da DC (UEHARA et al., 2007) (Figura 10).

Células do sistema imune inato tais como as células dendríticas e macrófagos assim como células epiteliais e miofibroblastos também podem reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). No intestino, a atividade dessas células é regulada por vários mecanismos que quando iniciados de forma inadequada e excessiva levam ao desenvolvimento da inflamação intestinal (KAYAMA; TAKEDA, 2012; GEREMIA et al., 2013).

As células dendríticas (DCs) intestinais estão envolvidas na apresentação antigenica e ativação dos linfócitos T e B o que podem contribuir para a inflamação por meio da produção de citocinas pró-inflamatórias. A ativação das DCs intestinais é pré-requisito para ativação das células T que são cruciais para DII (KELSALL; LEON, 2005). O tipo de mediador que as DCs produzem determinará o subtipo de célula T efetora a ser ativada (Th1, Th2 ou Th17) (VAN LIEROP et al., 2009).

Na doença inflamatória intestinal, a ativação das células dendríticas ocorre por meio da ativação de receptores Toll like (TRL) 2 e 4. Esses receptores reconhecem produtos bacterianos e modulam a produção de interleucina (HART et al., 2005).

Os macrófagos são os principais fagócitos mononucleares teciduais residentes e tem importante papel no reconhecimento e eliminação bacteriana, assim como, no direcionamento da imunidade inata e adaptativa. Além disso, também são importantes para manutenção da homeostase visto que interferem na inflamação via produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β (MOSSER, 2003; MANTOVANI et al., 2004; GORDON; TAYLOR, 2005).

Foi relatado que macrófagos intestinais possuem funções imuno-regulatórias. Em contraste aos macrófados esplênicos, os macrófagos intestinais não expressam receptores da resposta inata, embora essas células mantenham suas funções fagocíticas e bactericidas, além de não produzirem citocinas pró-inflamatórias em resposta a vários estímulos, incluindo componentes bacterianos (ROGLER et al., 1998; SMITH et al., 2001).

A homeostase imunológica no intestino é quebrada quando a função dos macrófagos está desregulada, podendo resultar em inflamação crônica intestinal (SMYTHIES et al., 2005; KAMADA et al., 2009). Estudos relatam que o número de macrófagos CD4 $^{+}$ estão aumentados em pacientes com DC e produzem grandes quantidades de citocinas colitogênicas incluindo IL-6, IL-23 e TNF- α frente a bactérias comensais quando comparado aos indivíduos saudáveis (KAMADA et al., 2008).

Além disso, a IL-23 derivada de macrófagos de intestinos humanos pode aumentar a diferenciação de células T produtoras de IL-17 e INF- γ , sugerindo que os macrófagos desempenham importante papel na resposta imune inata anormal e consequente desenvolvimento de DII (KAMADA et al., 2008, 2009; LEE et al., 2009; AHERN et al., 2010).

Os monócitos ajudam na defesa frente a patógenos (*T. spiralis* e *N. brasiliensis*) por produzirem proteases e recrutam neutrófilos e eosinófilos para o intestino, aumentando a permeabilidade vascular (BISCHOFF; KRÄMER, 2007). Essas células também contribuem para homeostase intestinal por estimularem a produção de IgA pelas células B e por manter a arquitetura do epitélio intestinal (GROSCHWITZ; HOGAN, 2009; MERLUZZI et al., 2010).

A ativação excessiva de mastócitos é positivamente correlacionada a processos alérgicos (alergia alimentar) e inflamatórios (doenças inflamatórias intestinais) severos. O acúmulo de mastócitos ativados ou degranulados e o aumento nos níveis de triptases derivadas de mastócitos são encontrados em intestinos de pacientes com DII. Os fatores relacionados à ativação de

mastócitos durante a inflamação intestinal podem ser considerados um possível alvo para o tratamento da DII (GROSCHWITZ; HOGAN, 2009; HAMILTON et al., 2011; KURASHIMA et al., 2012).

As células *natural killer* (NK) são células imunes encontradas na mucosa e tem correlação com as doenças inflamatórias intestinais. Essas células respondem rapidamente aos estímulos das células apresentadoras de antígenos (APCs) (células dendríticas e macrófagos) e secretam várias citocinas, como IL-13 (HISAMATSU et al., 2013). As células NK são as principais produtoras de IL-13 no modelo de retocolite induzida por oxazolona (agente químico indutor de colite ulcerativa) e direciona uma resposta inflamatória Th2 (FUSS et al., 2004). A IL-13 induz danos nas células epiteliais do intestino (KAWASHIMA et al., 2006, 2011).

As células NK são um subtipo da família de células efetoras hematopoiéticas chamadas de células linfoïdes inatas (ILCs). Essas células foram recentemente identificadas como importantes populações de células inatas em humanos e animais (camundongos) estando envolvidas na manutenção da barreira intestinal, indução da inflamação e regulação da reparação tecidual (LAMKANFI; DIXIT, 2012; GOTO; IVANOV, 2013). As citocinas secretadas pelas ILCs assemelham-se as secretadas pelas células T do sistema imune adaptativo e por isso são consideradas como homólogos inatos dos linfócitos T (WALLACE et al., 2014).

As ILCs são divididas em três grupos1- grupo 1 (ILC1 e NK) são definidas por sua habilidade de produzir citocinas associadas as células Th1 (INF- γ , IL-6, TNF); grupo 2 (células auxiliares naturais) produz citocinas associadas a resposta Th2 (IL-5, IL-6, IL-13, TNF) (FORT et al., 2001; HURST et al., 2002; NEILL et al., 2010); e grupo 3 (células ILC3) é caracterizado por sua habilidade de secretar citocinas associadas aos linfócitos Th17 (IL-17, IL-21 e IL-22) (TAKATORI et al., 2009; MJÖSBERG et al., 2012; SPITS et al., 2013; WALKER; BARLOW; MCKENZIE, 2013).

Respostas anormais das ILCs podem alterar a imunidade intestinal e causar inflamação intestinal (HISAMATSU et al., 2013). Em seres humanos acometidos pela DC, a frequência de ILC1 e ILC3 está elevada quando comparada a sujeitos saudáveis (GEREMIA et al., 2011; FUCHS et al., 2013). Estes achados indicam que ILCs, juntamente com células Th1 e Th17, são

promissores alvos para os tratamentos das doenças inflamatórias intestinais (KURASHIMA; GOTO; KIYONO, 2013).

Os fibroblastos são destacados pelo seu papel na produção da matriz extracelular na patogênese das DII com consequente formação da fibrose tecidual (STALLMACH et al., 1992; PUCILOWSKA; WILLIAMS; LUND, 2000). Essas células são fontes importantes de enzimas proteolíticas responsáveis pela destruição tecidual na inflamação, as metaloproteinases (BAUGH et al., 1999; VON LAMPE et al., 2000). Os fibroblastos devem ser considerados participantes ativos das DII, uma vez que ativados ocasionam o aumento na expressão de moléculas de adesão celular, produção de quimiocinas e consequentemente induz a migração de células T locais (VOGEL et al., 2004).

As plaquetas estão envolvidas em eventos trombóticos que são relativamente comuns em pacientes com DC e RCU (IRVING; PASI; RAMPTON, 2005). Além disso, as plaquetas tem destaque cada vez maior na resposta imunológica por meio do papel amplificatório na imunidade e inflamação, que é em grande parte mediada via ligante CD40-L (WEYRICH; ZIMMERMAN, 2004).

Pacientes com DII apresentam níveis elevados de ligantes CD40-L presentes na circulação sistêmica originados das plaquetas, a partir de sua ativação na microvasculatura intestinal inflamada (DANESE et al., 2003).

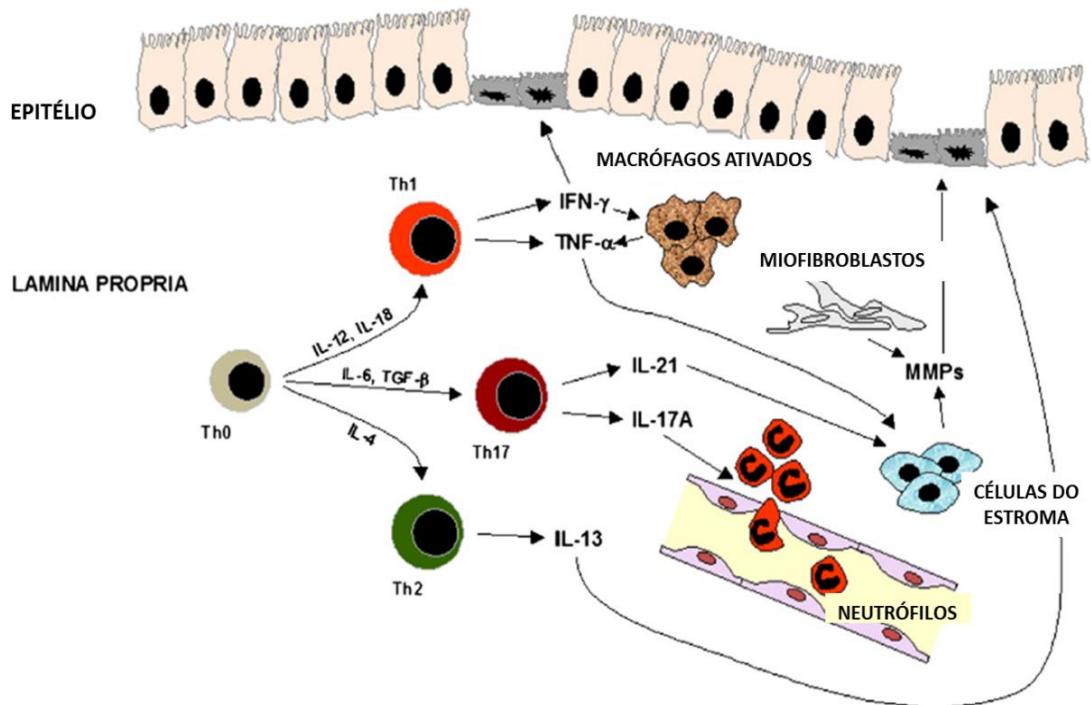
2.4.2.2 Imunidade adaptativa nas DII

O sistema imune adaptativo comprehende os linfócitos (células T e B) que ativados geram respostas efetoras (citocinas e anticorpos). Esse sistema é altamente específico e confere memória ao sistema imunitário (FUSS et al., 2004; WALLACE et al., 2014). As células T *naive* (Th0) podem ser ativadas e diferenciar-se em Th1, Th2 ou Th17 (WALLACE et al., 2014). Normalmente os componentes do sistema imune adaptativo cooperam com outras células e moléculas do sistema inato para obter uma resposta efetiva, capaz de eliminar invasores (patógenos) (GEREMIA et al., 2013).

A disfunção no sistema imune inato induz anormalidades funcionais no sistema imune adaptativo e isto pode levar ao inicio da inflamação e liberação excessiva de citocinas e quimiocinas as quais possuem efeitos patogênicos em células do ambiente local, tanto do sistema inato (macrófagos, células

dendríticas, neutrófilos, epitélio, células endoteliais e elementos do estroma) quanto do adaptativo, reforçando muitas das características do processo inflamatório crônico (DANESE; FIOCCHI, 2011; GEREMIA et al., 2013; WALLACE et al., 2014).

Figura 11 Resposta imune adaptativa no intestino



Fonte: Adaptado de GEREMIA et al., 2014

As células Th1 são tipicamente evocadas em resposta aos patógenos intracelulares. A resposta é coordenada para localizar o agente infeccioso e secretar fatores que promovem apoptose (INF- γ e TNF- α) ou para induzir a diferenciação de linfócitos T citotóxicos. Durante a inflamação intestinal ativa, células Th0 diferenciam-se em células do tipo Th1 sob a ação das interleucinas IL-12/IL-18. As células Th1, por sua vez, produzem grandes quantidades de interferon INF- γ e induzem a produção do fator de necrose tumoral TNF- α . O INF- γ induz a produção de TNF- α a partir dos macrófagos intestinais ativados e desencadeia a apoptose de células epiteliais. O TNF- α promove a diferenciação das células do estroma da lâmina própria em miofibroblastos ativados, que iniciam a produção de grandes quantidades de metaloproteinases da matriz (MMP-degradantes) (GEREMIA et al., 2013)

(Figura 11). A característica marcante de uma resposta Th1 é a formação de granuloma (KOBAYASHI; KANEDA; KASAMA, 2001).

As células Th2 são diferenciadas sob a ação da IL-4. O papel desse tipo celular na mediação de lesões da mucosa na retocolite ulcerativa ainda é pouco esclarecida. Sabe-se que as Th2 são uma importante fonte de IL-13, que aumenta a permeabilidade intestinal e induz a apoptose e a diferenciação dos enterócitos (GEREMIA et al., 2013) (Figura 11).

Recentemente, foi identificado um novo subconjunto de células T, as Th17. Essas células produzem IL-17 e IL-21, ambas são citocinas pró-inflamatórias capazes de promover destruição do tecido local. As células Th17 são ativadas pela combinação da IL-6 e TGF-β e são induzidas a se diferenciar e amadurecer em células secretoras da IL-17 (ZHOU et al., 2007).

Na inflamação intestinal, células Th17 liberam IL-17A, que recrutam neutrófilos para os locais de inflamação ativa, e IL-21, o qual, entre outras ações pró-inflamatórias induz a produção de MMP por células do estroma. As MMPs degradam a matriz extracelular da membrana basal, assim induzindo a apoptose no enterócito (GEREMIA et al., 2013) (Figura 11).

Em pacientes com DII, há forte infiltração de linfócitos T CD4⁺ (Th1, Th2, Th17) para mucosa em resposta ao processo inflamatório e ao aumento da produção de quimioatraentes (DANESE; FIOCCHI, 2011).

A hipótese do equilíbrio entre a resposta Th1 e Th2 foi usada para explicar a patogênese das doenças inflamatórias intestinais. Entretanto, a descoberta das células Th17, que produzem citocinas da família IL-17, tem gerado um novo paradigma, demonstrando que as células Th17 são essenciais para o desenvolvimento das desordens inflamatórias crônicas em seres humanos e animais (HISAMATSU et al., 2013).

Células T obtidas das mucosas de pacientes com Doença de Crohn tem mostrado secretar maiores quantidades de INF-γ e IL-2 que as células de pacientes do grupo controle ou com retocolite ulcerativa (BREESE et al., 1993; NOGUCHI et al., 1995). Além disso, foi demonstrado que células T ativadas de pacientes com retocolite ulcerativa produzem maiores quantidades de IL-5 e possuem células NK atípicas que secretam grandes quantidades de IL-13 em comparação ao pacientes com doença de Crohn (FUSS et al., 2004; HELLER et al., 2005). Portanto, DC foi caracterizada por uma resposta autoimune Th1 enquanto que a colite ulcerativa é considerada uma doença mediada pela

resposta Th2, com excessiva produção de IL-5 e IL-13 (DI SABATINO et al., 2012).

Em condições normais, o número e atividade de células T efetoras são altamente regulados por um organizado sistema que consiste de múltiplos tipos celulares que mantém a homeostase intestinal (KAYAMA; TAKEDA, 2012). As células T regulatórias (Treg) apresentam singular importância para o sistema de defesa imunológica intestinal, pois atua suprimindo a resposta imune. Devido a essas células, os indivíduos saudáveis geralmente não desenvolvem resposta imune frente a抗ígenos da dieta ou da flora comensal (SAKAGUCHI et al., 1995, 2001; KAYAMA; TAKEDA, 2012).

As Treg são caracterizadas pela expressão do fator de transcrição Foxp3, sendo definidas como células T capazes de suprimir a proliferação Th0 *in vitro* e *in vivo* (KAU et al., 2011). Tais células exercem suas funções por produzir citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e TGF-β e por prevenir a ativação e função das células T efetoras que escaparam de outros mecanismos de tolerância (QUINTANA et al., 2008).

A interação das células regulatórias com células apresentadoras de抗ígenos (APC) ocasiona a liberação de IL-10 e TGF-β. Estas citocinas inibem a ativação de células Th1 assim como de macrófagos. Estas citocinas também regulam a ativação da endotelina vascular da mucosa, controlando a resposta inflamatória intestinal (PAVLICK et al., 2002).

A contribuição do sistema imune adaptativo para o desenvolvimento e manutenção das DII tem sido alvo para investigações por muitos anos. Entretanto, a contribuição específica de diferentes subtipos de células T para as lesões intestinais presentes na doença de Crohn e na colite ulcerativa precisam ser melhores esclarecidas (GEREMIA et al., 2013).

2.4.3 Citocinas na patogênese das DII

As citocinas são pequenas proteínas produzidas principalmente pelas células imunes. Tem como principal função facilitar a comunicação, estimular a proliferação de células efetoras específicas contra抗ígeno e mediar a inflamação local e sistêmica usando as vias autócrina, parácrina e endócrina (NEUMAN, 2007; SANCHEZ-MUNOZ; DOMINGUEZ-LOPEZ; YAMAMOTO-FURUSHO, 2008).

As citocinas desempenham um importante papel nas doenças inflamatórias intestinais, porque elas são moléculas fundamentais de sinalização do sistema imunitário do intestino (SANCHEZ-MUNOZ; DOMINGUEZ-LOPEZ; YAMAMOTO-FURUSHO, 2008).

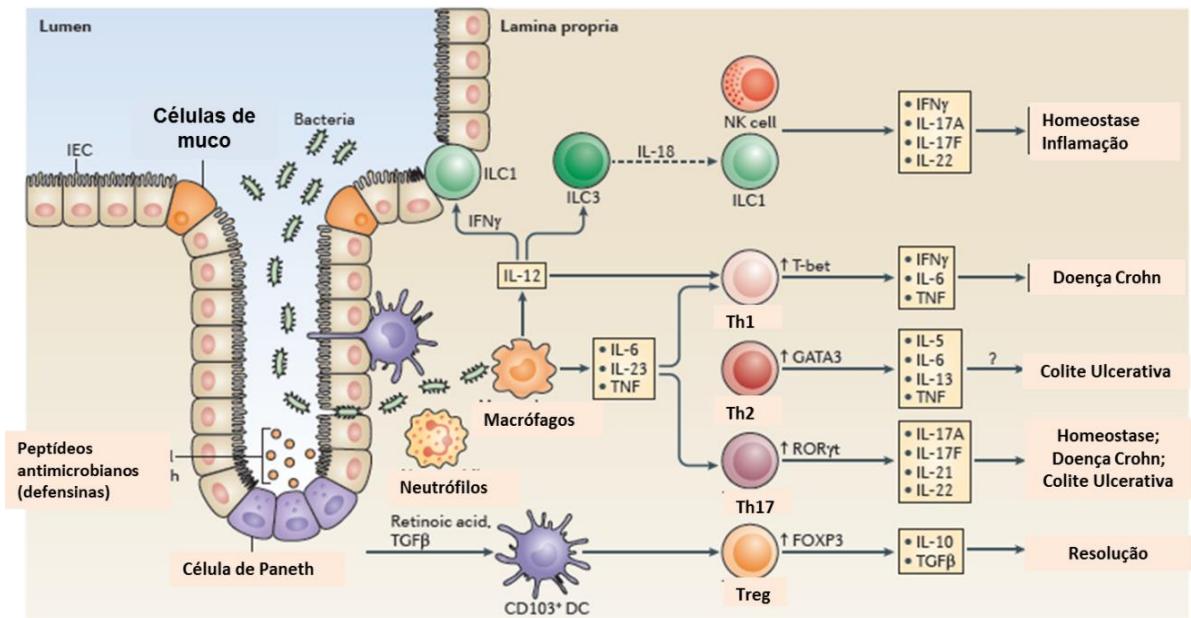
Em pacientes com DII e em modelos experimentais de retocolite, as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias tem mostrado ser produzidas por várias células do sistema imune da mucosa em resposta aos estímulos ambientais, como bactérias e micro-organismos comensais. Em particular, células dendríticas, neutrófilos, macrófagos células *natural killer* (NK), células epiteliais intestinais, células linfoides inatas, células T efetoras (Th1, Th2 e Th17) e células regulatórias (Treg) (Figura 12) (NEURATH, 2014).

O desequilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , INF- γ , IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-13, IL-17, IL-21, IL-22) e as anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) na mucosa regula o desenvolvimento e perpetuação da inflamação na mucosa de pacientes com DII (NEURATH, 2014).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma das citocinas pró-inflamatórias mais importantes que é liberada a partir de macrófagos e células Th1 durante a resposta inflamatória (Figura 12). Essa citocina desempenha um papel importante no modelo de retocolite induzida por TNBS. Provavelmente é o regulador chave da cascata inflamatória neste modelo de DII (CHO et al., 2011).

A secreção de TNF- α induz a hipervascularização e angiogênese, aumento da produção de outras citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e células T, causa alterações na barreira, promove morte das células epiteliais intestinais e células de Paneth. O TNF também promove destruição tecidual por aumentar a produção de metaloproteinases (MMPs) por miofibroblastos e induz resistência das células T a apoptose, via indução dos receptores de TNF e ativação do fator nuclear kB (NF-kB). Anticorpos específicos para TNF podem aliviar as DII por suprimir várias vias pró-inflamatórias (CHO et al., 2011; NEURATH, 2014).

Figura 12 Citocinas na patogênese das DII



Fonte : Adaptado de NEURATH, 2014.

A IL-1 β e IL-6 também são mediadores chave da progressão das doenças inflamatórias intestinais. Foi demonstrado que um antagonista do receptor de IL-1 β suprimiu a infiltração de células inflamatórias para o intestino grosso, a atividade de MPO de células em áreas de edema e a necrose tecidual nos animais com colite experimental aguda (DIONNE et al., 1998 apud HUR et al., 2012).

Na mucosa inflamada, macrófagos e células dendríticas produzem além do TNF- α , citocinas como IL-6 e IL-23 (Figura 12). Essas citocinas ativam células T e proteínas de fase aguda, recrutam células imunes, induz a proliferação de células epiteliais e favorece o crescimento de tumores. A IL-23, em particular, estabiliza o fenótipo de células Th17 (NEURATH, 2014).

Os macrófagos também secretam IL-12 que induz uma diferenciação celular Th1 e uma consequente produção de outras citocinas (IFN γ , IL-6 e TNF- α), além de ativar ILCs. As ILCs, por sua vez, quando ativadas produzem IL-18 que atua sobre as células NK estimulando a produção de IL-17A, IL-17F, IL-22 e IFN γ , o que pode induzir a um quadro inflamatório ou levar a homeostase (Figura 12) (NEURATH, 2014).

A IL-17A, IL-17F e IL-22 liberadas das ICLs ou células Th17 podem apresentar efeitos duplos como homeostase ou inflamação (Figura 12). A IL-22 ativa a produção de peptídeos antimicrobianos pelas células epiteliais tendo um

papel na função de barreira, entretanto, recentemente foi observado o efeito pró-inflamatório dessa citocina o que sugere seu papel multifacetado na inflamação (EKEN et al., 2014). O IFN- γ estimula o processamento de antígenos e causam morte das células epiteliais (NEURATH, 2014).

As Células T da lâmina própria de pacientes com retocolite ulcerativa produzem citocinas características da via Th2 como IL-5 e IL-13 (Figura 12): A IL-13 promove fibrose, causa alterações nas *tight junctions* e induz apoptose, o que leva a ulceração da mucosa (HELLER et al., 2005).

As células Treg suprimem as respostas efetoras das células T e tem sido demonstrado que esse efeito advém da produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β (Figura 12). Essas citocinas são capazes de manter a regulação e ocasionar a resolução da DII. Esses efeitos advêm da indução da via de sinalização STAT3 nas celulas T regulatórias e supressão das citocinas pró-inflamatórias (NEURATH, 2014).

2.4.4 Cicloxygenase-2 (COX-2) e inflamação

A cicloxygenase (COX) e lipoxigenase são enzimas que produzem mediadores diferentes a partir do ácido araquidônico. A via da COX é iniciada por duas enzimas diferentes (COX-1 expressa constitutivamente e a COX-2, induzível), leva a geração de prostaglandinas. Existe um grande interesse na enzima COX-2, pois ela é induzida por vários estímulos inflamatórios e não é encontrada na maioria dos tecidos em condições normais de repouso. Por outro lado, a COX-1 é produzida em resposta a estímulos inflamatórios e também se expressa constitutivamente na maioria dos tecidos (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

As prostaglandinas estão divididas em séries, com base nas características estruturais e identificadas por letras (PGD, PGE, PGF, PGG e PGH). As mais importantes na inflamação são a PGE₂, PGD₂, PGF_{2 α} , PGI₂ (prostacilina) e TXA₂ (tromboxano), cada uma derivada da ação de uma enzima específica em um produto intermediário da via de ativação. Algumas dessas enzimas apresentam uma restrição na distribuição tecidual (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

A isoforma COX-2 é induzida nas células inflamatórias quando são ativadas e são importantes as citocinas inflamatórias primárias- interleucina

(IL)-1 β e TNF- α (RANG et al., 2012). No trato gastrintestinal, as prostaglandinas formadas sob ação da COX-2 são responsáveis pelo processo inflamatório, regulação da adesão leucocitária nos vasos, angiogênese e reparo celular por meio de fatores de crescimento (KONTUREK; KONTUREK; BRZOZOWSKI, 2005).

2.4.5 Epidemiologia

As doenças inflamatórias intestinais são o segundo tipo mais comum de doenças inflamatórias sendo mais frequentes em regiões de latitude norte. Pode afetar indivíduos de qualquer idade, entretanto, são mais comumente diagnosticadas na segunda ou terceira década de vida (BERNSTEIN et al., 2001; BAUMGART; SANDBORN, 2012). Existem relatos que as mulheres são mais frequentemente acometidas que homens (RIEDER et al., 2013). Os homens hispânicos, africanos e americanos são mais acometidos que asiáticos (HOU; EL-SERAG; THIRUMURTHI, 2009).

A maior ocorrência das DII tem sido relatada em países ocidentais, principalmente nos países mais desenvolvidos (Ex: Canadá, 20 e 19 por 100.000 pessoas para DC e RCU, respectivamente) e norte europeu (Ex. Reino Unido, 11 para 100.000 pessoas) (MOLODECKY et al., 2012).

Tem sido relatado o aumento no número de casos em pessoas do continente africano, asiático e latino americano (LOFTUS, 2004). Entretanto, tais doenças continuam a ser menos comuns na maior parte dos países em desenvolvimento (COSNES et al., 2011).

Foram observadas diferenças na incidência de RCU e DC para diferentes grupos étnicos. A RCU tem se apresentado mais frequente que DC em hispânicos e asiáticos, enquanto que na população africana e americana a DC foi mais frequente (HOU; EL-SERAG; THIRUMURTHI, 2009).

A incidência para Doença de Crohn (DC) e Colite Ulcerativa (UC), no mundo, varia de 0,1 a 16 e 0,5 a 25 para 100.000 habitantes, respectivamente (COSNES et al., 2011; MOLODECKY et al., 2012).

Nas últimas duas décadas, foi possível observar mudanças na epidemiologia das DII. As taxas de incidência em áreas tradicionalmente mais afetadas, como Europa Ocidental, tem-se mantido relativamente estáveis ou mesmo com tendência a diminuição, entretanto, tem se tornado mais

prevalente em áreas de baixa incidência, como Ásia e Europa Oriental (LAKATOS et al., 2004; THIA et al., 2008; COSNES et al., 2011; NG et al., 2013; BURISCH et al., 2014)

A causa para essa mudança epidemiológica ainda permanece obscura. Entretanto, mesmo tendo ocorrido às melhorias na utilização de ferramentas para o diagnóstico, essa mudança é provavelmente secundária à influência do estilo de vida, a fatores ambientais e fatores genéticos (NG et al., 2013).

2.4.6 Terapêutica das DII

O tratamento das DII inclui terapia farmacológica, intervenções cirúrgicas e reavaliações no estilo de vida dos pacientes (KESSELRING; STEFAN, 2012). A farmacoterapia é utilizada com o objetivo de combater a exacerbação e evitar a recidiva da doença, entretanto, os procedimentos cirúrgicos estão indicados para casos severos da doença (SOBCZAK et al., 2014).

Existe um crescente número de agentes terapêuticos disponíveis para o tratamento das DII, como decorrência da expansão do conhecimento sobre sua patogênese a exemplo dos derivados dos salicilatos (sulfassalazina), corticosteroides (prednisolona), imunossupressores (azatioprina) e mais recentemente terapias anti-TNF- α utilizadas tanto na Doença de Crohn quanto na Colite Ulcerativa (PALMON; MAYER, 2006).

Os derivados aminosalicilatos são as drogas mais utilizadas por apresentarem potente atividade anti-inflamatória. O primeiro aminosalicilato utilizado foi a sulfassalazina que consiste no ácido 5-aminossalícílico (5-ASA) ligado ao antibiótico sulfapiridina, via uma azo-ligação. Esta ligação é quebrada por enzimas no cólon intestinal. O 5-ASA é liberado e passa a exercer seus efeitos terapêuticos, como inibição da síntese de mediadores inflamatórios derivados do ácido araquidônico (AA) (leucotrienos ou prostaglandina), interleucina-1 e TNF- α (SHANAHAN et al., 1990; MAHIDA et al., 1991) aumenta a produção de IgA e IgG e migração das células inflamatórias para mucosa (LOPEZ; PEYRIN-BIROULET, 2013), além de possuir atividade sequestradora de espécies reativas de oxigênio produzidas no cólon (MCKENZIE; DOE; BUFFINTON, 1999).

A sulfassalazina deve ser usada em pacientes com inflamação no cólon, enquanto que mesalazina e os seus derivados podem ser utilizados para o

tratamento de pacientes com alterações no intestino delgado e grosso (MARSHALL et al., 2010).

Os efeitos colaterais da sulfassalazina ocorrem em 10 a 45% dos pacientes com retocolite ulcerativa e relacionam-se principalmente a fração sulfa. Alguns relacionam a dose, incluindo a cefaleia, náuseas e fadiga. Além disso, pode desencadear reações alérgicas como exantema, febre, hepatite, pneumonia, anemia hemolítica, e supressão da medula óssea (BRUNTON, 2010).

Os corticoides (prednisolona, budesonida e beclometasona), por sua vez, são uma alternativa terapêutica para pacientes que não respondem ao 5-ASA. São indicados para casos leves e moderados da retocolite ulcerativa e doença de Crohn. Essas drogas são hormônios esteroides que se ligam aos receptores citosólicos e que depois translocam-se para o núcleo onde afetam a transcrição de vários genes (SOBCZAK et al., 2014). Isto leva a inibição de vários mediadores inflamatórios como citocinas, leucotrienos, moléculas de adesão e óxido nítrico sintetase. (GIRLICH; SCHOLMERICH, 2012).

Entretanto, o uso contínuo de corticoides está diretamente ligado a uma série de efeitos adversos como diabetes, perdas óssea (tornando necessária a suplementação com vitamina D e cálcio), acne e supressão adrenal (BRUNTON, 2010). Além disso, é relatado que os mesmos não protegem contra recidiva e não promove uma efetiva cicatrização da mucosa, o que é crucial para o controle da inflamação e o restabelecimento das funções fisiológicas do intestino (SOBCZAK et al., 2014).

As drogas imunossupressoras, a exemplo da azatioprina e 6-mercaptopurina (6-MP) são utilizados em pacientes que não respondem aos esteróides e aminosalicilatos (KONDAMUDI et al., 2013). Conhecidas como drogas "poupadoras de esteróides", seu uso permite a interrupção do uso crônico de esteróides em pacientes acometidos. Estudos clínicos têm confirmado a utilidade dos tiopurinas na indução e manutenção da remissão da DC e RCU (PRESENT et al., 1980; GEORGE et al., 1996).

A azatioprina (antimetabólico das purinas) é metabolizada em 6-MP, o qual é convertido em um número de metabólitos incluindo o nucleotídeo 6-tioguanina (6-TG). O efeito terapêutico é devido à inibição da proliferação das células participantes da resposta imune e diminuição na síntese de

prostaglandina, sendo benéficos de 3-6 meses de uso (MALTZMAN; KORETZKY, 2003; THOMAS et al., 2005).

No tratamento das DII também é importante destacar a utilização dos agentes biológicos. Essas drogas imitam moléculas ativas que ocorrem naturalmente no corpo humano, como exemplo pode-se citar o Infliximab. São indicadas para o tratamento da doença de Crohn ativa (moderada a grave) e fistulante (SOBCZAK et al., 2014).

Infliximab é um anticorpo monoclonal contra o TNF- α , que atua por ligação e neutralização do mesmo e indução de apoptose das células T (SCALLON et al., 1995). Pode ser utilizado tanto para terapia de manutenção quanto em episódios críticos da doença, neste caso, sendo necessária a associação com fármacos imunossupressores ou corticóides (CASSINOTTI; TRAVIS, 2009).

Pode-se destacar também o Adalimumabe, um anticorpo anti-TNF que atua por ligação ao TNF- α interferindo na interação da subunidade α com receptores p55 e p75 na superfície celular (PEYRIN-BIROULET et al., 2008). Este fármaco é utilizado para o tratamento de Doença de Crohn (AHLUWALIA, 2012).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os mecanismos antiulcerogênico e anti-inflamatório intestinal do extrato etanólico bruto ou da fase hexânica obtidos das folhas da espécie *Combretum duarteanum* Cambess (Combretaceae) em modelos animais.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito cicatrizante do tratamento crônico com o extrato etanólico bruto ou a fase hexânica obtidos de *Combretum duarteanum* em estômago submetido ao modelo de indução aguda de úlcera;
- Realizar análise histológica e imunohistoquímica do estômago, submetido ao tratamento crônico;
- Avaliar o efeito antiulcerogênico das amostras vegetais em modelo de indução de úlcera no duodeno;
- Elucidar os mecanismos de ação envolvidos na atividade antiulcerogênica em modelos citoprotetor e antioxidante;
- Investigar o efeito anti-inflamatório intestinal das amostras vegetais em modelo que mimetiza a fase aguda da retocolite ulcerativa;
- Estudar o efeito anti-inflamatório intestinal das amostras vegetais em modelo que mimetiza a recidiva da retocolite ulcerativa;
- Avaliar a participação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias;
- Proceder à análise histológica e imunohistoquímica do intestino, submetido ao tratamento crônico.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Local da pesquisa

Os experimentos realizados para a investigação dos mecanismos antiulcerogênicos e do efeito anti-inflamatório intestinal foram desenvolvidos no Laboratório de Farmacologia do Trato Gastrintestinal (LFTGI) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarm) da Universidade Federal da Paraíba sob a orientação da Profa. Dra. Leônia Maria Batista no período de março/2011 a agosto/2014.

As metodologias empregadas na avaliação dos mecanismos cicatrizante (análise histológica e imunohistoquímica), antioxidante e participação das citocinas no efeito anti-inflamatório intestinal das amostras vegetais foram executadas no Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Biologia na UNICAMP, nos Laboratórios de Produtos Naturais e de Morfologia da UNESP-Botucatu, sob a colaboração das Professoras Dra. Alba R. de Sousa Brito, Clélia Akiko Hiruma Lima e Cláudia Helena Pellizzon, respectivamente.

4.1.2 Material botânico

As amostras vegetais utilizadas nos experimentos de investigação dos mecanismos antiulcerogênicos e anti-inflamatória intestinal em animais foram obtidas das folhas da espécie *Combretum duarteanum* Cambess, coletadas no município de Serra Branca, Estado da Paraíba, em 2010. Esta espécie foi identificada pela Dra. Maria de Fátima Agra e uma exsicata encontra-se depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) da UFPB, sob código de identificação M. F. Agra *et al.*, 6767.

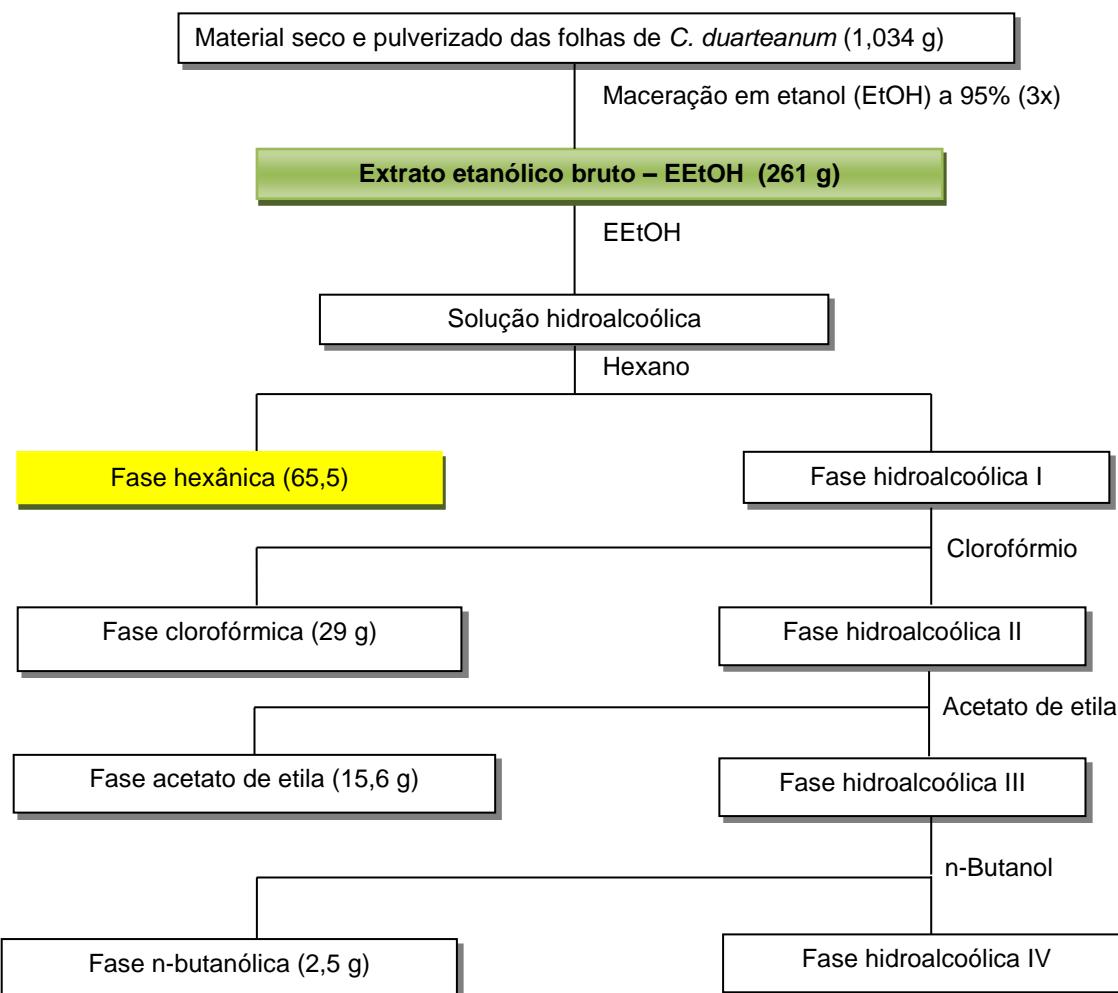
O extrato etanólico bruto (EEtOH-Cd) e a fase hexânica (FaHex-Cd) obtidos das folhas de *Combretum duarteanum* Cambess foram fornecidos pelo colaborador da fitoquímica, Prof. Dr. Josean Fechine Tavares e sua equipe, todos do PgPNSB/UFPB.

4.1.3 Obtenção do extrato etanólico bruto e da fase hexânica de *Combretum duarteanum Cambess*

O material vegetal seco e pulverizado das folhas de *Combretum duarteanum* (1,034 g) foi submetido à maceração exaustiva com etanol (EEtOH) a 95%, resultando numa solução etanólica, a qual foi filtrada e concentrada em um rotaevaporador, obtendo-se o EEtOH-Cd (261 g).

O EEtOH-Cd foi submetido a uma partição líquido-líquido utilizando seguidamente os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol, para obtenção das fases hexânica (65,5 g), clorofórmica (29 g), acetato de etila (15,6 g) e n-butanólica (2,5 g), respectivamente (Figura 13).

Figura 13 Marcha fitoquímica para obtenção do EEtOH e da FaHex obtidos das folhas de *Combretum duarteanum*. (Realizada pelo grupo de pesquisa do professor Dr. Josean Fechine Tavares/PgPNSB/UFPB).



4.1.4 Animais

Os animais utilizados nos modelos experimentais de investigação da atividade antiulcerogênica e mecanismos de ação relacionados e na atividade anti-inflamatória intestinal promovida por *Combretum duarteanum* foram ratos (*Rattus norvegicus*) albinos machos, linhagem Wistar pesando entre 180-250 g, procedentes do Biotério “Prof. Thomas George” do IPeFarM/UFPB. Os animais foram aclimatados às condições do biotério local, por cerca de sete dias, antes dos ensaios experimentais sob temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclos claro-escuro controlado de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração Presence ® tipo pellets e água *ad libitum*.

Para a realização dos experimentos, os animais foram submetidos a um jejum que variou de acordo com o preconizado nas metodologias empregadas. Os animais ($n = 5-9$) foram distribuídos em grupos controle negativo (solução tween 80 12%), controle positivo (droga de referência ou ferramenta farmacológica), grupo Sham (para modelo de úlcera induzida por ácido acético), normal (para modelo de isquemia e reperfusão em ratos) e amostras vegetais testadas (EEtOH-Cd ou FaHex-Cd) em diferentes doses. Nos modelos de investigação da atividade anti-inflamatória intestinal os animais foram divididos nos grupo colíticos (tween 80 12%+TNBS), não-colíticos (Tween 80 12%), EEtOH-Cd ou FaHex-Cd.

Todos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, seguindo os princípios internacionais para o estudo com animais de laboratório (ZIMMERMANN, 1983) e quando necessário, de acordo com o protocolo experimental, foram anestesiados por via intramuscular com 0,04 mL/100 g de cloridrato de xilazina 2% (relaxante muscular) e com 0,08 mL/100 g de cloridrato de cetamina 10% (anestésico), no intuito de diminuir a dor e o sofrimento.

Para a realização deste trabalho, os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal – CEPA/LTF/UFPB com o registro n 1112/10 (ANEXO 1).

4.1.5 Substâncias utilizadas

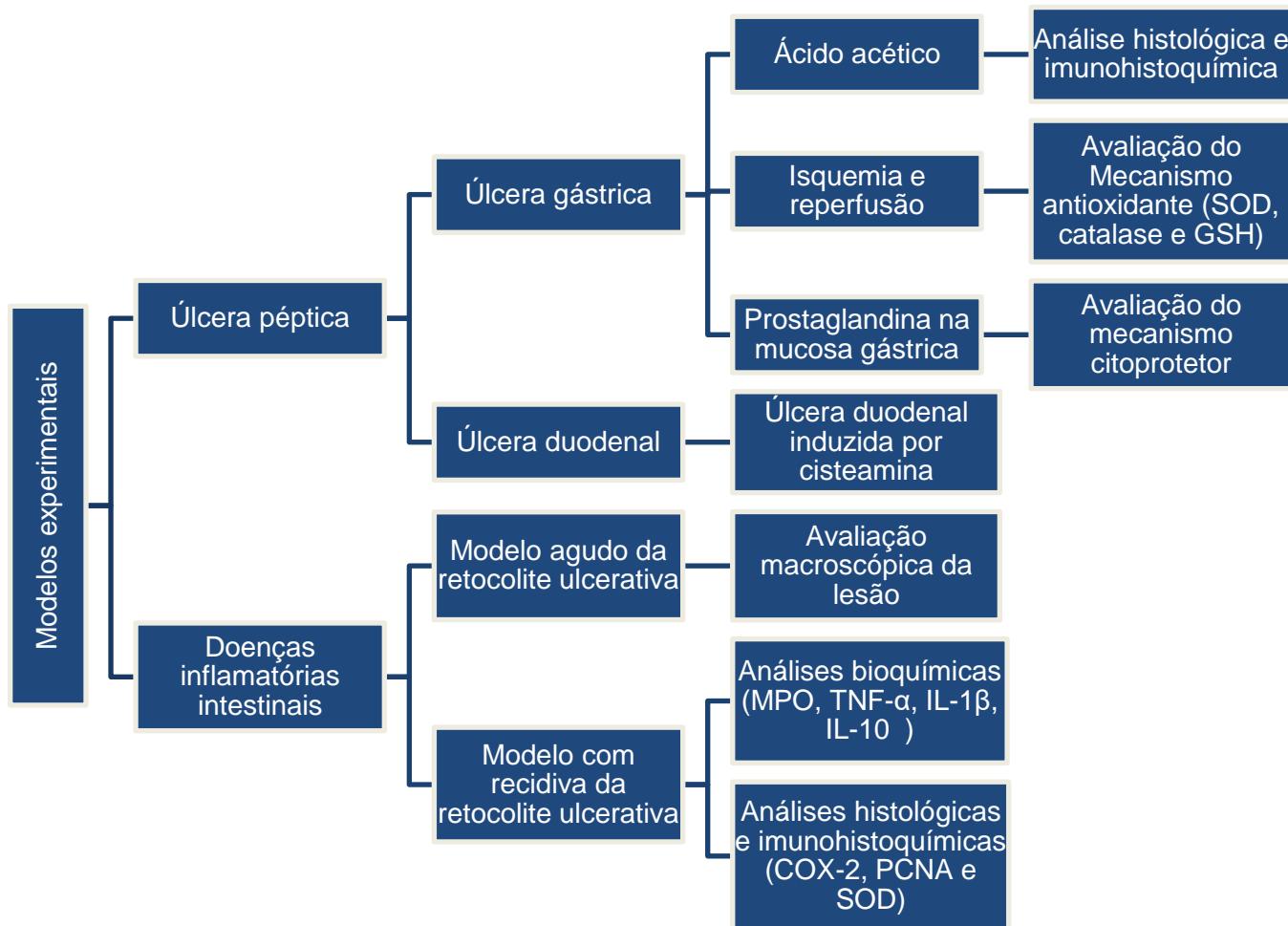
Para a realização dos protocolos experimentais, foram utilizadas as seguintes substâncias: cimetidina (SIGMA-ALDRICH), lansoprazol (SIGMA-ALDRICH), ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) (SIGMA-ALDRICH), ácido acético P.A, indometacina (SIGMA-ALDRICH), quetamina 5% (VETANARCOL), xilazina 2% (DORCIPEC), etanol (MERCK®, Germany), tween 80 (MERCK®, Germany), cloreto de sódio (SIGMA-ALDRICH), hidróxido de sódio (SIGMA-ALDRICH), ácido 5-5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (SIGMA-ALDRICH), ácido 1,3-dietil-2-tiobarbitúrico (SIGMA-ALDRICH), ácido tricloroacético (SIGMA-ALDRICH), brometo hexadeciltrimetilamônio (SIGMA-ALDRICH), cloreto de nitrotetrazólio (SIGMA-ALDRICH), cloreto de o-dianisidina (SIGMA-ALDRICH), cloreto de potássio (SIGMA-ALDRICH), dodecil sulfato de sódio (SIGMA-ALDRICH), glutatona oxidada (SIGMA-ALDRICH), glutatona redutase (SIGMA-ALDRICH), glutatona reduzida (SIGMA-ALDRICH), hipoxantina (SIGMA-ALDRICH), fosfato de β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (SIGMA-ALDRICH), solução de peróxido de hidrogênio e xantina oxidase (SIGMA-ALDRICH).

O EEtOH-Cd e a FaHex-Cd foram solubilizados em solução tween 80 12% e as substâncias utilizadas como controle positivo e ferramentas farmacológicas foram solubilizadas em solução salina 0,9%.

4.2 Métodos

Os métodos utilizados na realização desse trabalho de pesquisa foram desenvolvidos conforme descrito na Figura 14.

Figura 14 Fluxograma do protocolo experimental



4.2.1 Avaliação da atividade cicatrizante do EEtOH-Cd e FaHex-Cd em modelo de indução aguda de úlcera por ácido acético (TAKAGI et al., 1969)

Após jejum de 24 horas, ratos Wistar machos ($n=9$) foram divididos aleatoriamente nos grupos sham, controle negativo (tween 80 12%), controle positivo (cimetidina 100 mg/kg), EEtOH-Cd (250 mg/kg) ou FaHex-Cd (250 mg/kg), anestesiados com cloridrato de xilazina 2% (relaxante muscular) e cloridrato de quetamina 5% (anestésico) e tiveram o abdômen aberto para exposição do estômago. Um tubo plástico de 5,0 mm de diâmetro, com um pellet de algodão inserido no seu interior, foi firmemente colocado em contato com a camada serosa da parede do estômago, para que fosse administrada uma solução de 100 μ L de ácido acético (P.A) por 60 segundos. Após esse tempo, o ácido foi removido completamente com solução salina, para em seguida proceder à sutura do abdômen. Após 48 h da exposição do estômago ao ácido acético, as substâncias para o tratamento foram administradas aos animais por via oral uma vez ao dia durante 14 dias consecutivos. Ao final do tratamento, os animais foram colocados no jejum de 12 horas e eutanasiados por deslocamento cervical e seus estômagos foram removidos e abertos no sentido da grande curvatura, para a determinação da área da lesão ulcerativa - ALU (mm^2), com a ajuda de um paquímetro digital Digimatic (Mitutoyo Corporation da Caliper-Japão) e retirada das amostras para realização das análises morfológicas e imunohistoquímicas.

4.2.1.1 Análises morfológicas

a) Análise histológica (microscopia de luz)

Os estômagos foram fixados em solução de ALFAC (formol 37%; álcool 80%; ácido acético 37%) por 24 horas, em temperatura ambiente. As peças foram desidratadas em etanol, blocadas em parafina e cortadas em micrótomo. Posteriormente foram fixadas em lâminas, para serem submetidas à coloração com hematoxilina e eosina (HE) (BEHMER; TOLOSA; FREITAS-NETO, 1976)

para análise morfológica e ácido periódico de Schiff (PAS) para confirmação da secreção de muco protetor e analisado em microscópio óptico. A análise morfométrica foi realizada por meio de um analisador de imagens Leica Q-WinStandard Versão 3.1.0 (Reino Unido) acoplado ao microscópio Leica DM. A partir das lâminas coradas com hematoxilina e eosina foram realizadas as contagens de células totais por meio da marcação dos núcleos de células intactas em número de campos fixos. A contagem foi realizada com o auxílio do programa AVSoft Bioview® versão 4.0.1.

b) Contagem das células totais

As amostras do estômago foram fixadas com formalina tamponada a 4% e processadas para inclusão em paraplast. Posteriormente as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE). Nos cortes corados com HE foram contadas as células totais da região de lesão para a posterior análise. De cada animal foram fotografados 5 campos aleatórios dentro das definições da área de análise e quantificado, pelo programa AVSoft Bioview® versão 4.0.1, o percentual total de células presentes nessas regiões, totalizando uma área de 3.000.000 μm^2 .

4.2.1.1.1 Imunohistoquímica

Para contagem de vasos, os cortes histológicos foram desparafinizados, re-hidratados e submetidos a recuperação antigênica pelo método do tampão citrato 0,1M em forno de micro-ondas em alta temperatura por 10 minutos. Após a recuperação antigênica, os cortes foram colocados por 1 hora em solução de bloqueio da reação, constituída de leite desnatado a 1%, peróxido de hidrogênio a 3% e soro normal de cabra 1% em solução tampão salina (PBS).

Esses cortes foram lavados em PBS e, posteriormente, incubados com anticorpo primário (anti-VEGF) diluído em solução PBS contendo albumina padrão (BSA 1%) por duas horas em temperatura ambiente. Após essa incubação, os cortes foram lavados com PBS contendo albumina padrão (BSA 1%) e, em seguida, incubados com anticorpo secundário (anti anticorpo primário) e a reação foi revelada com reagentes do kit Vectastain ABC que

compreende Avidina-Biotina associado com 3-3`diaminobenzina tetrahydrochloride (DAB, Sigma). Os resultados foram analisados em microscópio LEICA e as imagens capturadas pelo software Leica Q-Win Standard Versão 3.1.0 Abril de 2004, Reino Unido.

4.2.2 Úlcera gástrica induzida por isquemia e reperfusão (UEDA et al., 1989)

Ratos Wistar machos (n=5-8), pesando 180-250 g, foram mantidos em jejum prévio de 24 h e em seguida submetidos aos tratamentos com EEtOH-Cd (250 mg/kg), FaHex-Cd (250 mg/kg), rutina (200 mg/kg) (controle positivo) ou veículo (controle negativo). Após 30 min, os animais foram anestesiados e submetidos ao procedimento cirúrgico para clampeamento da artéria celíaca. Decorrida meia hora, o “clamp” foi retirado e, então, seguiu-se uma hora de reperfusão. Em seguida, foi realizada a eutanásia, os estômagos retirados, abertos ao longo da grande curvatura e prensados entre placas de vidro para capturar as imagens por meio de câmera digital e posteriormente analisadas no programa AvSoft Bioview® versão 4.0.1, para a quantificação da área de lesão em mm². As porções glandulares dos estômagos foram congeladas em -80 °C até a realização dos ensaios bioquímicos.

4.2.3 Investigação do efeito do EEtOH-Cd e FaHex-Cd sobre às lesões duodenais induzidas por cisteamina em ratos (SZABO, 1978)

Os ratos (n=5-8), pesando entre 180-250 g foram submetidos a um jejum de 3 horas e, posteriormente, tratados oralmente com 5 mL/kg de solução tween 80 12% (veículo), lansoprazol 30 mg/kg (controle positivo), EEtOH-Cd (31,25; 62,5; 125 e 250 mg/kg) ou FaHex-Cd (31,25; 62,5; 125 e 250 mg/kg). Após 1 h desse procedimento, a úlcera duodenal foi induzida por duas administrações orais subsequentes de 5 mL/kg de cisteamina hidroclorídrica (300 mg/kg), uma ferramenta farmacológica que causa lesões com características morfológicas e funcionais semelhantes às do homem, solubilizada em solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9% em intervalo de 4 horas. Os animais foram eutanasiados 24 horas após a primeira indução da lesão. O duodeno foi retirado e aberto na região antimesentérica para obtenção

das imagens e posterior determinação da ALU com auxílio do programa AVSoft Bioview® versão 4.0.1.

4.2.4 Mecanismos de ação envolvidos na gastroproteção

4.2.4.1 Avaliação do mecanismo citoprotetor

4.2.4.1.1 Síntese de prostaglandina na mucosa gástrica (LIRA et al., 2009)

Ratos Wistar machos ($n=5-8$), pesando 18-250g foram colocados em jejum por 24 horas e distribuídos em oito grupos. Conforme o pré-tratamento, 4 grupos receberam veículo e os outros 4 grupos receberam Indometacina 30 mg/kg (v.o.). Após 1 h dessa administração, cada quatro grupos foram tratados por via oral com veículo (Tween 80 12%), misoprostol 50 µg/kg (análogo da prostaglandina) e a melhor dose obtida para o efeito gastroprotetor do EEtOH-Cd ou FaHex-Cd (250 mg/kg). Após 1 hora do tratamento, os ratos receberam 4 mL/kg de etanol (agente lesivo) por via oral. Decorridos mais 60 minutos, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, os estômagos foram retirados, abertos ao longo da grande curvatura e fotografados para quantificação da área de lesão ulcerativa (ALU) utilizando o programa AVSoft Bioview® versão 4.0.1.

4.2.4.2 Avaliação do mecanismo antioxidante

A partir do experimento de indução de úlcera por isquemia e reperfusão em ratos, os estômagos foram retirados, abertos ao longo da grande curvatura, fotografados, cortados em diferentes segmentos, pesados e congelados em temperatura de -80 °C para posterior análise do efeito do EEtOH-Cd e FaHex-Cd sobre o sistema antioxidante.

4.2.4.2.1 Quantificação das proteínas totais (BRADFORD, 1976)

Este método é fundamentado na reação do azul de Coomassie com grupos proteicos, produzindo um complexo colorido que foi analisado em

espectrofômetro a 595 nm. As proteínas totais foram quantificadas para que os dados dos parâmetros analisados posteriormente (SOD, catalase e GSH) fossem expressos em relação à quantidade de proteínas da amostra em miligramas.

4.2.4.2.2 Quantificação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) (WINTERBOURN et al., 1975)

Amostras de estômagos armazenadas do modelo de úlcera gástrica induzidas por isquemia e reperfusão foram utilizadas nas dosagens. As amostras foram homogeneizadas (1:200) em tampão fosfato, centrifugadas (6000 rpm, 4°C por 15 min.) e diluídas em tampão 0,1 M, pH = 7,4, na proporção 1:20. Cerca de 100 µL do homogenato foram adicionados a 150 µL da solução de hipoxantina (0,1 mM), xantina oxidase (0,07 U) e nitrobluetetrazolium (NBT - 0,6 mM). As absorbâncias foram lidas a 560 nm e os resultados foram expressos em U/mg de proteína. O grupo Normal foi incluído no experimento para uma análise comparativa dos parâmetros de normalidade.

4.2.4.2.3 Quantificação da catalase (AEBI, 1984)

Recortes de estômago submetidos a isquemia e reperfusão foram homogeneizados em solução tampão de extração (0,1 M, pH=7,4) e centrifugados (6000 rpm, a 4°C, por 15 minutos). Cerca de 200 µL do sobrenadante foram coletados e a este, adicionado 100 µL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (0,010 mol em tampão fosfato salino, PBS, 0,05 mol a pH 7). A determinação da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 240 nm. A atividade foi expressa em U/mg de proteína.

4.2.4.2.4 Quantificação de grupamentos sulfidrila não protéicos (GSH) (FAURE; LAFOND, 1995)

Para realizar esta determinação foram utilizados recortes de estômagos congelados em temperatura de -80 °C homogeneizados em solução de ácido

tricloroacético (TCA) 5% (p/v). Esses recortes foram automaticamente homogeneizados com auxílio do homogeneizador automático Polytron (Kinematica AG, Lucerne, Suíça). As amostras foram centrifugadas (12000 rpm, a 4 °C, por 15 minutos) e o sobrenadante diluído (1:10) em tampão fosfato de sódio (0, 1 M, pH = 7,4). A seguir, foi realizada a leitura da absorbância de 100 µL da amostra, acrescidos de 100 µL de solução de Tris (1,0 mM) e EDTA (0,02 mM), a 412 nm (A1). Após esta leitura adicionou-se 20 µL de ácido 5,5 ditiobiis (2-nitrobenzóico) diluído em metanol (DTNB - 0,01mM), deixando reagir por 15 minutos para determinação de grupamentos sulfidrila não proteicos (GSH). A concentração de grupamentos sulfidrila (tiol) foi dada por (A1-A2) x 1,57.

4.2.5 Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal

4.2.5.1 Modelo de retocolite ulcerativa

4.2.5.1.1 Investigação do efeito de EEOH-Cd e FaHex-Cd na fase aguda do processo inflamatório intestinal induzido por trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos (MORRIS et al., 1989, modificado)

Ratos Wistar machos (n=5-8), pesando 180-250 g, após jejum de 24 h, foram separados em quatro grupos sendo eles o não colítico, colítico, EEtOH-Cd e FaHex-Cd. Em seguida, anestesiados para administração via retal de TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico) – 10 mg solubilizados em 0,25 mL de etanol 50% v/v. O procedimento de indução de inflamação foi realizado com o auxílio de sonda (2 mm de diâmetro) a qual foi inserida cerca de 8 cm através reto do animal. Após a administração do TNBS, os animais foram mantidos 15 minutos de cabeça para baixo para permitir total absorção do agente indutor administrado. Os animais do grupo não-colíticos foram submetidos aos mesmos procedimentos. Entretanto, não receberam o TNBS via retal.

Cada grupo de ratos foi pré-tratado com veículo (tween 80 12%), EEtOH-Cd (31,25; 62,5; 125; 250 mg/kg) ou FaHex-Cd (31,25; 62,5; 125; 250 mg/kg), 48, 24 e 1 h antes da administração do TNBS/etanol 50%, assim como

24 horas após a indução da colite. Decorridas 48 horas da indução do processo inflamatório, os animais foram eutanasiados e o segmento cólico retirado, aberto, lavado e fotografado para quantificação da área de lesão, escore macroscópico e avaliação do processo inflamatório intestinal. Parâmetros gerais como diarreia e relação peso/comprimento do cólon foram avaliados. As melhores doses obtidas nesse modelo foram utilizadas no modelo crônico com recidiva da colite ulcerativa em ratos.

4.2.5.1.2 Avaliação do efeito do EEOH-Cd e FaHex-Cd na recidiva do processo inflamatório intestinal induzido por trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos (MORRIS et al., 1989, modificado)

Ratos Wistar machos (n= 7-9), pesando 180-250, foram separados em 4 grupos, não colítico, colítico, EEtOH-Cd e FaHex-Cd. Após jejum de 24 h foi realizada a indução da inflamação intestinal com TNBS (10 mg/ 0,25 mL etanol 50% v/v, via retal). 24 h após a indução inicial, os grupos de animais foram tratados oralmente com tween 80 12% (não-colíticos e colíticos), EEtOH-Cd (125 mg/kg) ou FaHex-Cd (62,5 mg/kg). No 14º dia após a primeira indução, foi realizada a segunda administração (recidiva) do TNBS (10 mg/ 0,25 mL etanol 50% v/v, via retal), para mimetizar as recidivas recorrentes nas doenças inflamatórias intestinais em humanos.

Parâmetros gerais como diarreia, consumo de água e ração e peso corpóreo foram verificados diariamente durante todo o período de tratamento. No 21º dia todos os animais foram eutanasiados, o cólon retirado, aberto e lavado para ser submetido a análise das lesões macroscópicas e avaliação do processo inflamatório intestinal, bem como para coleta do material para análises bioquímicas e histológicas. As amostras foram estocadas em -80 °C para avaliação da mieloperoxidase (MPO) e das citocinas envolvidas no processo inflamatório intestinal.

4.2.5.1.3 Parâmetros avaliados na retocolite ulcerativa

O cólon após ser retirado de cada animal foi submetido a uma análise macroscópica inicial sendo avaliados parâmetros como peso, comprimento, severidade da lesão e extensão do dano intestinal de acordo com uma escala descrita previamente por BELL; GALL; WALLACE (1995)(Tabela 2). As amostras colônicas de cada animal foram fotografadas para determinação da área de lesão. Após essa avaliação inicial, o cólon foi seccionado e estocado em -80 °C para a análise de parâmetros bioquímicos.

No modelo crônico com recidiva foram avaliados parâmetros de caráter geral, tais como consumo de alimento, peso corporal e aparecimento de fezes diarreicas.

Tabela 2 Critério de determinação de escore de lesão colônica

Escore	Critério
0	Sem prejuízo (sem úlcera)
1	Hiperemia, sem úlceras
2	Úlcera linear sem inflamação significante
3	Úlcera linear com inflamação em um sítio
4	Dois ou mais sítios de ulceração/inflamação
5	Dois ou mais sítios de ulceração e inflamação ou um sítio de inflamação maior que 1 cm ao longo da extensão do cólon
6-10	Se o prejuízo cobrir mais que 2 cm ao longo da extensão do cólon (o escore é aumentado em 1 ponto para cada centímetro adicional)

Fonte: (BELL; GALL; WALLACE, 1995)

4.2.5.2 Análise morfológica

Segmentos colônicos foram coletados e destinados à microscopia de luz. Para isso, foram fixados em solução de ALFAC por 24 horas a temperatura ambiente. Após esse tempo, as peças foram mantidas em álcool 80% até o momento de montagem dos blocos. As peças foram desidratadas e incluídas em paraplast formando blocos, posteriormente, cortados em 10 µm de

espessura para montagem das lâminas. Essas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para análise morfológica (BEHMER et al., 1976).

4.2.5.3 Quantificação da atividade da mieloperoxidase (MPO) (KRAWISZ; SHARON; STENSON, 1984)

Segmentos de cólon, armazenados sob temperatura de -80 °C foram utilizados nas dosagens da MPO e citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. As amostras foram homogeneizadas no tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (0,5% em tampão fosfato sódico 50 mM, pH 6.0) que atua como detergente, lisando os grânulos dos neutrófilos que contém a mieloperoxidase, sendo esta liberada. A amostra foi centrifugada por 10 minutos a 4 °C. O homogenato foi submetido a um triplo processo de congelamento e descongelamento para facilitar a ruptura das estruturas celulares e consequentemente a liberação da enzima. Numa placa de Elisa, foram colocados 50 µL do sobrenadante de cada amostra e 150 µL de tampão de reação.

Os resultados foram expressos como unidades de mieloperoxidase por grama de tecido, onde 1 unidade de atividade de MPO é definida como aquela que degrada 1 µmol de peróxido de hidrogênio por minuto em 25 °C.

4.2.5.4 Avaliação do envolvimento de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α e IL-1β) e anti-inflamatórias (IL-10)

Os níveis de TNF-α, IL-1β e IL-10 foram determinados a partir de amostras do cólon, congeladas sob temperatura de -80 °C, coletados no modelo de recidiva da retocolite ulcerativa. Para isso, foi utilizado o tampão PBS pH 7.4 (1:5) para homogeneização das amostras. Os tubos com homogenato foram centrifugados a 12000 rpm durante 10 min. Os sobrenadantes foram congelados a -80 °C até o ensaio. Posteriormente, as amostras foram agitadas em banho-maria a 37°C por 20 min. e depois centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min. a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e as citocinas TNF-α, IL-1β e IL-10 foram quantificados usando Kits de dosagem imunoenzimático ELISA (DuoSet®, R&D Systems).

4.2.5.5 Análise imunohistoquímica

Esse protocolo experimental foi realizado conforme metodologia descrita para análise imunohistoquímica em amostras coletadas a partir do modelo de úlcera induzida por ácido acético. As amostras histológicas foram incubadas com anticorpo secundário anti-COX-2 (marcador para avaliar efeito anti-inflamatório), anti-PCNA (marcador de divisão celular, para avaliar potencial de regeneração) e anti-SOD (marcador para avaliar o efeito antioxidante). As células positivamente marcadas foram contadas para as diversas reações imunohistoquímicas em número de campos fixos que por meio de um analisador de imagens Leica Q-Win Standard Versão 3.1.0 (Reino Unido) acoplado ao microscópio Leica DM foram fotografadas e analisadas pelo programa AVSoft Bioview Spectra e Seeker 4.0.

4.3 Análise estatística

Resultados com valores paramétricos (modelos de úlcera gástrica, duodenal, área de lesão inflamatória intestinal e relação peso/comprimento) foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguida por teste de Dunnett ou Tukey e expressos como média \pm desvio padrão (d.p.) da média. Nos ensaios de quantificação das enzimas antioxidantes, mieloperoxidase e citocinas os valores obtidos foram apresentados como média \pm erro padrão da média (e.p.m).

Para valores não paramétricos (escore da inflamação intestinal e imunohistoquímica) foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA, pós-teste de Dunn). Os resultados foram expressos em mediana (mínimo-máximo). Os dados foram analisados com a utilização do software GraphPad Prism 6.0, San Diego, CA, EUA e o nível de significância mínimo foi de $p<0,05$.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da atividade cicatrizante do EEtOH-Cd e FaHex-Cd no modelo de indução de úlcera por ácido acético

5.1.1 Análise morfológica de cortes da área ulcerativa corados com hematoxilina e eosina (HE)

A área ulcerativa gástrica corada com hematoxilina e eosina dos grupos de animais tratados com Tween 80 12%, cimetidina 100 mg/kg, EEtOH-Cd 250 mg/kg ou FaHex-Cd 250 mg/kg está demonstrada na Figura 15. No grupo Sham foi observada a arquitetura da mucosa preservada com organização das glândulas estomacais e as células preservadas. Entretanto, no grupo Tween 80 12% (controle negativo) é possível observar uma ampla dilatação das glândulas estomacais sem preservação da arquitetura celular, assim como, pouca secreção no interior das glândulas. Nos animais tratados com cimetidina (controle positivo) evidencia-se a dilatação das glândulas com uma leve secreção no interior.

Cortes histológicos de estômagos de animais tratados com EEtOH-Cd demonstraram glândulas organizadas com pouca dilatação e presença de secreção no seu interior. Resultados semelhantes foram observados para FaHex-Cd onde as glândulas apresentaram dilatação na base com organização e presença de secreção no interior.

5.1.2 Análise da secreção de muco pela coloração com ácido periódico de Schiff (PAS)

Nos grupos de animais tratados com EEtOH-Cd (250 mg/kg) ou FaHex-Cd (250 mg/kg) foi observada, nas áreas ulcerativas coradas com PAS, intensa coloração no interior das glândulas, em que apresentaram secreção mucoide com maior intensidade quando comparado ao grupo tratado com veículo. Nos animais tratados com cimetidina 100 mg/kg foi observada uma discreta secreção mucoide no ápice das células, conforme visualizado na Figura 16.

Figura 15 Fotomicrografias de cortes histológicos estomacais corados com HE apóis animais serem submetidos à úlcera gástrica crônica induzida com ácido acético 100% e tratados durante 14 dias. **A-** grupo sham, **B-** solução tween 80 12%, **C-** cimetidina 100 mg/kg, **D-EEtOH-Cd** 250 mg/kg, **E- FaHex-Cd** 250 mg/kg. **Linha I-** aumento 10X; **Linha II-** aumento 20X, **Linha III** aumento 40X (* região da borda da lesão aonde as glândulas estomacais encontram-se com dilatação; # a dilatação glandular com intensa secreção; → uma dilatação importante das glândulas; Barra: 50 µm)

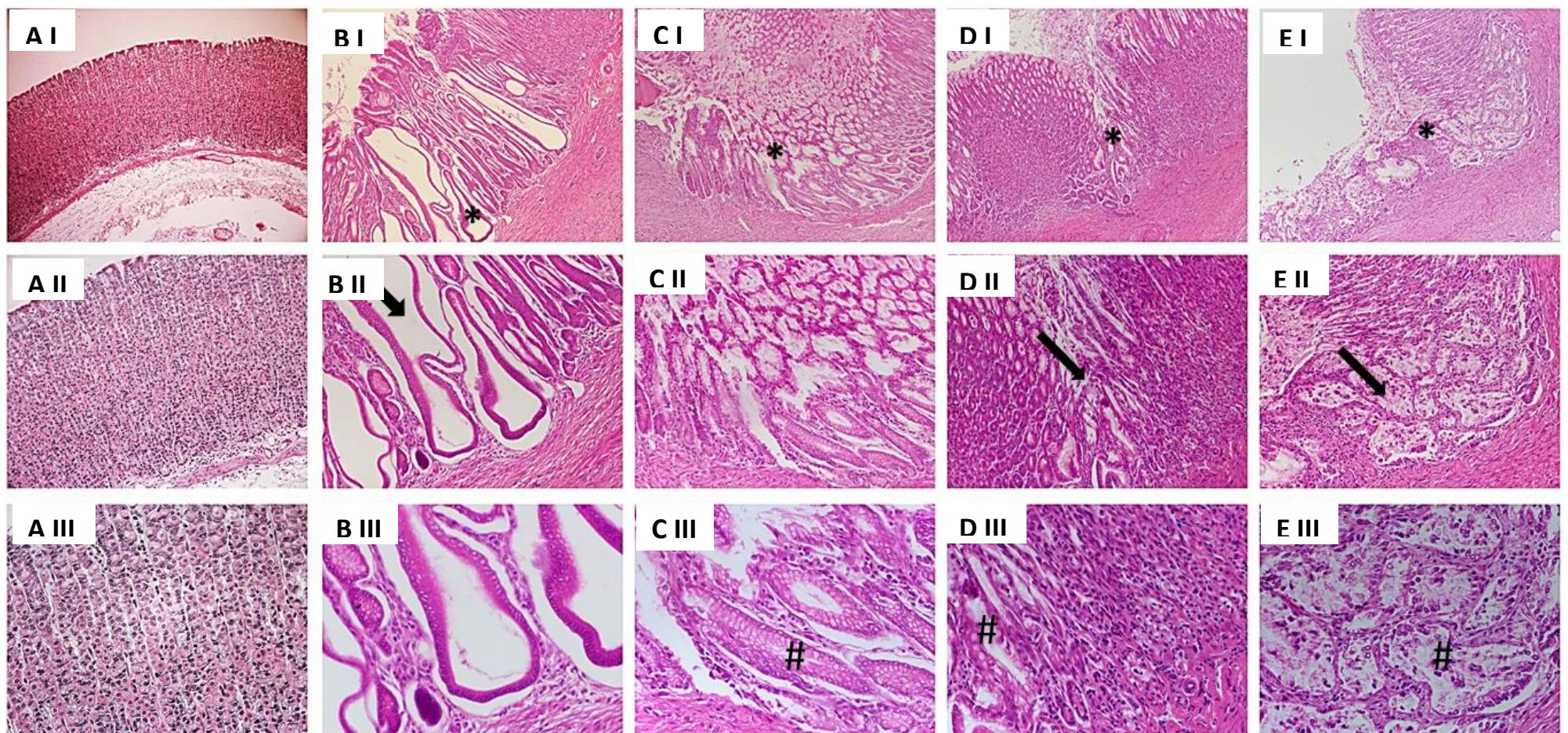
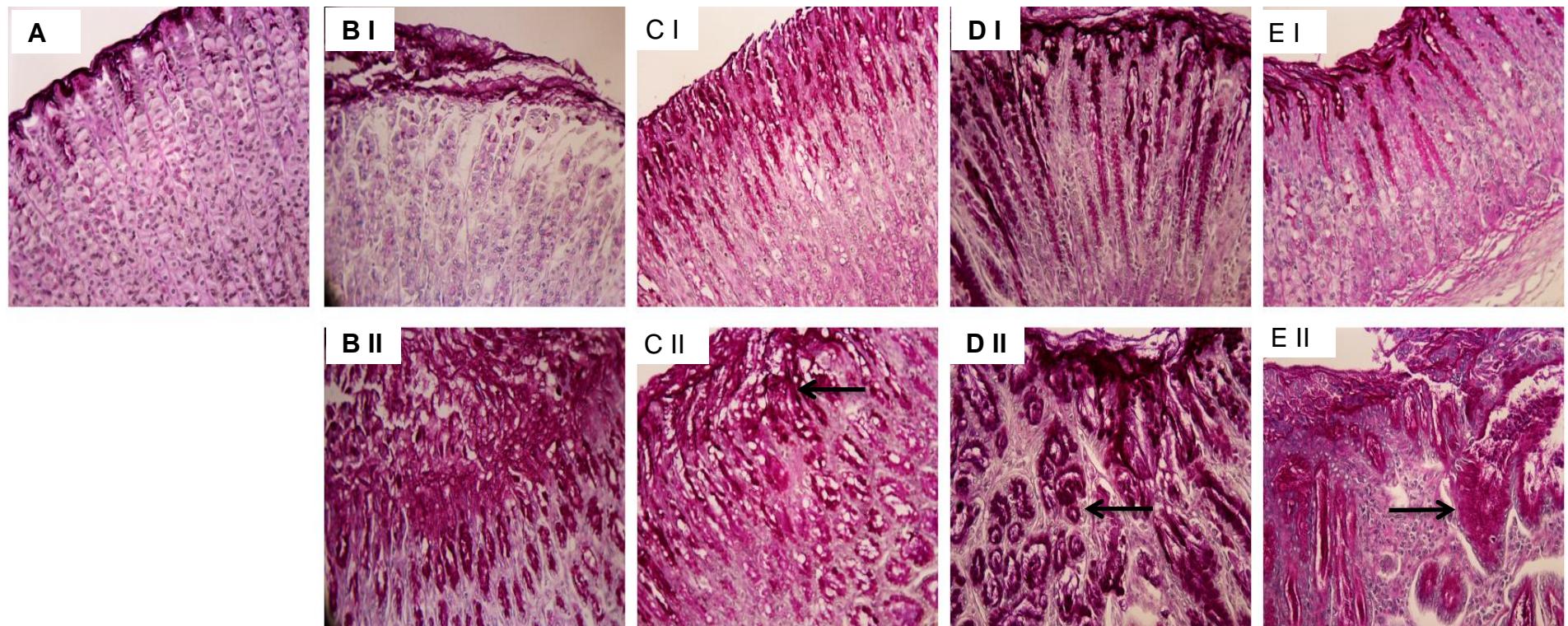


Figura 16 Fotomicrografia de amostras de estômagos dos ratos submetidos à úlcera por ácido acético após 14 dias de tratamento com Cimetidina 100 mg/kg, EEtOH-Cd 250 mg/kg; FaHex-Cd 250 mg/kg, coradas com ácido período de Schiff (PAS). **A**- grupo sham, **B**- solução tween 80 12%, **C**- cimetidina 100 mg/kg, **D**-EEtOH-Cd 250 mg/kg, **E**- FaHex-Cd. **Linha I**- borda não lesionada; **Linha II**- secção da lesão (→ secreção mucoide, Barra: 50 µm)



5.1.3 Percentual de células totais na lesão ulcerativa

De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar o aumento significativo no percentual de células totais na lesão dos animais tratados com EEtOH-Cd 250 mg/kg para 18,3 (13,3 - 31) ($p<0,01$) ou FaHex-Cd 250 mg/kg 17,5 (10,8-19,5) ($p<0,05$) quando comparados ao controle negativo 9,1 (6-11,8) (Tabela 3).

Tabela 3 Percentual de células totais em lesões ulcerativas induzidas por ácido acético em estômagos de ratos tratados com EEtOH-Cd ou FaHex-Cd durante 14 dias

Tratamento	Dose (mg/kg)	Células totais (%)
Tween 80 12%	-	9,1 (6-11,8)
Cimetidina	100	11,1 (9,1- 19)
EEtOH- Cd	250	18,3 (13,3-31)**
FaHex-Cd	250	17,5 (10,8-19,5)*

Os resultados estão expressos como mediana (mínimo-máximo) ($n=3-4$). Análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(3, 14)} = 6,580$; ($p<0,05$), seguido do teste de Kruskal-Wallis, comparado ao controle negativo * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

5.1.4 Quantificação de vasos sanguíneos

Os resultados obtidos nessa avaliação demonstraram que o tratamento com EEtOH-Cd 250 mg/kg aumentou significativamente o número de vasos sanguíneos para 13 (10,8-14,4) ($p<0,01$) quando comparado ao controle negativo 5,8 (5,0-6,2). Entretanto, não foram observadas alterações para cimetidina 100 mg/kg 6,0 (5,2-7,2) e FaHex-Cd 5,8 (3,8-6,8) (Tabela 4).

Tabela 4 Número de vasos sanguíneos em estômagos de ratos ulcerados com ácido acético e tratados com EEtOH-Cd ou FaHex-Cd durante 14 dias

Tratamento	Dose (mg/kg)	Nº de vasos
Tween 80 12%	-	5,8 (5,0-6,2)
Cimetidina	100	6,0 (5,2-7,2)
EEtOH- Cd	250	13 (10,8-14,4)**
FaHex-Cd	250	5,8 (3,8-6,8)

Os resultados estão expressos como mediana (mínimo-máximo) ($n=3-4$). Análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(3, 14)} = 6,580$; ($p<0,05$), seguido do teste de Kruskal-Wallis, comparado ao controle negativo ** $p<0,01$.

5.2 Úlcera gástrica induzida por isquemia e reperfusão

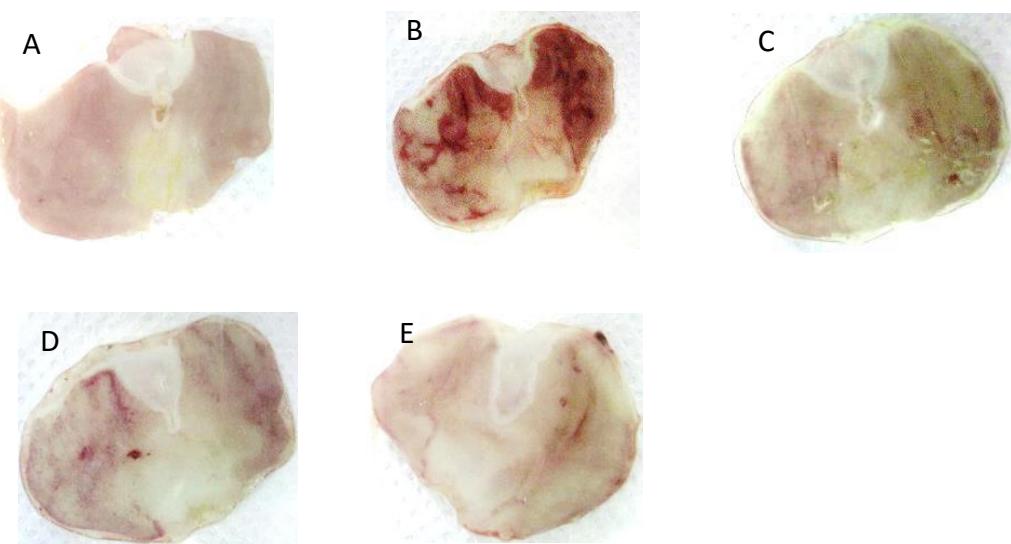
De acordo com os resultados obtidos no modelo de isquemia e reperfusão em ratos, foi possível observar que o tratamento dos animais com EEtOH-Cd, FaHex-Cd ou rutina (controle positivo) reduziu significativamente a área de lesão ulcerativa, nas doses avaliadas para $62 \pm 4,6$ ($p<0,01$), 49 ± 19 ($p<0,001$), $28 \pm 9,6$ ($p<0,001$), respectivamente, o que equivale a 53%, 63% e 79% quando comparadas ao controle negativo (123 ± 40). Esses resultados estão expressos na Tabela 5 e podem ser visualizados na Figura 17.

Tabela 5 Efeitos da administração oral do EEtOH-Cd, FaHex-Cd ou rutina nas lesões gástricas induzidas por isquemia e reperfusão em ratos

Tratamento	Dose (mg/Kg)	ALU	Inibição (%)
Normal	-	-	100
Tween 80 12%	-	123 ± 40	-
Rutina	200	$28 \pm 9,6$ ***	79
EEtOH- Cd	250	$62 \pm 4,6$ **	53
FaHex-Cd	250	49 ± 19 ***	63

Os resultados estão expressos como média \pm d.p ($n=5-8$). Análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(3, 17)} = 24,65$; ($p<0,05$), seguido do teste de Dunnett, comparado ao controle negativo ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. ALU= Área de Lesão Ulcerativa.

Figura 17 Estômagos de ratos em modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão dos grupos Normal (A), tween 80 12% (B) Rutina (C), EEtOH-Cd (D), FaHex-Cd (E).



5.3 Investigação do efeito de EEtOH-Cd e FaHex-Cd sobre às lesões duodenais induzidas por cisteamina em ratos

De acordo com os resultados obtidos no modelo de úlcera duodenal induzida por cisteamina em ratos, foi possível observar que o tratamento oral dos animais com EEtOH-Cd nas doses de 31,25; 62,5 ou 125 mg/kg reduziu significativamente a área de lesão ulcerativa ($1,3 \pm 0,5$, $p<0,01$; $1,0 \pm 0,3$, $p<0,001$ e $0,8 \pm 0,2$, $p<0,001$, respectivamente), quando comparados ao controle negativo ($4,0 \pm 1,7$), equivalendo a uma inibição de 68%, 76% e 81%, conforme apresentado na Tabela 6.

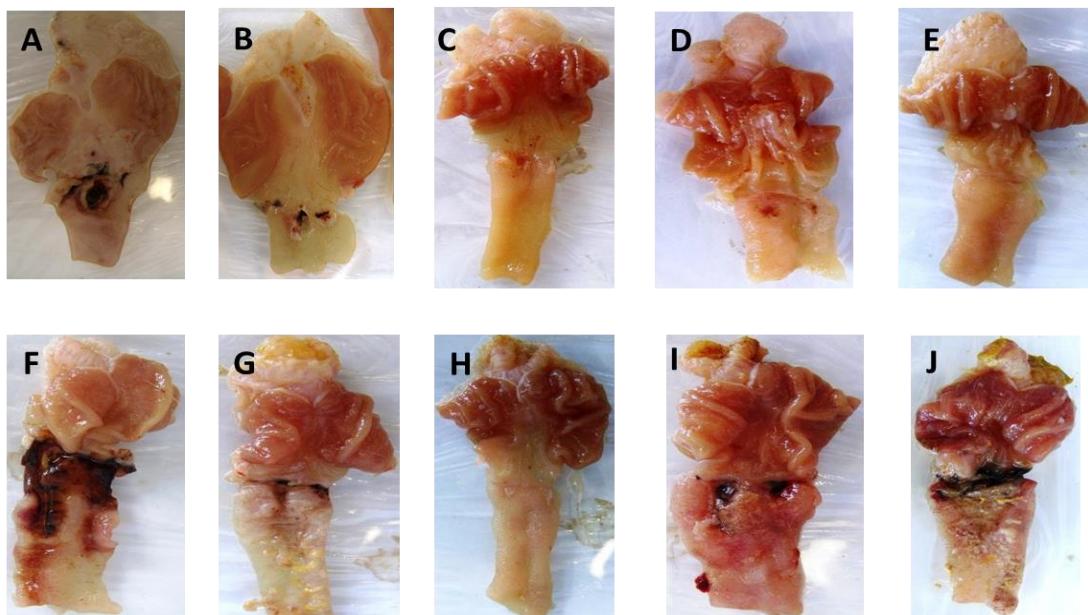
Com relação à FaHex-Cd foi observado que nas doses 31,25 e 62,5 mg/kg ocorreu uma redução significativa da área de lesão ulcerativa para $1,6 \pm 0,7$, $p<0,01$ (60%) e $0,7 \pm 0,2$, $p<0,001$ (82%), respectivamente, quando comparados ao controle negativo ($4,0 \pm 1,7$) (Tabela 6). Esses resultados podem ser visualizados na Figura 18.

Tabela 6 Efeitos da administração oral do EEtOH-Cd, da FaHex-Cd e do Lansoprazol nas lesões duodenais induzidas por cisteamina em ratos

Tratamento	Dose (mg/Kg)	ALU	Inibição (%)
Tween 80 12%	-	$4,0 \pm 1,7$	-
Lansoprazol	30	$1,3 \pm 0,6^{**}$	68
EEtOH-Cd	31,25	$1,3 \pm 0,5^{**}$	68
	62,5	$1,0 \pm 0,3^{***}$	76
	125	$0,8 \pm 0,2^{***}$	81
	250	$5,5 \pm 2,4$	-
FaHex-Cd	31,25	$1,6 \pm 0,7^{**}$	60
	62,5	$0,7 \pm 0,2^{***}$	82
	125	$2,2 \pm 0,8$	46
	250	$2,3 \pm 0,8$	43

Os resultados estão expressos como média \pm d.p (n=5-8). Análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(9, 47)} = 12,22$; ($p<0,05$), seguido do teste de Dunnett, comparado ao controle negativo ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. ALU= Área de Lesão Ulcerativa

Figura 18 Duodenos de ratos em modelo de indução de úlcera por cisteamina hidroclorídrica e tratados com Tween 80 12% (A), Lansoprazol 30 mg/kg (B), EEtOH-Cd 31,25 mg/kg (C), EEtOH-Cd 62,5 mg/kg (D), EEtOH-Cd 125 mg/kg (E), EEtOH-Cd 250 mg/kg (F), FaHex-Cd 31,25 mg/kg (G), FaHex-Cd 62,5 mg/kg (H), . FaHex-Cd 125 mg/kg (I), FaHex-Cd 250 mg/kg (J).



5.4 Mecanismos de ação envolvidos na gastroproteção

5.4.1 Avaliação do mecanismo citoprotetor

5.4.1.1 Síntese de prostaglandina na mucosa gástrica

Os resultados obtidos no modelo que investigou a participação da prostaglandina na proteção gástrica induzida por EEtOH-Cd (250 mg/kg) e FaHex-Cd (250 mg/kg), demonstraram que os grupos pré-tratados com veículo (Tween 80 12%) e depois tratados com Misoprostol ($36 \pm 12,6$, $p<0,001$), EEtOH-Cd ($119,6 \pm 41,0$ $p<0,05$) ou FaHex-Cd ($88 \pm 36,0$ $p<0,001$), apresentaram uma redução significativa da área de lesão ulcerativa (ALU) em 81%, 35% e 52%, respectivamente, quando comparado ao controle negativo ($184,6 \pm 36,6$) conforme demonstrado no Gráfico 1.

Quando foi avaliado o grupo pré-tratado com Indometacina (anti-inflamatório não esteroidal) e tratado com misoprostol ($136,1 \pm 44,5$, $p<0,001$) foi observada exacerbação significativa da ALU ($p<0,001$) quando comparado ao grupo de mesmo tratamento oral e pré-tratado com veículo. Entretanto, o

tratamento com EEtOH-Cd ($117,5 \pm 44$, $p<0,001$) ou FaHex-Cd (107 ± 18 , $p<0,001$) não exacerbaram significativamente a ALU quando comparados aos seus respectivos grupos de mesmo tratamento oral ($p>0,05$) (Gráfico 1). Estes resultados podem ser melhor visualizados na Figura 19.

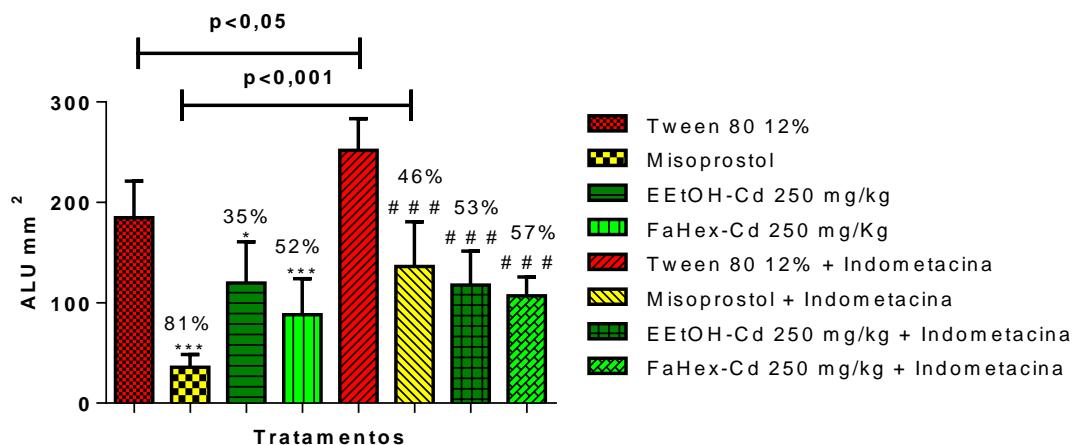
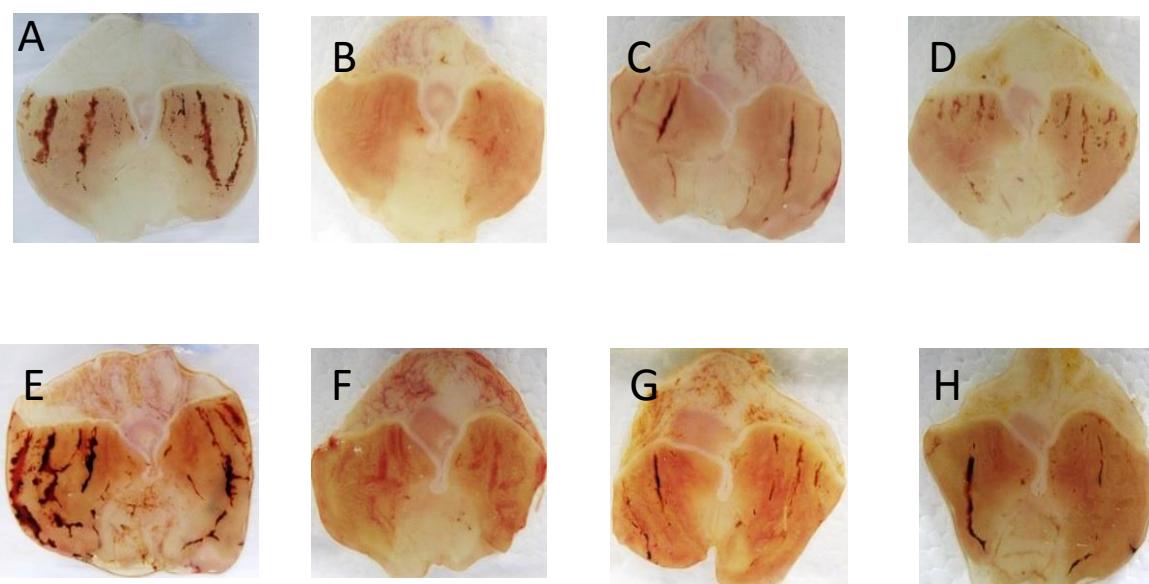


Gráfico 1 Efeito da administração oral do EEtOH-Cd, FaHex-Cd ou Misoprostol em úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com Indometacina. Resultados expressos como média \pm desvio padrão ($n=5-7$). ANOVA $F_{(3, 20)} = 22,24$ / $F_{(3, 22)} = 28,52$ ($p<0,05$), seguido do teste de Dunnett * $p<0,05$, *** $p<0,001$ comparando-se ao grupo tween 80 12% ou # # # $p<0,001$ comparando-se ao grupo tween 80 12% + Indometacina; teste de Tukey-Kramer, comparando os grupos que receberam o mesmo tratamento $p< 0,001$. ($n=5-8$).

Figura 19 Estômagos de ratos ulcerados por etanol absoluto ou etanol/indometacina tratados oralmente com Tween 80 12% (A) Misoprostol (B), EEtOH-Cd (C) ou FaHex-Cd (D), Tween 80 12%+Indometacina (E), Misoprostol+Indometacina (F), EEtOH-Cd+Indometacina (G), FaHex-Cd+Indometacina (H)



5.4.2 Avaliação dos mecanismos antioxidantes

5.4.2.1 Quantificação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

Foi avaliado o efeito do EEtOH-Cd (250 mg/kg) ou FaHex-Cd (250 mg/kg) sobre a atividade da SOD, utilizando como controle positivo a rutina, um flavonoide como padrão antioxidante. Os resultados obtidos neste experimento demonstraram aumento significativo da atividade da SOD no controle negativo (Tween 80 12%) para $5,6 \pm 0,6$ ($p<0,001$) quando comparado ao grupo Normal ($2,8 \pm 0,2$). O tratamento dos animais com rutina, EEtOH-Cd 250 mg/kg ou FaHex-Cd 250 mg/kg reduziu a atividade da SOD para $3,7 \pm 0,3$ ($p<0,05$), $3,05 \pm 0,3$ ($p<0,001$) e $3,0 \pm 0,4$ ($p<0,001$), respectivamente, quando comparado ao controle negativo ($5,4 \pm 0,6$). Estes resultados estão expressos no Gráfico 2

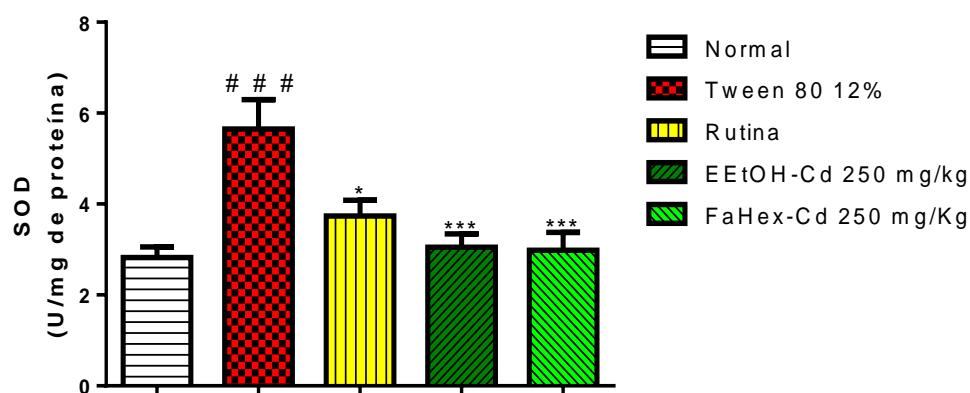


Gráfico 2 Efeito da administração oral do veículo, rutina, EEtOH-Cd ou FaHex-Cd sobre os níveis da superóxido dismutase (SOD) na mucosa gástrica de ratos sob isquemia e reperfusão. Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m Análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(4, 26)} = 7,9$ ($p<0,05$), seguido do teste de Dunnett * $p<0,05$, e *** $p<0,001$ comparando-se ao grupo solução tween 80 a 12%; #, #, # $p<0,001$ comparado ao grupo normal ($n=5-8$).

5.4.2.2 Quantificação da Catalase

No modelo de isquemia e reperfusão observou-se redução significativa da Catalase no controle negativo (Tween 80 12%) ($2,8 \pm 0,1$, $p<0,001$) quando comparado ao grupo Normal ($4,8 \pm 0,6$). O tratamento com rutina, EEtOH-Cd ou FaHex-Cd, por sua vez, aumentou significativamente os níveis da Catalase

para $3,3 \pm 0,2$ ($p<0,05$), $5,0 \pm 0,3$ ($p<0,001$) e $4,4 \pm 0,4$ ($p<0,01$), respectivamente, quando comparado ao grupo controle negativo ($2,8 \pm 0,1$). Estes resultados estão expressos no Gráfico 3.

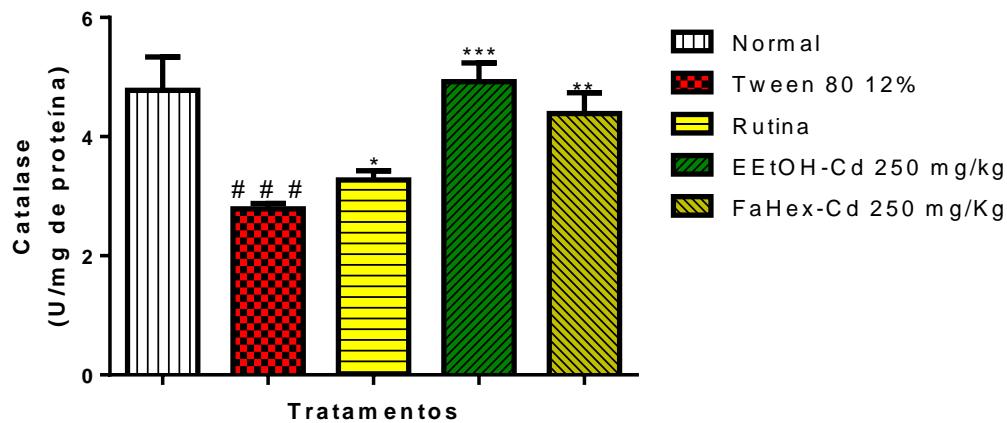


Gráfico 3 Efeito da administração oral do veículo, rutina, EEtOH-Cd ou FaHex-Cd sobre os níveis de catalase na mucosa gástrica de ratos sob isquemia e reperfusão. Os resultados estão expressos como média \pm e.p. Análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(4, 22)} = 9,0$. ($p<0,05$), seguido do teste de Dunnett e test t * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ comparando-se ao grupo solução tween 80 a 12%; # $p<0,001$ comparado ao grupo Normal ($n=5-8$).

5.4.2.3 Quantificação dos grupamentos sulfidrilas não-proteicos (GSH)

De acordo com os resultados obtidos foi observada diminuição significativa dos níveis da GSH no controle negativo ($4.494 \pm 162,5$, $p<0,001$) quando comparado ao grupo Normal (11.472 ± 839). Entretanto, os grupos tratados com Rutina, EEtOH-Cd ou FaHex-Cd aumentaram significativamente esses níveis (8.712 ± 1.109 , $p<0,05$; 9.280 ± 1.491 , $p<0,01$ e $10.820 \pm 482,4$, $p<0,001$, respectivamente) quando comparados ao grupo controle negativo ($4.494 \pm 162,5$). Os resultados estão expressos no Gráfico 4.

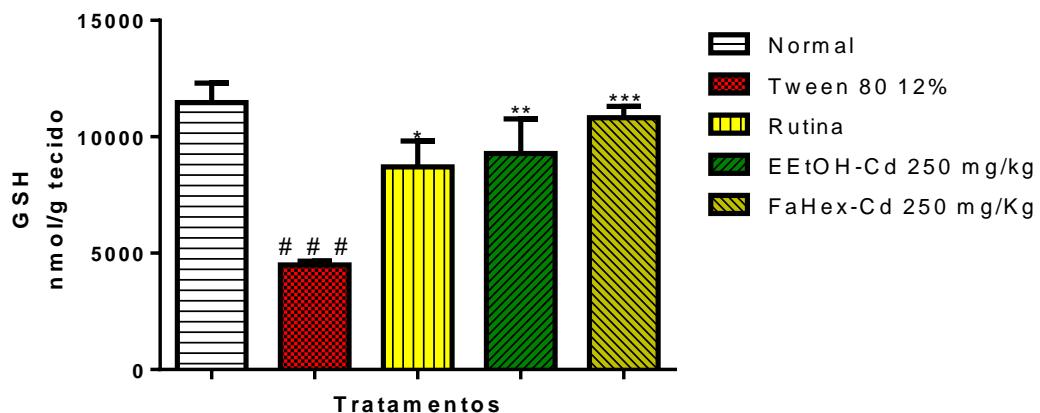


Gráfico 4 Efeito da administração oral do veículo, rutina, EEtOH-Cd ou FaHex-Cd sobre os níveis de GSH na mucosa gástrica de ratos sob isquemia e reperfusão. Os resultados estão expressos como média \pm e.p. Análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(4, 22)} = 7,5$ ($p<0,05$), seguido do teste de Dunnett * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ comparando-se ao grupo solução tween 80 a 12%; ### $p<0,001$ comparado ao grupo Normal ($n=5-8$).

5.5 Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal

5.5.1 Modelo de retocolite ulcerativa

5.5.1.1 Investigação do efeito do EEOH-Cd e FaHex-Cd na fase aguda do processo inflamatório intestinal induzido por trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos

Nesse modelo experimental pode-se observar redução significativa da área de lesão ulcerativa intestinal de ratos tratados com EEtOH-Cd nas doses de 62,5 e 125 mg/kg (46 ± 12 , $p<0,01$ e 19 ± 8 , $p<0,001$ respectivamente) quando comparados aos animais do grupo colítico (107 ± 38). Na avaliação experimental do efeito da FaHex-Cd, foi observada redução significativa nas doses de 31,25 e 62,5 mg/kg para 52 ± 18 ($p<0,01$) e 21 ± 7 ($p<0,001$), respectivamente, quando comparados aos animais colíticos (101 ± 45) (Tabela 7).

Quanto ao escore de lesão, o EEtOH-Cd nas doses de 62,5 e 125 mg/kg, reduziram significativamente os valores para 4,0 (1-5) ($p<0,05$) e 3,0 (2-5) ($p<0,01$), respectivamente, comparado ao controle colítico 6 (5-7). FaHex-Cd 31,25 e 62,5 mg/kg reduziram significativamente para 5,0 (1-6) ($p<0,05$) e 5,0

(4-5) ($p<0,01$), respectivamente, comparado ao grupo colítico 7 (5-8) (Tabela 7).

Foi observado ainda aumento significativo na relação peso/comprimento do grupo colítico (148 ± 17 , $p<0,001$; 154 ± 27 , $p<0,001$) quando comparado ao não-colítico (110 ± 8 ; 102 ± 14 , respectivamente). Os tratamentos com diferentes doses do EEtOH-Cd (31,25; 62,5; 125 e 250 mg/kg) não reduziram (152 ± 19 ; 146 ± 19 ; 134 ± 5 e 152 ± 14 , respectivamente) esse parâmetro em comparação ao controle colítico (148 ± 17). No entanto, o tratamento com FaHex-Cd na dose de 62,5 mg/kg reduziu significativamente essa relação para 129 ± 20 ($p<0,05$), comparado ao seu respectivo controle colítico (154 ± 27) (Tabela 7).

A administração do TNBS promoveu índice de 100% no acometimento de diarreia nos animais colíticos. O EEtOH-Cd na dose de 125 mg/kg reduziu significativamente o acometimento de diarreia para 14%. Para FaHex-Cd, o tratamento na dose de 62,5 mg/kg reduziu significativamente para 29% ($p<0,05$) quando comparados ao seu respectivo controle colítico (87%) (Tabela 7).

Intestinos de ratos colíticos, não colíticos e tratados com as diferentes doses testadas do EEtOH-Cd ou FaHex-Cd no modelo, podem ser visualizados na Figura 20 e na Figura 21, respectivamente.

Tabela 7 Efeitos da administração oral do EEtOH-Cd ou FaHex-Cd na fase aguda do processo inflamatório intestinal induzido por trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos

Grupos	Dose (mg/kg)	ALU (mm ²)	Inibição (%)	Escore de lesão	Peso/comprimento. (mg/cm)	Diarréia (%)
Não-colíticos	-	-	100		110 ± 8	0
Colíticos	-	107 ± 38	-	6,0 (5-7)	148 ± 17 ^{# ##}	100
EEtOH-Cd	31,25	79 ± 31	26	5,0 (3-7)	152 ± 19 ^{# ##}	100
	62,5	46 ± 12 ^{**}	57	4,0 (1-5)*	146 ± 19 ^{# ##}	57
	125	19 ± 8 ^{***}	82	3,0 (2-5)**	134 ± 5 [#]	14**
	250	76 ± 23	29	6,0 (4-7)	152 ± 14 ^{# ##}	85,7
Não-colíticos	-	-	-		102 ± 14	0
Colíticos	-	101 ± 45	-	7,0 (5-8)	154 ± 27 ^{# ##}	87
FaHex-Cd	31,25	52 ± 18 ^{**}	49	5,0 (1-6)*	142 ± 20 ^{# #}	87
	62,5	21 ± 7 ^{***}	79	5,0 (4-5)**	129 ± 20*	29*
	125	95 ± 33,	7	6,0 (5-6)	154 ± 10 ^{# ##}	71
	250	80 ± 12	22	5,0 (4-7)	155 ± 16 ^{# ##}	86

Resultados expressos em média ± d.p ou em mediana (mínimo-máximo) dos parâmetros analisados (n=5-8). Para os dados paramétricos foi utilizado média ± d.p. ANOVA e teste *a posteriori* de Dunnet. Para os dados não paramétricos (mediana, mínimo-máximo) Kruskall Walis e teste *a posteriori* de Dunn. * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001 comparado ao grupo colítico; # p < 0,05, # # p < 0,01 e # # # p < 0,001, comparado ao grupo não-colítico .

Figura 20 Fotos de intestinos de ratos não-colíticos (A) Colíticos (B), EEtOH-*Cd* 31,25 mg/kg (C), EEtOH-*Cd* 62,5 mg/kg (D), EEtOH-*Cd* 125 mg/kg (E), EEtOH-*Cd* 250 mg/kg (F).

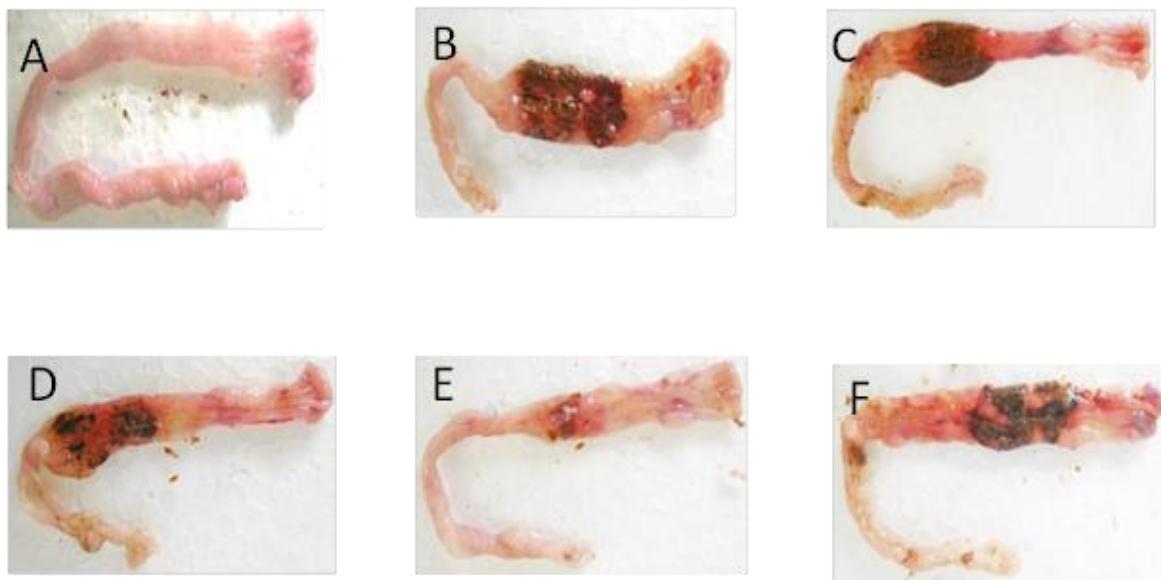
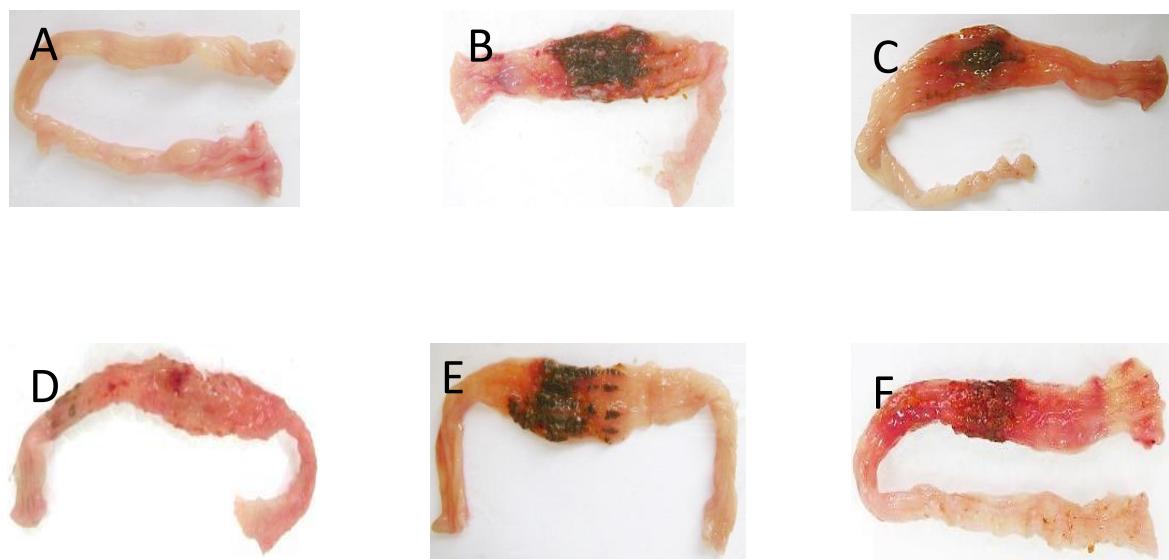


Figura 21 Fotos de intestinos de ratos não-colíticos (A) Colíticos (B) FaHex-*Cd* 31,25 (C), FaHex-*Cd* 62,5 (D), FaHex-*Cd* 125 mg/kg (E), FaHex-*Cd* 250 mg/kg (F).



5.5.2 Avaliação do efeito do EEtOH-Cd e FaHex-Cd na fase crônica com recidiva do processo inflamatório intestinal induzido por trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos

Foi possível observar redução significativa no escore de lesão macroscópico tanto para EEtOH-Cd (125 mg/kg) quanto para FaHex-Cd (62,5 mg/kg) para 1,0 (1-4) ($p<0,05$) e 1,0 (1-4) ($p<0,01$), respectivamente, comparado ao controle colítico 4,0 (3-6). Além disso, as amostras vegetais testadas reduziram o acometimento pela diarreia em 56% quando comparados aos animais colíticos (94%).

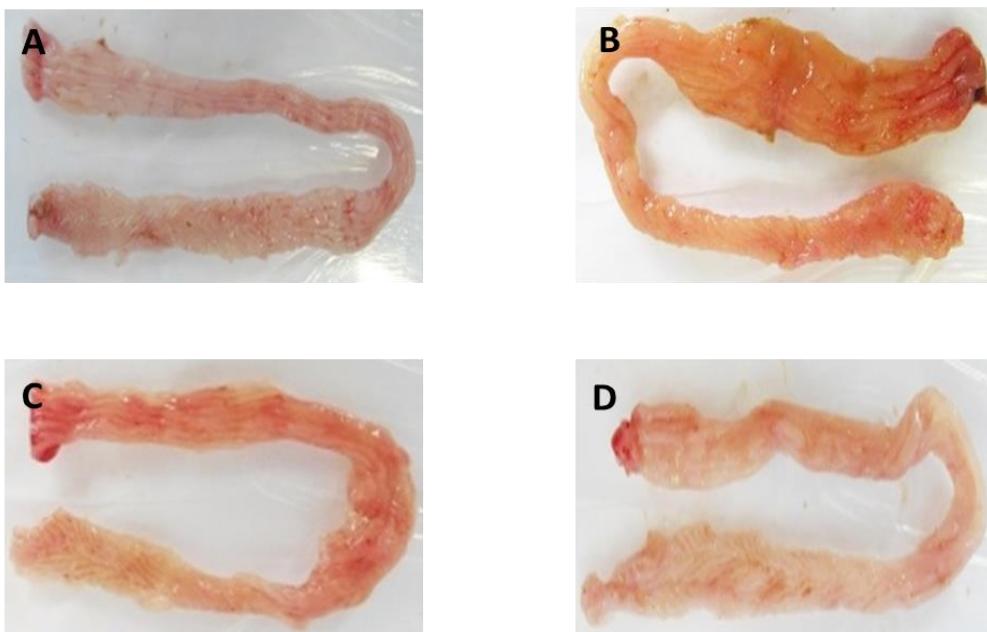
A relação peso/comprimento aumentou significativamente nos grupos colíticos, EEtOH-Cd e FaHex-Cd (143 ± 14 , $p<0,001$; 132 ± 11 , $p<0,001$; 122 ± 12 , $p<0,01$, respectivamente) quando comparados ao não colítico (97 ± 9). Entretanto, FaHex-Cd 62,5 mg/kg promoveu redução significativa (122 ± 12 , $p<0,01$) nesse parâmetro quando comparado ao grupo colítico (143 ± 14). Esses resultados estão expressos na Tabela 8 e podem ser melhores visualizados na Figura 22.

Tabela 8 Efeitos da administração oral de EEtOH-Cd e FaHex-Cd, na colite recidiva induzidas por TNBS em ratos

Grupos	Dose (mg/kg)	Escore	Peso/comp. (mg/cm)	Diarréia (%)
Não-colíticos	-		97 ± 9	0
Colíticos	-	4,0 (3-6)	$143 \pm 14^{###}$	94
EEtOH-Cd	125	1,0 (1-4)*	$132 \pm 11^{###}$	56*
FaHex-Cd	62,5	1,0 (1-4)**	$122 \pm 12^{#,**}$	56*

Resultados expressos em média \pm d.p. ou em mediana (mínimo-máximo) dos parâmetros analisados ($n=7-9$). Para os dados paramétricos foi utilizado média \pm d.p. ANOVA e teste *a posteriori* de Dunnet. Para os dados não paramétricos (mediana, mínimo-máximo) Kruskall Walis e teste *a posteriori* de Dunn. * $p<0,05$ e ** $p<0,01$, comparado ao grupo colítico. # $p<0,01$ e ### $p<0,001$, comparado ao grupo não-colítico.

Figura 22 Fotos de intestinos de ratos não-colíticos (A) Colíticos (B), EEtOH-Cd 125 mg/kg (C), FaHex-Cd 62,5 mg/kg (D).



5.5.2.1 Avaliação do consumo de água e ração

Complementando a avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal, foi realizado o acompanhamento do consumo diário de água e ração dos animais durante 21 dias. Foi possível observar uma diminuição significativa na ingestão de água (28 ± 3 , $p < 0,01$) e ração (19 ± 2 , $p < 0,01$) do grupo colítico quando comparado ao grupo de animais não colíticos (31 ± 4 e 22 ± 2 , respectivamente).

Quando avaliados o tratamento com EEtOH-Cd ou FaHex-Cd, apenas o tratamento com FaHex-Cd aumentou o consumo de água (31 ± 2 , $p < 0,05$) e ração (22 ± 3 , $p < 0,01$) em comparação aos animais colíticos (28 ± 3 , $p < 0,01$ e 19 ± 2 , $p < 0,01$, respectivamente) (Tabela 9).

Tabela 9 Efeito da administração oral do EEtOH-Cd e da FaHex-Cd durante 21 dias sobre o consumo de água e ração dos ratos no modelo de colite ulcerativa com recidiva induzida por TNBS em ratos

Tratamento	Dose	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)
Não-colíticos	-	31 ± 4	22 ± 2
Colíticos	-	28 ± 3 ^{# #}	19 ± 2 ^{# #}
EEtOH-Cd	125 mg/kg	30 ± 4	20 ± 3 [#]
FaHex-Cd	62,5 mg/kg	31 ± 2*	22 ± 3**

Os valores estão expressos como média ± d.p. (n = 7-9). ANOVA de uma via, seguido do teste de Dunnett, *p<0,05, **p<0,01, comparados ao grupo colítico; [#]p<0,05, ^{# #}p<0,01, comparados ao grupo não-colítico.

5.5.2.2 Avaliação ponderal

Como parâmetro complementar aos dados acima descritos, foi avaliado o efeito de administrações repetidas de EEtOH-Cd (125 mg/kg) ou FaHex-Cd (62,5 mg/kg) sobre o peso corporal dos animais acometidos de colite ulcerativa. Ao final do experimento, foi observada uma redução significativa na média do peso corporal do grupo colítico (215 ± 21 , p<0,001) quando comparado ao grupo não colítico (261 ± 35). Entretanto, quando avaliados os tratamentos realizados com EEtOH-Cd (125 mg/kg) ou FaHex-Cd (62,5 mg/kg) apenas FaHex-Cd aumentou significativamente a média do peso corporal (239 ± 17 , p<0,05) quando comparado aos animais colíticos (215 ± 21) (Tabela 10).

Tabela 10 Efeito da administração oral do EEtOH-Cd ou FaHex-Cd durante 21 dias sobre o peso corporal dos ratos no modelo de colite ulcerativa com recidiva induzida por TNBS em ratos

Tratamento	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Aumento médio (g)
Não-colíticos	202 ± 32	261 ± 35	51 ± 10
Colíticos	189 ± 19	215 ± 21 ^{# ##}	35 ± 12 [#]
EEtOH-Cd	178 ± 13	230 ± 7	43 ± 6
FaHex-Cd	184 ± 14	239 ± 17*	48 ± 10*

Os valores estão expressos como média ± d.p. (n = 7-9). ANOVA de uma via, seguido do teste de Dunnett, *p<0,05 comparados ao grupo colítico; [#]p<0,05, ^{##}p<0,001, comparados ao grupo não-colítico.

5.5.2.3 Avaliação do peso dos órgãos

Os dados obtidos demonstraram um aumento significativo no peso do baço do grupo colítico (2,8 ± 0,5, p<0,05) quando comparado ao não-colítico (2,1 ± 0,2). Ao analisar os órgãos dos animais tratados com EEtOH-Cd ou FaHex-Cd foi observado o aumento significativo do baço de animais tratados com EEtOH-Cd quando comparado ao grupo não-colítico (Tabela 11). Nas demais avaliações (coração, fígado e rins) não ocorreram alterações significativas em comparação ao grupo não-colítico.

Tabela 11 Efeito da administração oral do EEtOH-Cd e da FaHex-Cd durante 21 dias sobre o peso dos órgãos de ratos no modelo de colite ulcerativa com recidiva induzida por TNBS em ratos

Órgãos	Coração	Fígado	Rins	Baço
Não-colíticos	4,0 ± 0,2	41 ± 1,5	8,6 ± 0,6	2,1 ± 0,2
Colíticos	4,0 ± 0,5	43 ± 5,3	8,6 ± 1,0	2,8 ± 0,5 [#]
EEtOH-Cd	4,0 ± 0,3	43 ± 3,1	8,6 ± 0,2	2,8 ± 0,4 ^{##}
FaHex-Cd	4,0 ± 0,3	44 ± 1,2	8,4 ± 0,5	2,4 ± 0,2

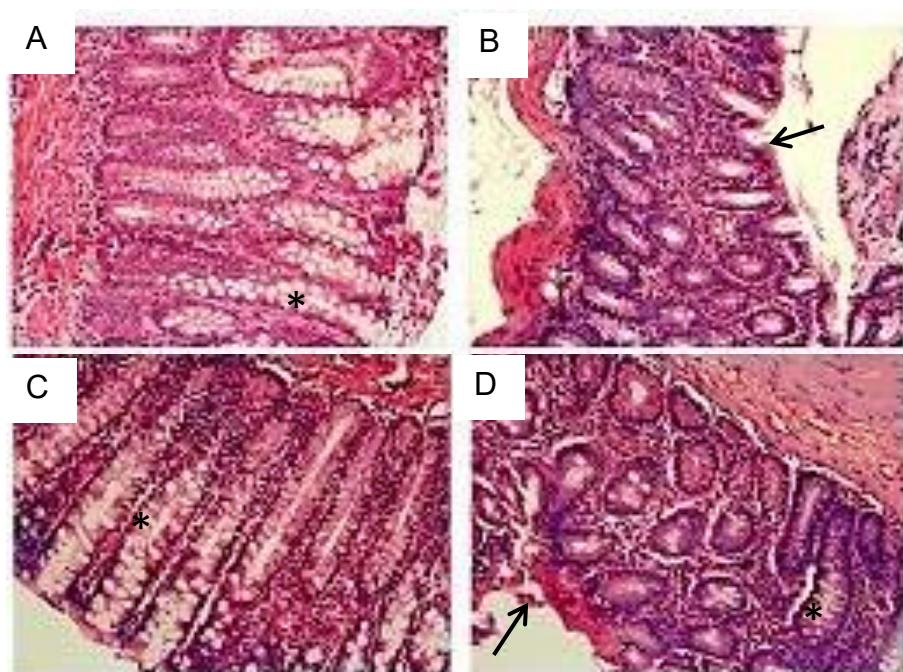
Os valores estão expressos como média ± d.p. (n = 7-9). ANOVA de uma via, seguido do teste de Dunnett, [#]p<0,05, ^{##}p<0,01, comparados ao grupo não-colítico.

5.5.2.4 Análise morfológica de cortes do cólon corados com hematoxilina e eosina (HE)

O estudo histológico do cólon de ratos pertencentes ao grupo não-colítico demonstraram a estrutura histológica normal, destacando na mucosa a estrutura das glândulas intestinais retas com grande número de células caliciformes e lâmina própria clássica (ou normal). Os animais pertencentes ao grupo colítico apresentaram inflamação transmural, necrose da mucosa com desestruturação das glândulas, redução das células caliciformes e perda das células epiteliais. Observa-se ainda a presença de granulação destacando infiltração neutrofílica e linfocítica.

O tratamento com EEtOH-Cd (125 mg/kg) ou FaHex-Cd (62,5 mg/kg) preservou algumas áreas da estrutura da mucosa, quando comparada a ação lesiva observada nos animais colíticos, permanecendo intacto o epitélio e reduzindo as células inflamatórias na lâmina própria em comparação ao grupo colítico, sugerindo a re-epitelização do animais tratados com as amostras vegetais.

Figura 23 Fotomicrografias de cortes histológicos do cólon corados com HE após animais serem submetidos ao modelo de retocolite ulcerativa com recidiva e tratados durante 21 dias. **A**- grupo não-colítico, **B**- grupo colítico, **C** - EEtOH-Cd 125 mg/kg, **D**- FaHex-Cd 62,5 mg/kg. aumento 40X (* células caliciformes; → região de ulceração; **Barra: 50 µm**)



5.5.2.5 Quantificação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

De acordo com os resultados obtidos pode-se observar aumento significativo da MPO para 40.270 ± 3.077 ($p<0,001$) no grupo dos animais colíticos quando comparados aos não-colíticos (10.120 ± 1.672). Os tratamentos com EEtOH-Cd (15.187 ± 1.158 , $p<0,001$) ou FaHex-Cd (17.620 ± 2.395 , $p<0,001$) reduziram significativamente a MPO quando comparado ao controle colítico (40.270 ± 3.077) (Gráfico 5).

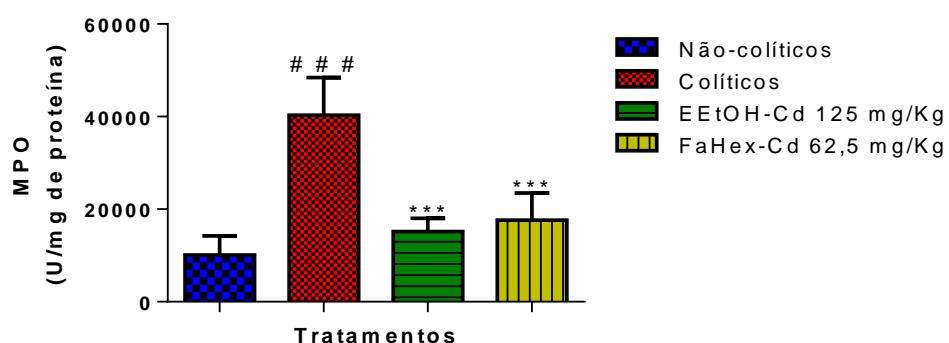


Gráfico 5 Efeito da administração EEtOH-Cd e FaHex-Cd sobre os níveis de mieloperoxidase em ratos com colite experimental com recidiva induzida por TNBS. Resultados expressos em média \pm e.p.m ($n=7-9$). ANOVA seguida de teste a posteriori de Dunnet. $^{###}p<0,01$ comparado ao grupo não-colítico e $^{***}p<0,001$ comparados ao grupo colítico.

5.5.2.6 Avaliação das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e anti-inflamatória (IL-10)

5.5.2.6.1 Determinação do nível tecidual de TNF- α

Os resultados demonstraram aumento significativo nos níveis do TNF- α nos animais colíticos ($2,0 \pm 0,2$, $p<0,01$) em comparação aos não colíticos ($1,3 \pm 0,1$). Entretanto, quando avaliados o tratamento com EEtOH-Cd (125 mg/kg) ou FaHex-Cd (62,5 mg/kg) ocorreu uma redução nos níveis de TNF- α ($1,2 \pm 0,2$ e $1,4 \pm 0,1$) respectivamente, quando comparados ao grupo colítico ($2,0 \pm 0,2$) (Gráfico 6).

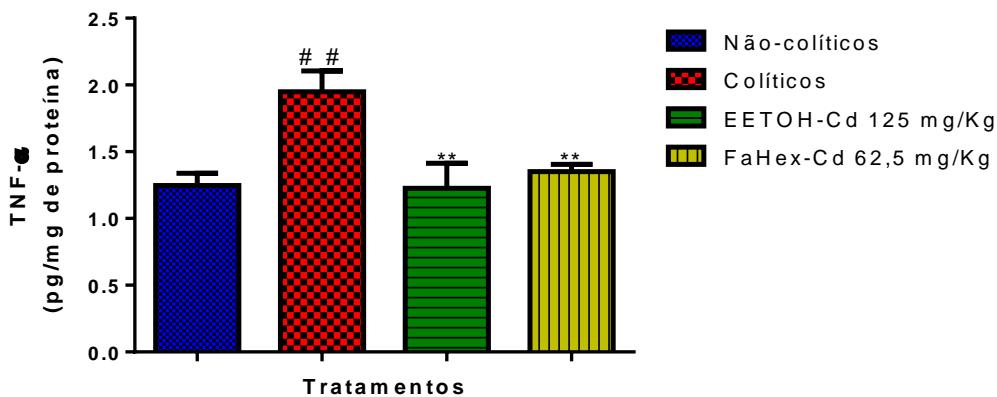


Gráfico 6 Efeito da administração EEtOH-Cd e FaHex-Cd sobre os níveis de TNF- α em ratos com colite ulcerativa com recidiva induzida por TNBS. Resultados expressos em média \pm e.p.m ($n=7-9$). ANOVA seguida de teste a posteriori de Dunnet, $^{###}p<0,01$, comparados ao grupo não-colítico e $^{**}p<0,01$ comparado ao grupo colítico.

5.5.2.6.2 Determinação do nível tecidual de IL-1 β

Os resultados obtidos demonstram o aumento significativo nos níveis da IL-1 β nos animais do grupo colítico (63 ± 6 , $p<0,001$) quando comparados ao grupo controle não-colítico ($32 \pm 4,0$). O tratamento com EEtOH-Cd reduziu de forma significativa para 41 ± 5 ($p<0,01$) a IL-1- β em comparação ao grupo colítico ($63 \pm 6,2$). FaHex-Cd não promoveu alteração significativa quando comparado ao controle colítico. Dados expressos no **Gráfico 7**.

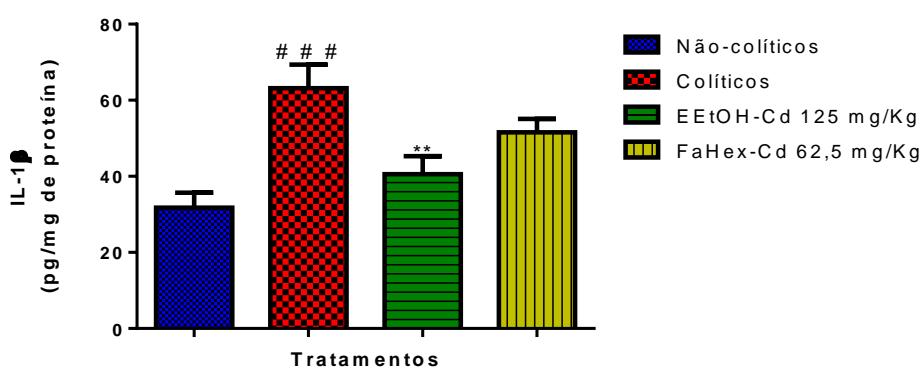


Gráfico 7 Efeito da administração EEtOH-Cd e FaHex-Cd sobre os níveis de IL-1 β em ratos com colite ulcerativa com recidiva induzida por TNBS. Resultados expressos em média \pm e.p.m ($n=7-9$). ANOVA seguida de teste a posteriori de Dunnet, $^{###}p<0,05$, $^{###}p<0,001$ comparados ao grupo não-colítico e $^{**}p<0,01$ comparado ao grupo colítico.

5.5.2.6.3 Determinação do nível tecidual de IL-10

Os resultados demonstraram redução significativa da IL-10 nos tecidos intestinais do grupo colítico para $3,2 \pm 0,3$ ($p<0,05$) quando comparado ao não-colítico ($5,1 \pm 0,8$). O tratamento com EEtOH-Cd ou FaHex-Cd provocaram aumento significativo ($5,0 \pm 0,4$, $p<0,05$; $5,8 \pm 0,3$, $p<0,01$ respectivamente) quando comparados ao grupo colítico ($3,2 \pm 0,3$) (Gráfico 8).

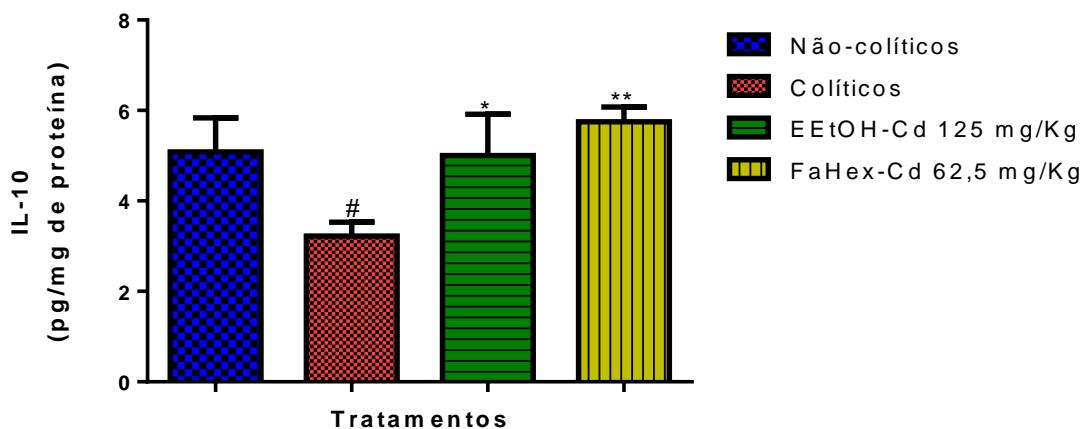


Gráfico 8 Efeito da administração EEtOH-Cd e FaHex-Cd sobre os níveis de IL-10 em ratos com colite ulcerativa com recidiva induzida por TNBS. Resultados expressos em média \pm e.p.m ($n=7-9$). ANOVA seguida de teste a posteriori de Dunnet, $^{\#}p<0,05$ comparado ao grupo não-colítico e $^{*}p<0,05$, $^{**}p<0,01$ comparado ao grupo colítico

5.5.2.6.4 Análise imunohistoquímica da expressão da COX-2

Na análise dos resultados da expressão de COX-2 demonstrados na Tabela 12 e Figura 24, foi possível observar aumento significativo da expressão da COX-2 nos animais do grupo colítico para 505 (100-1.450) ($p<0,05$) quando comparado ao não-colítico 230 (110-700). Entretanto, o tratamento com EEtOH-Cd (125 mg/kg) ou FaHex-Cd (62,5 mg/kg) reduziram de forma significativa a expressão de COX-2 para 90 (10-2.590) ($p<0,001$) e 205 (20-790) ($p<0,001$), respectivamente, quando comparado ao grupo colítico 505 (100-1.450).

5.5.2.6.5 Quantificação de células positivas para PCNA

Foi observado um aumento significativo da expressão do PCNA nos animais do grupo colítico para 5.380 (850-15.960) ($p<0,001$) quando

comparado ao não-colítico 1.425 (60-7890). Entretanto, o tratamento com EEtOH-Cd (125 mg/kg) ou FaHex-Cd (62,5 mg/kg) reduziram significativamente a expressão do PCNA para 1.630 (90-14.790) ($p<0,001$) e 1.570 (250-9.500) ($p<0,001$), respectivamente, quando comparado ao grupo colítico 5.380 (850-15.960) ($p<0,001$). Esses resultados estão demonstrados na tabela Tabela 12 e Figura 24.

5.5.2.6.6 Avaliação imunohistoquímica da expressão da enzima superóxido dismutase (SOD)

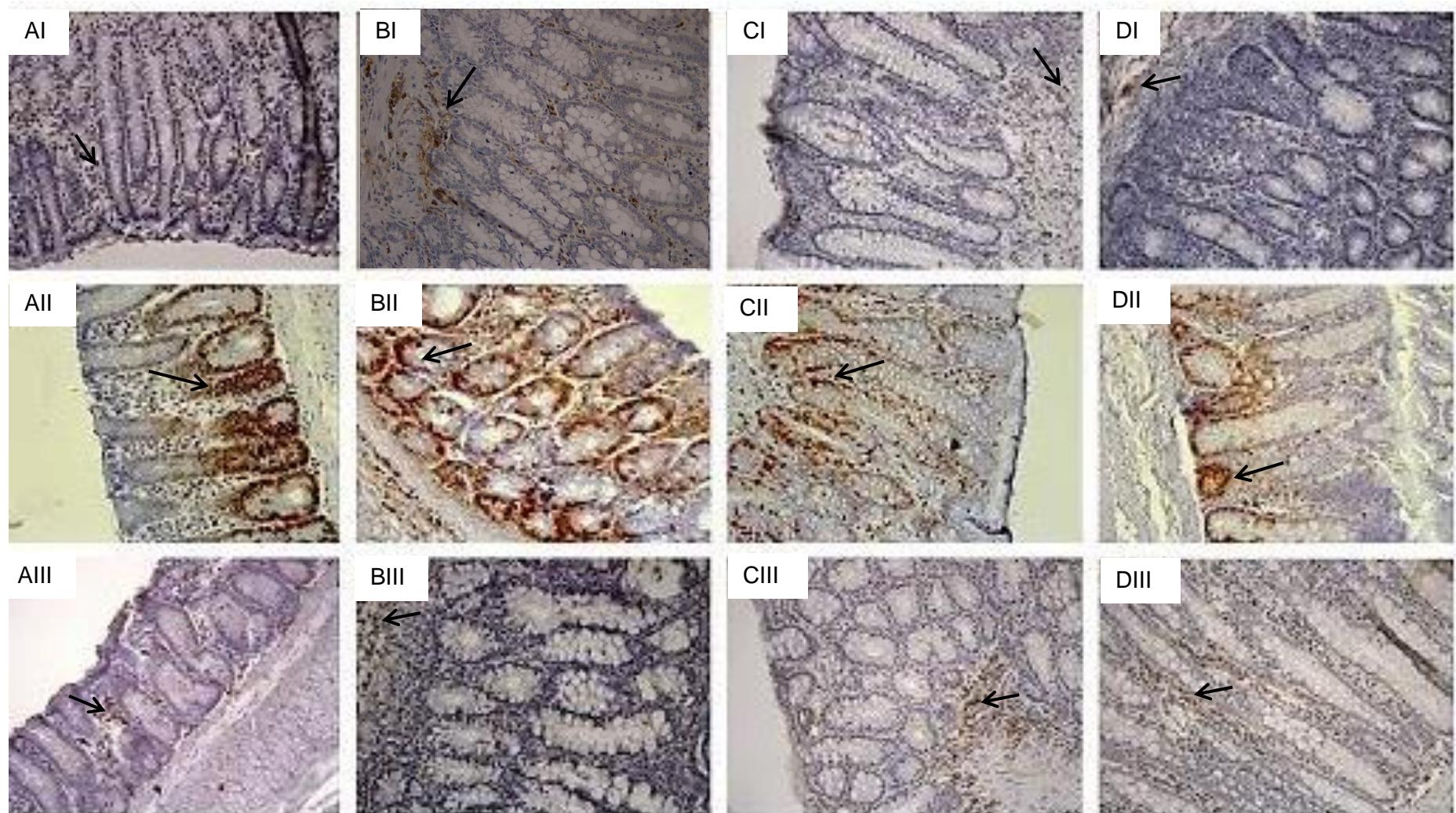
Os resultados obtidos nesta análise demonstraram diminuição significativa na expressão da SOD no controle colítico para 165 (10-1.000) ($p<0,001$) quando comparado ao grupo não-colítico 400 (80-1.115). O tratamento dos animais com EEtOH-Cd (125 mg/kg) ou FaHex-Cd (62,5 mg/kg) aumentou a expressão da SOD para 400 (50-1.480) ($p<0,05$) e 435 (20-1.650) ($p<0,001$), respectivamente, quando comparado ao controle colítico. Estes resultados estão expressos na Tabela 12 e Figura 24.

Tabela 12 Efeito da administração oral do EEtOH-Cd e da FaHex-Cd durante 21 dias sobre a expressão da ciclo-oxigenase 2 (COX-2), antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e enzima superóxido dismutase (SOD) no modelo de colite ulcerativa com recidiva induzida por TNBS em ratos

Tratamentos	Dose (mg/kg)	COX-2 (μm^2)	PCNA (μm^2)	SOD (μm^2)
Não-colíticos	-	230 (110-700)	1425 (60-7890)	400 (80-1.115)
Colíticos	-	505 (100-1.450) [#]	5380 (850-15.960) ^{###}	165 (10-1.000) ^{###}
EEtOH- Cd	125	90 (10-2.590) ^{***}	1630 (90-14.790) ^{***}	400 (50-1.480) ^{***}
FaHex-Cd	62,5	205 (20-790) ^{***}	1570 (250-9.500) ^{***}	435 (20-1.650) ^{***}

Resultados expressos em mediana (mínimo-máximo) dos parâmetros analisados (n=7-9). Para os dados não paramétricos (mediana, mínimo-máximo) Kruskall Walis e teste *a posteriori* de Dunn. ***p<0,001 comparado ao grupo colítico. [#]p<0,05 e ^{###}p<0,001, comparado ao grupo não-colítico.

Figura 24 Fotomicrografia de amostras de cólon dos ratos submetidos ao modelo de retocolite ulcerativa com recidiva após 21 dias de tratamento. **A-** grupo não-colítico, **B-** grupo colítico, **C- EEtOH-Cd 125 mg/kg**, **D-FaHex-Cd 62,5 mg/kg**. **Linha I**- marcação imunohistoquímica para **COX-2** ; **Linha II**- marcação imunohistoquímica para **PCNA**; **Linha III** marcação imunohistoquímica para **SOD** (→COX-2, PCNA e SOD, respectivamente; Barra: **50 µm**)



DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Muitas espécies vegetais e seus constituintes químicos exercem ações terapêuticas, o que revela uma promissora área para pesquisa. Isso tem direcionado o desenvolvimento de novos medicamentos eficazes e seguros para o tratamento de vários processos patológicos. Existe um interesse voltado para terapias de doenças derivadas do estresse oxidativo, tais como úlcera péptica e doenças inflamatórias intestinais (CALIXTO et al., 2004; AWAAD; EL-MELIGY; SOLIMAN, 2013).

Cada planta possui uma variedade de constituintes químicos que agem por mecanismos e vias metabólicas diferentes (LIMA DE ALBUQUERQUE et al., 2010). De acordo com De Moraes Lima (2011) em estudos realizados com a espécie *C. duarteanum*, rica em triterpenos em diferentes modelos experimentais de indução de úlcera (etanol/HCl, etanol absoluto, estresse, AINES, ligadura do piloro), constatou que esta espécie apresenta atividade gastroprotetora a qual encontra-se relacionada a uma proteção local com a participação das vias do óxido nítrico e grupamentos sulfidrilas.

Este trabalho é um estudo de continuidade e dessa forma se propõe a avaliar a atividade cicatrizante gástrica, antiulcerogênica em duodeno, além de elucidar os mecanismos envolvidos na ação farmacológica avaliando o efeito anti-inflamatório intestinal promovido pelo extrato etanólico bruto e fase hexânica obtidos de *C. duarteanum*. Sendo esta última escolhida para o estudo devido possuir maior quantidade de triterpenos na sua constituição.

O modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético é o que mais se assemelha a úlcera gástrica no homem (OKABE; AMAGASE, 2005). Por esta razão este modelo é largamente utilizado para estudar o mecanismo de cicatrização e avaliar o efeito antiulcerogênico de vários compostos (MARIA-FERREIRA et al., 2014). Foi demonstrado que após a administração do ácido acético ocorre o desenvolvimento de trombos nos vasos da submucosa, levando a estase microvascular o que resulta em necrose isquêmica da mucosa gástrica (morte tecidual) e na formação da úlcera (TARNAWSKI; AHLUWALIA, 2012).

A cicatrização é um processo de reparação tecidual que pode ser dividido em três períodos: 0-3 dias (consiste no desenvolvimento da úlcera com formação do tecido necrótico, infiltrado inflamatório, implantação e formação da margem da úlcera); 3-10 dias (envolve o processo de migração celular e contração da úlcera); e 10-20 dias (o processo torna-se mais lento e inclui etapas como angiogênese, remodelação do tecido de granulação e regeneração epitelial completa da lesão ulcerosa) (SCHMASSMANN, 1998; TARNAWSKI, 2005; TARNAWSKI; AHLUWALIA, 2012).

A angiogênese consiste na formação de novos microvasos que é essencial para cicatrização de úlceras gastrintestinais. Ocorre via uma série de etapas sequenciais que inclui: (a) degradação da capilaridade basal pela matriz metaloproteinase; (b) migração de células endoteliais para o espaço perivascular e proliferação; (c) formação de tubos microvasculares seguido de anastomose; (d) estabelecimento de uma lâmina e membranas basais; e (e) formação de uma rede de capilares (TARNAWSKI, 2005; TARNAWSKI; AHLUWALIA, 2012).

A capacidade de acelerar o processo de cicatrização depende do fator de crescimento epidermal (EGF), peptídeos trefoil e cicloxigenase tipo 2 (COX-2) atuando de maneira sincronizada (TARNAWSKI, 2005). A formação do tecido de granulação e a geração de novos microvasos são estimulados pelo fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), angiopoietinas, óxido nítrico e possivelmente outros fatores de crescimento e citocinas, incluindo IL-1 β e TNF- α (TARNAWSKI, 2005; TARNAWSKI; AHLUWALIA, 2012).

No trabalho de dissertação realizado por De Moraes Lima (2011), o EEtOH-Cd (250 mg/kg) e a FaHex-Cd (250 mg/kg) aceleraram o processo de cicatrização considerando que ocorreu uma redução significativa da área de lesão ulcerativa (ALU). No estudo atual, passou-se a analisar as estruturas morfológicas e as possíveis vias envolvidas no efeito cicatrizante promovido pela espécie *Combretum duarteanum*.

A área da úlcera gástrica possui duas estruturas histológicas principais, a margem da úlcera, que é o componente epitelial formado pela mucosa

adjacente, e o tecido de granulação, na base da úlcera, composto por tecido conjuntivo constituído de células como fibroblastos, macrófagos e células endoteliais em proliferação, formando microvasos (HELANDER, 1983; TARNAWSKI et al., 1991; TARNAWSKI, 2005).

De acordo com os achados desse estudo, o EEtOH-Cd e FaHex-Cd promoveram um aumento significativo no percentual de células totais (células epiteliais, fibroblastos, macrófagos, neutrófilos e células endoteliais) presentes na área de lesão. Esses dados sugerem que a restauração do epitélio promovida pela droga teste ocorre por meio de proliferação celular. A proliferação celular é muito importante na reconstituição da mucosa gástrica e estudos apontam que o equilíbrio entre a proliferação e a apoptose (morte celular programada) é crítico para manutenção da mucosa gástrica (REED, 2000; MORAES et al., 2013).

Os estudos De Morais Lima (2011) demonstraram uma redução significativa da ALU em animais tratados com cimetidina 100 mg/kg. Entretanto, esse tratamento não alterou de forma significativa o percentual de células totais na área de lesão. Finn et al. (1996) demonstrou a ausência do efeito proliferativo da cimetidina, o que pode indicar que depende da ativação dos receptores para histamina do tipo H₂.

O estudo morfológico realizado a partir de lâminas coradas com hematoxilina e eosina demonstrou que o tratamento dos animais com EEtOH-Cd ou FaHex-Cd promoveu conservação da arquitetura glandular com pouca dilatação e presença de secreção mucoide no seu interior. Diante dessa observação, passou-se a avaliar a participação do muco no efeito antiulcerogênico promovido pela espécie vegetal estudada.

O muco gástrico consiste em um gel viscoso, transparente, elástico e aderente. É formado por água e glicoproteínas e recobre toda mucosa gastrintestinal. As propriedades protetoras dependem não somente do gel estrutural mas também da quantidade ou espessura da barreira que recobre a superfície da mucosa (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

Ao analisar as lâminas coradas com ácido periódico de Schiff foi possível visualizar intensa coloração no interior das glândulas, em que estas

apresentaram secreção mucoide com maior intensidade quando comparado ao grupo tratado com veículo. Estes achados demonstram a presença de muco o que sugere uma ação citoprotetora.

Os resultados obtidos na observação morfológica são de grande importância em termos da avaliação da ocorrência de recidivas, pois a ruptura vascular e glandular, dilatação das glândulas gástricas e aumento do tecido conjuntivo são anormalidades que causam recidiva das úlceras gástricas (TARNAWSKI et al., 1991; TARNAWSKI, 2005; TARNAWSKI; AHLUWALIA, 2012).

A diminuição do fluxo sanguíneo é um fator predisponente para ulceração por causar hipóxia (baixa concentração de oxigênio) e anóxia (ausência de oxigênio). Então, tratamentos que conferem aumento na quantidade de vasos sanguíneos têm um importante papel na manutenção e regeneração da mucosa gástrica (SZABO; VINCZE, 2000).

Fatores como VEGF, bFGF, angiopoietinas, óxido nítrico, endotelina, prostaglandina e metaloproteinases são importantes para a angiogênese, remodelamento vascular e regeneração da mucosa na úlcera gástrica (TARNAWSKI; AHLUWALIA, 2012). De acordo com Jones et al (2001) a terapia genética com VEGF e angiopoietina-1 (Ang1) na base da úlcera, com duração limitada da expressão do gene alvo,显著mente aumenta a neovascularização e acelera o processo de cicatrização da úlcera.

A quantificação de vasos revelou um aumento significativo nos animais tratados com EEtOH-Cd quando comparados ao controle negativo. Entretanto, esse efeito não foi observado para FaHex-Cd e cimetidina, apesar de nos estudos da dissertação De Morais Lima (2011) ter sido evidenciado que esses tratamentos promoveram redução significativa na ALU.

Aumentar a vascularização é importante para cura da úlcera por ocasionar o suprimento de novas células e nutrientes e assim induzirem o crescimento epidermal (SÁNCHEZ-FIDALGO et al., 2004). Entretanto, as úlceras cicatrizadas espontaneamente ou depois da administração da cimetidina (antagonista do receptor H₂) são pobemente vascularizadas e

possuem de 2 a 3 vezes menor densidade de novos vasos sanguíneos (SZABO et al., 1994 apud SZABO; VINCZE, 2000).

O próximo passo foi avaliar o efeito das amostras vegetais no modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão em ratos. Esse modelo é conhecido por induzir lesões gástricas predominantemente devido ao excesso na formação de espécies reativas de oxigênio que induzem a resposta inflamatória e dano tecidual por fragmentação do DNA celular (UEDA et al., 1989; DEFONESKA; KAUNITZ, 2010).

A isquemia enfraquece a barreira da mucosa gástrica e aumenta a retrodifusão de ácido tornando a mucosa suscetível ao desenvolvimento da lesão (RAO; VIJAYAKUMAR, 2007). Após a reperfusão, as espécies reativas de oxigênio são geradas pelo sistema xantina-xantina oxidase e ativam neutrófilos, levando a peroxidação lipídica que em combinação com a secreção gástrica resulta em dano e morte celular (KIMURA et al., 2001). O tratamento dos animais com EEtOH-Cd ou FaHex-Cd reduziram significativamente as lesões gástricas quando comparado ao grupo controle negativo.

Diante dos resultados promissores obtidos frente a modelos de indução aguda de úlcera gástrica em animais, partiu-se para investigar o efeito promovido por EEtOH-Cd e FaHex-Cd na úlcera duodenal induzida por cisteamina (uma ferramenta farmacológica que causa lesões com características morfológicas e funcionais semelhantes às do homem) em ratos.

As úlceras duodenais ocorrem em cerca de 10% da população mundial e são mais prevalentes e incidentes que as úlceras gástricas. A patogênese é comumente relacionada ao aumento de fatores agressores na produção de ácido e pepsina e outras proteases ou pela enfraquecimento na proteção da mucosa, além da presença do *H. pylori* (CHOI et al., 2012)

O modelo de úlcera duodenal induzida por cisteamina é considerado padrão para avaliação da atividade antiulcerogênica de novas drogas. Os mecanismos moleculares de como a cisteamina provoca ulceração ainda não estão totalmente esclarecidos. Sabe-se que a cisteamina reduz a biodisponibilidade da somatostatina resultando no aumento dos níveis da gastrina no soro, com um associado aumento da secreção ácida

LICHTENBERGER; SZABO; TRIER, 1977; SZABO; REICHLIN, 1981 apud CHOI et al., 2012), diminui a neutralização do ácido no duodeno proximal (ADLER; GALLAGHER; SZABO, 1983 apud CHOI et al., 2012), diminui os níveis de dopamina nas glândulas gástricas e duodenais (SZABO et al., 1987 apud CHOI et al., 2012), inibe o transito gástrico e a motilidade (LICHTENBERGER; SZABO; REYNOLDS, 1977 apud CHOI et al., 2012).

A cisteamina concentra-se no duodeno ocasionando a geração de espécies reativas de oxigênio e diminuição da capacidade antioxidante do organismo. Além disso, provoca aumento na endotelina-1, um potente vasoconstritor, com diminuição do fluxo sanguíneo ocasionando isquemia e hipóxia. Portanto, a alteração no estado redox e a redução na oxigenação da mucosa são alterações observadas sempre na mucosa duodenal após o tratamento com a cisteamina (CHOI et al., 2012).

Estudos *in vitro* tem demonstrado que o efeito citotóxico da cisteamina depende primariamente da geração de H₂O₂ em presença de metais de transição como o Fe³⁺ (BIAGLOW et al., 1984; TAHSILDAR et al., 1988; CHOI et al., 2012). O H₂O₂ derivado de tióis reage com metais de transição para produzir radicais hidroxila via reação de Fenton (JEITNER; LAWRENCE, 2001).

Uma redução significativa na lesão duodenal dos animais tratados com EEtOH-Cd (31,25, 62,5 e 125 mg/kg) ou FaHex-Cd (31,25 e 62,5 mg/kg) foi observada quando comparados ao controle negativo. Esses efeitos podem ser atribuídos ao reforço nos fatores de proteção da mucosa induzidos pelo tratamento com a espécie vegetal.

Diante dos resultados obtidos, a próxima etapa do trabalho foi investigar a participação das prostaglandinas (PG) endógenas nos mecanismos de ação envolvidos na citoproteção promovida por EEtOH-Cd e FaHex-Cd. As prostaglandinas são substâncias produzidas por quase todas as células (exceto as hemácias), derivadas do metabolismo do ácido araquidônico, pela ação da enzima cicloxigenase (COX) (EBERHART; DUBOIS, 1995; BOTTING, 2006).

As PGs atuam estimulando e facilitando quase todos os mecanismos de proteção da mucosa gástrica. A geração contínua de PGI₂ e PGE₂, mediada pela COX-1, é essencial para a manutenção da integridade e proteção contra

agentes necrosantes e ulcerogênicos, tais como etanol e indometacina (TAKEEDA et al., 2004; KONTUREK; KONTUREK; BRZOZOWSKI, 2005; PESKAR, 2005; STARODUB et al., 2008).

A administração oral aguda do etanol absoluto em ratos produz lesões hemorrágicas lineares extensivas a submucosa, edema, infiltração de células inflamatórias e perda de células epiteliais do estômago. A patogênese da úlcera gástrica induzida por etanol ocorre diretamente ou indiretamente por meio da participação de vários mediadores como lipoxigenase, citocinas e espécies reativas de oxigênio (ABDEL-SALAM et al., 2001; FRANKE; TEYSEN; SINGER, 2006).

A capacidade da indometacina causar úlceras está relacionada principalmente a sua habilidade em suprimir a síntese de prostaglandina, com maior afinidade para COX-1 que COX-2. A inibição da COX-1 nas plaquetas também pode acarretar um decréscimo na produção de tromboxano diminuindo a coagulação sanguínea, sugerindo este ser o principal fator determinante da propensão de um AINE provocar complicações hemorrágicas (MUSUMBA; PRITCHARD; PIRMOHAMED, 2009).

As PGs possuem papel citoprotetor e podem atuar inibindo a secreção gástrica, aumentando o fluxo sanguíneo da mucosa, melhorando a barreira muco-bicarbonato-fosfolipídios, acelerando o reparo epitelial e participando da restituição e cicatrização da mucosa (TAKEEDA et al., 2004; KONTUREK; KONTUREK; BRZOZOWSKI, 2005; PESKAR, 2005).

Os resultados do presente trabalho demonstraram que o dano gástrico produzido pelo etanol foi significativamente prevenido pelos tratamentos com EEtOH-Cd, FaHex-Cd ou misoprostol, um análogo da prostaglandina. Mas a proteção promovida pelas amostras vegetais estudadas não foi inibida pela administração da indometacina, um bloqueador inespecífico da cicloxigenase, sugerindo não haver dependência das prostaglandinas endógenas na citoproteção gástrica promovida pela espécie vegetal estudada.

A citoproteção gástrica pode ser mediada por pelo menos dois mecanismos: um envolvendo prostaglandina e o segundo envolvendo o aumento na produção de glicoproteínas (GUARDIA et al., 1994). O efeito

citoprotetor promovido por EEtOH-Cd e FaHex-Cd pode ser atribuído a composição dessas amostras vegetais (terpenos e flavonoides) que podem induzir o aumento da atividade sintética de glicoproteínas. O muco é rico em glicoproteínas relacionadas a sua atividade antioxidante, responsável pela proteção na mucosa gástrica. Muitos açúcares (a exemplo do manitol e glicose) são relatados na literatura como potentes varredores de radicais livres (CROSS; HALLIWELL; ALLEN, 1984; GRISHAM et al., 1987; HIRAI SHI et al., 1993).

O óxido nítrico (NO) é também regulador da secreção de muco no estômago. Seus efeitos são produzidos via estimulação da guanilato ciclase na célula epitelial. Assim, NO parece ser produzido em resposta à ativação de receptores colinérgicos provocando a liberação de muco pelas células garantindo, dessa forma, a integridade da mucosa (BROWN et al., 1993; WALLACE; MILLER, 2000). De Morais Lima (2013) demonstrou envolvimento do óxido nítrico na gastroproteção promovida por EEtOH-Cd e FaHex-Cd o que justifica o estímulo da produção de muco verificada nesses estudos.

De Morais Lima (2011) verificou ainda envolvimento dos compostos sulfidrilas na gastroproteção promovida por EEtOH-Cd e FaHex-Cd. Maria (2000) demonstrou que a atividade citoprotetora de compostos terpenoides é atribuída também a presença de aceptores eletrofílicos na sua estrutura molecular que interagem com compostos sulfidrílicos na mucosa gástrica reforçando a proteção e prevenindo as lesões gástricas induzidas pelo etanol.

Os mecanismos de ação envolvidos na atividade antioxidante promovida por EEtOH-Cd e FaHex-Cd foram avaliados tais como a participação da superóxido dismutase, catalase e GSH. As células do trato gastrintestinal possuem um sistema de defesa antioxidante que previne a citotoxicidade das espécies reativas de oxigênio por meio de mecanismos que envolvem a ação de enzimas e compostos com capacidade para sequestrar radicais livres e prevenir a ação destrutivas dos mesmos. A principal enzima antioxidante é a SOD, que catalisa a dismutação de O_2^- em H_2O_2 , que posteriormente será degradada pela catalase ou GSH-Px (BHATTACHARYYA et al., 2014).

Foi possível observar um aumento significativo da SOD nos animais do grupo controle negativo quando comparado aos do grupo normal (valores

basais). Os tratamentos com EEtOH-Cd ou FaHex-Cd restauraram os valores aos seus níveis basais. Este é um achado interessante, visto que a diminuição da atividade da SOD está relacionada como a causadora de úlcera gástrica e o seu aumento indica um processo de restauração da mucosa gástrica em pacientes (NAITO et al., 1992 apud BHATTACHARYYA et al., 2014). Resultados semelhantes a esse já foram demonstrados por Rozza et al. (2014) e Bonamin et al. (2014) em modelos de úlcera gástrica em ratos, o que se justifica pelo fato de tecidos gástricos quando submetidos a condições de estresse, gera uma grande produção de O_2^- o que estimula a atividade da superóxido dismutase (FRIDOVICH, 1986 apud BONAMIN et al., 2014).

A catalase dismuta o H_2O_2 produzido pela SOD em H_2O e O_2 . A perda na atividade da catalase é observada em câncer colorretal, úlcera gástrica, adenocarcinoma gástrico e estômagos infectados pela *H. pylori* (BHATTACHARYYA et al., 2014). O tratamento com EEtOH-Cd ou FaHex-Cd promoveu o aumento na atividade dessa enzima restaurando os seus níveis basais.

Em seguida, foi investigado o efeito das drogas vegetais sobre compostos antioxidantes não enzimáticos, tais como a GSH. O tripeptídeo, c-L-glutamil-L-cisteína-glicina, conhecido como glutationa reduzida (GSH) é o mais importante composto antioxidante de baixo peso molecular produzido nas células. A GSH é sintetizada pela adição sequencial de cisteína e glutamato seguida da adição da glicina. O grupo sulfidril (-SH) da cisteína está envolvido em reações de redução e conjugação que estão normalmente envolvidas nas principais funções da GSH. Esse composto é utilizado por três membros da família GPx/GR e por um das peroxidinas, catalizando a redução do H_2O_2 pela GSH em H_2O e GSSG (FORMAN; ZHANG; RINNA, 2009; LU, 2009).

Foi observado que EEtOH-Cd e FaHex-Cd mantiveram os níveis da GSH mesmo na presença da lesão, sugerindo que o efeito gastroprotetor promovido por *C. duarteanum* está relacionado a atividade antioxidante com participação das vias da GSH. As plantas medicinais apresentam muitos compostos que são capazes de modular os níveis de várias enzimas antioxidantes endógenas. Portanto, drogas com múltiplos mecanismos de ação, dentre os quais o antioxidante, podem tornar-se boas estratégias

terapêuticas para minimizar a lesão tecidual em humanos (BALARAMAN; BAFNA; KOLHAPURE, 2004).

Diante dos resultados obtidos em que se ratifica a atividade gastroprotetora e antiulcerogênica das amostras vegetais testadas, partiu-se para investigar uma possível atividade anti-inflamatória intestinal promovida por *C. duarteanum* em modelos animais.

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são desordens crônicas progressivas e destrutivas do trato gastrintestinal e podem se manifestar nas doença de Crohn (DC) ou retocolite ulcerativa (RCU). Existem evidências que a patogênese das DII estão relacionadas a uma interação disfuncional entre as bactérias da microflora intestinal e o sistema imune da mucosa (PODOLSKY, 2002; SWIDSINSKI et al., 2008).

A doença de Crohn e a retocolite ulcerativa são doenças imunologicamente diferentes. A DC é marcada por uma resposta celular exagerada do tipo Th1 ($CD4^+$) e Th17, caracterizada por altos níveis de INF- γ /IL17 e IL-12/IL-23, enquanto que RCU é caracterizada pela resposta exacerbada Th2 e excessiva produção de IL-5 e IL-13 (FUSS; MANNON, 2007; SHEIKH; PLEVY, 2010; STROBER). Essa resposta (Th2) na colite é atípica devido a ausência da IL-4 (uma citocina característica Th2) detectada em biópsias do cólon de pacientes com RCU (BOUMA; STROBER, 2003)

A investigação farmacológica das DII é instigada por recentes descobertas de possíveis alvos terapêuticos. Com isso, vários modelos animais para inflamação intestinal estão disponíveis para investigar os diferentes mecanismos fisiopatológicos envolvidos e avaliar novas estratégias terapêuticas (DOTHEL et al., 2013).

Nos últimos quinze anos, diferentes modelos animais foram desenvolvidos para avaliar as DII e aproximadamente 40 desses são frequentemente usados em protocolos experimentais (MIZOGUCHI; MIZOGUCHI, 2010; MIZOGUCHI, 2012). É possível identificar quatro classes de modelos de indução das DII: 1- modelos químicos (TNBS, dodecil sulfato de sódio, ácido acético, indometacina, oxazolona); 2- genéticos (*knock-out* e modelos transgênicos); 3-espontâneos; e 4- imuno-mediados (transferência de

imunócitos ativados em camundongos imuno-deficientes (DOTHEL et al., 2013).

A maioria dos modelos animais utilizados em estudos de pesquisa das DII são desenvolvidos em roedores, principalmente porque atendem aos requisitos de similaridades filogenéticas com os seres humanos e de fácil manuseio. Quanto a analogia imunológica, várias correlações foram detectadas com os seres humanos, incluindo as alterações nas bactérias luminais (LEY et al., 2006).

O modelo escolhido para este trabalho foi o de indução química por meio do TNBS (ácido trinitrobenzenosulfônico). Esse composto é um hapteno administrado como enema em ratos ou camundongos em combinação com etanol 50%, para quebrar a barreira de muco e facilitar a penetração do hapteno no epitélio intestinal. O TNBS reage com proteínas autólogas e estimula o desenvolvimento de uma hipersensibilidade, levando a ativação de células T específicas. A resposta imune induzida por hapteno provoca ulcerações na mucosa e barreira epitelial caracterizada por infiltração transmural de células mononucleares (MORRIS et al., 1989).

Embora o TNBS também possa ser avaliado em camundongos, nosso grupo de pesquisa optou por trabalhar com ratos devido as vantagens no que se refere à semelhança morfológica com a estrutura intestinal humana e ao fácil manuseio, enquanto camundongos tem uma caracterização genética mais diversificada (DOTHEL et al., 2013).

Neste trabalho, foram realizados modelos de indução aguda da retocolite ulcerativa em ratos, utilizando diferentes doses de EEtOH-Cd ou FaHex-Cd. A partir desse modelo, foi escolhida a melhor dose do EEtOH-Cd e FaHex-Cd para realização do modelo crônico de recidiva e verificação do efeito curativo.

O tratamento preventivo com EEtOH-Cd (62,5 e 125 mg/kg) ou FaHex-Cd (31,25 e 62,5 mg/kg), no modelo agudo, provocou redução significativa na severidade e extensão da lesão que foi refletida no escore de lesão macroscópico. No modelo de colite induzida por TNBS em ratos, o escore do dano macroscópico, microscópico e relação peso/comprimento do cólon podem

ser considerados como indicadores confiáveis e sensíveis para estimar a severidade da doença e consequentemente o efeito anti-inflamatório promovido por uma droga teste (YANG et al., 2012).

Também foi observada baixa incidência de diarreia nos animais tratados com EEtOH-Cd e FaHex-Cd. A diarreia é um importante sintoma da doença tanto nos animais como em humanos e indica perda da capacidade absorptiva do colón, que fica prejudicada em um processo inflamatório intestinal (SÁNCHEZ DE MEDINA et al., 2002). Os resultados obtidos sugerem que o tratamento com as amostras vegetais restauraram a capacidade absorptiva intestinal.

A administração oral de EEtOH-Cd (31,25; 62,5; 125 e 250 mg/kg) ou FaHex-Cd (31,25; 125 e 250 mg/kg) não alterou a relação peso/comprimento. Esta relação reflete o edema que ocorre devido ao processo inflamatório (YANG et al., 2012) e a falta de um efeito sobre esse parâmetro pode ser explicada com base na extensão dos danos do cólon induzida por TNBS/etanol, a qual é difícil ser superada pelo tratamento farmacológico (VELJACA et al., 1995 apud LUCHINI et al., 2008). Por outro lado, a FaHex-Cd 62,5 mg/kg reduziu significativamente esse parâmetro. Este efeito possivelmente está relacionado a capacidade sequestradora de radicais livres provocada pelo tratamento com essa dose (LUCHINI et al., 2008).

Estes resultados demonstraram pela primeira vez, para uma espécie vegetal pertencente ao gênero *Combretum*, atividade anti-inflamatória intestinal. O tratamento com EEtOH-Cd (62,5; 125 mg/kg) ou FaHex-Cd (31,25; 62,5 mg/kg) foi capaz de reduzir a severidade e extensão do dano colônico agudo induzido pelo TNBS. O decréscimo na extensão e severidade da lesão foi acompanhado por baixa incidência de diarreia nos animais tratados.

Nos modelos em que se avaliou o efeito antiulcerogênico e seus mecanismos de ação relacionados, foi utilizada a dose de 250 mg/kg tanto para o EEtOH-Cd quanto para FaHex-Cd. Essa dose foi selecionada a partir do modelo de indução de úlcera por etanol absoluto, realizado por De Moraes Lima (2011) em trabalho de dissertação.

Nos modelos que avaliaram o efeito das amostras vegetais sobre as doenças inflamatórias intestinais, doses mais baixas para o EEtOH-Cd (125 mg/kg) ou FaHex-Cd (62,5 mg/kg) foram escolhidas para serem utilizadas no modelo crônico com recidiva da retocolite ulcerativa, em virtude dos seus efeitos anti-inflamatório e ulcerativo frente a uma situação de doença intestinal instalada.

Essa alteração na melhor dose utilizada no modelo de inflamação intestinal quando comparada ao modelo de úlcera pode ser explicada devido as doenças inflamatórias intestinais apresentarem interações redundantes e pleiotrópicas (mutantes). Assim, a droga teste pode interagir em diferentes níveis e apresentar diferentes mecanismos, sendo que estes devem ser elucidados para apreciar plenamente o seu potencial terapêutico na prática clínica (DOTHEL et al., 2013)

Gouveia et al. (2011) em estudo *in vitro* demonstrou que o EEtOH-Cd em altas concentrações promoveu aumento na produção de radicais NO, assim como, a diminuição na capacidade de eliminação desses compostos. As mudanças no efeito oxidante para pró-oxidante são observadas em análises de misturas complexas, a exemplo dos extratos vegetais, isso devido a presença de um amplo espectro de compostos com propriedades redox diferentes para variadas concentrações (BASU; HAZRA, 2006; GUIMARÃES et al., 2010).

De Morais Lima et al. (2013) em modelo de indução de úlcera gástrica por ligadura de piloro em diferentes vias de administração (oral e intraduodenal) observaram que o efeito gastroprotetor promovido pelo EEtOH-Cd e FaHex-Cd, na dose de 250 mg/kg (escolhida no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos), está relacionado ao efeito sistêmico auxiliado pelo efeito local de proteção gástrica, o que pode explicar o excelente efeito nessa dose no estômago.

Diante dos resultados promissores obtidos no modelo agudo da retocolite ulcerativa e considerando a baixa toxicidade de *C. duarteanum* que foi demonstrada por De Morais Lima (2011), foram selecionadas as melhores doses do EEtOH-Cd (125 mg/kg) ou da FaHex-Cd (62,5 mg/kg) e então passou-se a investigar seus efeitos no modelo de retocolite ulcerativa sub-crônico de 21 dias com recidiva no 14º dia.

O modelo de colite ulcerativa com recidiva é considerado como o que mimetiza esta doença em humanos e pode ser usado para avaliar novos tratamentos potencialmente aplicáveis as DII (YANG et al., 2012).

As DII são desordens intestinais crônicas caracterizadas por sangramento retal e diarreia resultando em quebra da barreira epitelial e formação da ulceração (DA SILVA et al., 2010). O tratamento com EEtOH-Cd (125 mg/kg) ou FaHex-Cd (62,5 mg/kg) diminuiu significativamente os sinais da doença como a lesão macroscópica (escore e área de lesão), a relação peso/comprimento e a diarreia evidenciando assim o efeito anti-inflamatório da administração durante o período de 21 dias de tratamento.

É observado que o modelo de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS promove a perda de 8 a 10% do peso corpóreo principalmente após uma semana de administração do TNBS e isso está relacionado a redução no consumo alimentar que é uma consequência da dor abdominal e da diarreia durante a fase ativa da doença (CAMPOS et al., 2002). O tratamento com FaHex-Cd (62,5 mg/kg) reverteu o baixo consumo de água, de ração e perda de peso corporal, provocados pela doença .

Estratégias terapêuticas interessantes podem ser utilizadas para restaurar a integridade e função do epitélio intestinal ou atenuar a inflamação da mucosa (KRUIDENIER; VERSPAGET, 1998). Os resultados obtidos confirmam que EEtOH-Cd e FaHex-Cd podem ser potencialmente úteis para esta finalidade.

O baço recicla células vermelhas do sangue e atua como uma reserva das mesmas. Esse órgão é o centro de atividade do sistema retículo-endotelial e parte essencial do sistema imune (CHO et al., 2011). Foi possível observar um aumento significativo no peso do baço dos animais colíticos quando comparado aos não colíticos. Esses resultados são condizentes com a literatura, pois a esplenomegalia (aumento no tamanho do baço) é observada em muitas desordens hematológicas, inflamações, infecções e malignidades. A colite ulcerativa e a doença de Crohn são mencionadas na lista de fatores que podem acarretar aumento do tamanho do baço e isso pode ocorrer por meio do acúmulo de células linfoides com funções imunológicas (HUGHES; YOUNG, 1987; CHO et al., 2011; PEREIRA;).

Os pontos acima avaliados (escore, área de lesão, ingesta de alimento e água, peso corporal e peso dos órgãos) são comuns em modelos para estudar as DII e denotam sobre a melhora nas condições de inflamação e expressão da doença. Ambas as avaliações qualitativas e quantitativas são largamente utilizadas nas primeiras avaliações de drogas testes para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais e reproduzem os mecanismos das doenças em humanos com alta sensibilidade (capacidade de caracterizar a atividade de um composto em determinada doença), mas possuem pouca especificidade, ou seja, capacidade de avaliar o papel de um alvo específico na fisiopatologia da doença, a exemplo do padrão de citocinas envolvidas (WALLACE; KEENAN, 1990; AMEHO et al., 1997; DOTHEL et al., 2013).

Doseamentos bioquímicos são mais específicos para as características singulares de diferentes DII e podem ser utilizados para avaliar o papel de um alvo específico na fisiopatologia e/ou para avaliar a eficácia de um composto teste (DOTHEL et al., 2013). Por isso, passou-se a avaliar parâmetros tais como mieloperoxidase e citocinas (TNF α , IL-1 β e IL-10). Para isso, foram utilizadas amostras coletadas no modelo de colite com recidiva, devido esse modelo mimetizar melhor a doença inflamatória intestinal em humanos e assim possibilitar uma melhor averiguação do potencial terapêutico da espécie vegetal estudada.

A atividade da mieloperoxidase (MPO) tem sido largamente usada para detectar a inflamação intestinal. A colite induzida por TNBS envolve a infiltração neutrofílica e o aumento de mediadores inflamatórios (NEURATH; FUSS; STROBER, 2000; YANG et al., 2012). A MPO é uma enzima encontrada em neutrófilos e tem sido utilizada como índice quantitativo do influxo neutrofílico para o tecido intestinal inflamado. O recrutamento e ativação de neutrófilos resulta em um aumento significativo na produção de radicais livres capaz de superar os mecanismos de proteção antioxidante do tecido, resultando em uma espécie de estresse oxidativo, que definitivamente perpetua a inflamação (VELJACA et al., 1995; LIMA DE ALBUQUERQUE et al., 2010).

Foi possível observar a redução significativa nos níveis de atividade da MPO dos animais tratados com EEtOH-Cd ou FaHex-Cd quando comparado ao grupo colítico. A redução na atividade da MPO pode ser interpretada como

uma manifestação do efeito anti-inflamatório relacionado a espécie *C. duarteanum*.

A inflamação em modelos de colite induzida por TNBS é caracterizada por uma resposta imunológica via Th1, em que se observa o aumento de TNF α , IL-1 β , IL-12, IL-17, IL-18 e IL-6. Durante a inflamação crônica, a resposta tem sido observada como Th1/Th17 e aumento na expressão da IL-17 e IL-12 (ALEX et al., 2009; SHI; WINSTON; SARNA, 2011; ZHU et al., 2012). Tendo em vista essa informação da literatura, passou-se a investigar o envolvimento do TNF α , IL-1 β (pró-inflamatórias) e IL-10 (anti-inflamatória) no efeito anti-inflamatório intestinal promovido pela espécie vegetal.

O TNF α é uma citocina pleiotrópica que está envolvida em muitos aspectos relevantes da inflamação sendo importante para a patogênese da DII (NEURATH, 2014). Inclui-se como seus mecanismos, a expressão de moléculas de adesão, recrutamento de neutrófilos, aumento da permeabilidade intestinal, ativação das células imunes com subsequente liberação de outras citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-6 juntamente com iniciação do efeito citotóxico e apoptótico (ARAB et al., 2014).

Os dados obtidos nesse trabalho descrevem uma supra regulação do estado inflamatório com aumento dos níveis do TNF- α nos ratos colíticos quando comparados aos não colíticos, o que corrobora os achados da literatura (WITACENIS et al., 2012). Entretanto, o tratamento dos animais com EEtOH- Cd ou FaHex- Cd foi capaz de reduzir significativamente os níveis de TNF- α quando comparado ao controle colítico, sugerindo a supressão do TNF- α no efeito anti-inflamatório promovido pela espécie vegetal estudada.

A IL-1 β é uma citocina multifuncional com importante papel na iniciação e amplificação de muitas condições inflamatórias. É liberada de vários tipos celulares incluindo monócitos, macrófagos, neutrófilos e células endoteliais. O aumento na sua concentração tem sido encontrado nos tecidos intestinais de pacientes com DII. Um amplo número de efeitos nas células intestinais epiteliais tem sido demonstrado *in vitro* incluindo a ativação da cascata redox levando ao aumento da atividade transcricional e ativação e secreção de IL-8, IL-6, prostaglandina e óxido nítrico (LIGUMSKY et al., 1990; BÖCKER et al., 1998; ACOSTA-RODRIGUEZ et al., 2007).

Os dados obtidos nesse trabalho sustentam o que é relatado na literatura, ou seja, foi observado um aumento significativo nos níveis da IL-1 β nos animais colíticos quando comparados aos não colíticos e o tratamento com EEtOH-Cd promoveu redução significativa nesses níveis quando comparados aos animais colíticos. A FaHex-Cd não reduziu a IL-1 β embora tenha reduzido TNF α . Isso se explica pelo fato de que apesar dessas duas citocinas possuírem efeitos semelhantes, apresentam mecanismos de produção diferentes. A IL-1 β é produzida na sua forma inativa tornando necessária a clivagem para ativação. Isso ocorre por meio da ativação de um grande complexo multiproteico conhecido por inflamassoma, cuja função é produzir IL-1 β por meio da ativação da caspase 1 (LI P et al., 1995; NEURATH, 2014; OGRYZKO; RENSHAW; WILSON, 2014). O TNF α , por sua vez, é produzido como uma proteína transmembrana da qual o TNF solúvel é liberado por clivagem proteolítica via enzima metaloproteinase conversora de TNF (NEURATH, 2014). Portanto, os resultados sugerem que diferentemente de FaHex-Cd, compostos presentes no EEtOH-Cd podem interferir na maquinaria da ativação da síntese da IL-1 β , inibindo a sua produção nesse processo inflamatório.

Estudos *in vitro* e *in vivo* tem evidenciado que o aumento de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α ou IL-1 β podem alterar a permeabilidade do epitélio intestinal e facilitar a infiltração de células inflamatórias contribuindo para perpetuar o processo inflamatório intestinal (DOTHEL et al., 2013). Entretanto, os tratamentos com as amostras vegetais derivadas de *C. duarteanum* foram capazes de prevenir os aumentos nos níveis dessas citocinas, sugerindo sua potencial atividade anti-inflamatória intestinal via TNF- α e IL-1 β .

Esse efeito de redução das citocinas TNF- α ou IL-1 β pode ser atribuído a presença dos triterpenos na espécie vegetal estudada, já que esses compostos são citados na literatura por possuírem um amplo espectro de atividades biológicas tais como: antitumoral, antibacteriana, antiviral e anti-inflamatória (YOGESWARI; SRIRAM, 2005). Os terpenoides são eficazes em prevenir o aumento significativo de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6, em modelos que mimetizam doenças inflamatórias intestinais (HUR et al., 2012).

O próximo passo foi avaliar a participação da via da IL-10 no efeito anti-inflamatório promovido por *C. duarteanum*. A IL-10 possui primariamente funções imunossupressoras em tecidos inflamados. Esta citocina anti-inflamatória é atualmente conhecida por ser produzida por uma variedade de tipos celulares incluindo células mielóides e diferentes subtipos de células T (STEPANKOVA et al., 2007), mas foi originalmente identificada como fator produzido pelas células Th2 que inibiam a síntese de citocinas produzidas pelas células Th1. A IL-10 suprime a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IL-6, IL-1 e TNF- α de macrófagos ativados *in vitro* e bloqueia a habilidade dos macrófagos estimular a produção de INF pelas células Th1. A IL-10 é produzida em grandes quantidades pelo subtipo de células TCD4 $^{+}$ chamadas de células regulatórias (T_{regs}). As T_{regs} mantêm a homeostase por suprimir resposta adaptativa das células T e previnem a autoimunidade (JONES-HALL; GRISHAM, 2014)

Foi possível observar a elevação significativa nos níveis de IL-10 nos animais tratados com EEtOH-Cd ou FaHex-Cd quando comparados aos animais colíticos. Essa elevação pode ser atribuída a um mecanismo compensatório frente a injúria colônica, possivelmente desempenhando um papel na redução da inflamação da mucosa impedindo-a de se tornar descontrolada, pois a IL-10 regula negativamente a apresentação antigênica e posteriormente a liberação de citocinas pró-inflamatórias tal como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (SCHREIBER et al., 1995; ARAB et al., 2014).

O TNF- α atua em importantes vias de sinalização inflamatória, incluindo a expressão da cicloxigenase-2 (COX-2), que tem um papel chave na patogênese das doenças inflamatórias no trato gastrintestinal, incluindo a retocolite ulcerativa (AGOFF et al., 2000). A cicloxigenase (COX) é uma enzima envolvida na conversão do ácido araquidônico em prostaglandina. A COX-1 é constitutiva e importante para manutenção do organismo. A COX-2 é responsável pela inflamação e rapidamente supra-regulada por fatores de crescimento e citocinas (PARK, 2007). O aumento na expressão da COX-2 leva a produção de espécies reativas de oxigênio, excessiva produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) e tromboxano B₂ (TXB₂) que são importantes mediadores inflamatórios e contribuem para a hiperemia, edema e disfunção contribuindo para o dano tecidual (O'CONNOR; ZENEWICZ; FLAVELL, 2010).

Estudos tem demonstrado que COX-2 é predominantemente expressa em colite experimental. Humanos e animais colíticos apresentaram melhora considerável do processo inflamatório quando utilizaram inibidores da COX-2 (MAHADEVAN et al., 2002).

Neste trabalho, foi observado que o grupo colítico apresentou alta expressão de COX-2 quando comparado ao não colítico. O tratamento com as drogas vegetais estudadas preveniu o aumento na expressão dessa enzima. Esses dados sugerem que o efeito anti-inflamatório intestinal apresentado pelo EEtOH-Cd e FaHex-Cd é possivelmente mediado pela redução na expressão da COX-2. Estudos realizados por Zwolinska-Wcislo et al. (2011) mostraram que o tratamento com inibidor da COX-2 diminuiu a área de lesão, a atividade da mieloperoxidase (MPO) e a expressão de marcadores pró-inflamatórios como o TNF- α , o que corrobora com os resultados até aqui obtidos.

O dano epitelial que ocorre durante a retocolite ulcerativa pode facilitar a invasão de bactérias intestinais, resultando em inflamação crônica da mucosa intestinal. A inflamação crônica está associada a uma alta atividade proliferativa das células epiteliais, de forma anormal e persistente, sendo responsável pela progressão da inflamação do cólon e câncer colorectal (VETUSCHI et al., 2002).

O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é uma proteína intranuclear cuja sua expressão está relacionada a proliferação celular e reparo do DNA, sendo expressa em altos níveis durante a fase S do ciclo celular (PRELICH; STILLMAN, 1988). Estudos mostram que a expressão do PCNA é supra-regulada durante a inflamação crônica por induzir a proliferação de células epiteliais para reparar a mucosa (FUKUI et al., 2006; SÁNCHEZ-FIDALGO et al., 2013).

No presente trabalho, a expressão da PCNA foi aumentada nos animais colíticos e o tratamento com EEtOH-Cd (125 mg/kg) ou FaHex-Cd (62,5 mg/kg) diminuiu significativamente a expressão dessa proteína. Portanto, o tratamento com as amostras vegetais estudadas protegeram as células epiteliais intestinais do dano induzido pelo TNBS e esse efeito pode ser mediado via regulação do PCNA.

O processo inflamatório está intimamente relacionado à formação de espécies reativas de oxigênio, estando o estresse oxidativo envolvido na patogênese das doenças inflamatórias intestinais (BOUZID et al., 2013). O estado redox do epitélio intestinal desempenha um papel fundamental na manutenção da função e integridade da mucosa. O sistema antioxidante enzimático e não enzimático é a primeira linha de defesa da mucosa intestinal frente aos desequilíbrios redox (BIASI et al., 2013).

A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima chave que converte o superóxido em H_2O_2 , um metabólito mais estável. Durante o estresse oxidativo e processo inflamatório a atividade da SOD tende a ser diminuída em tecidos inflamados quando comparados aos não inflamados. Esta baixa atividade da SOD diminuída permite o acúmulo de superóxido e subsequente ação oxidativa no tecido intestinal, assim como aumento na expressão das moléculas de adesão (KANNAN; GURUVAYOORAPPAN, 2013).

Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram uma diminuição da expressão da SOD nos animais colíticos quando comparados aos não-colíticos. Entretanto, o tratamento com EEtOH-Cd ou FaHex-Cd aumentou significativamente a expressão dessa enzima quando comparados aos animais colíticos, sugerindo participação do efeito antioxidante na atividade anti-inflamatória intestinal promovida pela espécie vegetal estudada.

O tratamento com EEtOH-Cd ou FaHex-Cd não alteraram igualmente todos os parâmetros avaliados nesse estudo. De fato, não existe nenhuma droga capaz de alterar todas as etapas do processo inflamatório nos modelos experimentais das doenças inflamatórias intestinais (BALLESTER et al., 2005).

Os resultados obtidos no modelo de retocolite ulcerativa demonstraram o efeito anti-inflamatório promovido por EEtOH-Cd (125 mg/kg) ou FaHex-Cd (62,5 mg/kg). Tal efeito está relacionado à inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) além do efeito imuno-regulatório evidenciado pelo aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 o que justifica os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios.

Portanto, é possível concluir que *C. duarteanum* apresenta promissora atividade gastroprotetora, cicatrizante e anti-inflamatória intestinal e que a

atividade antiulcerogênica está relacionada a mecanismos citoprotetores, antioxidantes e moduladores da resposta imune intestinal.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados foi possível concluir que:

- O extrato etanólico bruto (EEtOH-Cd) e a fase hexânica (FaHex-Cd) obtidos da espécie vegetal *C. duarteanum* apresentaram efeito cicatrizante relacionado a proliferação celular, aumento do número de vasos e da secreção de muco, além de efeito protetor na mucosa duodenal, o que sugere atividade antiulcerogênica;
- O efeito protetor da mucosa gástrica induzido pelo EEtOH-Cd e FaHex-Cd é atribuído a mecanismos antioxidante e citoprotetor;
- As amostras testes (EEtOH-Cd e FaHex-Cd) apresentaram efeito anti-inflamatório intestinal na retocolite ulcerativa aguda e com recidiva;
- O tratamento com EEtOH-Cd e FaHex-Cd em animais colíticos reduziu os níveis das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e aumentou a citocina anti-inflamatória (IL-10), o que caracteriza um efeito regulatório da resposta imunológica.
- A melhora no processo inflamatório intestinal observada nos animais tratados com EEtOH-Cd ou FaHex-Cd está associada a redução na expressão da cicloxigenase-2 (COX-2), do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e ao aumento da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD).

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABDEL-SALAM, O. M. et al. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. **Journal of physiology, Paris**, v. 95, p. 105–27, 2001.
- ABREU, M. T.; ARDITI, M. Innate immunity and toll-like receptors: clinical implications of basic science research. **J Pediatr**, v. 144, p. 421–429, 2004.
- ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V et al. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. **Nature immunology**, v. 8, p. 942–9, 2007.
- ADEROGBA, M. A. et al. Isolation of antioxidant constituents from Combretum apiculatum subsp. apiculatum. **South African Journal of Botany**, v. 79, p. 125–131, 2012.
- ADLER, R. S.; GALLAGHER, G. T.; SZABO, S. Duodenal ulcerogens cysteamine and propionitrile decrease duodenal neutralization of acid in the rat. **Digestive diseases and sciences**, v. 28, p. 716–723, 1983.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121–6, 1984.
- AGOFF, S. N. et al. The role of cyclooxygenase 2 in ulcerative colitis-associated neoplasia. **The American journal of pathology**, v. 157, p. 737–45, 2000.
- AGRA, M. D. F. **Plantas da medicina popular dos Cariris Velhos, Paraíba, Brasil: espécies mais comuns**. João Pessoa: Editora União, 1995.
- AHERN, P. P. et al. Interleukin-23 Drives Intestinal Inflammation through Direct Activity on T Cells. **Immunity**, v. 33, p. 279–288, 2010.
- AHLUWALIA, J. P. Immunotherapy in inflammatory bowel disease. **The Medical clinics of North America**, v. 96, p. 525–44, 2012.
- AIHARA, T. et al. Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: past, present, and future. **Pharmacology & therapeutics**, v. 98, p. 109–27, 2003.
- ALEX, P. et al. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. **Inflammatory Bowel Diseases**, p. 341–352, 2009.
- ALSTEAD, E. . The pill: safe sex and Crohn's disease? **Gut**, v. 45, p. 165–166, 1999.
- AMEHO, C. K. et al. Prophylactic effect of dietary glutamine supplementation on interleukin 8 and tumour necrosis factor alpha production in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis. **Gut**, v. 41, p. 487–493, 1997.

- ANIAGU, S. O. et al. Anti-diarrhoeal and ulcer-protective effects of the aqueous root extract of *Guiera senegalensis* in rodents. **Journal of ethnopharmacology**, v. 97, p. 549–54, 2005.
- ARAB, H. H. et al. Camel's milk ameliorates TNBS-induced colitis in rats via downregulation of inflammatory cytokines and oxidative stress. **Food and chemical toxicology**, v. 69, p. 294–302, 2014.
- ARAWWAWALA, L. D. A M.; ARAMBEWELA, L. S. R.; RATNASOORIYA, W. D. Gastroprotective effect of *Piper betle* Linn. leaves grown in Sri Lanka. **Journal of Ayurveda and integrative medicine**, v. 5, p. 38–42, 2014.
- ARNÉR, E. S. J.; HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **European Journal of Biochemistry**, v.267, p. 6102-9, 2000.
- ARO, P. et al. Peptic ulcer disease in a general adult population: The kalixanda study: A random population-based study. **American Journal of Epidemiology**, v. 163, p. 1025–1034, 2006.
- ASMARI, A. AL et al. Gastroprotective effect of minocycline in experimentally induced gastric ulcers in rats. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 7, p. 586–596, 2014.
- ASUZU, I. U.; ADIMORAH, R. I. The antiinflammatory activity of extracts from the root of *Combretum dolichopetalum*. **Phytomedicine**, v. 5, p. 25–8, 1998.
- AWAAD, A. S.; EL-MELIGY, R. M.; SOLIMAN, G. A. Natural products in treatment of ulcerative colitis and peptic ulcer. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 17, p. 101–124, 2013.
- BAKER, D. D. et al. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural product reports**, v. 24, p. 1225–1244, 2007.
- BALARAMAN, R.; BAFNA, P. A.; KOLHAPURE, S. A. Antioxidant activity of DHC-1 - A herbal formulation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 135–141, 2004.
- BALLESTER, I. et al. Monochloramine induces acute and protracted colitis in the rat: response to pharmacological treatment. **Life sciences**, v. 76, p. 2965–80, 2005.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v.78, p. 431-441, 2005.
- BANDONI, A.; CZEPAK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores.** Vitoria: Edufes, 2008. p. 624
- BANDYOPADHYAY, D. et al. Gastric toxicity and mucosal ulceration induced by oxygen-derived reactive species: protection by melatonin. **Current molecular medicine**, v. 1, p. 501–513, 2001.

- BANDYOPADHYAY, D.; CHATTOPADHYAY, A. Reactive oxygen species-induced gastric ulceration: protection by melatonin. **Current medicinal chemistry**, v. 13, p. 1187–1202, 2006.
- BARKUN, A.; LEONTIADIS, G. Systematic Review of the Symptom Burden, Quality of Life Impairment and Costs Associated with Peptic Ulcer Disease. **American Journal of Medicine**, v. 123, 2010.
- BARNICH, N.; DARFEUILLE-MICHAUD, A. Adherent-invasive Escherichia coli and Crohn's disease. **Current opinion in gastroenterology**, v. 23, p. 16–20, 2007.
- BASU, S.; HAZRA, B. Evaluation of nitric oxide scavenging activity, *in vitro* and *in vivo*, of selected medicinal plants traditionally used in inflammatory diseases. **Phytother Res**, v. 20, p. 896–900, 2006.
- BATISTA, L. M. et al. Gastric antiulcer activity of *Syngonanthus arthrotrichus* SILVEIRA. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 27, p. 328–32, 2004.
- BATISTA, L. M. et al. Gastroprotective Effect of the Ethanolic Extract and Fractions obtained from *Syngonanthus bisulcatus* Rul. **Records Natural Product**, v.7, p. 35–44, 2013.
- BATISTA, L. M. et al. Gastroprotective effects (in rodents) of a flavonoid rich fraction obtained from *Syngonanthus macrolepsis*. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 66, p. 445–52, 2014.
- BAUGH, M. D. et al. Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 117, p. 814–822, 1999.
- BAUMGART, D. C.; SANDBORN, W. J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. **Lancet**, v. 369, p. 1641–1657, 2007.
- BAUMGART, D. C.; SANDBORN, W. J. Crohn's disease. **Lancet**, v. 380, p. 1590–605, 2012.
- BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS-NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo/SP: Editora da Universidade de São Paulo, 1976.
- BELL, C. J.; GALL, D. G.; WALLACE, J. L. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. **The American journal of physiology**, v. 268, p. G622–G630, 1995.
- BERARDI, R. R. Inflammatory bowel disease. In: HERFINDAL, E.; GOURLEY, D. (Eds.). **Textbook of Therapeutics-Drug and Disease Management**. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p.483-502.
- BERNSTEIN, C. N. et al. The prevalence of extraintestinal diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study. **The American journal of gastroenterology**, v. 96, p. 1116–1122, 2001.

BERSTAD, K.; BERSTAD, A. I infection in peptic ulcer disease. **Scand Journal Gastroenterology**, v. 28, p. 561–567, 1993.

BHATIA, V.; TANDON, R. K. Stress and the gastrointestinal tract. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.20, p.332-9, 2005.

BHATTACHARYYA, A. et al. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiological reviews**, v. 94, p. 329–54, 2014.

BIAGLOW, J. E. et al. Factors influencing the oxidation of cysteamine and other thiols: implications for hyperthermic sensitization and radiation protection. **Radiation research**, v. 100, p. 298–312, 1984.

BIASI, F. et al. Inflammatory bowel disease: mechanisms, redox considerations, and therapeutic targets. **Antioxidants & redox signaling**, v. 19, p. 1711–47, 2013.

BIGHETTI, A. E. et al. Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from Mikania laevigata Schultz Bip. **Phytomedicine**, v. 12, p. 72–77, 2005.

BISCHOFF, S. C.; KRÄMER, S. Human mast cells, bacteria, and intestinal immunity. **Immunological Reviews**,v.217, p.329-37, 2007.

BISOLI, E. et al. Bioactive pentacyclic triterpenes from the stems of Combretum laxum. **Molecules**, v. 13, p. 2717–2728, 2008.

BÖCKER, U. et al. Differential expression of interleukin 1 receptor antagonist isoforms in human intestinal epithelial cells. **Gastroenterology**, v. 115, p. 1426–1438, 1998.

BONAMIN, F. et al. The effect of a minor constituent of essential oil from Citrus aurantium: the role of β-myrcene in preventing peptic ulcer disease. **Chemico-biological interactions**, v. 212, p. 11–9, 2014.

BOTTING, R. M. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927-2004).**Journal of Thermal Biology**, v.31, p. 208-219,.2006.

BOUMA, G.; STROBER, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 3, p. 521–533, 2003.

BOUZID, D. et al. Oxidative stress markers in intestinal mucosa of Tunisian inflammatory bowel disease patients. **Saudi journal of gastroenterology**, v. 19, p. 131–5, 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRAGA, R. **Plantas do nordeste, especialmente do Ceará.** 2^a. ed. Fortaleza: Imprensa Oficial, 1960.

BRASIL. **Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS**BrasilMinistério da Saúde RENISUS, , 2009. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>Acesso em: Outubro 2014.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, p. 229–239, 2010.

BREESE, E. et al. Interleukin-2- and interferon-gamma-secreting T cells in normal and diseased human intestinal mucosa. **Immunology**, v. 78, p. 127–131, 1993.

BRIDGES, R. B.; FU, M. C.; REHM, S. R. Increased neutrophil myeloperoxidase activity associated with cigarette smoking. **European journal of respiratory diseases**, v. 67, p. 84–93, 1985.

BROWN, J. F. et al. Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells. **The American journal of physiology**, v. 265, p. G418–G422, 1993.

BRUNTON, L. Goodman & Gilman ' s The Pharmacological Basis of Therapeutics. In: **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. McGraw-Hill Professional; 12 edition, 2011, p. 417–55.

BURISCH, J. et al. East-West gradient in the incidence of inflammatory bowel disease in Europe: the ECCO-EpiCom inception cohort. **Gut**, v. 63, p. 588–97, 2014.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of natural products**, v. 67, p. 2141–53, 2004.

CADENAS, E. Basic mechanisms of antioxidant activity. **BioFactors**, v. 6, p. 391–397, 1997.

CADWELL, K. Crohn's disease susceptibility gene interactions, a NOD to the newcomer ATG16L1. **Gastroenterology**, v. 139, p. 1448–50, 2010.

CALABRÒ, A. et al. Spatial and temporal pattern of expression of interstitial collagenase, stromelysin/transin, gelatinase A, and TIMP-1 during experimental gastric ulcer healing. **Digestion**, v. 70, p. 127–38, 2004.

CALAM, J.; BARON, J. H. ABC of the upper gastrointestinal tract: Pathophysiology of duodenal and gastric ulcer and gastric cancer. **BMJ**, v. 323, p. 980–982, 2001.

CALDAS FILHO, M. R. D. **Avaliação da atividade gastroprotetora de Maytenus distichophylla Mart. Ex Reissek (Celastraceae)**. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, 2013.

CALIXTO, J. B. et al. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Medica**, v.70, p. 93-103, 2004.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131–134, 2005.

CAMINAL HOMAR, J. ¿Medicinas complementarias o alternativas? Un dilema para el sistema público. **Atención Primaria**, v. 35, p. 389–391, 2005.

CAMPOS, F. G. et al. Inflammatory bowel diseases: principles of nutritional therapy. **Revista do Hospital das Clínicas**, v. 57, p. 187–98, 2002.

CASALI, J. J. et al. Epidemiological analysis and use of rapid urease test in patients with perforated peptic ulcers. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 39, p. 93–8, 2012.

CASSINOTTI, A.; TRAVIS, S. Incidence and clinical significance of immunogenicity to infliximab in Crohn's disease: A critical systematic review. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.15, p.1264-75, 2009.

CASTRO, L. . et al. Úlcera péptica Gastroduodenal. In: **Tratado clínica médica**. 2^a. ed, 2009.

CHAABI, M. et al. Triterpenes and polyphenols from Anogeissus leiocarpus (Combretaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 59–62, 2008.

CHENTER, L.; RODRIGUES JÚNIOR, L. Úlcera Péptica. In: MISZPUTEN, S. J. (Ed.). **Guia de Gastroenterologia**. Barueri- SP: Editora Manole Ltda, 2002. p. 49–64.

CHIKA, A.; BELLO, S. O. Antihyperglycaemic activity of aqueous leaf extract of Combretum micranthum (Combretaceae) in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 129, p. 34–7, 2010.

CHO, E. J. et al. Anti-inflammatory effects of methanol extract of Patrinia scabiosaeefolia in mice with ulcerative colitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 428–435, 2011.

CHO, J. .; ABRAHAM, C. Inflammatory bowel disease genetics: Nod2. **Annual Review of Medicine**., v. 58, p. 401–416, 2007.

CHOI, K.-S. et al. Attenuation of cysteamine-induced duodenal ulcer with Cochinchina momordica seed extract through inhibiting cytoplasmic phospholipase A2/5-lipoxygenase and activating γ -glutamylcysteine synthetase. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 27, p. 13–22, 2012.

CIPOLLA, G. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and inflammatory bowel disease: current perspectives. **Pharmacological research**, v. 46, p. 1–6, 2002.

- CLAYBURGH, D. R.; SHEN, L.; TURNER, J. R. A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 84, p. 282–291, 2004.
- CORDELL, G. A.; COLVARD, M. D. Natural products and traditional medicine: Turning on a paradigm. **Journal of Natural Products**, v.75, p.514-525, 2012.
- CORRIDONI, D.; ARSENEAU, K. O.; COMINELLI, F. Inflammatory bowel disease. **Immunology Letters**, v.161, p.231-235, 2014.
- COSNES, J. Tobacco and IBD: Relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, v.18, p.481-496, 2004.
- COSNES, J. et al. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 140, p. 1785–1794, 2011.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670-95, 2013.
- CROSS, C.; HALLIWELL, B.; ALLEN, A. Antioxidant protection: a function of tracheobronchial and gastrointestinal mucus. **The Lancet**, v. 323, p. 1328–1330, 1984.
- D'ACAMPORA, J. . et al. Perfil epidemiológico dos pacientes portadores de úlcera péptica perfurada atendidos no centro cirúrgico do hospital florianópolis. **Rev Med Res**, v. 10, p. 141–146, 2008.
- DA SILVA, M. S. et al. Anti-inflammatory intestinal activity of Abarema cochliacarpos (Gomes) Barneby & Grimes in TNBS colitis model. **Journal of ethnopharmacology**, v. 128, p. 467–75, 2010.
- DANESE, S. et al. Activated platelets are the source of elevated levels of soluble CD40 ligand in the circulation of inflammatory bowel disease patients. **Gut**, v. 52, p. 1435–1441, 2003.
- DANESE, S.; FIOCCHI, C. Ulcerative colitis. **New England Journal of Medicine**, v. 365, p. 1713–1725, 2011.
- DANESE, S.; FIOCCHI, C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. **World journal of gastroenterology**, v. 30, p. 4807–4812, 2006.
- DANESE, S.; SANS, M.; FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. **Autoimmunity reviews**, v. 5, p. 394–400, 2004.
- DAS, D.; BANERJEE, R. K. Effect of Stress on the Antioxidant Enzymes and Gastric-Ulceration. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 125, p. 115–125, 1993.
- DE MORAIS LIMA, G. R. **Atividade Gastroprotetora de Combretum duarteanum Cambess (Combretaceae) em modelos animais**. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos

Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

DE MORAIS LIMA, G. R. et al. Bioactivities of the Genus Combretum (Combretaceae): A Review. **Molecules**, v. 17, p.9142-206, 2012.

DE MORAIS LIMA, G. R. et al. Gastroprotective activity of the ethanolic extract and hexane phase of *Combretum duarteanum* Cambess. (Combretaceae). **Journal of Natural Medicines**, v. 67, p. 492–502, 2013.

DEFONESKA, A.; KAUNITZ, J. D. Gastroduodenal mucosal defense. **Current opinion in gastroenterology**, v. 26, p. 604–10, 2010.

DEMAUDE, J. et al. Phenotypic changes in colonocytes following acute stress or activation of mast cells in mice: implications for delayed epithelial barrier dysfunction. **Gut**, v. 55, p. 655–661, 2006.

DHARMANI, P.; CHADEE, K. Biologic therapies against inflammatory bowel disease: a dysregulated immune system and the cross talk with gastrointestinal mucosa hold the key. **Current molecular pharmacology**, v. 1, p. 195–212, 2008.

DI SABATINO, A. et al. New pathogenic paradigms in inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.18, p. 368-71, 2012.

DIONNE, S. et al. Colonic explant production of IL-1 and its receptor antagonist is imbalanced in inflammatory bowel disease (IBD). **Clinical and experimental immunology**, v. 112, p. 435–442, 1998.

DIPIRO, J. T. et al. No Title. In: **Pharmacotherapy, A Pathophysiologic Approach**. 5. ed. [s.l.] The McGraw-Hill companies, 2002. p. 625–369.

DOTHEL, G. et al. Animal models of chemically induced intestinal inflammation: Predictivity and ethical issues. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 139, p. 71-86, 2013.

EBERHART, C. E.; DUBOIS, R. N. Eicosanoids and the gastrointestinal tract. **Gastroenterology**, v. 109, p. 285–301, 1995.

ECKBURG, P. B. et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, v. 308, p. 1635–8, 2005.

EKEN, A et al. IL-23R+ innate lymphoid cells induce colitis via interleukin-22-dependent mechanism. **Mucosal immunology**, v. 7, p. 143–54, 2014.

ELIAKIM, R.; KARMELOV, F. Divergent effects of nicotine administration on cytokine levels in rat small bowel mucosa, colonic mucosa, and blood. **The Israel Medical Association journal : IMAJ**, v. 5, p. 178–180, 2003.

EVANS, M. J. et al. Reciprocal antagonism between estrogen receptor and NF-kappaB activity in vivo. **Circulation Research.**, v. 89, p. 823–830, 2001.

EVERHART, J. E. Recent developments in the epidemiology of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology clinics of North America**, v. 29, p. 559–578, 2000.

FALCÃO, H. DE S. et al. Gastroprotective mechanisms of the chloroform and ethyl acetate phases of *Praxelis clematidea* (Griseb.) R.M.King & H.Robinson (Asteraceae). **Journal of natural medicines**, v. 67, p. 480–91, 2013.

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

FINN, P. E.; PURNELL, P.; PILKINGTON, G. J. Effect of histamine and the H₂ antagonist cimetidine on the growth and migration of human neoplastic glia. **Neuropathology and applied neurobiology**, v. 22, p. 317–324, 1996.

FOGLIO, M. A. et al. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos : Um Modelo Multidisciplinar. **MultiCiências**, v. 7, p. 1–8, 2006.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, p. 1-12, 2009.

FORT, M. M. et al. IL-25 Induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. **Immunity**, v. 15, p. 985–995, 2001.

FRANK, D. N. et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 13780–13785, 2007.

FRANKE, A.; TEYSSEN, S.; SINGER, M. V. Alcohol-related diseases of the esophagus and stomach. **Digestive Diseases**, v. 23, p. 204-13, 2006.

FRIDOVICH, I. Biological effects of the superoxide radical. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 247, p. 1–11, 1986.

FUCHS, A. et al. Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of il-12- and il-15-responsive ifn-??-producing cells. **Immunity**, v. 38, p. 769–781, 2013.

FUKUI, T. et al. Investigation of Musashi-1 expressing cells in the murine model of dextran sodium sulfate-induced colitis. **Digestive diseases and sciences**, v. 51, p. 1260–8, 2006.

FURLAN, R. et al. Sympathetic overactivity in active ulcerative colitis: effects of clonidine. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 290, p. R224–R232, 2006.

FUSS, I. J. et al. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. **The Journal of clinical investigation**, v. 113, p. 1490–1497, 2004.

- FYHRQUIST, P. et al. Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of Terminalia and Combretum (Combretaceae) growing in Tanzania. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 169–177, 2002.
- GARCIA RODRIGUEZ, L. A; RUIGOMEZ, A; PANES, J. Acute gastroenteritis is followed by an increased risk of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 130, p. 1588–1594, 2006.
- GEORGE, J. et al. The long-term outcome of ulcerative colitis treated with 6-mercaptopurine. **The American journal of gastroenterology**, v. 91, p. 1711–1714, 1996.
- GEREMIA, A. et al. IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. **The Journal of experimental medicine**, v. 208, p. 1127–1133, 2011.
- GEREMIA, A. et al. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. **Autoimmunity reviews**, v. 13, p. 13-10, 2013.
- GERMANÒ, M. P. et al. Anti-ulcer, anti-inflammatory and antioxidant activities of the n-butanol fraction from *Pteleopsis suberosa* stem bark. **Journal of ethnopharmacology**, v. 115, p. 271–5, 2008.
- GIRARDIN, S. E.; HUGOT, J. P.; SANSONETTI, P. J. Lessons from Nod2 studies: Towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing. **Trends in Immunology**, v. 24, p. 652-8, 2003.
- GIRLICH, C.; SCHOLMERICH, J. Topical delivery of steroids in inflammatory bowel disease. **Current drug delivery**, v. 9, p. 345–9, 2012.
- GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, p. 953–964, 2005.
- GOTO, Y.; IVANOV, I. I. Intestinal epithelial cells as mediators of the commensal-host immune crosstalk. **Immunology and cell biology**, v. 91, p. 204–14, 2013.
- GOUVEIA, M. G. S. et al. Antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract of *Combretum duarteanum* in rodents. **Journal of medicinal food**, v. 14, p. 1389–96, 2011.
- GOVINDARAJAN, R. et al. Antiulcer and antimicrobial activity of *Anogeissus latifolia*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 106, p. 57–61, 2006.
- GRISHAM, M. B. et al. Interaction between oxygen radicals and gastric mucin. **The American journal of physiology**, v. 253, p. G93–G96, 1987.
- GROENEN, M. J. M. et al. Incidence of duodenal ulcers and gastric ulcers in a Western population: back to where it started. **Canadian journal of gastroenterology**, v. 23, p. 604–8, 2009.

GROSCHWITZ, K. R.; HOGAN, S. P. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 124, p. 3–20, 2009.

GUARDIA, T. et al. Mucus synthesis and sulphydryl groups in cytoprotection mediated by dehydroleucodine, a sesquiterpene lactone. **Journal of natural products**, v. 57, p. 507–9, 1994.

GUIMARÃES, A. G. et al. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 107, p. 949–957, 2010.

GUO, G. et al. Psychological stress enhances the colonization of the stomach by *Helicobacter pylori* in the BALB/c mouse. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 12, p. 478–485, 2009.

HAMILTON, M. J. et al. Essential role for mast cell tryptase in acute experimental colitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, p. 290–295, 2011.

HAROLD, K.; GRANT, D. M.; MITCHEL, J. Principles of Medical Pharmacology. In: 7. ed. [s.l.] Elsevier Canada Ltd, 2007. p. 557- 559.

HART, A. L. et al. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 129, p. 50–65, 2005.

HELANDER, H. F. Morphological studies on the margin of gastric corpus wounds in the rat. **Journal of submicroscopic cytology**, v. 15, p. 627–643, 1983.

HELLER, F. et al. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. **Gastroenterology**, v. 129, p. 550–564, 2005.

HENDRICKSON, B. A.; GOKHALE, R.; CHO, J. H. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, p. 79–94, 2002.

HERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; MONTIEL-RUÍZ, C.; VÁZQUEZ-MARTÍNEZ, O. Gastric mucosal cell proliferation in ethanol-induced chronic mucosal injury is related to oxidative stress and lipid peroxidation in rats. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 80, p. 1161–1169, 2000.

HIGUCHI, L. M. et al. A prospective study of cigarette smoking and the risk of inflammatory bowel disease in women. **The American journal of gastroenterology**, v. 107, p. 1399–406, 2012.

HIRAISHI, H. et al. Role for mucous glycoprotein in protecting cultured rat gastric mucosal cells against toxic oxygen metabolites. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 121, p. 570–578, 1993.

- HISAMATSU, T. et al. Immune aspects of the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Pharmacology & therapeutics**, v. 137, p. 283–97, 2013.
- HOLLE, G. E. Pathophysiology and modern treatment of ulcer disease. **International journal of molecular medicine**, v. 25, p. 483–491, 2010.
- HOOGERWERF, W PASRICHA, P. J. Pharmacotherapy of gastric acidity, peptic ulcers, and gastroesophageal reflux disease. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (Eds.). **Pharmacol Basis of Ther**. New York: Mc Graw Hill, 2006. p. 967–981.
- HORINOUCHI, C. D. DA S. et al. *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae): potential as an antiproliferative and anti-inflammatory agent. **Journal of ethnopharmacology**, v. 145, p. 311–9, 2013.
- HOU, J. K.; EL-SERAG, H.; THIRUMURTHI, S. Distribution and manifestations of inflammatory bowel disease in Asians, Hispanics, and African Americans: a systematic review. **The American journal of gastroenterology**, v. 104, p. 2100–2109, 2009.
- HUANG, W. Y. et al. Histopathologic evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PC10) in oral epithelial hyperplasias and premalignant lesions. **Oral surgery, oral medicine, and oral pathology**, v. 78, p. 748–54, 1994.
- HUR, S. J. et al. Review of natural products actions on cytokines in inflammatory bowel disease. **Nutrition research (New York, N.Y.)**, v. 32, p. 801–16, 2012.
- HURST, S. D. et al. New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. **Journal of immunology**, v. 169, p. 443–453, 2002.
- HUTCHINGS, A. et al. **Zulu Medicinal Plants: An Inventory**. Pietermaritzburgl: University of Natal Press, 1996.
- IRVING, P. M.; PASI, K. J.; RAMPTON, D. S. Thrombosis and inflammatory bowel disease. **Clinical gastroenterology and hepatology**, v. 3, p. 617–628, 2005.
- JAIN, K. S. et al. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 1181–205, 2007.
- JANTCHOU, P. et al. Animal protein intake and risk of inflammatory bowel disease: The E3N prospective study. **The American journal of gastroenterology**, v. 105, p. 2195–2201, 2010.
- JAWANJAL, H. et al. Pharmacological evaluation of fruits of *Terminalia belerica* Roxb. for antiulcer activity. **Journal of complementary & integrative medicine**, v. 9, p. 9, 2012.

JEITNER, T. M.; LAWRENCE, D. A. Mechanisms for the cytotoxicity of cysteamine. **Toxicological Sciences**, v. 63, p. 57–64, 2001.

JESUS, N. Z. T. et al. Hyptis suaveolens (L.) Poit (Lamiaceae), a medicinal plant protects the stomach against several gastric ulcer models. **Journal of ethnopharmacology**, v. 150, p. 982–8, 2013.

JONES, M. K. et al. Gene therapy for gastric ulcers with single local injection of naked DNA encoding VEGF and angiopoietin-1. **Gastroenterology**, v. 121, p. 1040–1047, 2001.

JONES-HALL, Y. L.; GRISHAM, M. B. Immunopathological characterization of selected mouse models of inflammatory bowel disease: Comparison to human disease. **Pathophysiology**, p. 1–22, 2014.

KAMADA, N. et al. Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, p. 2269–2280, 2008.

KAMADA, N. et al. Human CD14+ macrophages in intestinal lamina propria exhibit potent antigen-presenting ability. **Journal of immunology**, v. 183, p. 1724–1731, 2009.

KAMADA, N. et al. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, p. 321–35, 2013.

KANGWAN, N. et al. Quality of healing of gastric ulcers: Natural products beyond acid suppression. **World journal of gastrointestinal pathophysiology**, v. 5, p. 40–7, 2014.

KANNAN, N.; GURUVAYOORAPPAN, C. Protective effect of Bauhinia tomentosa on acetic acid induced ulcerative colitis by regulating antioxidant and inflammatory mediators. **International immunopharmacology**, v. 16, p. 57–66, 2013.

KATIYAR, C. et al. Drug discovery from plant sources: An integrated approach. **Ayu**, v. 33, p. 10–9, 2012.

KAU, A. L. et al. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. **Nature**, v. 474, p. 327–336, 2011.

KAWASHIMA, R. et al. IL-13 receptor alpha2 promotes epithelial cell regeneration from radiation-induced small intestinal injury in mice. **Gastroenterology**, v. 131, p. 130–141, 2006.

KAWASHIMA, R. et al. Interleukin-13 damages intestinal mucosa via TWEAK and Fn14 in MiceA pathway associated with ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 141, p. 2119-2129, 2011.

KAYAMA, H.; TAKEDA, K. Regulation of intestinal homeostasis by innate and adaptive immunity. **International Immunology**, v. 24, p. 673–680, 2012.

KELLY, D.; CONWAY, S.; AMINOV, R. Commensal gut bacteria: Mechanisms of immune modulation. **Trends in Immunology**, v. 26, p. 326-33, 2005.

KELSALL, B. L.; LEON, F. Involvement of intestinal dendritic cells in oral tolerance, immunity to pathogens, and inflammatory bowel disease. **Immunological Reviews**, v. 206, p. 132-48, 2005.

KESSELRING, R.; STEFAN, F. F. Immune responses triggering colitis and colitis-associated carcinoma. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v.397, p. 527-33, 2012.

KHOMENKO, T. et al. Role of iron in the pathogenesis of cysteamine-induced duodenal ulceration in rats. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 296, p. G1277–G1286, 2009.

KIMURA, M. et al. Impairment of glutathione metabolism in human gastric epithelial cells treated with vacuolating cytotoxin from Helicobacter pylori. **Microbial pathogenesis**, v. 31, p. 29–36, 2001.

KINGSTON, D. G. I. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 496-511, 2011.

KLOPPER, R. . et al. **Checklist of the Flowering Plants of Sub-Saharan Africa: An Index of Accepted Names and Synonyms**. 42. ed. Pretoria: SABONET, 2006.

KOBAYASHI, K.; KANEDA, K.; KASAMA, T. Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. **Microscopy Research and Technique**, v. 53, p. 241–245, 2001.

KOELINK, P. J. et al. Targeting chemokine receptors in chronic inflammatory diseases: An extensive review. **Pharmacology and Therapeutics**, v.133, p. 1-18, 2012.

KOHÁRYOVÁ, M.; KOLÁROVÁ, M. Oxidative stress and thioredoxin system. **General physiology and biophysics**, v. 27, p. 71–84, 2008.

KOMEN, N. A. P. et al. Helicobacter genotyping and detection in peroperative lavage fluid in patients with perforated peptic ulcer. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, v. 12, p. 555–560, 2008.

KONDAMUDI, P. K. et al. Drugs as causative agents and therapeutic agents in inflammatory bowel disease. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 3, p. 289–296, 2013.

KONTUREK, S. J. et al. Helicobacter pylori and its involvement in gastritis and peptic ulcer formation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 57, p. 29-50, 2006.

KONTUREK, S. J.; KONTUREK, P. C.; BRZOZOWSKI, T. Prostaglandins and ulcer healing. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 56, p. 5–31, 2005.

KOOLHAAS, J. M. et al. Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, p. 1291-301, 2011.

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

KRUIDENIER, L. et al. Differential mucosal expression of three superoxide dismutase isoforms in inflammatory bowel disease. **Journal of Pathology**, v. 201, p. 7–16, 2003.

KRUIDENIER, L.; VERSPAGET, H. W. Antioxidants and mucosa protectives: realistic therapeutic options in inflammatory bowel disease? **Mediators of inflammation**, v. 7, p. 157–62, 1998.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K; FAUSTO, N. **Robins e Conran, Bases Patológicas das Doenças**. 7. ed. [s.l.] Elsevier Ltd, 2005. p. 91–93

KUNO, Y. et al. Possible involvement of neutrophil elastase in impaired mucosal repair in patients with ulcerative colitis. **Journal of gastroenterology**, v. 37, p. 22–32, 2002.

KURASHIMA, Y. et al. Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. **Nature Communications**, v. 3, p.1034, 2012.

KURASHIMA, Y.; GOTO, Y.; KIYONO, H. Mucosal innate immune cells regulate both gut homeostasis and intestinal inflammation. **European Journal of Immunology**, v. 43, p. 3108–3115, 2013.

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

LAKATOS, L. et al. Striking elevation in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in a province of western Hungary between 1977-2001. **World journal of gastroenterology**, v. 10, p. 404–409, 2004.

LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in Microbiology**, v.15, p.279-289, 2007.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Inflammasomes and Their Roles in Health and Disease. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 28, p. 137-61, 2012.

LANGHOLZ, E. Current trends in inflammatory bowel disease: the natural history. **Therapeutic advances in gastroenterology**, v. 3, p. 77–86, 2010.

LEE, Y. K. et al. Late Developmental Plasticity in the T Helper 17 Lineage. **Immunity**, v. 30, p. 92–107, 2009.

LEONG, R. W. Differences in Peptic Ulcer Between the East and the West. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 38, p. 363-79, 2009.

LEVENSTEIN, S. Stress and peptic ulcer: life beyond Helicobacter. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 316, p. 538–541, 1998.

LEY, R. E. et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v. 444, p. 1022-3, 2006.

LI, H.; HORKE, S.; FÖRSTERMANN, U. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.34, p.313-319, 2013.

LI P et al. Mice deficient in IL 1 beta converting enzyme are defective in production of mature IL 1 beta and resistant to endotoxic shock. **Cell**, v. 80, p. 401–411, 1995.

LICHTENBERGER, L. M.; SZABO, S.; REYNOLDS, E. S. Gastric emptying in the rat is inhibited by the duodenal ulcerogens, cysteamine and propionitrile. **Gastroenterology**, v. 73, p. 1072–6, 1977.

LICHTENBERGER, L. M.; SZABO, S.; TRIER, J. S. Duodenal ulcerogens, cysteamine and propionitrile, stimulate serum gastrin levels in the rat. **Gastroenterology**, v. 73, p. 1305–1308, 1977.

LIGUMSKY, M. et al. Role of interleukin 1 in inflammatory bowel disease--enhanced production during active disease. **Gut**, v. 31, p. 686–689, 1990.

LIM, J. H. et al. Gastroprotective Effect of Cochinchina momordica Seed Extract in Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug-Induced Acute Gastric Damage in a Rat Model. **Gut and Liver**, v. 8, p. 49–57, 2014.

LIMA DE ALBUQUERQUE, C. et al. Effect of kale and papaya supplementation in colitis induced by trinitrobenzenesulfonic acid in the rat. **e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism**, v. 5, p. e111–e116, 2010.

LIMA, I. O. **Avaliação farmacológica do extrato metanólico bruto e da fase nbutanólica obtida da espécie Herissantia crispa (L.) Brizicky em modelos animais frente à atividade antiulcerogênica**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de pós-graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos, Universidade Federal da Paraíba, 2008.

LIRA, S. R. DE S. et al. Gastroprotective effect of lupeol on ethanol-induced gastric damage and the underlying mechanism. **Inflammopharmacology**, v. 17, p. 221–8, 2009.

- LIU, C.; CRAWFORD, J. M. O trato gastrointestinal. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. (Eds.). **Robbins & Cotran. Patologia – Bases patológicas das doenças.** 7^a. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 213–218.
- LODES, M. J. et al. Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, p. 1296–1306, 2004.
- LOFTUS, E. V. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. **Gastroenterology**, v.126, p. 1504-17, 2004.
- LOFTUS, E. V.; SANDBORN, W. J. Epidemiology of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 126, p. 1504-17, 2002.
- LOIOLA, M. I. et al. Flora da Paraíba, Brasil: Combretaceae. v. 23, p. 330–342, 2009.
- LOPEZ, A.; PEYRIN-BIROULET, L. 5-Aminosalicylic acid and chemoprevention: Does it work? **Digestive Diseases**, v. 31, p. 248–253, 2013.
- LU, J.; HOLMGREN, A. The thioredoxin antioxidant system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 66, p. 75–87, 2014.
- LU, S. C. Regulation of glutathione synthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, v.30, p. 42-59, 2009.
- LUCHINI, A. C. et al. Intestinal anti-inflammatory activity of coumarin and 4-hydroxycoumarin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 31, p. 1343–50, 2008.
- LUTHER, J. et al. Empiric quadruple vs. triple therapy for primary treatment of Helicobacter pylori infection: Systematic review and meta-analysis of efficacy and tolerability. **The American journal of gastroenterology**, v. 105, p. 65–73, 2010.
- MACPHERSON, A. J.; HARRIS, N. L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. **Nature reviews. Immunology**, v. 4, p. 478–485, 2004.
- MAHADEVAN, U. et al. Safety of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in inflammatory bowel disease. **The American journal of gastroenterology**, v. 97, p. 910–4, 2002.
- MAHIDA, Y. R. et al. 5-Aminosalicylic acid is a potent inhibitor of interleukin 1 beta production in organ culture of colonic biopsy specimens from patients with inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 32, p. 50–54, 1991.
- MAITY, P. et al. Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer - Recent mechanistic update. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 253, p. 329-38, 2003.

MAJUMDAR, D.; BEBB, J.; ATHERTON, J. Helicobacter pylori infection and peptic ulcers. **Medicine**, v. 39, p. 154–161, 2011.

MALAGELADA, J. .; KUIPERS, E. .; BLASER, M. . Acid peptic disease: clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prognosis. In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. (Eds.). 23. ed. Philadelphia Pa: Saunders Elsevier; 2007, cap. 142.

MALFERTHEINER, P. et al. Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection: the Maastricht III Consensus Report. **Gut**, v. 56, p. 772-81, 2007.

MALFERTHEINER, P.; CHAN, F. K. L.; MCCOLL, K. E. L. Peptic ulcer disease. **Lancet**, v. 374, p. 1449–1461, 2009.

MALNICK, S. D. H. et al. Helicobacter pylori: Friend or foe? **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 20, p. 8979–8985, 2014.

MALTZMAN, J. S.; KORETZKY, G. A. Azathioprine : old drug , new actions. **Journal of Clinical Investigation**. v. 111, p. 1122–1124, 2003.

MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in Immunology**, v. 25, p. 677-86, 2004.

MARIA, A. O. et al. Gastric anti-ulcer activity of several alpha,beta-unsaturated carbonyl compounds in rats. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 23, p. 555–557, 2000.

MARIA-FERREIRA, D. et al. Rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen: gastroprotective and ulcer healing properties in rats. **PloS one**, v. 9, p. e84762, 2014.

MARINHO, M.; SILVA, C.; ANDRADE, L. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de caatinga no município de São José de Espinharas, Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, p. 170–182, 2011.

MARSHALL, B. J.; WARREN, J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet**, v. 1, p. 1311–1315, 1984.

MARSHALL, J. K. et al. Rectal 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis. **Cochrane database of systematic reviews (Online)**, p. CD004115, 2010.

MARTÍNEZ-LARA, I. et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as a marker of dysplasia in oral mucosa. **Acta stomatologica Belgica**, v. 93, p. 29–32, 1996.

MARTINI, N. D.; KATERERE, D. R. P.; ELOFF, J. N. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 207–212, 2004.

- MASELLA, R. et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, p. 577–86, 2005.
- MAWDSLEY, J. E.; RAMPTON, D. S. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. **Gut**, v. 54, p. 1481–1491, 2005.
- MCCHESNEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, p. 2015–22, 2007.
- MCEWEN, B.; LASLEY, E. N. Allostatic load: when protection gives way to damage. **Advances in mind-body medicine**, v. 19, p. 28–33, 2003.
- MCGRATH, J.; MCDONALD, J. W. D.; MACDONALD, J. K. Transdermal nicotine for induction of remission in ulcerative colitis. **Cochrane database of systematic reviews**, vol. 18, p. CD004722, 2004.
- MCKENZIE, S. M.; DOE, W. F.; BUFFINTON, G. D. 5-aminosalicylic acid prevents oxidant mediated damage of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in colon epithelial cells. **Gut**, v. 44, p. 180–185, 1999.
- MEDZHITOY, R. et al. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. **Molecular cell**, v. 2, p. 253–258, 1998.
- MERLUZZI, S. et al. Mast cells enhance proliferation of B lymphocytes and drive their differentiation toward IgA-secreting plasma cells. **Blood**, v. 115, p. 2810–2817, 2010.
- MILLER, T. A. Mechanisms of stress-related mucosal damage. **The American journal of medicine**, v. 83, p. 8–14, 1987.
- MINEKA, S.; KIHLSTROM, J. F. Unpredictable and uncontrollable events: a new perspective on experimental neurosis. **Journal of abnormal psychology**, v. 87, p. 256–271, 1978.
- MISHRA, V. et al. Anti-secretory and cyto-protective effects of chebulinic acid isolated from the fruits of Terminalia chebula on gastric ulcers. **Phytomedicine**, v. 20, p. 506–11, 2013.
- MIZOGUCHI, A. Animal models of inflammatory bowel disease. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 105, p. 263–320, 2012.
- MIZOGUCHI, A.; MIZOGUCHI, E. Animal models of IBD: linkage to human disease. **Current opinion in pharmacology**, v. 10, p. 578–87, 2010.
- MJÖSBERG, J. et al. Transcriptional control of innate lymphoid cells. **European Journal of Immunology**, v. 42, p. 1916–23, 2012.
- MOLODECKY, N. A. et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. **Gastroenterology**, v. 142, p. 46–54, 2012.

MONTENEGRO, C. DE A. Atividade gastroprotetora de *Xylopia langsdorffiana* St.-Hil. & Tul. (Annonaceae) em modelos animais. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de pós-graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos. Universidade Federal da Paraíba, 2011.

MOOSOPHON, P. et al. Antiplasmodial and cytotoxic flavans and diarylpropanes from the stems of *Combretum griffithii*. **Journal of natural products**, v. 76, p. 1298–302, 2013.

MORAES, T. M. et al. Healing actions of essential oils from *Citrus aurantium* and d-limonene in the gastric mucosa: the roles of VEGF, PCNA, and COX-2 in cell proliferation. **Journal of medicinal food**, v. 16, p. 1162–7, 2013.

MORRIS, G. P. et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology**, v. 96, p. 795–803, 1989.

MOSSER, D. M. The many faces of macrophage activation. **Journal of leukocyte biology**, v. 73, p. 209–212, 2003.

MOTA, K. S. DE L. **Avaliação da atividade antiulcerogênica de Maytenus obtusifolia Mart. (Celastraceae) em modelos animais**. Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos. Universidade Federal da Paraíba, 2009.

MUISE, A. M. et al. Polymorphisms in E-cadherin (CDH1) result in a mis-localised cytoplasmic protein that is associated with Crohn's disease. **Gut**, v. 58, p. 1121–1127, 2009.

MUSHI, N. F. et al. Antibacterial, anti-HIV-1 protease and cytotoxic activities of aqueous ethanolic extracts from *Combretum adenogonium* Steud. Ex A. Rich (Combretaceae). **BMC complementary and alternative medicine**, v. 12, p. 163, 2012.

MUSUMBA, C.; PRITCHARD, D. M.; PIRMOHAMED, M. Review article: cellular and molecular mechanisms of NSAID-induced peptic ulcers. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 30, p. 517–31, 2009.

NAITO, Y. et al. Changes in superoxide dismutase activity in the gastric mucosa of peptic ulcer patients. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 14, p. S131–S134, 1992.

NAJM, W. I. Peptic ulcer disease. **Primary care**, v. 38, p. 383–394, 2011.

NAKAZAWA, A. et al. The Expression and Function of Costimulatory Molecules B7h and B7-H1 on Colonic Epithelial Cells. **Gastroenterology**, v. 126, p. 1347–1357, 2004.

NEILL, D. R. et al. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. **Nature**, v. 464, p. 1367–1370, 2010.

NENOI, M. et al. Regulation of the catalase gene promoter by Sp1, CCAAT-recognizing factors, and a WT1/Egr-related factor in hydrogen peroxide-resistant HP100 cells. **Cancer research**, v. 61, p. 5885–94, 2001.

NEUMAN, M. G. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. **Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine**, v. 149, p. 173–186, 2007.

NEURATH, M. F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 14, p. 329–42, 2014.

NEURATH, M.; FUSS, I.; STROBER, W. TNBS-colitis. **International reviews of immunology**, v. 19, p. 51–62, 2000.

NEUWINGER, H. D. **African Ethnobotany Poisons and Drugs**. Medpharm Scientific Publishers, 1996.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. **The influence of natural products upon drug discovery**. **Natural Product Reports**, v. 17, p. 215–234, 2000.

NG, S. C. et al. Incidence and phenotype of inflammatory bowel disease based on results from the Asia-Pacific Crohn's and colitis epidemiology study. **Gastroenterology**, v. 145, p. 158–165, 2013.

NJUME, C. et al. Inhibitory and Bactericidal Potential of Crude Acetone Extracts of *Combretum molle* (Combretaceae) on Drug-resistant Strains of *Helicobacter pylori*. **Journal of Health, Population and Nutrition**, v. 29, p. 438–445, 2011.

NOGUCHI, M. et al. Enhanced interferon-gamma production and B7-2 expression in isolated intestinal mononuclear cells from patients with Crohn's disease. **Journal of gastroenterology**, v. 30, p. 52–55, 1995.

NOZIK-GRAYCK, E.; SULIMAN, H. B.; PIANTADOSI, C. A. Extracellular superoxide dismutase. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 37, p. 2466–2471, 2005.

NSUADI MANGA, F. et al. Vascular effects and antioxidant activity of two *Combretum* species from Democratic Republic of Congo. **Journal of ethnopharmacology**, v. 142, p. 194–200, 2012.

NUNES, P. H. M. et al. Antiulcerogenic activity of *Combretum leprosum*. **Die Pharmazie**, v. 64, p. 58–62, 2009.

O'CONNOR, W.; ZENEWICZ, L. A.; FLAVELL, R. A. The dual nature of T(H)17 cells: shifting the focus to function. **Nature immunology**, v. 11, p. 471–6, 2010.

OGAN, A. U. The alkaloids in the leaves of *Combretum micranthum*. Studies on West African medicinal plants. VII. **Planta medica**, v. 21, p. 210–7, 1972.

- OGRYZKO, N. V.; RENSHAW, S. A.; WILSON, H. L. The IL-1 family in fish: swimming through the muddy waters of inflammasome evolution. **Developmental and comparative immunology**, v. 46, p. 53–62, 2014.
- OKABE, S.; AMAGASE, K. An overview of acetic acid ulcer models--the history and state of the art of peptic ulcer research. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 28, p. 1321–41, 2005.
- OKADO-MATSUMOTO, A.; FRIDOVICH, I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, p. 38388–38393, 2001.
- OKWUOSA, O. M. T. B. et al. Phytochemical and antifungal activities of Uvaria. chamae leaves and roots, Spondias mombin leaves and bark and Combretum racemosum leaves. **African Journal of Medicine and Medical Sciences**, v. 41, p. 99–103, 2012.
- OLBE, L.; CARLSSON, E.; LINDEBERG, P. A proton-pump inhibitor expedition: The case histories of omeprazole and esomeprazole. **Nature Review Drug Discovery**, v. 2, p. 132-139, 2003.
- OLIVER-BEVER, B. **Medicinal Plants in Tropical West Africa**. Cambridge: Cambridge University Press, 1986.
- OVERMIER, J. B.; MURISON, R. Restoring psychology's role in peptic ulcer. **Applied psychology. Health and well-being**, v. 5, p. 5–27, 2013.
- PAI, R. et al. Induction of mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway during gastric ulcer healing in rats. **Gastroenterology**, v. 114, p. 706–713, 1998.
- PAI, R. et al. Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. **Nature medicine**, v. 8, p. 289–293, 2002.
- PALMON, R.; MAYER, L. F. Inflammatory Bowel Diseases: Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. In: **Intestinal, Hepatic, and Pancreatic Diseases**. New York, 2006, p. 713–728.
- PARASHER, G.; EASTWOOD, G. L. Smoking and peptic ulcer in the Helicobacter pylori era. **European journal of gastroenterology & hepatology**, v. 12, p. 843–853, 2000.
- PARK, S. et al. Preventive effect of the flavonoid, wogonin, against ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 49, p. 384–394, 2004.
- PARK, Y. S. [COX-2 inhibitors in inflammatory bowel disease: friends or foes?]. **The Korean journal of gastroenterology**, v. 50, p. 350–5, 2007.
- PASTORE, A. et al. Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. **Clinica Chimica Acta**, v. 333, p.19-39, 2003.

- PAVLICK, K. P. et al. Serial Review: Reactive Oxygen and Nitrogen in Inflammation Guest Editor: Giuseppe Poli role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, p. 311–322, 2002.
- PEREIRA, J. L.; HUGHES, L. E.; YOUNG, H. L. Spleen size in patients with inflammatory bowel disease. Does it have any clinical significance? **Diseases of the colon and rectum**, v. 30, p. 403–9, 1987.
- PESKAR, B. M. Role of cyclooxygenase isoforms in gastric mucosal defense and ulcer healing. **Inflammopharmacology**, v. 13, p. 15–26, 2005.
- PEYRIN-BIROULET, L. et al. Efficacy and safety of tumor necrosis factor antagonists in Crohn's disease: meta-analysis of placebo-controlled trials. **Clinical gastroenterology and hepatology**, v. 6, p. 644–653, 2008.
- PIETROVSKI, E. F. et al. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3beta,6beta,16beta-trihidroxilup-20(29)-ene obtained from the flowers of Combretum leprosum in mice. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 83, p. 90–9, 2006.
- PODOLSKY, D. K. The current future understanding of inflammatory bowel disease. **Best practice & research. Clinical gastroenterology**, v. 16, p. 933–943, 2002.
- POYTON, R. O.; BALL, K. A.; CASTELLO, P. R. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.7, p.332-340, 2009.
- PRABHU, V.; SHIVANI, A. An overview of history, pathogenesis and treatment of perforated peptic ulcer disease with evaluation of prognostic scoring in adults. **Annals of medical and health sciences research**, v. 4, p. 22–9, 2014.
- PRELICH, G.; STILLMAN, B. Coordinated leading and lagging strand synthesis during SV40 DNA replication in vitro requires PCNA. **Cell**, v. 53, p. 117–26, 1988.
- PRESENT, D. H. et al. Treatment of Crohn's disease with 6-mercaptopurine. A long-term, randomized, double-blind study. **The New England journal of medicine**, v.302, p 981-988, 1980.
- PUCILOWSKA, J. B.; WILLIAMS, K. L.; LUND, P. K. Fibrogenesis. IV. Fibrosis and inflammatory bowel disease: cellular mediators and animal models. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 279, p. G653–G659, 2000.
- PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C. Biologia química: Uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Quimica Nova**, v.30, p. 1446-1455, 2007.
- QUINTANA, F. J. et al. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. **Nature**, v. 453, p. 65–71, 2008.

- QUINTANS, J. S. S. et al. Phytochemical study and antinociceptive effect of the hexanic extract of leaves from *Combretum duarteanum* and friedelin, a triterpene isolated from the hexanic extract, in orofacial nociceptive protocols. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 60–66, 2014.
- RAMAKRISHNAN, K.; SALINAS, R. C. Peptic ulcer disease. **American family physician**, v. 76, p. 1005–12, 2007.
- RANG, H. et al. **M. Rang and Dale's Pharmacology**. 5 ed., Elsevier, Rio de Janeiro, 2005. p. 237–245
- RAO, C. V; VIJAYAKUMAR, M. Protective effect of (+)-catechin against gastric mucosal injury induced by ischaemia-reperfusion in rats. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 59, p. 1103–7, 2007.
- RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.
- REED, C. J. Apoptosis and cancer: strategies for integrating programmed cell death. **Seminars in hematology**, v. 37, p. 9–16, 2000.
- REGASSA, F.; ARAYA, M. In vitro antimicrobial activity of *Combretum molle* (Combretaceae) against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* isolated from crossbred dairy cows with clinical mastitis. **Tropical animal health and production**, v. 44, p. 1169–73, 2012.
- RICARDO, L. et al. Gastroprotective effects of the essential oil of *Hyptis crenata* Pohl ex Benth . on gastric ulcer models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, p. 694–700, 2013.
- RIEDER, F. et al. Crohn's disease complicated by strictures: a systematic review. **Gut**, v. 62, p. 1072–84, 2013.
- ROGERS, C. ; VEROTTA, L. Chemistry and Biological Properties of the African Combretaceae. In: HOSTETTMAN, K. et al. (Eds.). **Chemistry, Biological and Pharmacological Properties of African Medicinal Plants**. Zimbabwe: University of Zimbabwe Publications, 1996.
- ROGLER, G. et al. Isolation and phenotypic characterization of colonic macrophages. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 112, p. 205–215, 1998.
- ROZZA, A. L. et al. The gastroprotective effect of menthol: involvement of anti-apoptotic, antioxidant and anti-inflammatory activities. **PloS one**, v. 9, p. e86686, 2014.
- SAKAGUCHI, S. et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **Journal of immunology**, v. 155, p. 1151–1164, 1995.

SAKAGUCHI, S. et al. Immunologic self tolerance maintained by T-cell-mediated control of self-reactive T cells: Implications for autoimmunity and tumor immunity. **Microbes and Infection**, v.13, p. 911-8, 2001.

SAKAMOTO, N. et al. Dietary risk factors for inflammatory bowel disease: a multicenter case-control study in Japan. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 11, p. 154–163, 2005.

SÁNCHEZ DE MEDINA, F. et al. Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. **Life sciences**, v. 70, p. 3097–108, 2002.

SÁNCHEZ-FIDALGO, S. et al. Angiogenesis, cell proliferation and apoptosis in gastric ulcer healing. Effect of a selective cox-2 inhibitor. **European Journal of Pharmacology**, v. 505, p. 187–194, 2004.

SÁNCHEZ-FIDALGO, S. et al. Dietary extra virgin olive oil polyphenols supplementation modulates DSS-induced chronic colitis in mice. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 24, p. 1401–13, 2013.

SANCHEZ-MUNOZ, F.; DOMINGUEZ-LOPEZ, A.; YAMAMOTO-FURUSHO, J.-K. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. **World journal of gastroenterology**, v.14, p. 4280-8, 2008.

SANTOS, V. L. **Atividade antiulcerogênica, antidiarréica e antiespasmódica do extrato etanólico bruto e fase acetato de etila obtidos da entrecasca do caule de Maytenus rigida Mart. (Celastraceae) em modelos animais.** Tese de doutorado apresentada ao Programa de pós-graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos, Universidade federal da Paraíba, 2008.

SAXENA, B.; KRISHNAMURTHY, S.; SINGH, S. Gastroprotective potential of risperidone, an atypical antipsychotic, against stress and pyloric ligation induced gastric lesions. **Chemico-Biological Interactions**, v. 190, p. 155–164, 2011.

SCALLON, B. J. et al. Chimeric anti-TNF-alpha monoclonal antibody cA2 binds recombinant transmembrane TNF-alpha and activates immune effector functions. **Cytokine**, v. 7, p. 251–259, 1995.

SCHEPETKIN, I. A. et al. Immunomodulatory and hemagglutinating activities of acidic polysaccharides isolated from Combretum racemosum. **International Immunopharmacology**, v. 15, p. 628–637, 2013.

SCHMIDT, B. et al. A natural history of botanical therapeutics. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 57, p. S3-9, 2008.

SCHRADER, M.; FAHIMI, H. D. Peroxisomes and oxidative stressBiochimica et Biophysica. **Acta - Molecular Cell Research**, v.1763, p. 1755-1766, 2006.

SCHREIBER, S. et al. Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 108, p. 1434–1444, 1995.

SCHUBERT, M. L.; PEURA, D. A. Control of gastric acid secretion in health and disease. **Gastroenterology**, v. 134, p. 1842–60, 2008.

SHANAHAN, F. et al. Sulfasalazine inhibits the binding of TNF?? to its receptor. **Immunopharmacology**, v. 20, p. 217–224, 1990.

SHAW, S. Y.; BLANCHARD, J. F.; BERNSTEIN, C. N. Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. **The American journal of gastroenterology**, v. 105, p. 2687–2692, 2010.

SHEIKH, S. Z.; PLEVY, S. E. The role of the macrophage in sentinel responses in intestinal immunity. **Current opinion in gastroenterology**, v. 26, p. 578–82, 2010.

SHI, X.-Z.; WINSTON, J. H.; SARNA, S. K. Differential immune and genetic responses in rat models of Crohn's colitis and ulcerative colitis. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 300, p. G41–G51, 2011.

SILVA, N. DA; VALENTE, M. DA C. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Combretaceae. **Rodriguésia**, p. 447–448, 2005.

SILVERSTEIN, M. D. et al. Cigarette smoking in Crohn's disease. **The American journal of gastroenterology**, v. 84, p. 31–33, 1989.

SIMMONDS, M. S. . Novel drugs from botanical sources. **Drug discovery today**, v. 8, p. 721–722, 2003.

SIMON, M. K. et al. The anthelmintic effect of aqueous methanol extract of Combretum molle (R. Br. x. G. Don) (Combretaceae) in lambs experimentally infected with Haemonchus contortus. **Veterinary parasitology**, v. 187, p. 280–4, 8 jun. 2012.

SMITH, P. D. et al. Intestinal macrophages lack CD14 and CD89 and consequently are down-regulated for LPS- and IgA-mediated activities. **Journal of immunology**, v. 167, p. 2651–2656, 2001.

SMYTHIES, L. E. et al. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, p. 66–75, 2005.

SOBCZAK, M. et al. Current overview of extrinsic and intrinsic factors in etiology and progression of inflammatory bowel diseases. **Pharmacological Reports**, v.66, p.766-775, 2014.

SÖDERHOLM, J. D.; PERDUE, M. H. Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 280, p. G7–G13, 2001.

- SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 435–440, 2010.
- SPADACIO, C. et al. Medicinas Alternativas e Complementares: uma metassíntese. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26, p. 7–13, 2010.
- SPITS, H. et al. Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. **Nature Reviews**, v. 13, p. 145–149, 2013.
- STACE, C. . Combretaceae. In: SMITH, N. et al. (Eds.). **Flowering Plants of the Neotropics**. [s.l.] Princeton University Press, 2004. p. 110–111.
- STALLMACH, A. et al. Increased collagen type III synthesis by fibroblasts isolated from strictures of patients with Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 102, p. 1920–1929, 1992.
- STARODUB, O. T. et al. Disruption of the Cox-1 gene slows repair of microscopic lesions in the mouse gastric epithelium. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 294, p. C223–32, 2008.
- STEPANKOVA, R. et al. Segmented filamentous bacteria in a defined bacterial cocktail induce intestinal inflammation in SCID mice reconstituted with CD45RBhigh CD4+ T cells. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 13, p. 1202–1211, 2007.
- STROBER, W.; FUSS, I.; MANNON, P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, p. 514–521, 2007.
- SUNG, J. J. Y.; KUIPERS, E. J.; EL-SERAG, H. B. Systematic review: the global incidence and prevalence of peptic ulcer disease. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 29, p. 938–946, 2009.
- SWIDSINSKI, A. et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 122, p. 44–54, 2002.
- SWIDSINSKI, A. et al. Active Crohn's disease and ulcerative colitis can be specifically diagnosed and monitored based on the biostructure of the fecal flora. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 14, p. 147–161, 2008.
- SZABO, S. Animal model for human disease: duodenal ulcer disease. **American Journal Pathology**, v. 93, p. 273–276, 1978.
- SZABO, S. et al. Biochemical changes in tissue catecholamines and serotonin in duodenal ulceration caused by cysteamine or propionitrile in the rat. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 240, p. 871–878, 1987.
- SZABO, S. et al. Accelerated healing of duodenal ulcers by oral administration of a mutein of basic fibroblast growth factor in rats. **Gastroenterology**, v. 106, n. 4, p. 1106–11, 1994.

- SZABO, S.; REICHLIN, S. Somatostatin in rat tissues is depleted by cysteamine administration. **Endocrinology**, v. 109, p. 2255–2257, 1981.
- SZABO, S.; VINCZE, A. Growth factors in ulcer healing: lessons from recent studies. **Journal of physiology, Paris**, v. 94, p. 77–81, 2000.
- TAHSILDAR, H. I. et al. Factors influencing the oxidation of the radioprotector WR-1065. **Radiation research**, v. 113, p. 243–251, 1988.
- TAKAGI, K.; OKABE, S.; SAZIKI, R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. **Japanese journal of pharmacology**, v. 19, p. 418–26, 1969.
- TAKATORI, H. et al. Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. **The Journal of experimental medicine**, v. 206, p. 35–41, 2009.
- TAKEEDA, M. et al. Roles of endogenous prostaglandins and cyclooxygenase isoenzymes in mucosal defense of inflamed rat stomach. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 55, p. 193–205, 2004.
- TARGAN, S. R. et al. Antibodies to CBir1 flagellin define a unique response that is associated independently with complicated Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 128, p. 2020–2028, 2005.
- TARNAWSKI, A. et al. Quality of gastric ulcer healing: histological and ultrastructural assessment. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 5, p. 79–90, 1991.
- TARNAWSKI, A. et al. Increased expression of epidermal growth factor receptor during gastric ulcer healing in rats. **Gastroenterology**, v. 102, p. 695–698, 1992.
- TARNAWSKI, A. S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. **Digestive Diseases and Sciences**, v.50, p. S24-33, 2005.
- TARNAWSKI, A. S.; JONES, M. K. The role of epidermal growth factor (EGF) and its receptor in mucosal protection, adaptation to injury, and ulcer healing: involvement of EGF-R signal transduction pathways. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 27, p. S12–S20, 1998.
- TARNAWSKI, A.; AHLUWALIA, A. Molecular Mechanisms of Epithelial Regeneration and Neovascularization During Healing of Gastric and Esophageal Ulcers. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 16-27, 2012.
- TARNAWSKI, A.; AHLUWALIA, A.; K. JONES, M. The Mechanisms of Gastric Mucosal Injury: Focus on Microvascular Endothelium as a Key Target. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, p. 4-15, 2012.
- THIA, K. T. et al. An update on the epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. **American Journal of Gastroenterology**, v. 103, p. 3167-82, 2008.

THOMAS, C. W. et al. Selective inhibition of inflammatory gene expression in activated T lymphocytes: a mechanism of immune suppression by thiopurines. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutics**, v. 312, p. 537–545, 2005.

TOPPO, S. et al. Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily. **Antioxidants & redox signaling**, v. 10, p. 1501–1514, 2008.

TOURÉ, A. et al. In vitro antioxidant and radical scavenging of Guinean kinkeliba leaf (*Combretum micranthum* G. Don) extracts. **Natural product research**, v. 25, p. 1025–36, 2011.

TRIANTAFILLIDIS, J. K.; MERIKAS, E.; GIKAS, A. Psychological factors and stress in inflammatory bowel disease. **Expert review of gastroenterology & hepatology**, v. 7, p. 225–38, 2013.

TROJAN-RODRIGUES, M. et al. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 139, p. 155–63, 2012.

UEDA, S. et al. Role of free radicals and lipid peroxidation in gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. **Scandinavian journal of gastroenterology. Supplement**, v. 162, p. 55–58, 1989.

UEHARA, A. et al. Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. **Molecular Immunology**, v. 44, p. 3100–3111, 2007.

URS, A. N.; NARULA, P.; THOMSON, M. Peptic ulcer disease. **Paediatrics and Child Health**, p. 1–6, 2014.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, p. 44–84, 2007.

VAN LIEROP, P. P. et al. Role of the innate immune system in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Journal Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 48, p. 142–151, 2009.

VEIGA JUNIOR, V. F.; MELLO, J. C. P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 464–471, 2008.

VELJACA, M. et al. BPC-15 reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 272, p. 417–422, 1995.

VERMA, M. A Review on Peptic ulcer : A Global Threat. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, p. 2088–2091, 2010.

- VETUSCHI, A. et al. Increased proliferation and apoptosis of colonic epithelial cells in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. **Digestive diseases and sciences**, v. 47, p. 1447–57, 2002.
- VIAU, C. M. et al. The natural triterpene $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihydroxy-lup-20(29)-ene obtained from the flowers of Combretum leprosum induces apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, p. 280, 2014.
- VIEGAS, C.; DA SILVA BOLZANI, V.; BARREIRO, E. J. OS produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quimica Nova**, v. 29, p. 326–337, 2006.
- VOGEL, J. D. et al. CD40-Mediated Immune-Nonimmune Cell Interactions Induce Mucosal Fibroblast Chemokines Leading to T-Cell Transmigration. **Gastroenterology**, v. 126, p. 63–80, 2004.
- VON LAMPE, B. et al. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 47, p. 63–73, 2000.
- WALKER, J. A; BARLOW, J. L.; MCKENZIE, A. N. J. Innate lymphoid cells--how did we miss them? **Nature reviews. Immunology**, v. 13, p. 75–87, 2013.
- WALLACE, J. L.; KEENAN, C. M. An orally active inhibitor of leukotriene synthesis accelerates healing in a rat model of colitis. **The American journal of physiology**, v. 258, p. G527–G534, 1990.
- WALLACE, J. L.; MILLER, M. J. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. **Gastroenterology**, v. 119, p. 512–520, 2000.
- WALLACE, K. L. et al. Immunopathology of inflammatory bowel disease. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 20, p. 6–21, 2014.
- WEYRICH, A. S.; ZIMMERMAN, G. A. Platelets: Signaling cells in the immune continuum. **Trends in Immunology**, v.25, p.489-95, 2004.
- WINTERBOURN, C. C. et al. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 85, p. 337–341, 1975.
- WITAICENIS, A. et al. Suppression of TNBS-induced colitis in rats by 4-methylesculetin, a natural coumarin: Comparison with prednisolone and sulphasalazine. **Chemico-Biological Interactions**, v. 195, p. 76–85, 2012.
- XAVIER, R. J.; PODOLSKY, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 448, p. 427–434, 2007.
- YANG, X. L. et al. Therapeutic effect of ginsenoside Rd in rats with TNBS-induced recurrent ulcerative colitis. **Archives of Pharmacal Research**, v. 35, p. 1231–1239, 2012.

YEN, E. F.; PARDI, D. S. Non-IBD colitides (eosinophilic, microscopic). **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, v. 26, p. 611–622, 2012.

YOGEESWARI, P.; SRIRAM, D. Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. **Current medicinal chemistry**, v. 12, p. 657–666, 2005.

ZÁMOCKÝ, M.; KOLLER, F. Understanding the structure and function of catalases: Clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 72, p. 19–66, 1999.

ZHAO, W. et al. Protective effects of DIDS against ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 41, p. 301–308, 2009.

ZHOU, L. et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. **Nature immunology**, v. 8, p. 967–974, 2007.

ZHU, M. Y. et al. Dynamic progress of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid induced chronic colitis and fibrosis in rat model. **Journal of Digestive Diseases**, v. 13, p. 421–429, 2012.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, p. 109–10, 1983.

ZWOLINSKA-WCISŁO, M. et al. Nitric oxide-releasing aspirin but not conventional aspirin improves healing of experimental colitis. **World journal of gastroenterology**, v. 17, p. 4076–89, 2011.

APÊNDICE

APÊNDICE A- Artigo publicado na revista International Journal of Molecular Science

Int. J. Mol. Sci. **2011**, *12*, 2692–2749; doi:10.3390/ijms12042692

OPEN ACCESS

**International Journal of
Molecular Sciences**

ISSN 1422-0067

www.mdpi.com/journal/ijms

Review

Database Survey of Anti-Inflammatory Plants in South America: A Review

**Gedson Rodrigues de Morais Lima, Camila de Albuquerque Montenegro,
Cynthia Layse Ferreira de Almeida, Petrônio Filgueiras de Athayde-Filho,
José Maria Barbosa-Filho and Leônia Maria Batista ***

Laboratory of Pharmaceutical Technology, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraiba, 58051-970, João Pessoa, PB, Brazil; E-Mails: gedson@ltf.ufpb.br (G.R.M.L.); camila_montenegro@ltf.ufpb.br (C.A.M.); cynthialayse@gmail.com (C.L.F.A.); athayde-filho@quimica.ufpb.br (P.F.A.-F.); jbarbosa@ltf.ufpb.br (J.M.B.-F.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: leoniab@uol.com.br;
Tel.: +55-83-32167003; Fax: +55-83-32167502.

Received: 1 April 2011; *in revised form:* 8 April 2011 / *Accepted:* 11 April 2011 /

Published: 21 April 2011

Abstract: Inflammation is a complex event linked to tissue damage whether by bacteria, physical trauma, chemical, heat or any other phenomenon. This physiological response is coordinated largely by a variety of chemical mediators that are released from the epithelium, the immunocytes and nerves of the lamina propria. However, if the factor that triggers the inflammation persists, the inflammation can become relentless, leading to an intensification of the lesion. The present work is a literature survey of plant extracts from the South American continent that have been reported to show anti-inflammatory activity. This review refers to 63 bacterial families of which the following stood out: Asteraceae, Fabaceae, Euphorbiaceae, Apocynaceae and Celastraceae, with their countries, parts used, types of extract used, model bioassays, organisms tested and their activity.

Keywords: anti-inflammatory activity; leukocytes; medicinal plants; natural products; South American; review

APÊNDICE B- Artigo publicado na revista International Journal of Molecular Science

Int. J. Mol. Sci. **2011**, *12*, 4550-4573; doi:10.3390/ijms12074550

OPEN ACCESS

International Journal of
Molecular Sciences

ISSN 1422-0067
www.mdpi.com/journal/ijms

Review

Bioactivities from Marine Algae of the Genus *Gracilaria*

Cynthia Layse F. de Almeida, Heloína de S. Falcão, Gedson R. de M. Lima,
Camila de A. Montenegro, Narlize S. Lira, Petrônio F. de Athayde-Filho, Luis C. Rodrigues,
Maria de Fátima V. de Souza, José M. Barbosa-Filho and Leônia M. Batista *

Department of Pharmaceutical Sciences, Laboratory of Pharmaceutical Technology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB 58051-900, Brazil;
E-Mails: cynthialayse@gmail.com (C.L.F.A.); heloinafalcao@yahoo.com.br (H.S.F.); gedson@ltf.ufpb.br (G.R.M.L.); camila_montenegro@ltf.ufpb.br (C.A.M.); narlizelira@yahoo.com.br (N.S.L.); athayde-filho@quimica.ufpb.br (P.F.A.-F.); lcezar@ltf.ufpb.br (L.C.R.); mfvanderlei@ltf.ufpb.br (M.F.V.S.); jbarbosa@ltf.ufpb.br (J.M.B.-F.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: leoniab@uol.com.br;
Tel.: +55-83-32167003; Fax: +55-83-32167502.

Received: 16 May 2011; in revised form: 26 June 2011 / Accepted: 5 July 2011 /

Published: 15 July 2011

Abstract: Seaweeds are an important source of bioactive metabolites for the pharmaceutical industry in drug development. Many of these compounds are used to treat diseases like cancer, acquired immune-deficiency syndrome (AIDS), inflammation, pain, arthritis, as well as viral, bacterial, and fungal infections. This paper offers a survey of the literature for *Gracilaria* algae extracts with biological activity, and identifies avenues for future research. Nineteen species of this genus that were tested for antibacterial, antiviral, antifungal, antihypertensive, cytotoxic, spermicidal, embriotoxic, and anti-inflammatory activities are cited from the 121 references consulted.

Keywords: *Gracilaria*; macroalgae; seaweed; biological activity; natural product; review

1. Introduction

The ocean environment contains over 80% of world's plant and animal species [1] and with more than 150,000 seaweeds found in the intertidal zones and tropical waters of the oceans, it is a primary source of natural products [2].

APÊNDICE C- Artigo publicado na revista Journal of Natural Medicines

J Nat Med (2013) 67:492–502
DOI 10.1007/s11418-012-0706-3



ORIGINAL PAPER

Gastroprotective activity of the ethanolic extract and hexane phase of *Combretum duarteanum* Cambess. (Combretaceae)

Gedson Rodrigues de Moraes Lima · Camila de Albuquerque Montenegro · Heloína de Sousa Falcão · Neyres Zínea Taveira de Jesus · Analúcia Guedes Silveira Cabral · Isis Fernandes Gomes · Maria de Fátima Agra · Josean Fechine Tavares · Leônia Maria Batista

Received: 26 November 2011/Accepted: 21 August 2012/Published online: 15 September 2012
© The Japanese Society of Pharmacognosy and Springer 2012

Abstract *Combretum duarteanum* Cambess. is found in South America, particularly in Bolivia, Paraguay, and Brazil. In Paraíba state (Brazil), the species usually occurs in the Caatinga biome. It is popularly known as *mofumbo*, *cipiúba*, or *cipaúba*. This work aims to evaluate the gastroprotective activity and the cytoprotective mechanisms of the ethanolic extract (Cd-EtOHE) and hexane phase (Cd-HexP) obtained from the leaves of *C. duarteanum*. Doses at 62.5, 125, 250, and 500 mg/kg of Cd-EtOHE and Cd-HexP were tested in models of gastric ulcers induced by HCl/ethanol, absolute ethanol, stress, non-steroidal anti-inflammatory drugs, and pylorus ligation in male rats or mice. Cd-EtOHE and Cd-HexP significantly reduced gastric injuries induced in all models. Cd-EtOHE and Cd-HexP did not alter gastric juice parameters such as pH, [H⁺], or volume after pylorus ligation. Cytoprotective mechanisms of Cd-EtOHE and Cd-HexP in relation to mucus, nitric oxide (NO), and sulfhydryl (SH) groups were evaluated. Neither product increased the mucus, and they both showed dependence on NO and SH groups to prevent gastric ulcer. Both Cd-EtOHE and Cd-HexP demonstrated gastroprotective activity.

Keywords Medicinal plants · *Combretum duarteanum* · Gastric ulcer · Gastroprotective activity · Cytoprotection

Introduction

Gastric ulcer is a primary gastrointestinal tract disorder which develops from an imbalance between offensive (acid secretion, pepsin) and defensive (gastric mucosal integrity) factors [1] such as mucosal barrier, mucus secretion, blood flow, cellular regeneration, prostaglandins, and epidermal growth factors [2–4]. The pathogenesis of gastric ulcer may be related to pathophysiological disturbances, genetic, or environmental factors such as alcohol, smoking, stress, continued ingestion of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), or *Helicobacter pylori* infection, among others [5, 6].

There are two main approaches to treating peptic ulcer. The first deals with reducing gastric acid production, the second with enhancing gastric mucosa protection [7, 8]. Drugs currently used for treating gastric ulcer are antacids, anti-cholinergics, proton pump inhibitors, and H₂-receptor antagonists [9, 10]. Antimicrobial therapies in combination with anti-secretory drugs are being used successfully to treat peptic ulcers caused by infection with *H. pylori* [11].

The development of tolerances, relapses, and common adverse effects has made the use of various anti-ulcer drugs questionable, and has been a motive for developing new drugs [12].

Plant extracts are attractive sources for new drugs and have shown promising results in the treatment of gastric ulcers [13]. In traditional medicine, for example, various plants and herbs have been used to treat gastrointestinal disorders [14–16].

Combretaceae is a large family of herbs, shrubs, and trees which has about 13 genera and 500 species with tropical distribution occurring in hot environments on all the continents with centers of diversity in Africa and Asia [17, 18]. The major genera of this family are *Combretum*,

G. R. de Moraes Lima · C. de Albuquerque Montenegro · H. de Sousa Falcão · N. Z. T. de Jesus · A. G. S. Cabral · I. F. Gomes · M. de Fátima Agra · J. F. Tavares · L. M. Batista (✉)
Departamento de Ciências Farmacêuticas,
Laboratório de Tecnologia Farmacêutica,
Universidade Federal da Paraíba,
João Pessoa, PB 58051-970, Brazil
e-mail: leoniab@uol.com.br

APÊNDICE D- Artigo publicado na revista Molecules Journal

Molecules 2012, 17, 9142-9206; doi: 10.3390/molecules17089142

OPEN ACCESS

molecules

ISSN 1420-3049
www.mdpi.com/journal/molecules

Review

Bioactivities of the Genus *Combretum* (Combretaceae): A Review

Gedson Rodrigues de Moraes Lima, Igor Rafael Praxedes de Sales,
Marcelo Ricardo Dutra Caldas Filho, Neyres Zínia Taveira de Jesus, Heloína de Sousa Falcão,
José Maria Barbosa-Filho, Analúcia Guedes Silveira Cabral, Augusto Lopes Souto,
Josean Fechine Tavares and Leônia Maria Batista *

Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraiba, João Pessoa 58051-970, PB, Brazil; E-Mails: gedson@ltf.ufpb.br (G.R.M.L.); igor_caraubas@hotmail.com (I.R.P.S.); marcelo.dutra@ltf.ufpb.br (M.R.D.C.F.); neyresj@hotmail.com (N.Z.T.J.); heloinafalcao@yahoo.com.br (H.S.F.); jbarbosa@ltf.ufpb.br (J.M.B.-F.); analuciaguedes@gmail.com (A.G.S.C.); augustosouto@gmail.com (A.L.S.); josean@ltf.ufpb.br (J.F.T.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: leoniab@uol.com.br;
Tel.: +55-83-3216-7003; Fax: +55-83-3216-7502.

Received: 18 May 2012; in revised form: 23 July 2012 / Accepted: 25 July 2012 /

Published: 2 August 2012

Abstract: The Combretaceae is a large family of herbs, shrubs and trees, comprising about 20 genera and 600 species with tropical distribution around the globe and centers of diversity in Africa and Asia. Some *Combretum* species are extensively used in traditional medicine against inflammation, infections, diabetes, malaria, bleeding, diarrhea and digestive disorders and others as a diuretic. The present work is a literature survey of *Combretum* species that have been evaluated for their ability to exert biological activities. A total number of 36 *Combretum* species are discussed with regard to plant parts used, component tested and bioassay models. This review is of fundamental importance to promoting studies on *Combretum* species, thereby contributing to the development of new therapeutic alternatives that may improve the health of people suffering from various health problems.

Keywords: Combretaceae; *Combretum*; bioactivity; medicinal plants; natural products; review

APÊNDICE E- Artigo publicado na revista International Journal Molecular Science

Int. J. Mol. Sci. **2012**, *13*, 3203–3228; doi:10.3390/ijms13033203

OPEN ACCESS

International Journal of
Molecular Sciences
ISSN 1422-0067
www.mdpi.com/journal/ijms

Review

Tannins, Peptic Ulcers and Related Mechanisms

Neyres Zinia Taveira de Jesus, Heloína de Souza Falcão, Isis Fernandes Gomes, Thiago Jose de Almeida Leite, Gedson Rodrigues de Moraes Lima, Jose Maria Barbosa-Filho, Josean Fechine Tavares, Marcelo Sobral da Silva, Petrônio Filgueiras de Athayde-Filho and Leonia Maria Batista *

Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraiba, João Pessoa 58051-970, PB, Brazil; E-Mails: neyresj@hotmail.com (N.Z.T.J.); heloinafalcao@yahoo.com.br (H.S.F.); isisfarmacia@hotmail.com (I.F.G.); thiago454@yahoo.com.br (T.J.A.L.); gedson@ltf.ufpb.br (G.R.M.L.); jbarbosa@ltf.ufpb.br (J.M.B.-F.); josean@ltf.ufpb.br (J.F.T.); marcelosobral@ltf.ufpb.br (M.S.S.); athayde-filho@ltf.ufpb.br (P.F.A.-F.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: leoniab@uol.com.br; Tel.: +55-83-32167003; Fax: +55-83-32167502.

Received: 29 January 2012; *in revised form:* 26 February 2012 / *Accepted:* 28 February 2012 / *Published:* 8 March 2012

Abstract: This review of the current literature aims to study correlations between the chemical structure and gastric anti-ulcer activity of tannins. Tannins are used in medicine primarily because of their astringent properties. These properties are due to the fact that tannins react with the tissue proteins with which they come into contact. In gastric ulcers, this tannin-protein complex layer protects the stomach by promoting greater resistance to chemical and mechanical injury or irritation. Moreover, in several experimental models of gastric ulcer, tannins have been shown to present antioxidant activity, promote tissue repair, exhibit anti *Helicobacter pylori* effects, and they are involved in gastrointestinal tract anti-inflammatory processes. The presence of tannins explains the anti-ulcer effects of many natural products.

Keywords: tannins; antiulcer activity; gastric ulcer; natural products; *Helicobacter pylori*

APÊNDICE F- Artigo publicado na revista Records Natural Products.**ORIGINAL ARTICLE****A C G
publications***Rec. Nat. Prod.* 7:1 (2013) 35-44**records of natural
products**

Gastroprotective Effect of the Ethanolic Extract and Fractions obtained from *Syngonanthus bisulcatus* Rul.

Leônia Maria Batista^{1,*}, Ana Beatriz Albino de Almeida², Gedson Rodrigues de Morais Lima¹, Heloína de Sousa Falcão¹, Anderson Luiz Ferreira², Luciana de Pietro Magri², Roberta Gomes Coelho³, Tamara Regina Calvo³, Wagner Vilegas³, Alba Regina Monteiro Souza Brito²

¹*Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, PB, Brasil.*

²*Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Cx. Postal 6109, CEP. 13083-970, Campinas, SP, Brasil.*

³*Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Araraquara, SP, Brasil.*

(Received June 22, 2012; Revised October 9, 2012, Accepted October 30, 2012)

Abstract: *Syngonanthus bisulcatus* Rul., popularly known in Brazil as “sempre-vivas chapadeira”, is a plant of the family Eriocaulaceae, it is found in the states of Minas Gerais and Bahia. In this work, the ethanolic extract (EtOHE), flavonoid-rich (FRF), and flavonoid-deficient (FDF) fractions obtained from scapes of *S. bisulcatus* were investigated for gastroprotection in both rats and mice. The activity was evaluated in models for induced gastric ulcer (absolute ethanol, stress, non-steroidal anti-inflammatory drugs, and pylorus ligation). The participation of mucus and prostaglandin E₂ were also investigated. Sb-EtOHE (50, 100, and 250 mg/kg, p.o.), Sb-FRF (100 mg/kg, p.o.), and Sb-FDF (100 mg/kg, p.o.) significantly reduced gastric injuries in all models. Sb-FRF altered gastric juice parameters after pylorus ligation. Sb-FRF and Sb-FDF (100 mg/kg each, p.o.) significantly increased the amount of adherent mucus in the gastric mucosa. Sb-FRF maintained the mucosal levels of prostaglandin after the administration of indomethacin. The results indicate that Sb-EtOHE, Sb-FRF and Sb-FDF have significant gastroprotective activity. The observed gastroprotective effects of *S. bisulcatus* probably involve the participation of both mucus and prostaglandins, integral parts of the gastrointestinal mucosa's cytoprotective mechanisms against aggressive factors.

Keywords: Medicinal plants; eriocaulaceae; *syngonanthus bisulcatus*; gastric ulcer; gastroprotective activity.

APÊNDICE G- Artigo publicado na revista Pharmacy and Pharmacology.

Gastroprotective effects (in rodents) of a flavonoid rich fraction obtained from *Syngonanthus macrolepsis*

Leônia Maria Batista^{a,b}, Ana Beatriz Albino de Almeida^b, Gedson Rodrigues de Moraes Lima^a, Heloína de Sousa Falcão^a, Luciana de Pietro Magri^b, Anderson Luiz-Ferreira^b, Lourdes Campaner dos Santos^c, Clélia Akiko Hiruma-Lima^d, Wagner Vilegas^c and Alba Regina Monteiro Souza Brito^b

^aDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Laboratório de Farmacologia do Trato Gastrintestinal, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, PB, ^bDepartamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, ^cDepartamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara and ^dDepartamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brazil

Keywords

Eriocaulaceae; flavonoid; gastroprotective activity; medicinal plants; *Syngonanthus macrolepsis*

Correspondence

Leônia Maria Batista, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, João Pessoa, 58051-900, Brazil.
E-mail: leoniab@uol.com.br

Received June 9, 2013

Accepted October 10, 2013

doi: 10.1111/jphp.12175

Abstract

Objectives *Syngonanthus macrolepis*, popularly known in Brazil as ‘sempre-vivas’, is a plant from the family Eriocaulaceae, it is found in the states of Minas Gerais and Bahia. The species contains a variety of constituents, including flavonoids with gastroprotective effect. In this work, a flavonoid-rich fraction (Sm-FRF) obtained from scapes of *S. macrolepis* was investigated for preventing gastric ulceration in mice and rats.

Methods The activity was evaluated in models of induced gastric ulcer (absolute ethanol, stress, non-steroidal anti-inflammatory drugs and pylorus ligation). The cytoprotective mechanisms of the Sm-FRF in relation to sulphhydryl (SH) groups, nitric oxide (NO) and antioxidant enzymes were also evaluated.

Key findings The Sm-FRF (100 mg/kg, p.o.) significantly reduced gastric injury in all models, and did not alter gastric juice parameters after pylorus ligation.

Conclusions The results indicate significant gastroprotective activity for the Sm-FRF, which probably involves the participation of both SH groups and the antioxidant system. Both are integral parts of the gastrointestinal mucosa’s cytoprotective mechanisms against aggressive factors.

Introduction

Gastric ulcer is a common disease with multiple aetiologies, and it is highly prevalent worldwide.^[1] It results from an imbalance between aggressive factors which promote gastric mucosal injury (acid, pepsin, *Helicobacter pylori*, non-steroidal anti-inflammatory drugs) and protective factors (bicarbonate, mucus, blood flow, prostaglandins), which are required for gastro-duodenal mucosal integrity.^[2]

Several factors are involved in the pathogenesis of ulcers, including inadequate diet, genetic predisposition, altered acid secretion, rapid gastric emptying, defective mucosal defence mechanisms, psychological or physical stress and smoking.^[3] Both *Helicobacter pylori* infection and continued use of non-steroidal anti-inflammatory drugs promote the generation of reactive oxygen species and have been reported to be important factors in the development of ulcers.^[4]

Various classes of synthetic antiulcer drugs are used for pharmacological treatment of peptic ulcers (antacids, proton pump inhibitors, anticholinergic and histamine receptor antagonists).^[5] However, the reported adverse effects and high cost of these drugs limits their use and stimulates the continuing search for an ideal antiulcer drug now extended to herbal drugs because of their availability, better protection, lower cost and lower toxicity.^[6,7]

The Eriocaulaceae family comprises about 1200 species, which are distributed over 10 genera. It has pantropical distribution, but most species occur in near tropical regions, such as in the mountains of Venezuela or Brazil.^[8-10] The family Eriocaulaceae is the dominant herbal family in the Cipó Mountain range in the state of Minas Gerais Brazil. The *Syngonanthus* genus is of economic importance, and

APÊNDICE H- Artigo publicado na revista Journal of Ethnopharmacology.

Journal of Ethnopharmacology 150 (2013) 982–988



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jep



Hyptis suaveolens (L.) Poit (Lamiaceae), a medicinal plant protects the stomach against several gastric ulcer models



N.Z.T. Jesus, H.S. Falcão, G.R.M. Lima, M.R.D. Caldas Filho, I.R.P. Sales, I.F. Gomes, S.G. Santos, J.F. Tavares, J.M. Barbosa-Filho, L.M. Batista *

Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba (UFPB), 58051-970 João Pessoa, PB, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 June 2013

Received in revised form

14 September 2013

Accepted 3 October 2013

Available online 29 October 2013

Keywords:

Hyptis suaveolens

Lamiaceae

Peptic ulcer

Gastroprotective

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Hyptis suaveolens* is used by the traditional population in several parts of the world to treat inflammation, gastric ulcer and infection and is used as a crude drug to relieve symptoms related with gastric ulcer or gastritis in northeaster and central region of Brazil.

Materials and methods: the standardized ethanolic extract (*Hs-EtOHE*) and hexanic fraction (*Hs-HexF*) of *Hyptis suaveolens* (62.5, 125, 250 and 500 mg/kg) was evaluated in several models of acute gastric ulcers. The participation of NO was evaluated by pretreatment with L-NAME and non-protein sulphydryls by NEM in the gastroprotective effect.

Results: *Hs-EtOHE* and *Hs-HexF* markedly reduced the gastric lesions induced by all ulcerogenic agents (HCl/ethanol, ethanol, NSAIDs and hypothermic restraint-stress). Gastric ulcerations were exacerbated by administration of NEM suggesting that the gastroprotective mechanism of action of *Hs-EtOHE* and *Hs-HexF* involves sulphydryl groups.

Conclusion: Our results show that an extract of *Hyptis suaveolens*, administered orally to rodents, present gastro protective activity in different models of acute of gastric ulcer and give some support to the reported claims on the use of this plant as a gastro protective agent.

© 2013 Published by Elsevier Ireland Ltd.

1. Introduction

Peptic ulcer is a disease of the gastrointestinal tract, which includes both gastric and duodenal ulcers. The occurrence of peptic ulcer disease (PUD) has been attributed to the imbalance between aggressive factors like acid, pepsin, and *Helicobacter* infection on one hand and the local mucosa defenses like bicarbonate and mucus secretion and prostaglandins synthesis (Jain et al., 2007) on the other hand. In addition, the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), emotional stress, excessive alcohol use and smoking are among the principal etiological factors associated with peptic ulcer (Malfertheiner et al., 2009).

PUD affects millions of people worldwide (Klein et al., 2010). In Brazil, the prevalence of peptic ulcers is unknown but duodenal ulcer prevalence has been estimated to be 3.3% for the period between 1996 and 2005 (Saul et al., 2007). The treatment of PUD is

usually focused on the control of acid secretion and increase gastric protection (Mejia and Kraft, 2009). Although treatment of PUD has improved over the years, existing drugs failed to meet therapeutic requirements of certain groups of patients due to adverse effects and limited effectiveness (Malfertheiner et al., 2009; Sheen and Triadafilopoulos, 2011).

Natural products are potentially a rich source of new safer and effective antiulcer agents (Schmeda-Hirschmann and Yesilada, 2005). Several plant extracts and plant derived compounds have shown promising results in the treatment of gastric ulcer, with some having advanced to clinical trials (Falcão et al., 2008; Shenoy et al., 2009).

There are more than 300 species belonging to the *Hyptis* Jacq. (Lamiaceae) genus, many of which are reportedly used for medicinal purposes in many part of the world including Brazil (Falcão and Menezes, 2003; Agra et al., 2008; Shenoy et al., 2009). Several of these species represent an important source of biologically and pharmacologically important constituents (Caldas et al., 2011; Takayama et al., 2011; Picking et al., 2013).

Hyptis suaveolens (L.) Poit. (Lamiaceae), popularly known in Brazil as "alfazema-brava"; "bamburral" or "tapera velha" is a species native to the Americas that is widely distributed in the tropical and subtropical regions. It is used in folk medicine in the treatment of respiratory and gastrointestinal infections, indigestion, cold, pain, fever, cramps, skin diseases, gastric ulcer and inflammatory

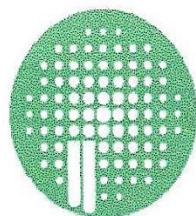
Abbreviations: *Hs-EtOHE*, ethanolic extract *Hyptis suaveolens*; *Hs-HexF*, hexanic fraction *Hyptis suaveolens*; *Hs-DCMF*, dicloromethanic fraction *Hyptis suaveolens*; *Hs-EAF*, ethyl acetate fraction; NO, nitric oxide; L-NAME, L-nitro-L-arginine methyl ester; NEM, N-ethylmaleimide; NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drugs

* Corresponding author. Tel.: +55 83 32167003; fax: +55 83 32167502.

E-mail address: leoniac@uol.com.br (L.M. Batista).

ANEXO

ANEXO A- Certidão de aprovação do projeto pelo comitê de ética em pesquisa animal (LTF/UFPB)



PgPNSB

Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL

C E R T I D Ã O

João Pessoa, 15 de dezembro de 2010

CEPA N° 1112/10

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Profa. Dra. Leônia Maria Batista

Orientando(a) : GEDSON RODRIGUES DE MORAIS LIMA

Departamento/Setor: LTF

Ref.:MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA INTESTINAL DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E FASE HEXÂNICA DE *Combretem duarteanaum* CAMBESS. (COMBRETACEAE).

O Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, em reunião, **ANALISOU e APROVOU** a execução do projeto acima.

Número de animais: 250 ratos e 84 camundongos

Período: 2011 (1º semestre) – 2013 (2º semestre).

Atenciosamente,

Sandra Rodrigues Mascarenhas
Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB