

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

RAPHAELA FRANCELINO DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DO ÁCIDO
ROSMARÍNICO EM MODELOS ANIMAIS**

JOÃO PESSOA - PB

2016

RAPHAELA FRANCELINO DO NASCIMENTO

**ATIVIDADE GASTROPROTETORA DO ÁCIDO ROSMARÍNICO EM MODELOS
ANIMAIS**

**Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos, do Centro
de Ciências da Saúde, da
Universidade Federal da Paraíba,
como parte dos requisitos para
obtenção do título de MESTRE EM
PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de
concentração: FARMACOLOGIA.**

ORIENTADORA: Profa. Dra. Leônia Maria Batista

**JOÃO PESSOA – PB
2016**

N244a Nascimento, Raphaela Francelino do.
Avaliação da atividade gastroprotetora do ácido
rosmarínico em modelos animais / Raphaela Francelino do
Nascimento.- João Pessoa, 2016.
145f. : il.
Orientadora: Leônia Maria Batista
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS
1. Produtos naturais. 2. Farmacologia. 3. Ácido
rosmarínico. 4. Úlceras gástricas. 4. Gastroproteção.
5. Citoproteção. 6. Anti-inflamatório.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

RAPHAELA FRANCELINO DO NASCIMENTO

ATIVIDADE GASTROPROTETORA DO ÁCIDO ROSMARÍNICO EM
MODELOS ANIMAIS

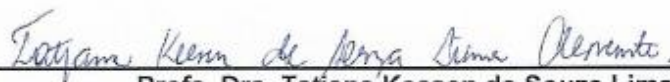
APROVADA EM: 24 / 02 / 16

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Leônia Maria Batista
Orientadora – UFPB

Profa. Dra. Liana Clebia de Moraes Pordeus
Examinadora externa – UFPB



Profa. Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente
Examinadora interna - UFPB

João Pessoa, 24 de fevereiro de 2016

Aos meus pais, Lucineide e Agnaldo, por seu exemplo de amor, honestidade e determinação. Sem o carinho e o zelo de vocês eu não teria chegado até aqui.

Agradecimientos

A Deus, por ser sempre o meu abrigo e refúgio. Além de ser a força que me impulsiona a sair de mim mesma e avançar por águas mais profundas.

À minha família, pelo amor incondicional e por todo cuidado. Obrigada por cada oração, conselho, por sempre estarem presente nos momentos de angústia e alegria.

A Dougllas, meu noivo e grande amigo, obrigada por todo incentivo, presença e docilidade comigo. Seu companheirismo foi essencial nesse processo.

À Profa. Dra. Leônia Maria Batista, pelo acolhimento, orientação e conhecimentos adquiridos. Obrigada por todo zelo e dedicação.

Ao Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho, pela atenção e fornecimento da droga teste.

À Profa. Dra Giciane Carvalho Vieira, pela colaboração com a realização da histologia.

À Profa. Dra Aurigena Antunes de Araújo, por ter auxiliado nos experimentos da atividade imunorregulatória.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pelo aprendizado e colaboração na minha formação profissional.

A Seu Josué, por diariamente ter vindo com sua alegria, atenção e carinho.

A todos que compõe o Laboratório de Farmacologia do Trato gastrointestinal, Igor, Flávia, Rodrigo, Gedson, Mateus e Monique. Obrigada pela convivência diária e ajuda que permitiram a conclusão desse trabalho.

Aos meus companheiros de experimento, Igor e Flávia, obrigada por estarem comigo do início ao fim, sem vocês teria sido bem mais difícil. Obrigada por tudo.

Aos meus irmãos de comunidade, por suas orações, incentivo e amizade cotidiana, vocês são um grande tesouro para mim.

Aos colegas da turma de Mestrado 2014 do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, por todas as experiências compartilhadas.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pela atenção e auxílio cedido.

À José Crispim Duarte, por sua disponibilidade, incentivo e apoio.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo auxílio financeiro por parte da concessão da minha bolsa e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES)**, pelo suporte técnico científico.

A Universidade Federal da Paraíba, por através de sua estrutura, corpo docente e funcionários ter permitido a realização deste trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, participaram do desenvolvimento e da conclusão desta dissertação.

Avaliação da atividade gastroprotetora do ácido rosmarínico em modelos animais. 2016. 145p. NASCIMENTO, R.F. Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Dissertação de Mestrado, CCS/UFPB (2016).

RESUMO

O ácido rosmarínico (AR) é um metabólito secundário presente em diversas espécies de plantas, quimicamente caracterizado como um composto fenólico, oriundo da esterificação do ácido cafeico e do ácido láctico 3,4 dihidroxifenil. Seu nome é derivado da *Rosmarinus officinalis*, espécie da qual foi isolada pela primeira vez. Diversos efeitos biológicos têm sido descritos para o AR como o antioxidante, antialérgico, anticâncer, antimicrobiano, neuroprotetor, hepatoprotetor, entre outros. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a toxicidade aguda, a atividade gastroprotetora do ácido rosmarínico, e os mecanismos de ação relacionados, em modelos animais. No modelo de toxicidade aguda em camundongos fêmeas, o ácido rosmarínico nas doses de 300 e 2000 mg/kg, v.o, não demonstrou nenhuma alteração comportamental nos parâmetros avaliados, nem alterações no consumo de água e ração, peso corpóreo e na estrutura macroscópica dos órgãos. Devido a presença de morte na dose de 2000 mg/kg, a DL50 do ácido rosmarínico foi estipulada em 2500 mg/kg, de acordo com o guia 423 da OECD, o que sugere baixa toxicidade. A atividade gastroprotetora do AR foi avaliada nas doses de 25, 50, 100 e 200 mg/kg (v.o) em diferentes modelos de indução aguda de úlcera: etanol acidificado, etanol, estresse por imobilização e frio, anti-inflamatório não-esteroidal (AINE) e contensão do suco gástrico. Na triagem farmacológica com o etanol acidificado em camundongos, o AR e a carbenoxolona diminuiu o índice de lesão ulcerativa (ILU) em 42, 42, 40, 66 e 42%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle negativo (solução salina 0,9%). No modelo de etanol, AR (50, 100 e 200 mg/kg) e carbenoxolona (100 mg/kg) reduziu a área de lesão ulcerativa (ALU) em 52, 68, 96 e 93%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle negativo. No modelo de estresse, o AR (25, 50, 100 e 200 mg/kg) e a cimetidina (100 mg/kg) diminuiu o ILU em 39, 41, 69, 71 e 40%, quando comparado ao grupo solução salina 0,9%. No modelo de úlcera induzido por AINE o AR (25, 50, 100 e 200 mg/kg) e a cimetidina (100 mg/kg) diminuiu o ILU em 36, 39, 49, 67 e 29%, quando comparado ao grupo controle negativo. No modelo úlceras induzidas por contensão do suco gástrico, o AR (200 mg/kg) e cimetidina (100 mg/kg) quando administrado por via oral ou intraduodenal, reduziu o ILU em 38 e 51% ; 43 e 31%, respectivamente, quando comparados aos seus controles negativos. Foi avaliada a participação dos mecanismos antissecretórios ou neutralizante (parâmetros bioquímicos), citoproteção (grupamentos sulfidrílica, óxido nítrico, muco, prostaglandina), antioxidante (GSH) e imunorregulatório (TNF- α , IL-1 β e IL-10). Foi observado que o efeito gastroprotetor do ácido rosmarínico não está relacionado à alteração dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico (pH, volume e [H⁺]), não envolve a participação do óxido nítrico, muco e prostaglandinas, mas está relacionado a participação dos grupamentos sulfidrílicos, aumento dos níveis de GSH, redução de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) e manutenção dos níveis de citocinas anti-inflamatórias (IL-10). Desta forma, é possível inferir que o ácido rosmarínico apresenta atividade gastroprotetora, relacionada a mecanismos citoprotetores, antioxidante e anti-inflamatórios.

Palavras-chave: Ácido rosmarínico, úlceras gástricas, gastroproteção, citoproteção e anti-inflamatório.

Evaluation of the gastroprotective activity of rosmarinic in animal models. 2016. 145p. NASCIMENTO, R.F. Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Dissertação de Mestrado, CCS/UFPB (2016).

ABSTRACT

The rosmarinic acid (RA) is a secondary metabolite present in several plant species, chemically characterized as a phenolic compound, derived from the esterification of caffeic acid and 3,4-dihydroxyphenyl lactic acid. Its name is derived from *Rosmarinus officinalis*, the species from which it was first isolated. Various biological effects have been described for the AR as antioxidant, antiallergic, anticancer, antimicrobial, neuroprotective, hepatoprotective, among others. This study aimed to assess the acute toxicity, the gastroprotective activity of rosmarinic acid, and related mechanisms of action in animal models. In the model of acute toxicity in female mice, rosmarinic acid in the doses of 300 and 2000 mg/kg, p.o, no showed behavioral changes in the evaluated parameters, or changes in the consumption of water and food, body weight and macroscopic structure of the organs. Due to the presence of death at the dose of 2000 mg/kg, the LD50 of rosmarinic acid was set at 2500 mg/kg, according to the OECD guide 423, which suggest low toxicity. The gastroprotective activity of AR was evaluated at the doses 25, 50, 100 and 200 mg/kg (po) in different models of induction of acute ulcers: ethanol acidified, ethanol, stress, immobilization and cold, anti-inflammatory non-steroidal (NSAIDs) and containment of gastric juice. In pharmacological screening with acidified ethanol in mice, AR and carbenoxolone reduced the ulcerative lesion index (ULI) at 42, 42, 40, 66 and 42%, respectively, compared to the negative control (saline 0.9 %). In the ethanol model, AR (50, 100 and 200 mg/kg) and carbenoxolone (100 mg/kg) reduced in the ULA 52, 68, 96 and 93%, respectively, compared to the negative control group. In the stress model, AR (25, 50, 100 and 200 mg/kg) and cimetidina (100 mg/kg) decreased the ULI at 39, 41, 69, 71 and 40% when compared to the saline group 0.9%. In ulcer model induced by NSAIDs the AR (25, 50, 100 and 200 mg/kg) and cimetidine (100 mg/kg) decreased the ULI at 36, 39, 49, 67 and 29% when compared to the control group negative. In ulcer model induced gastric juice containment, AR (200 mg/kg) and cimetidine (100 mg/kg) when administered by oral or intraduodenal route, ULI reduced by 38 and 51%; 43 and 31%, respectively, when compared to their negative controls. It evaluated the contribution of antisecretory or neutralizing mechanisms (biochemical parameters), cytoprotection (sulfhydryl group, nitric oxide, mucus, prostaglandin), antioxidant (GSH) and immunoregulatory (TNF- α , IL-10 and IL-1 β). It was observed that the gastroprotective effect of rosmarinic acid is not related to the change of biochemical parameters of gastric juice (pH, volume and [H⁺]), does not involve the participation of nitric oxide, mucus, and prostaglandins, but is related to participation of groups sulfhydryl, an increase in GSH levels, reduction of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) and maintaining the levels of anti-inflammatory cytokines (IL-10). Thus, it is possible to infer that rosmarinic acid has gastroprotective activity related to cytoprotective mechanisms, antioxidant and anti-inflammatory.

Keywords: rosmarinic acid, gastric ulcers, gastroprotection, cytoprotective and anti-inflammatory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da distribuição das úlceras pépticas no Trato Gastrointestinal.....	4
Figura 2 Representação da secreção ácida.....	16
Figura 3 Representação dos mecanismos de defesa da mucosa gástrica	17
Figura 4 Representação esquemática do sistema antioxidante enzimático e não enzimático.....	28
Figura 5 Estrutura química do ácido rosmarínico.....	35
Figura 6 Camundongos Swiss (<i>Mus musculus</i>) (A) e rato Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>) (B) utilizados em modelos experimentais.....	41
Figura 7 Fluxograma experimental.....	43
Figura 8 Lupa OLYMPUS Optical TL3-SZ40 (A) e estômago de rato ulcerado com etanol absoluto.....	46
Figura 9 Representação de um estômago de rato ulcerado com etanol absoluto (A e B) e quantificação da área de lesão ulcerativa (B) com AVSoft Bioview Spectra 4.0®	46
Figura 10 Determinação da DL ₅₀ do ácido rosmarínico.....	56
Figura 11 Estômagos de ratos pré-tratados (v.o) com solução salina 0,9% (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B), ácido rosmarínico (25 mg/kg) (C), ácido rosmarínico (50 mg/kg) (D), ácido rosmarínico (100 mg/kg) (E), ácido rosmarínico (200 mg/kg) (F) no modelo de etanol.....	59
Figura 12 Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido gástrico corados com HE após animais serem submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol. A. grupo normal, B. solução salina 0,9% (controle negativo), C. carbenoxolona 100 mg/kg, D. ácido rosmarínico (200 mg/kg).....	61
Figura 13 Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido gástrico corados com PAS após animais serem submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol. A. grupo normal, B. solução salina 0,9% (controle negativo), C. carbenoxolona 100 mg/kg, D. ácido rosmarínico (200 mg/kg).....	61
Figura 14 Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido gástrico corados com PAS após animais serem submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol. A. grupo normal, B. solução salina 0,9% (controle negativo), C. carbenoxolona (100 mg/kg), D. ácido rosmarínico (200 mg/kg). Aumento 40x.....	62

Figura 15 Estômagos de ratos pré-tratados com solução salina 0,9% e tratados com solução salina 0,9% (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B), ácido rosmarínico 200 mg/kg (C) ou pré-tratados com NEM e tratados com solução salina 0,9% (D), carbenoxolona 100 mg/kg (E) e ácido rosmarínico 200 mg/kg (F) no modelo de úlceras induzidas por etanol para avaliação da participação dos grupamentos sulfidríla.....68

Figura 16 Estômagos de ratos pré-tratados com solução salina 0,9% e tratados com solução salina 0,9% (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B), ácido rosmarínico 200 mg/kg (C) ou pré-tratados com L-NAME e tratados com solução salina 0,9% (D), carbenoxolona 100 mg/kg (E) e ácido rosmarínico 200 mg/kg (F) no modelo de úlceras induzidas por etanol para avaliação da participação do óxido nítrico.....69

Figura 17 Estômagos de ratos pré-tratados com solução salina 0,9% e tratados com solução salina 0,9% (A), misoprostol μ g/kg (B), ácido rosmarínico 200 mg/kg (C) ou pré-tratados com Indometacina e tratados com solução salina 0,9% (D), misoprostol μ g/kg (E) e ácido rosmarínico 200 mg/kg (F) no modelo de úlceras induzidas por etanol para avaliação da participação das prostaglandinas.....71

Figura 18. Representação esquemática dos resultados obtivos a partir da avaliação da toxicidade aguda e do efeito gastroprotetor do ácido rosmarínico em modelos animais.....95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Efeito da administração oral do ácido rosmarínico na evolução ponderal, índice dos órgãos, consumo de água e de ração em camundongos fêmeas, após 14 dias.....	57
Tabela 2 Efeito da administração oral do ácido rosmarínico e carbenoxolona em úlceras gástricas induzidas por etanol acidificado em camundongos.....	58
Tabela 3 Efeito da administração oral do ácido rosmarínico e cimetidina em úlceras gástricas induzidas por anti-inflamatório não-esteroidal em camundongos.....	63
Tabela 4 Efeito da administração oral do ácido rosmarínico e cimetidina em úlceras gástricas induzidas por estresse em camundongos	64
Tabela 5 Efeito do tratamento com ácido rosmarínico (via oral e intraduodenal) e cimetidina em úlceras gástricas induzidas por ligadura do piloro.....	65
Tabela 6 Efeito da administração oral e intraduodenal do ácido rosmarínico e cimetidina nos parâmetros bioquímicos do suco gástrico após ligadura do piloro.....	66

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Efeito da administração oral do ácido rosmarínico e carbenoxolona em úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos.....	58
Gráfico 2 Efeito da administração oral do ácido rosmarínico e carbenoxolona após pré-tratamento com salina e NEM (i.p.), em úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos.....	67
Gráfico 3 Efeito da administração oral do ácido rosmarínico carbenoxolona após pré-tratamento com solução salina 0,9% e L-NAME (i.p.), na úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos.	68
Gráfico 4 Efeito da administração oral do ácido rosmarínico e carbenoxolona sobre a concentração de muco aderida a mucosa gástrica após ligadura do piloro em ratos.....	70
Gráfico 5 Efeito da administração oral do ácido rosmarínico e misoprostol após pré-tratamento com solução salina 0,9% e indometacina (v.o), na úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos.	71
Gráfico 6 Efeito da administração oral do ácido rosmarínico e carbenoxolona sobre os níveis de TNF- α (A), IL-1 β (B) e IL-10 (C) em estômagos submetidos ao modelo de úlcera por etanol em ratos.....	73
Gráfico 7 Efeito da administração oral do ácido rosmarínico e carbenoxolona após pré-tratamento com salina e ácido rosmarínico (v.o), na úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AA	Ácido araquidônico
AC	Ciclase de adenilil
ACh	Acetilcolina
AINE	Anti-inflamatório não-esteroidal
ALU	Área de lesão ulcerativa
AMPc	3',5'- monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de variância de uma via
CagA	Citotoxina associada ao gene A
Ca²⁺	Íon cálcio
CAT	Catalase
CBiotec	Centro de Biotecnologia
CCK	Colecistocinina
CCK-1	Receptor de colecistocinina 1
CCK-2	Receptor de colecistocinina 2
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEUA	Comitê de Ética em Uso Animal
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
Cl⁻	Íon cloreto
CRF	Fator de liberação da corticotropina
CSPP-28	Fosfoproteína sensível a concentração de Ca ²⁺
CoQ10	Coezima Q10
CO₂	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase tipo 1
COX-2	Ciclooxigenase tipo 2
COX-3	Ciclooxigenase tipo 3
DAG	Diacilglicerol
DL50	Dose Letal 50%
DNA	Ácido desoxirribonucleico

DP	Receptor de PGD2
d.p.	Desvio padrão da média
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGF-R	Receptor do fator de crescimento epidérmico
eNOS	Sintase de óxido nítrico endotelial
e.p.m.	Erro padrão da média
EP	Receptor de prostaglandina E
EP1	Receptor de prostaglandina E tipo1
EP2	Receptor de prostaglandina E tipo2
EP3	Receptor de prostaglandina E tipo3
EP4	Receptor de prostaglandina E tipo4
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FP	Receptor de PGF
GCs	Ciclase de guanilil solúvel
Gi	Proteína G inibitória
GIP	Polipeptídeo gástrico inibitório
G_s	Proteína G estimulatória
Gq/11	Proteína Gq ou proteína 11
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GRP	Peptídeo liberador de gastrina
GSH	Glutationa reduzida
GSSH	Glutationa oxidada
H⁺	Íon hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HCO₃⁻	Íon bicarbonato
H⁺-K⁺ ATPase	Bomba de prótons
H₂	Receptores histaminérgicos do tipo 2

HE	Hematoxilina e eosina
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HO₂[*]	Radical hidroperoxila
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
HP-NAP	Proteína ativada por neutrófilos
HSP	Proteína de choque térmico
ICAM-1	Molécula de adesão tipo 1
IgE	Imunoglobulina E
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
INF-γ	Interferon gama
IP3	1,4,5-trisfosfato de inositol
IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
i.p.	Via intraperitoneal
ILU	Índice de Lesão Ulcerativa
L-NAME	N-nitro-L-arginina metil éster
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
M₃	Receptor muscarínico M ₃
MDA	Malondialdeído
mMol	Mili mol
MPO	Mieloperoxidase
NA	Noradrenalina
Na⁺	Íon sódio
NEM	N-etilmaleimida
nNOS	Sintase de óxido nítrico neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintase de óxido nítrico
NP-SH	Compostos não proteícos sulfidrílicos
O₂	Oxigênio molecular
O₂^{*-}	Ânion superóxido

OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
OH·	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONOO-	Peroxinitrito
OVA	Ovoalbumina
PAS	Ácido periódico de Schiff
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PG	Prostaglandina
PGE₂	Prostaglandina da série E ₂
PGD₂	Prostaglandina da série D ₂
PGF_{2α}	Prostaglandina da série 2α
PGH₂	Prostaglandina H ₂
PGI₂	Prostaciclina
pH	Potencial hidrogeniônico
PK	Proteína quinase
PKA	Proteína quinase dependente de AMPC
PKG	Proteína quinase dependente de
PLA₂	GMPc Fosfolipase A ₂
PLC-β₁	Fosfolipase C beta 1
PNA	Peptídeo natriurético atrial
PNPMF	Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PPgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
s.c.	Subcutânea
SH	Compostos sulfidrila
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNAP	Sistema nervoso autônomo parassimpático

SNAS	Sistema nervoso autônomo simpático
SNC	Sistema nervoso central
SNE	Sistema nervoso entérico
SOD	Superóxido dismutase
SSTR2	Receptor de somatostatina 2
SUR	Subunidade receptora de sulfonilureia
SUS	Sistema Único de Saúde
TFF	Fator trefoil
TGF-α	Fator de transformação de crescimento alfa
TGI	Trato gastrointestinal
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRF	Fator de liberação da tireotropina
TRH	Hormônio liberador de tireotrofina
TXA₂	Tromboxano A ₂
TSH	Hormônio estimulante da tireoide
VacA	Citotoxina vacuolizante A
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
v.o.	Via oral

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

SUMÁRIO

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE GRÁFICOS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Considerações gerais.....	2
1.2 Úlcera péptica.....	4
1.2.1 Etiologia da úlcera péptica.....	4
1.2.2 Epidemiologia.....	10
1.2.3 Fisiologia gastrintestinal.....	11
1.2.3.1 Secreção gástrica.....	11
1.2.4 Mecanismos de defesa da mucosa gástrica.....	16
1.2.4.1 Defesa pré-epitelial.....	17
1.2.4.2 Defesa epitelial.....	19
1.2.4.3 Defesa subepitelial.....	20
1.2.4.4 Intervenção sensorial da mucosa gástrica.....	21
1.2.4.5 Reconstituição do epitélio gástrico.....	22
1.2.5 Fatores moduladores da barreira gástrica.....	22
1.2.5.1 Óxido nítrico (NO).....	22
1.2.5.2 Prostaglandinas (PGs).....	24
1.2.5.3 Grupamentos sulfidrílicos.....	25
1.2.6 Sistema antioxidante.....	26
1.2.7 Citocinas.....	29
1.2.8 Terapêutica da úlcera gástrica.....	30
1.3 Produtos naturais.....	32
1.4 Ácido rosmarínico.....	35
2. OBJETIVOS.....	38
2.1 Objetivo geral.....	38

2.2 Específicos.....	38
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1 MATERIAL.....	40
3.1.1 Local da pesquisa.....	40
3.1.2 Substância teste.....	40
3.1.3 Animais.....	40
3.1.4 Drogas utilizadas.....	41
3.2 MÉTODOS.....	42
3.2.1 Ensaio toxicológico pré-clínico agudo do ácido rosmarínico.....	43
3.2.2 Avaliação da atividade gastroprotetora do ácido rosmarínico.....	44
3.2.2.1 Modelos de indução aguda de úlcera gástrica.....	47
3.2.2.1.1 Úlcera gástrica induzida por etanol acidificado.....	47
3.2.2.1.2 Úlceras gástricas induzidas por etanol.....	47
3.2.2.1.3 Análise histopatológica.....	48
3.2.2.1.4 Úlceras gástricas induzidas por anti-inflamatório não-esteroidal (Piroxicam).....	48
3.2.2.1.5 Úlceras gástricas induzidas por estresse (imobilização e frio).....	48
3.2.2.2.1 Úlceras gástricas induzidas por contensão do suco gástrico.....	49
3.2.2.3 Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora do ácido rosmarínico.....	49
3.2.2.3.1 Avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico após ligadura do piloro (i.d./v.o.).....	49
3.2.2.3.2 Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrílicos (SHs).....	50
3.2.2.3.3 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) na gastroproteção...50	
3.2.2.3.4 Determinação da concentração de muco aderido à parede gástrica.51	
3.2.2.3.5 Avaliação da participação das prostaglandinas (PGs) na gastroproteção.....	52
3.2.2.4 Avaliação do efeito antioxidante.....	52
3.2.2.4.1 Extração dos componentes citosólicos.....	52
3.2.2.4.2 Determinação das proteínas totais.....	53
3.2.2.4.3 Determinação dos níveis de GSH.....	53
3.2.2.5 Avaliação da atividade imunorreguladora.....	53
3.2.2.5.1 Determinação das interleucinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e anti-inflamatórias (IL-10).....	53

3.2.3 Análise estatística.....	54
4. RESULTADOS.....	56
4.1 Ensaio toxicológico pré-clínico agudo do ácido rosmarínico.....	56
4.2 Avaliação da atividade gastroprotetora do ácido rosmarínico.....	58
4.2.1 Triagem farmacológica do ácido rosmarínico em modelo de indução aguda de úlcera pelo etanol acidificado.....	58
4.2.2 Úlceras gástricas induzidas por etanol.....	58
4.2.3 Análise histológica.....	59
4.2.4 Úlceras gástricas induzidas por anti-inflamatório não-esteroidal.....	62
4.2.5 Úlceras gástricas induzidas por estresse (imobilização e frio).....	63
4.2.6 Úlceras gástricas induzidas por contensão do suco gástrico.....	64
4.3 Mecanismos de ação envolvidos no efeito gastroprotetor do ácido rosmarínico.....	65
4.3.1 Avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico após ligadura do piloro (i.d./v.o.).....	65
4.3.2 Avaliação dos grupamentos sulfidril (SH) na atividade gastroprotetora do ácido rosmarínico.....	66
4.3.3 Avaliação do óxido nítrico (NO) na atividade gastroprotetora do ácido rosmarínico.....	68
4.3.4 Determinação da concentração de muco aderido à mucosa gástrica.....	70
4.3.5 Avaliação das prostaglandinas na atividade gastroprotetora do ácido rosmarínico.....	70
4.4 Avaliação do efeito antioxidante.....	72
4.4.1 Determinação dos níveis de GSH.....	72
4.5 Avaliação da atividade imunorreguladora.....	73
4.5.1 Determinação das interleucinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e anti-inflamatória (IL-10).....	73
5. DISCUSSÃO.....	77
6. CONCLUSÃO.....	94
7. PERSPECTIVAS.....	96
8. REFERÊNCIAS.....	98
ANEXO I.....	144
ANEXO II.....	145

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

A úlcera péptica é uma doença que acomete uma parcela significativa da população mundial (ZELICKSON, 2011; THORSEN et al., 2013) e apresenta múltiplas etiologias, sendo definida como uma descontinuidade da mucosa gástrica que pode se estender até a camada muscular da mucosa (TARNAWSKI, 2005; NIETO, 2012). É causada por um desequilíbrio entre fatores agressivos (físicos, químicos e biológicos) e mecanismos protetores da mucosa gástrica (HAROLD, 2007; LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

Apesar da vasta terapêutica existente no mercado para o tratamento da úlcera péptica e outros distúrbios gastrintestinais é possível constatar vários fatores limitantes, a exemplo da baixa eficácia terapêutica de alguns medicamentos, os inúmeros efeitos colaterais e adversos presentes ao se fazer uso contínuo, a recidiva da doença, entre outros. Dessa forma, existe uma grande necessidade de novas possibilidades terapêuticas com substâncias gastroprotetora e antiulcerogênicas mais eficazes e seguras (AL MOFLEH et al., 2007; ALQASOUMI et al., 2009).

Nesse contexto, os produtos naturais têm sido uma das principais fontes de matérias-primas utilizadas na descoberta de novos fármacos com potenciais efeitos terapêuticos (FIRN; JOHN, 2003; MISHRA; TIWARI, 2011; ANTONISAMY et al., 2014).

Os produtos naturais caracterizam-se como compostos químicos obtidos de plantas, microrganismos e organismos marinhos que atuam como moléculas de ligação para a síntese de diferentes drogas (KUMAR et al., 2014). Devido a diversidade de estruturas químicas, a pesquisa com produtos naturais tem contribuído para o desenvolvimento de novos medicamentos (MACHA et al., 2015) e para o avanço no conhecimento das ciências biológicas (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

O uso de produtos naturais, em especial das plantas medicinais, pela população se justifica pelo contexto cultural em que se encontram inseridos, por serem de fácil acesso, apresentarem um grande potencial terapêutico atribuído a riqueza de seus constituintes ativos, pelos poucos efeitos colaterais

quando utilizados dentro de um esquema terapêutico, além dos fatores limitantes dos medicamentos sintéticos (BARBOSA; OLIVEIRA; SILVA, 2010).

Parte da população dos países em desenvolvimento ainda depende da medicina caseira, utilizando vegetais para as necessidades primárias de saúde (BRAZ-FILHO, 2010). No Brasil 20% da população é responsável por 63% do consumo de medicamentos disponíveis, destacando-se o uso de plantas medicinais de maneira empírica, o que significa um potencial terapêutico a ser descoberto (AGRA et al., 2007; EDRIS, 2007; RABELO et al., 2013)

Os produtos naturais e seus derivados representam cerca de 25% e 50%, respectivamente, das drogas existentes no mercado (KINGSTON, 2011). Além disso, fornecem modelos para modificações estruturais e otimização das propriedades farmacológicas e bioquímicas, servindo para a inspiração de novos fármacos (BRAZ-FILHO, 2010).

Portanto, os produtos naturais apresentam-se como uma fonte ainda pouco explorada, que se destacam por sua capacidade de interagir com uma gama de macromoléculas biológicas e, portanto sistemas biológicos oferecendo assim maiores oportunidades para encontrar moléculas ativas úteis no tratamento de diversas afecções (SCHMITT et al., 2011).

Nesta perspectiva este trabalho se propôs ao estudo da atividade gastroprotetora de uma substância sintética, o ácido rosmarínico, caracterizado quimicamente como um composto fenólico (TEKELOVÁ et al., 2015) obtida pela primeira vez da espécie vegetal *Rosmarinus officinalis*, mas também encontrada em muitas outras espécies vegetais.

O ácido rosmarínico apresenta várias atividades biológicas, como a antialérgica (OSAKABE et al., 2004), antimicrobiana (MORENO et al., 2006), antioxidante (TEPEA et al., 2007), anti-apoptótica (HUR et al., 2007), no tratamento de Alzheimer (HAMAGUCHI et al., 2009), esclerose múltipla (FALLARINI et al., 2009), anticâncer (MOON et al., 2010), anti-inflamatório (CHU et al., 2012); neuroprotetor (ONO et al., 2012) e hepatoprotetor (DOMITROVIC et al., 2013).

Devido ao fato das espécies vegetais nas quais ele pode ser encontrada apresentarem efeito no trato gastrointestinal e por não haver relatos na literatura de seu efeito gastroprotetor, enquanto substância isolada, o mesmo foi escolhido como objeto de estudo deste trabalho. Assim o presente estudo visa

contribuir para o achado de novas alternativas terapêuticas, com efeito, gastroprotetor que sejam mais eficazes e seguros.

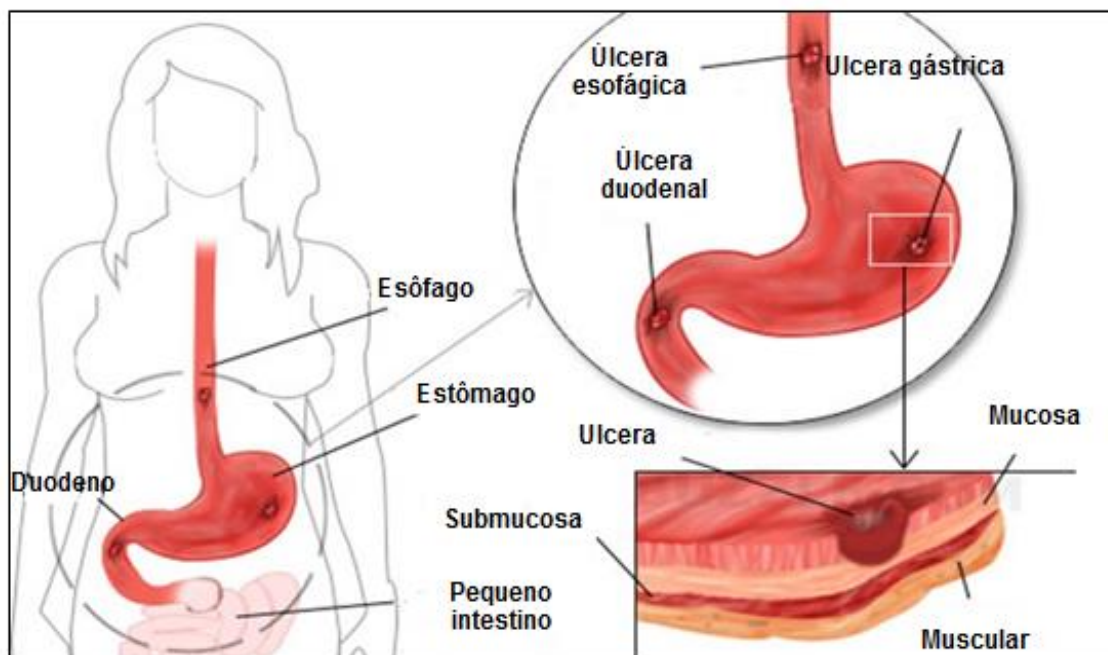
1.2 Úlcera péptica

1.2.1 Etiologia da úlcera péptica

A úlcera péptica é uma doença caracterizada por lesões necrotizantes, pontos hemorrágicos, hiperemia e inflamação severa na mucosa gastrointestinal que pode se estender até a camada muscular da mucosa (TARNAWSKI, 2000, 2005; NIETO, 2012). Esse rompimento da integridade da mucosa pode ocorrer no esôfago, estômago e/ou duodeno, sendo denominadas de úlceras esofágicas, gástrica e duodenal, respectivamente (KUMAR; DEWAN; RAMA, 2011; PAGUIGAN; CASTILLO; CHICHIOCO-HERNANDEZ, 2014) (Figura 1).

As úlceras gástricas estão localizadas no estômago, geralmente ao longo da curvatura menor na transição do corpo para o antro, enquanto que as úlceras duodenais estão localizadas no bulbo duodenal (NAJM, 2011).

Figura 1. Representação esquemática da distribuição das úlceras pépticas no Trato Gastrointestinal (Fonte: www.buzzle.com com modificações)



A úlcera péptica é caracterizada morfologicamente por duas estruturas, uma margem, formada pelo componente epitelial e mucosa adjacente não

necrosado e a base da úlcera, caracterizada por tecido de granulação (componente do tecido conjuntivo), e conectivo constituído por fibroblastos, macrófagos e células endoteliais de proliferação que formam os microvasos sanguíneos (HELANDER, 1983; TARNAWSKI, 1993, 2010; TARNAWSKI; AHLUWALIA, 2012).

A mucosa do TGI é frequentemente exposta a diversos fatores agressivos endógenos e exógenos. Entre os fatores endógenos tem-se a secreção ácida péptica, redução na secreção de muco e bicarbonato, refluxo biliar, leucotrienos, espécies reativas de oxigênio (ERO), presença da *Helicobacter pylori*, aumento de contrações gástricas e diminuição do fluxo sanguíneo (KONTUREK; KONTUREK; BRZOZOWSKI, 2005; MOTA et al., 2008; ALRASHDI et al., 2012). Como fatores exógenos tem-se a exposição ao estresse, a ingestão de álcool, o uso contínuo de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), fumo e deficiências nutricionais (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

Apesar da exposição a fatores agressores, em condições normais, a mucosa gástrica mantém a integridade estrutural devido a uma variedade de mecanismos de defesa, a exemplo de muco e bicarbonato, fluxo sanguíneo, óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGs), fatores de crescimento e regeneração celular, sistema de defesa antioxidante, estimulação vagal, liberação do Fator de Liberação da Corticotropina (CRF) e Fator de Liberação da Tireotropina (TRF), melatonina, hormônios como a gastrina, colecistocinina (CCK), grelina, corticosteróides das suprarrenais e fator de renovação celular (fator de crescimento epidermal - EGF) (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008; TARNAWSKI; AHLUWALIA, JONES, 2013).

O desequilíbrio entre os fatores agressivos e defensivos da mucosa gástrica pode desencadear o desenvolvimento desse processo complexo e multifatorial, que é a úlcera péptica (HAROLD, 2007; AWAAD; EL-MELIGY; SOLIMAN, 2012).

Os indivíduos com úlcera péptica em geral relatam dor epigástrica, associada em sua maioria com sintomas de dispepsia (distensão abdominal, eructações, azia, náuseas e refluxo) (BARKUN; LEONTIADIS, 2010; PROCTOR; DEANS, 2014), falta de apetite e perda de peso. Na úlcera gástrica o indivíduo ao comer sente dor, enquanto na úlcera duodenal a dor é

tipicamente aliviada com a ingestão de alimentos (PROCTOR; DEANS, 2014). Entre as mais freqüentes complicações da úlcera péptica estão a hemorragia digestiva de via alta e perfuração (LOPERFIDO et al., 2009), seguido de sangramento, a hematêmese, melanema e os choques hipovolêmico, o que se constitui em altas taxas de morbidade e mortalidade (LAU et al., 2011; PROCTOR; DEANS, 2014).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2011), em todo o mundo observa-se um amplo consumo de bebidas alcoólicas e isso tem se configurado em um agravo a saúde e um problema de saúde pública. Diversas doenças estão relacionadas ao consumo agudo ou crônico de álcool, de maneira particular as que acometem o esôfago e o estômago, como refluxo esofágico, câncer, gastrite e úlcera péptica (FRANKE; TEYSSEN; SINGER, 2005).

A ingesta de etanol pode produzir erosões gástricas hemorrágicas agudas no estômago e a ingestão excessiva pode levar a edema na mucosa, hemorragias sub-epiteliais, esfoliação celular e infiltração das células inflamatórias (GUSLANDI, 1987; CHEN et al., 2015).

O etanol penetra rapidamente na mucosa gástrica e desestabiliza a camada de muco-bicarbonato-fosfolípidos, fazendo com que enzimas proteolíticas (pepsina) e o ácido clorídrico atuem na mucosa gástrica (OATES; HAKKINEN, 1988; BALAN et al., 2015) e causem danos a membrana, esfoliação celular e erosão (SHAW et al., 1990; SENER et al., 2004, BALAN et al., 2015). Em seguida ocorre a ativação de mastócitos que liberam mediadores pró-inflamatórios (a exemplo da IL-1 β e TNF α), os quais induzem a migração de neutrófilos para o local da lesão, com liberação de espécies reativas de oxigênio que levam ao dano celular (TUORKEY; KAROLIN, 2009; LI et al., 2013).

O etanol também promove perturbação na microcirculação, causa hipóxia, secreção de endotelina, inibição da produção de prostaglandina e muco, aumento da secreção de pepsina, aumento do fluxo de Na⁺, K⁺ e H⁺ para o lúmen o que ocasiona a retrodifusão de H⁺ e consequentemente a lesão das células da mucosa (SZABO; BROWN, 1987; TAKAYAMA et al., 2011).

O etanol é metabolizado no fígado e no trato gastrointestinal pela enzima álcool desidrogenase, em acetaldeído, substância tóxica (ERIKSSON,

2000; HASEBA, 2008) que promove a liberação de radicais livres, que induz ao dano mitocondrial e leva ao estresse oxidativo e comprometimento da integridade celular (FARFÁN LABONNE et al., 2009).

Nas últimas décadas, especialmente nos países industrializados, com a melhora nas condições sanitárias, sociais e na qualidade de vida, tem-se observado um aumento na prevalência de úlcera péptica associada ao uso de AINEs, principalmente em idosos (GROENEM et al., 2009; MCJUNKIN et al., 2011; MUSUMBA et al., 2012).

Os AINEs são ácidos orgânicos fracos que ao entrarem em contato com a mucosa gástrica agem por mecanismo local e sistêmico (WALLACE, 2008). Estes em contato direto com a mucosa promovem efeito citotóxico direto sobre as células epiteliais inibindo a proliferação das mesmas (ALLEN et al., 1993; ROSSONI et al., 2002; WALLACE, 2008). Além disso, interagem quimicamente com os fosfolípidos de membrana reduzindo a sua capacidade hidrofóbica e esta causa o aumento da permeabilidade e alterações na fluidez da mucosa, espessura, flexibilidade, rigidez e na formação dos poros, o que culmina na formação das úlceras gástricas (LAINE, 1996; LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

Os AINEs agem por efeito sistêmico por inibição inespecífica da ciclooxigenase constitutiva (COX-1) e bloqueio moderado da ciclooxigenase induzida (COX-2), o que reduz a síntese de prostaglandinas endógenas (PGE₂ e PGI₂), as quais atuam como fatores citoprotetores da mucosa (SAMUELSSON; MORGENSTERN; JAKOBSSON, 2007; WALLACE, 2008). Desta forma, ocorre um aumento da liberação de íons H⁺ para o lúmen gástrico, menor produção de muco e bicarbonato e aumento da probabilidade de lesões gástricas (WALLACE, 2008; RAMSAY; CARR, 2011), retardando assim o seu mecanismo de reparo (SUZUKI et al., 2012).

O ácido araquidônico, antes substrato para a formação das prostaglandinas, passa a ser substrato para as lipoxigenases que sintetizam os leucotrienos, esses juntamente com o desbalanço de citocinas, gerado pela ação local, promovem um processo inflamatório, caracterizado por recrutamento de neutrófilos, estresse oxidativo e peroxidação lipídica na mucosa que resulta em dano celular (WALLACE, 2008; NIETO, 2012; FARZAEI; ABDOLLAHI; RAHIMI, 2015).

A exposição a eventos estressantes promovidas por situações de irritabilidade, ansiedade, impulsividade, dificuldade de concentração, depressão, pânico, má alimentação, têm sido associados ao desenvolvimento da úlcera péptica (MARSOLLA, 2009; MELINDER et al., 2015).

O estresse promove a ativação de duas vias, o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e o sistema simpato-adrenal (SAAVEDRA; SÁNCHEZ-LEMUS; BENICKY, 2010). O estresse estimula diretamente a glândula suprarrenal a liberar adrenalina e cortisol que no hipotálamo estimulam o sistema nervoso simpático que passa a liberar mais catecolaminas e glicocorticoides (MARSOLLA, 2009). O cortisol promove aumento na secreção de ácido clorídrico e pepsinogênio, além de redução na produção de muco (MCEWEN, 2008; MARSOLLA, 2009).

A adrenalina atua em receptores adrenérgicos α_1 na parede dos vasos do TGI, levando a vasoconstrição e a um menor aporte sanguíneo, o que acarreta no aumento da produção de EROs e a peroxidação lipídica na mucosa do estômago (MORSY, 2011; RAMSAY; CARR, 2012). Já a acetilcolina atua em receptores muscarínicos (M_3) da camada muscular aumentando a motilidade e assim diminuindo a quantidade de PG, óxido nítrico (NO), muco e bicarbonato no lúmen do estômago, aumentando o risco de dano a mucosa gástrica (ROBERT et al., 1989; MORSY, 2011; RAMSAY; CARR, 2012).

Fumar pode levar a formação de úlceras gástricas, a uma lentificação na cicatrização e a um aumento na recorrência de úlcera gástrica (MORSY; EL-SHEIKH, 2011). Estudo realizado por Mirzaei e colaboradores (2015) demonstrou que de 215 pacientes com úlcera péptica, 34% faziam uso do tabagismo.

O uso contínuo de nicotina estimula a produção de ácido gástrico, a qual é mediada pela estimulação de receptores histaminérgicos do tipo 2 (H_2) estimula a secreção de pepsinogênio, a formação de EROs, aumenta a taxa de refluxo biliar (MAITY et al., 2003), promove o refluxo do conteúdo duodenal para o estômago, reduz a produção de muco, por diminuição da síntese de PGE_2 , reduz o fluxo sanguíneo para a mucosa e a produção de EGF que contribui para aumento na secreção ácida e diminuição da proteção da mucosa (GREGORY, 1997; MORSY; EL-SHEIKH, 2011).

O desenvolvimento de gastrites, úlceras pépticas, carcinoma gástrico devido a presença da *H. pylori* é determinada por predisposição genética, fatores de virulência e ambientais (HAGYMASI; TOLUSSAY, 2014). A *Helicobacter pylori* é uma bactéria micro-aerófila, gram negativa, de crescimento lento, espiralada e flagelada (WEN; MOSS, 2009).

A *H. pylori* apresenta diversos fatores de virulência como a citotoxina-associada ao gene A (cagA), peptidoglicanos, citotoxina vacuolizante A (vacA), urease, flagelos, adesinas, porinas, anexinas e outras proteínas de membrana (HANDA; NAITO; YOSHIKAWA, 2010).

A presença da cagA está relacionada ao desenvolvimento de úlceras pépticas e câncer gástrico em pacientes infectados (HAGYMASI; TOLUSSAY, 2014). Após a infecção nas células epiteliais do hospedeiro, a cagA é fosforilada em um resíduo de tirosina e estimula a proteína quinase ativada por mitógeno (Ras-MAPK) promovendo nas células epiteliais gástricas crescimento, motilidade e alteração na diferenciação dessas células (FUJIKAWA et al., 2003; HAGYMASI; TOLUSSAY, 2014). Além disso, a cagA promove aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, fator de necrose tumoral- α e interleucinas, IL-6, IL-10 e IL-8 (KLAUSZ et al., 2004; HASNI; IPPOLITO; ILLEI, 2011).

A vacA atua como toxina multifuncional. É uma proteína caracterizada por sua capacidade de induzir a formação de vacúolos citoplasmáticos, interromper a barreira epitelial, alterar os compartimentos endossomais, modular a resposta inflamatória e induzir apoptose (WROBLEWSKI; PEEK; WILSON, 2010).

A vacA induz dano celular as células epiteliais, além de exercer uma ação imunossupressora por inibir a apresentação de antígenos e a ativação de linfócitos (SAYEHMIRI et al. 2015).

A presença *H. pylori* no estômago promove o aumento na liberação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (ERN) que estimula uma resposta imune via células T reguladoras (HANDA; NAITO; YOSHIKAWA, 2011). Entretanto, quando a resposta da células T é insuficiente tem-se a formação de úlceras gástricas (ROBINSON et. al., 2008; HANDA; NAITO; YOSHIKAWA, 2011).

1.2.2 Epidemiologia

A úlcera péptica acomete em média 4 milhões de pessoas ao redor do mundo (ZELICKSON, 2011; THORSEN et al., 2013). Tanto a úlcera gástrica como a duodenal, acometem mais homens que mulheres, sendo que a úlcera duodenal acomete mais pacientes jovens a partir dos 20 anos e principalmente a faixa etária de 50-60 anos, já a úlcera gástrica acomete pacientes mais idosos em especial a faixa etária de 60-70 anos (GROENEM et al., 2009).

A maior incidência de úlcera gástrica em idosos pode ser atribuída ao uso de AINEs (destacando-se o ácido acetilsalicílico) (SUNG et al., 2009; HERNÁNDEZ-DÍAZ; MARTÍN-MERINO; RODRÍGUEZ, 2013). Estudos realizados por Lau et al. (2011), mostram que a incidência anual de úlceras gástricas com hemorragia e perfuração é em torno de 20-57% e 4-14% respectivamente, as quais aumentaram juntamente com a idade e maior uso de AINEs.

A infecção por *H. pylori*, acomete mais da metade da população mundial. Essa infecção leva ao desenvolvimento de úlcera péptica em 20% dos casos (BLASER, 1997, NIETO, 2012), sendo presente em 90% dos pacientes com úlcera duodenal e 60-80% dos pacientes com úlcera gástrica (NIETO, 2012). Esta infecção acomete cerca de 25% dos adultos nos países mais desenvolvidos e ultrapassa 80% em países em desenvolvimento (MAJUMDAR; BEBB; ATHERTON, 2010). Entretanto, como a infecção está se tornando menos frequente nos países desenvolvidos, o uso de AINEs tem sido relatado como a causa mais comum de lesões ulcerativas (KUSTERS; VLIET; KUIPERS, 2006; NAJM, 2011).

No Brasil estima-se que a úlcera péptica afeta em torno de 1-20% da população, entretanto não se tem dados epidemiológicos precisos devido as subnotificações dos casos, que se deve a variação das populações estudadas, coleta de dados não padronizada e critérios selecionados para diagnóstico (CASTRO et al., 2009).

Estudo realizado por Carli et al., 2015 em um hospital de Porto Alegre (Brasil) demonstrou que 13% dos indivíduos diagnosticados com a úlcera péptica era atribuída ao uso de AINEs, em 20% a presença da *H. pylori* e em

21% era devido a causas idiopáticas, sendo que destes 73% dos pacientes com úlcera gástrica, 20,48% com úlcera duodenal e 42% com ambas.

1.2.3 Fisiologia gastrintestinal

1.2.3.1 Secreção gástrica

O TGI pode ser considerado como um tubo muscular revestido por um epitélio especializado que se prolonga a partir da cavidade oral até o ânus. É constituído por músculo liso, com exceção da cavidade oral e anal formadas por músculo esquelético. A camada muscular lisa, subdivide-se em uma camada longitudinal (superior) e outra circular (inferior), a camada superior é coberta por uma membrana serosa onde passam as artérias, veias e vasos linfáticos (CAMPBELL, 2014).

O TGI é revestido pela camada mucosa, abaixo dela está a submucosa, ambas são constituídas por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e linfonodos e estão separadas por uma fina camada de músculo liso que altera a disposição da mucosa localmente, alterando as áreas expostas a secreção e absorção (CAMPBELL, 2014).

O estômago é um órgão do TGI, localizado entre o esfíncter esofágico superior e o esfíncter pilórico (FEHER, 2012). Anatomicamente, apresenta quatro regiões: a cárdia, o fundo, o corpo e o piloro (RAJPUT et al., 2010; BERI et al., 2013). Funcionalmente o estômago é subdividido em duas regiões glandulares: a mucosa oxíntica (corresponde a 75% do número total de glândulas) e pilórica (FEHER, 2012).

O estômago tem como funções armazenar o alimento temporariamente, secretar íons hidrogênio para manter o pH ácido, atuação enzimática (pepsina e lipases) para início da digestão de alimentos, fornecer muco para as funções de proteção e lubrificação (CHU; SCHUBERT, 2012), absorção de íons, cálcio, ferro, vitamina B₁₂ e inativação de microrganismos (SCHUBERT, 2014).

A unidade base funcional é a glândula gástrica constituída por diferentes células (CHU; SCHUBERT, 2012). O epitélio do corpo do estômago contém quatro tipos de células diferenciadas: as células oxínticas (parietais), células zimogênicas (principais), células mucosas da superfície e células secretoras de hormônios enteroendócrinos (MILLS; SHIDAVANI, 2011).

As células *Stem* e as células progenitoras são localizadas no istmo das glândulas e a partir desse ponto as células migram bidirecionalmente para se diferenciarem em células neuroendócrinas, parietais, da mucosa e células chefes (CHU; SCHUBERT, 2012).

Na mucosa oxíntica há predominância das células parietais (secretoras de H^+) e das células semelhantes a enterocromafins (ECL) secretoras de histamina, porém, há também as células enterocromafins (secretam peptídeo natriurético atrial, serotonina e adrenomedulina), células D (somatostatina e amilina) e células Gr (grelina e obestatina). Na mucosa pilórica há predominância das células G (gastrina), células D, enterocromafins, células Gr e células chefes (CHU; SCHUBERT, 2012).

O trato gastrointestinal é controlado por plexos nervosos extrínsecos e intrínsecos, no entanto, o estômago possui uma maior dependência dos impulsos nervosos extrínsecos oriundos do sistema nervoso central autônomo que se subdivide em simpático e parassimpático (TRAVAGLI et al, 2006; CAMPBELL, 2014).

O hipotálamo e o nervo vago possuem fundamental importância na gastroproteção. A ativação do nervo vago pode induzir a lesões na mucosa gástrica por exacerbar a secreção ácida, no entanto, a integridade do nervo vago é essencial para a proteção gástrica, mediada pela liberação de prostaglandinas e NO, que resulta em redução na permeabilidade do epitélio, aumento na síntese e secreção de muco e bicarbonato, aumento do fluxo sanguíneo e melhor cicatrização do epitélio (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008; WALLACE, 2008; NIV; BANIC, 2014).

A secreção gástrica é constituída por íons H^+ , por enzimas proteolíticas (pepsina) e lipolíticas (lipases), muco, bicarbonato, fator intrínseco e secretagogos como a gastrina e histamina (FRY, 2009). As pepsinas e as lipases auxiliam na hidrólise de proteínas e de lipídeos, respectivamente, enquanto a camada de muco e bicarbonato protege a parede gástrica do conteúdo ácido luminal. A única secreção ácida essencial é o fator intrínseco, o qual é necessário para a absorção da vitamina B_{12} no íleo terminal. (FRY, 2009). Além disso, a alta acidez gástrica somada a ação das enzimas tem ação antimicrobiana, impedindo assim o crescimento excessivo de bactérias,

infecção entérica e peritonite bacteriana (MARTINSEN et al. 2011; WALDUM; HAUSO; FOSSMARK, 2014).

A secreção gástrica é constituída por três fases: A fase cefálica é ativada a partir de estímulos olfativos, gustativos e visuais. Nesta fase ocorre a indução da secreção gástrica a partir do nervo vago, ao liberar diretamente a acetilcolina e indiretamente a gastrina. A fase gástrica é estimulada pela ativação de receptores de estiramento e quimiorreceptores, iniciada pela presença de alimento no estômago, sendo o processo autorregulado quando o pH fica abaixo de 2,0. A fase intestinal é mediada por estímulos químicos no duodeno, que reduzem a secreção ácida pelo estômago. Com a presença do quimo no duodeno a secreção ácida passa a ser estimulada pela distensão mecânica e a presença de aminoácidos e peptídeos, após um tempo o conteúdo ácido no duodeno induz a secreção de secretina que atua sobre as células G e as células parietais reduzindo a secreção ácida (FRY, 2009; FEHER, 2012).

A secreção ácida é um processo que envolve uma variedade de sinais parácrinos, endócrinos e neurócrinos os quais culminam com a secreção de íons H^+ pelas células parietais (FEHER, 2012).

A célula parietal responsável pela produção da secreção ácida apresenta sua área de superfície luminal ampliada devido a presença de um sistema extensivo de canalículos que são revestidas com microvilosidades (BERRIDGE, 2014).

Um adulto possui aproximadamente 109 células parietais, que secretam ácido clorídrico a uma concentração de 160 mM ou pH 0,8 (JOHANSSON; SYNNERSTAD; HOLM, 2000; BOLTIN; YARON, 2014). A taxa de secreção ácida varia entre o jejum e a alimentação, podendo variar entre 10 mM (pH 2,0) e 100 mM (pH 1,0) e chegar até 140 mM (pH 0,85), sendo o principal íon o Cl^- (FRY, 2009), seguido do H^+ .

Em repouso, as células parietais contém um pequeno número de canalículos intracelulares e uma série de túbulo vesículas que possuem a bomba de $H^+-K^+ATPase$. A estimulação dessas células leva a fusão das túbulo vesículas com a membrana da célula apical e a consequente ativação da $H^+-K^+ATPase$, a qual passa a bombear H^+ para o lúmen gástrico e K^+ para o meio intracelular. O K^+ por sua vez retorna para o lúmen gástrico por meio de co-

transporte com íons Cl^- na porção apical da célula (URUSHIDANI; FORTE, 1997; FEHER, 2012; BERRIDGE, 2014).

Os principais secretagogos responsáveis pela secreção de ácido na membrana basolateral da célula parietal são a acetilcolina, histamina e gastrina.

A acetilcolina, liberada por fibras pós-ganglionares na mucosa fúndica, estimula diretamente as células parietais ao interagir com receptor muscarínico M_3 (PFEIFFER, 1990; WALDUM, 2013), que acoplado a proteína heterotrimérica Gq_{11} , induz a um aumento na liberação de íon cálcio (Ca^{2+}) e ativação da fosfolipase C beta 1 ($\text{PLC-}\beta_1$). O Ca^{2+} estimula a quinase da calmodulina II dependente de Ca^{2+} (CAMKII) que fosforila a fosfoproteína sensível a concentração de Ca^{2+} (CSPP-28). Essa por sua vez, estimula a ativação da $\text{H}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ e eventos de fusão que resultam na transferência de tubulovesículas para membrana apical (BERRIDGE, 2014).

A acetilcolina também ativa receptores muscarínicos, localizados no plexo submucoso, levando a liberação de neuropeptídeos e neurotransmissores, os quais estimulam a liberação de histamina das células ECL e gastrina pelas células G antrais (URUSHIDANI; FORTE, 1997; RAMSAY; CARR, 2011). Ver figura 2.

A histamina estimula diretamente as células parietais, a partir de sua ligação com os receptores H_2 que estão acoplados a proteína G estimulatória a qual ativa a adenilil ciclase (AC). Essa enzima por sua vez ao ser ativada gera o 3' 5' monofosfato-cíclico (AMP_c). O aumento da concentração intracelular de AMP_c ativa a proteína cinase dependente de AMP_c (PKA) que fosforila uma série de substratos os quais contribuem para translocação e fusão das vesículas na membrana apical. Entre esses substratos estão a ezrina e LSPA-1, duas proteínas relacionadas a remodelagem da actina, e portanto reorganização do citoesqueleto durante a fusão, além da parchorina que ao ser fosforilada transloca-se do citosol para a membrana apical, contribuindo assim para o aparecimento da secreção ácida. Após a fusão com a membrana apical das células parietais, a $\text{H}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ que está ativada promove a saída do íon hidrogênio (H^+) e a entrada do íon K^+ para o interior da célula, o que favorece a saída do íon Cl^- pelo gradiente eletroquímico que foi criado e assim formação do ácido clorídrico (BERRIDGE, 2014).

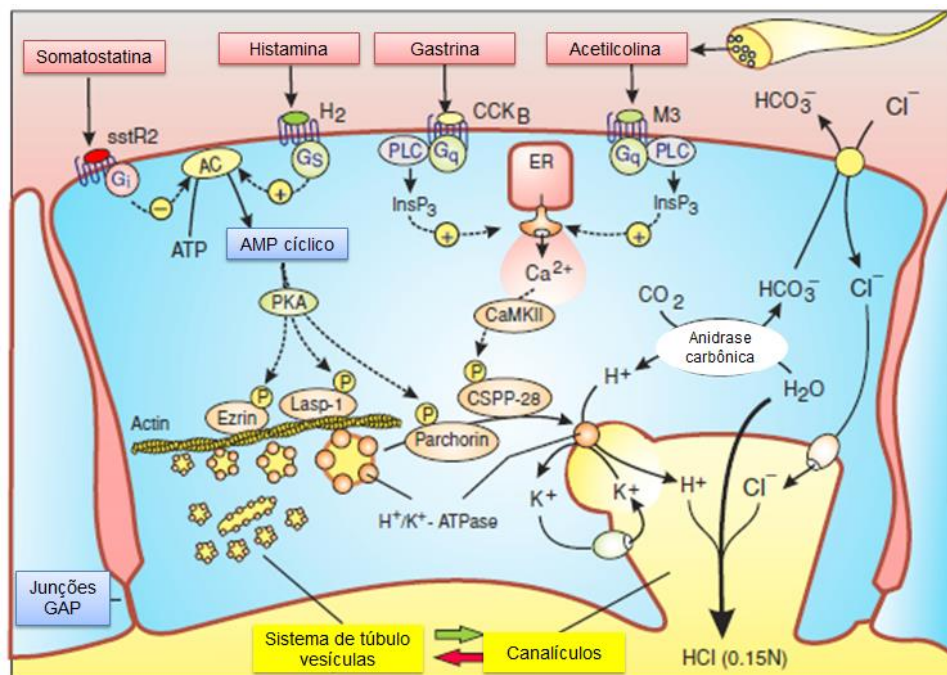
A histamina de forma indireta induz a secreção de ácido, pela interação com receptores H_3 ligados à inibição da somatostatina e, portanto, à estimulação da secreção de histamina e de ácido (GUSTAFSSON et al., 2011).

A gastrina é liberada na corrente sanguínea pelas células G, localizadas no antro gástrico e em menor grau na mucosa do duodeno. Esta interage com os receptores CCK_2 presentes nas células ECL (induzindo liberação de histamina) e parietais, levando ao aumento do AMP_C e consequentemente aumento de Ca^{2+} , o que proporciona nas células ECL maior liberação de histamina e nas células parietais maior recrutamento da bomba $H^+-K^+ATPase$ para a porção apical, aumentando assim a secreção gástrica (HAKANSON; LIEBERG, 1970; KULAKSIZ et al.; 2000; KOPIC, GEIBEL, 2013). (Ver figura 2)

A grelina é um peptídeo liberado a partir das células X/A-like e Gr, localizadas nas glândulas oxínticas no corpo do estômago que também estimula a secreção ácida por induzir a liberação de histamina pelas células ECL (STENGEL et al., 2013; SCHUBERT, 2014). As concentrações de grelina são elevadas durante o jejum e suprimida em resposta a ingestão de alimentos, obesidade e infecção por *H. pylori* (STENGEL et al., 2013; SCHUBERT, 2014). A redução na síntese de grelina por *H. pylori* exacerba a resposta inflamatória, pois a grelina tem efeito imunomodulador e gastroprotetor (SCHUBERT, 2014).

A somatostatina, por sua vez é liberada a partir das células D e funciona como um regulador parácrino inibindo a secreção de ácido. Liga-se a um receptor Sst ($SSTR2$) que atua por meio da proteína G_i inibindo a formação de AMP cíclico por adenilil ciclase o que impede a fusão das tubulovesículas aos canalículos e consequentemente a secreção ácida (KOPIC, GEIBEL, 2013; BERRIDGE, 2014).

Figura 2. Representação da secreção ácida (BERRINDGE, 2014 com modificações)



Legenda: sstR2 = receptor de somatostatina 2; H₂ = receptor de histamina 2; CCK_B = receptor de colecistocinina B; M₃ = receptor muscarínico; G_i = proteína G inibitória; G_s = proteína G estimulatória; G_q = proteína G_q; PKA = proteína cinase A; ezrin = ezrina; parchorin = parchorina; PLC = fosfolipase C; InsP₃ = 1,4,5 – trifosfato de inositol; CaMKII = quinase da Ca²⁺/calmodulina.

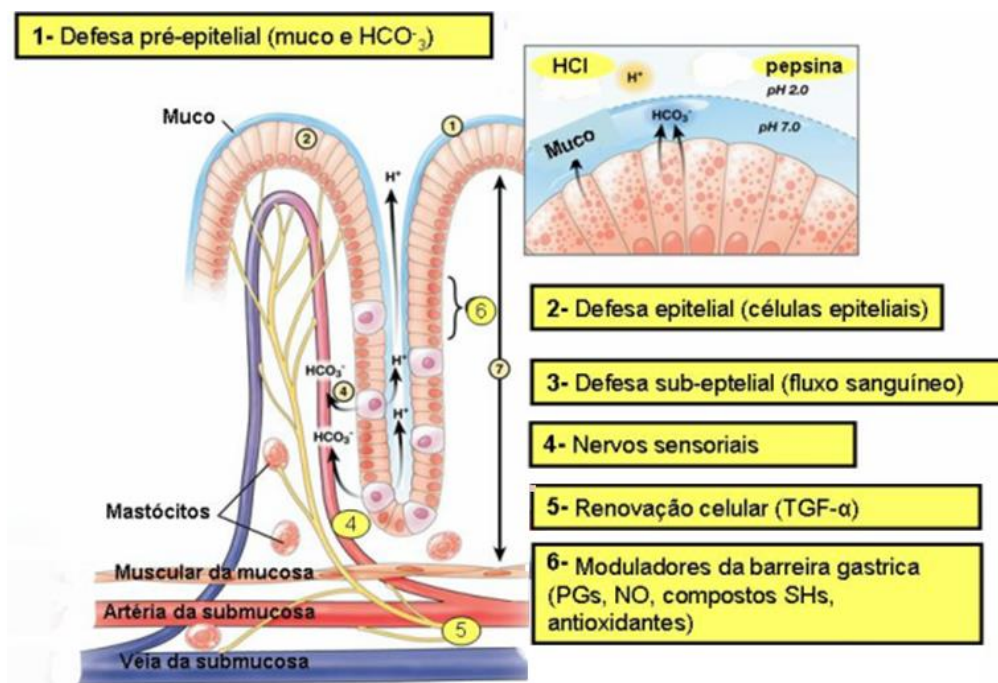
Para evitar o comprometimento da integridade da mucosa gástrica pela secreção ácida gástrica o organismo além de criar mecanismos regulatórios para o mesmo, desenvolveu mecanismos de proteção para a mucosa gástrica.

1.2.4 Mecanismos de defesa da mucosa gástrica

A mucosa gástrica é continuamente exposta a fatores agressores como HCl, pepsina, ácidos biliares, lecitina, etanol, AINEs, *H. pylori*, toxinas e outros fatores nocivos. Apesar desta exposição, a mucosa gástrica mantém sua homeostasia devido a presença de mecanismos de defesa (TARNAWASKI; AHLUWALIA, JONES, 2013). Esses mecanismos de defesa da mucosa gástrica envolvem sistemas locais e neuro-hormonais que compreendem fatores pré-epiteliais (camada de muco, bicarbonato, fosfolípido de membrana e ácidos graxos), fatores epiteliais (células epiteliais ligados, fatores de crescimento e renovação celular) e fatores sub-epiteliais (fluxo sanguíneo, inervação sensorial, fatores que atuam na reconstituição do epitélio, moduladores da barreira gástrica, prostaglandinas, componentes sulfidrilas e

sistema antioxidante) (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008; TARNAWASKI; AHLUWALIA, JONES, 2013). Figura 3.

Figura 3. Representação dos mecanismos de defesa da mucosa gástrica (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008, com modificações)



1.2.4.1 Defesa pré-epitelial

A primeira linha de defesa da mucosa é constituída pela barreira de muco-bicarbonato-fosfolípideos de membrana a qual mantém pH neutro e evita que as células epiteliais sejam lesionadas pelo conteúdo ácido-péptico (TARNAWSKI; AHLUWALIA; JONES, 2013).

O muco é liberado por exocitose das células mucosas superficiais do estômago e glândulas de Brunner no duodeno, formando uma camada protetora (RAMSAY; AARON, 2011). O muco apresenta um aspecto de gel viscoso, sendo constituído por 95% de água, 5% de glicoproteínas (mucina), além de pequena quantidade de lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas que revestem toda mucosa gastrointestinal (ALLEN; FLEMSTROM, 2005).

A mucina apresenta alto peso molecular e está ligada a outros monômeros de mucina ligados por pontes dissulfeto cujo grau de glicosilação

determina a extensão de proteção a mucosa gástrica (ALLEN; FLEMSTROM, 2005).

A secreção de mucina é estimulada pelos hormônios gastrintestinais secretina, PGE_2 e agentes colinérgicos. Após sua secreção ocorre polimerização de vários monômeros de mucina que se unem por pontes dissulfeto (ALLEN; FLEMSTROM, 2005; LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

O muco é secretado juntamente com proteínas de baixo peso molecular e fator trefoil (TFF). Os TFFs são parte integrante das vesículas secretoras de muco intracelular e desempenham importante papel na síntese e empacotamento da mucina. Além de aumentar a viscosidade da mucina gástrica e estabilizar a camada de gel (NEWTON et al., 2000; THIM; MADSEN; POULSEN, 2002; LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008)

O muco retarda a difusão do conteúdo ácido do lúmen gástrico para a mucosa gástrica e proporciona uma lubrificação para a passagem de alimentos, protegendo a mucosa de tensões mecânicas. Sob a ação de agentes agressores, a exemplo da pepsina e N-acetilcisteína, pode ser dissolvido, o que possibilita a passagem de sais biliares, etanol e AINES ocasionando a lesão (SILEN, 1993; RAMSAY; AARON, 201).

O bicarbonato é secretado pelas células epiteliais da mucosa e fica retido na camada de muco o que permite a manutenção de um microambiente neutro (pH 7,0) na superfície das células epiteliais, atuando como barreira física contra a retrodifusão dos íons H^+ e digestão proteolítica do epitélio superficial pela pepsina. A secreção de HCO_3^- é estimulada por prostaglandinas, fator de liberação de corticotrofina (CRF), melatonina, uroguanilina e orexina A (ALLEN; FLEMSTROM, 2005; LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

A camada de muco é revestida por uma barreira tensoativa de fosfolípidos que por sua natureza hidrofóbica diminui a difusão dos íons de hidrogênio. Esses fosfolípidos aumentam a viscosidade e permeabilidade dessa camada (GINDZIENSKI; ZWIERZ; SAROSIEK, 2003; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

Um outro componente da barreira pré-epitelial é a secreção ácida, composta pelo ácido clorídrico. Essa secreção promove desnaturação de IgE (alergias alimentares), inativa toxinas e elimina microrganismos (vírus, fungos,

bactérias entéricas e parasitas) sendo produzida por células parietais e controlada por via neurócrina (acetilcolina), parácrina (histamina e somatostatina) e endócrina (gastrina) (JOHANSSON; SYNNERSTAD; HOLM, 2000; BOLTIN; YARON, 2014).

1.2.4.2 Defesa epitelial

É considerada na segunda linha de defesa da mucosa gástrica. É composta por uma camada de células epiteliais que se renova continuamente por meio de um processo coordenado de proliferação das células progenitoras em um período de 3-7 dias, para que não ocorra perda da continuidade do epitélio (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008). Essas células se mantêm unidas por junções intercelulares constituídas por actina filamentosa (actina-F), responsável pela manutenção da integridade da mucosa. Essa camada de células forma uma barreira com permeabilidade seletiva prevenindo a retrodifusão dos íons H^+ e da pepsina (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

As células epiteliais secretam ainda muco e bicarbonato, proteínas de choque térmico (HSP), peptídeos da família do fator trefol (TFF), peptídeos antimicrobianos, catelicidinas e beta-defensinas que também participam da linha de defesa epitelial (TARNAWSKI; AHLUWALIA; JONES, 2013; YANDRAPU, SAROSIEK, 2015).

As HSPs são proteínas envolvidas na remodelagem de outras proteínas, sendo sua expressão aumentada em determinadas situações, como aumento de temperatura e tensões que danificam as células, a exemplo da inflamação, infecção, exercícios, exposição a toxinas ou agentes irritantes, inanição, hipóxia, para a manutenção da homeostase e sobrevivência celular. Essas proteínas são nomeadas de acordo com seu peso molecular, como HSP90, HSP70, HSP60 e HSP27 (CHOI et al., 2009).

Em geral, as HSPs melhoram a recuperação de uma lesão por reparo nas proteínas funcionais lesionadas, logo contribuem para mecanismos de defesa e cicatrização da úlcera a partir da recuperação de enzimas essenciais para esses processos (CHOI et al., 2009; PARK; KIM; HAHM, 2015).

Os TFFs são peptídeos resistentes a proteases que aceleram os mecanismos de reparação da mucosa gástrica após lesões e por serem abundantes em células secretoras de mucina alteram a viscosidade do muco, o que auxilia no processo de regeneração das lesões gástricas e manutenção da mucosa (HOFFMAN, 2005; TYTGAT, 2011). Seu mecanismo de ação ainda não está claro, porém estudos tem demonstrado que a ativação do receptor de quimiocina tipo 4 (CXCR4) e o trocador apical Na^+/H^+ são importantes na ativação desses peptídeos (DUBEYKOVSKAYA et al., 2009; XUE et al., 2011).

Peptídeos e proteínas antimicrobianas protegem ativamente o epitélio contra diferentes espécies de microrganismos (HOSAKA et al., 2008), sendo expressos em diferentes tipos de células, a exemplo das epiteliais. Eles são citotóxicos contra bactérias, mas não contra células normais de mamíferos (SILVA; MACHADO, 2012).

As catelicidinas e β -defensinas são peptídeos que desempenham um importante papel no sistema de defesa nas vias imunes inatas na prevenção da colonização bacteriana na superfície da mucosa, acelerando a cicatrização da úlcera (BAUER et al., 2013). Outros peptídeos com potencial atividade antimicrobiana são as proteína bactericida/indutora de permeabilidade (BPI), elafina e psoriasina (HOSAKA et al., 2008).

1.2.4.3 Defesa subepitelial

De acordo com Feinman e Haut (2014), o estômago possui uma extensa rede de irrigação sanguínea. As artérias gástricas, na camada muscular da mucosa, transformam-se em capilares que penetram a lâmina e se estendem em regiões próximas as células epiteliais gástricas e na base das células epiteliais, esse capilares convergem em vênulas coletoras (GUTH, 1992; LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

A microcirculação da mucosa gástrica é essencial para o fornecimento de oxigênio e nutrientes para as células. Quando a mucosa gástrica é exposta a uma substância irritante ou quando ocorre difusão de íons H^+ , o aumento do fluxo sanguíneo auxilia no processo de reparação tecidual, pois permite o reestabelecimento do equilíbrio ácido-base, impedindo a acidose tecidual (RAMSAY; CARR, 2011).

Os mecanismos de autoregulação mantêm um fluxo gástrico constante, as células endoteliais liberando substâncias vasodilatadoras como NO e prostaciclina, que protegem a mucosa gástrica contra lesões e se opõem a ação danosa de vasoconstrictores, tais como leucotrienos C₄, tromboxano A₂ e endotelina. Esse processo evita a agregação plaquetária e adesão leucocitária as células endoteliais microvasculares, impedindo o comprometimento da microcirculação (TARNAWSKI; AHLUWALIA; JONES, 2012).

1.2.4.4 Intervenção sensorial da mucosa gástrica

As fibras nervosas sensoriais são oriundas dos neurônios sensitivos espinhais (chegam ao estômago por meio dos nervos esplâncnicos e mesentéricos) e das fibras aferentes do nervo vago (HOLZER, 2007).

O plexo de neurônios extrínsecos aferentes estão na base da camada mucosa do estômago e envolvem tanto a vasculatura da mucosa como da submucosa gástrica. Essas fibras fazem o mesmo percurso dos capilares e alcançam a membrana basal das células epiteliais da superfície, onde podem detectar a acidez luminal e a retrodifusão de íons H⁺ (HOLZER, 2007; FORNAI et al., 2010).

Os nervos sensoriais regulam a contratilidade das arteríolas presentes na submucosa, modulando o fluxo sanguíneo na região da mucosa, pela liberação do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e substância P (HOLZER, 2007; FORNAI et al., 2010).

O CGRP é um peptídeo constituído por 37 aminoácidos que pertence a família de peptídeos da calcitonina. Nessa família estão também a adrenomedulina, amilina e calcitonina (DURHAM; VAUSE, 2010; BARWELL et al., 2012). O CGRP é importante na regulação do eixo cérebro-intestino ao ser liberado por nervos aferentes tem efeito gastroprotetor, pois aumenta a produção de NO e aumenta o fluxo sanguíneo, além de inibir a secreção ácida por seus efeitos no nervo vago (IMATAKE; MATSUI; MORIYAMA, 2009; DEFONESKA; KAUNITZ, 2010).

A substância P é caracterizada como um neuropeptídeo e pertence a família das taquicininas, sendo formada por 11 aminoácidos (HONG et al., 2009). Apresenta seletividade pelo receptor da neuroquinina-1 (NK-1R) e

desempenha importante papel na neuroinflamação, proliferação celular e na cicatrização de feridas. Encontra-se em grande quantidade no TGI onde atua como neurotransmissor e neuromodulador (PANTALEO et. al., 2010; BRANCATI et. al., 2013).

1.2.4.5 Reconstituição do epitélio gástrico

A contínua renovação do epitélio gástrico por células progenitoras é essencial para a manutenção da integridade estrutural da mucosa. Após a lesão, células epiteliais íntegras presentes nas glândulas, na região do pescoço migram, restituindo o epitélio, e só horas depois da lesão ocorre a proliferação de células progenitoras. O processo completo de renovação epitelial leva em média 3-7 dias, em contra partida, a substituição total das células da região glandular leva meses (MODLIN et al., 2003; LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008). Esse processo é controlado por fatores de crescimento que atuam de maneira geral no receptor de crescimento epidérmico (EGF-R) presente nas células progenitoras gástricas (TARNAWSKI et al., 1992; MODLIN et al., 2003; LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

O EGF-R pode ser ativado por fatores de crescimento mitogênico, como fator de transformação de crescimento ($TGF-\alpha$) e o fator de crescimento insulina-dependente-1 ($TGF-1$). Além disso a PGE_2 e a gastrina atuam sobre esse receptor ativando a via da quinase ativada por mitógeno (MAPK) estimulando a proliferação celular (NGUYEN et al., 2007; FORNAI et al., 2010). Em acréscimo, as células progenitoras expressam um fator antiapoptótico, a survivina que desempenha a gastroproteção por impedir a morte celular (PAI et al., 2002; FORNAI et al., 2010).

1.2.5 Fatores moduladores da barreira gástrica

1.2.5.1 Óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico origina-se da conversão do aminoácido L-arginina em citrulina pela ação da enzima sintase de óxido nítrico (NOS). A NOS apresenta-se em três isoformas: duas formas constitutivas (cNOS) dependentes de Ca^{2+} /calmodulina, NOS neuronal (nNOS) e a NOS endotelial (eNOS) e uma

forma induzida (iNOS), que é induzida pelas citocinas (TNF- α) e produtos bacterianos (lipopolissacarídeos) (DING et al., 1998; NISHIO et al., 2006; ROVERE-QUERINI; CLEMENTI; BRUNELLI, 2014) .

O óxido nítrico é uma molécula de sinalização envolvida na regulação de várias funções *in vivo*. Devido a seu estado gasoso, hidrofobicidade e pequeno tamanho, difunde-se facilmente através das membranas celulares, desempenhando um papel crítico em diversas funções biológicas a exemplo de vasodilatação, relaxamento muscular, resposta imune e neuromodulação (MOCANDA; PALMER; HIGGS, 1991; SCHMIT; WALTER, 1994; RAND; LI, 1995; ROCHA et al., 2010).

O NO é produzido e liberado no endotélio vascular gástrico e nervos sensoriais por meio da atividade enzimática da cNOS e iNOS, sobre o estímulo de agonistas como acetilcolina, bradicinina e serotonina (NAPOLI; IGNARRO, 2009; MAGIEROWSKI et al., 2015). Quando produzido pelo cNOS auxilia na manutenção da integridade da mucosa gástrica (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; LOPEZ-BELMONTE, WHITTLE, MONCADA, 1993).

O NO possui papel bifásico na resposta ulcerogênica da mucosa gástrica. Quando produzido pela cNOS apresenta efeito gastroprotetor e um pró ulcerogênico quando sintetizado pela iNOS (RIBBONS et al., 1995; WHITTLE et al., 1995; TANAKA et al., 1999).

Na mucosa gástrica, o NO aumenta a secreção de muco, bicarbonato e fluxo sanguíneo, além de inibir a secreção ácida gástrica, regular a motilidade gástrica, evitar a ativação de neutrófilos e a aderência ao endotélio vascular, proporcionando gastroproteção (CHELO et al., 1998; BRZOZOWSKI et al., 2008; SOBHIAN et al., 2011). Ele também tem a capacidade de eliminar os radicais livres com consequente diminuição dos peróxidos lipídicos gástricos (KOCHAR et al., 2011), acelerar o processo de cicatrização, induzir angiogênese, inibir a degranulação de mastócitos e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, além de reduzir o estresse oxidativo. Essa ação protetora está relacionada a sua ação reguladora da microcirculação sanguínea (FIORUCCI et al., 1999; BRZOZOWSKI et al., 2001; MAGIEROWSKI et al., 2015).

O óxido nítrico age ativando a via da guanilil ciclase solúvel (GC_s), que produz o monofosfato cíclico de guanosina (GMP_c), o qual ativa a proteína

cinase dependente de GMP_C (PKG), iniciando uma cascata de fosforilação, ativando alvos como fosfodiesterases e canais iônicos para a obtenção de respostas celulares as quais irão contribuir para a homeostase (ROBERT, 1981; DE PALMA; CLEMENTI, 2012; MAGIEROWSKI et al., 2015).

1.2.5.2 Prostaglandinas (PGs)

As PGs são metabólitos do ácido araquidônico constituídos por ácidos graxos insaturados com vinte átomos de carbono, formadas por um anel ciclopentano que sofre modificações dando origem a quatro tipo de prostaglandinas, prostaglandina D_2 (PGD_2), prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$), prostaglandina E_2 (PGE_2), e prostacilina (PGI_2), sendo as duas últimas relacionadas a gastroproteção (YUHKI et al., 2011).

O ácido araquidônico é liberado da membrana fosfolipídica em resposta a vários estímulos fisiológicos e patológicos pela ação da fosfolipase A_2 (PLA_2), e são convertidos em vários prostanoides, os quais sofrem ação das ciclooxigenases (COXs) para dar origem as PGs e tromboxano (BURKE; DENNIS, 2009; YUHKI et al., 2011).

A COX existe em três isoformas, COX-1, COX-2 e COX-3, sendo apenas as duas primeiras produtoras de eicosanoides. A COX-1 é constitutiva e está expressa em vários tipos de célula, sendo envolvida na síntese de PGs citoprotetoras no trato gastrointestinal, que aumentam a liberação de muco e bicarbonato (BOTTING, 2006; SZABO, 2014). A COX-2 é induzida e expressa em condições inflamatórias agudas devido a liberação de componentes pró-inflamatórios como interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral ($\text{TNF-}\alpha$) e lipopolissacarídeo (LPS) (NUGTEREN; HAZELHOF, 1973; GROVER et al., 2014). Ela promove o aumento da permeabilidade vascular com consequente edema, aumento do fluxo sanguíneo e infiltrado inflamatório, isso dilui e retarda a presença de agentes tóxicos que ao chegarem aos capilares subepiteliais, reduzem a lesão vascular (KUMAR et al., 2010; SZABO, 2014).

Há sete tipos de receptores para as prostaglandinas, designados receptor PGD (para PGD_2), PGE e seus subtipos EP1, EP2, EP3 e EP4, receptor PGF (para $\text{PGF}_{2\alpha}$) e receptor IP (PGI_2). Todos eles são receptores

acoplados a proteína G (GPCRs) que utilizam diferentes vias de sinalização (NARUMIYA, 2009).

A PGE_2 induz o aumento de Ca^{2+} intracelular quando acoplada aos receptores EP_1 , isso inibe a motilidade gástrica e estimula a secreção de bicarbonato (TAKEUCHI et al., 2006; WALLACE, 2008). Quando ativa receptores EP_2 a PGE_2 aumenta AMPc , inibindo apoptose e participa da resposta imune celular (REGAN, 2003; TAKEUCHI et al., 2006; HATAZAWA et al., 2007). Quando interage com receptores EP_3 , a PGE_2 pode diminuir a concentração de AMP_c , o que resulta na inibição da secreção ácida (WALLACE, 2008). Essa inibição pode ser direta nas células parietais ou indireta pela liberação de histamina das células ECL (KATO et al., 2005). Ao se ligar a receptores EP_4 , a PGE_2 acentua a secreção de muco e bicarbonato, inibe apoptose, aumenta angiogênese, bem como proliferação e migração de células epiteliais contribuindo para a reconstituição da mucosa ulcerada no estômago (HATAZAWA et al., 2007).

A PGI_2 é sintetizada nas células endoteliais e interage com receptores IP. A prostaciclina possui efeitos antitrombóticos, por inibir a síntese de tromboxano A_2 (WALLACE, 2008) e exerce efeito gastroprotetor, ao reduzir a secreção ácida no lúmen gástrico durante o estresse por contenção e frio, isquemia e reperfusão (TAKEUCHI; KATO; AMAGASE, 2010).

1.2.5.3 Grupamentos sulfidrilas (SHs)

Os compostos sulfidrilas são caracterizados por grupamentos químicos, os tióis, que são constituídos por um átomo de enxofre e estão envolvidos na proteção da mucosa gástrica por meio do fortalecimento das pontes de dissulfeto (SZABO, NAGY; PLEBANI, 1992; PARRA et al., 2015).

Dentre os compostos sulfidrílicos endógeno destaca-se a glutathione (GSH), um tripeptídeo, γ -L-glutamyl-L-cisteinylglycine, de baixo peso molecular presente em todos os tecidos de mamíferos (LU, 2013).

Eles protegem a integridade e a permeabilidade da membrana celular, funcionam como antioxidantes, mantém a função imune e regulam a síntese, degradação e estrutura das proteínas (SZABO, NAGY; PLEBANI, 1992; PARRA et al., 2015).

Os grupamentos sulfidríla agem reduzindo a produção de radicais livres, estabilizando a camada de muco (pontes dissulfeto) e mantendo a sua integridade (ÁVILA et al., 1996; PARRA et al., 2015).

Sulfidrílas endógenas, semelhantes a glutatona, exercem um importante papel na proteção da mucosa gástrica (SZABO, NAGY; PLEBANI, 1992; PARRA et al., 2015).

A GSH é sintetizada no citosol de maneira regulada, por uma sequência de adições de cisteína, glutamato e glicina (FORMAN et al., 2009). Os principais determinantes para sua síntese é a quantidade de cisteína (aminoácido precursor) e enxofre, além da enzima limitante, a ligase da cisteína glutamato (GCL) (LU, 2009). A redução da disponibilidade da GSH enquanto antioxidante não enzimático agrava o estresse oxidativo e resulta no aumento das lesões da mucosa gástrica (LABONNE et al., 2009).

1.2.6 Sistema antioxidante

Os radicais livres consistem em moléculas, átomos ou íons que possuem um ou mais elétrons desemparelhados na sua camada de valência (LOBO et al., 2010). Os radicais livres são instáveis e bastante reativos, tanto podem doar um elétron como recebê-lo de outras moléculas, comportando-se como oxidantes ou redutores (PHAM-HUY, HE; PHAM-HUY, 2008).

As espécies reativas de oxigênio são radicais livres gerados pelo metabolismo celular das mitocôndrias que apresentam tendência em doar oxigênio para outras substâncias (LOBO et al., 2010), a exemplo do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil ($OH^{\cdot}$), hidroperoxila ($HO_2^{\cdot}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O aumento destas espécies radiculares nas células causa danos a membrana plasmática, ou seja, peroxidação lipídica (PHAM-HUY, HE; PHAM-HUY, 2008; WU; KOSTEN; ZHANG, 2013).

Além disso, qualquer molécula do corpo pode ser alvo dos radicais livres, principalmente lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas, o que resulta em danos celulares e perturbações na homeostase (LOBO et al., 2010).

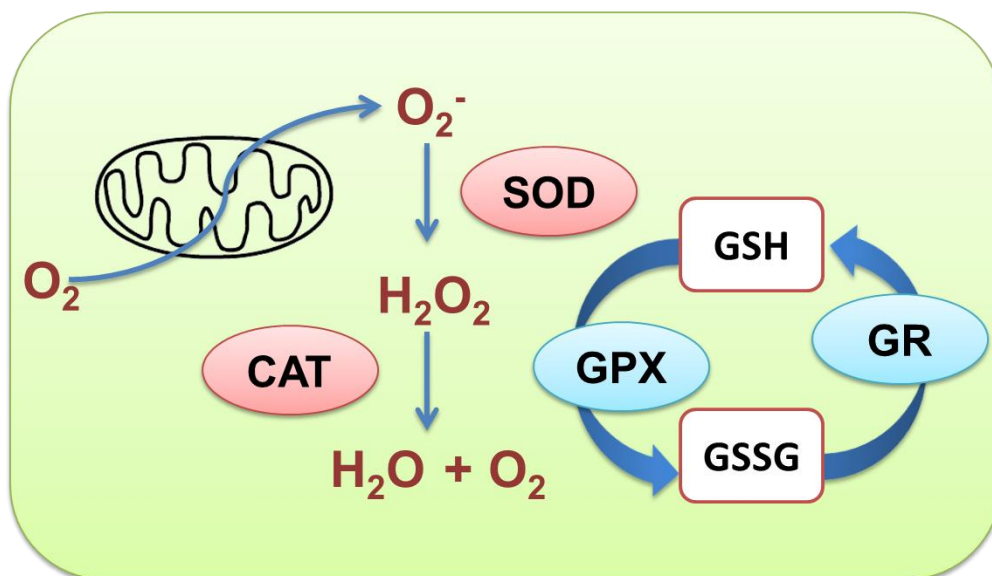
Os radicais livres em geral são obtidos a partir de fontes internas e externas. Os obtidos de fonte interna são produzidos a partir de reações enzimáticas, incluem as produzidas na cadeia respiratória, na fagocitose, na

síntese de prostaglandina e no sistema citocromo P450 e as reações não enzimáticas (reações entre oxigênio e compostos orgânicos, bem como iniciadas por reações ionizantes). Os obtidos de fontes externas, os radicais livres são resultantes da radiação, tabagismo, poluentes do ar, certos medicamentos, pesticidas, e produtos químicos industriais (LIU; STERN; ROBERTS, 1999; LOBO et al., 2010).

Um desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes leva a uma produção exacerbada de EROs e a um processo denominado estresse oxidativo, por sua vez o estresse oxidativo exerce um papel central na fisiopatologia de diferentes desordens (BURTON et al., 2010).

O nosso organismo dispõe de um sistema de defesa contra os radicais livres denominados sistema antioxidante que pode ser enzimático e não enzimático (BURTON et al., 2010). Os antioxidantes enzimáticos endógenos incluem a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR). Já os antioxidantes não enzimáticos são a glutathione, ácido ascórbico, vitamina E, L-arginina, coenzima Q10 (CoQ10), a melatonina e o ácido úrico (VASCONCELOS et al., 2007; VALKO et al., 2015). Ver figura 4.

Figura 4. Representação esquemática do sistema antioxidante enzimático e não enzimático



Legenda: O_2^- = ânion superóxido; SOD = superóxido dismutase; CAT = catalase; GPx = glutathiona peroxidase; GSH = glutathiona reduzida; GSSG = glutathiona oxidada; GR = glutathiona redutase; $NADP^+$ = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (Adaptado de WU; KOSTEN; ZHANG, 2013).

A GSH apresenta um papel chave frente ao estresse oxidativo, na detoxificação de xenobióticos e como modulador na proliferação celular, apoptose, resposta imune e fibrogênese (LU, 2013).

Quando exposto as espécies reativas de oxigênio, o GSH secretado pelas células epiteliais, é convertido em GSSG (glutathiona oxidada) pela glutathiona peroxidase (GPx), e em seguida reduzido pela GSSG redutase, pela ação de NADPH, formando um ciclo redox (LU, 2009). Quando há aumento nas espécies reativas de oxigênio, ocorre uma redução nos níveis de GSH, o que diminui a defesa da mucosa gástrica, tornando-a mais susceptível as lesões (SAXENA; KRISHNAMURTHY; SINGH, 2011).

A SOD atua na conversão do ânion O_2^- em H_2O_2 que por sua vez é decomposto em H_2O e O_2 pela CAT, evitando a formação de radicais hidroxil. Quando ocorre a geração de radicais hidroxil a GPx conjuga tanto os radicais hidroxil como os peróxidos a GSH, formando a GSSG. Em seguida, a GSSG é novamente convertida em GSH pela ação da GR. Portanto, o sistema antioxidante atua reduzindo a quantidade de EROs, caso haja um desequilíbrio desse mecanismo a célula pode entrar em estresse oxidativo e instala-se um quadro de peroxidação lipídica (VALKO et al., 2015).

Um antioxidante pode ser definido como uma molécula estável capaz de doar um elétron a um radical livre e assim neutralizá-lo, diminuindo assim os danos celulares. Estes antioxidantes atuam sequestrando radicais, doando elétrons, decompondo peróxidos, inibindo enzimas e quelando metais (KUHN, 2003).

1.2.7 Citocinas

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular produzidas por células que atuam como moléculas sinalizadoras e que tem como função mediar e regular a resposta imune (ABBAS; ABUL, 2013). O grupo de citocinas é bastante diversificado e agrupado em várias classes, incluindo interleucinas (IL), fatores de necrose tumoral (TNF), interferons (IFN), fatores estimulantes de colônias (CSF), fatores transformadores de epitélio (TGF) e quimiocinas. Elas são envolvidas em diversos processos fisiológicos, destacando-se a regulação das respostas inflamatórias e imunológicas (inata e adaptativa) (AIT-OUFELLA et al., 2011).

Na úlcera gástrica induzida por etanol ocorre um processo inflamatório devido ao desequilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias, a interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e o interferon γ (INF γ), que desempenham importantes papéis nas lesões gástricas e as citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (BESERRA et al., 2011).

O TNF- α e a IL-1 β são as primeiras citocinas liberadas em resposta a inflamação ou infecção na mucosa gástrica (MORSY; EL-SHEIK, 2012).

O TNF- α desempenha um papel fundamental na inflamação, induz febre, estimula a produção de proteínas de fase aguda no fígado, provoca a ativação das células endoteliais e aumenta a aderência de neutrófilos (LEON; WHITE; KLUGER, 1998; LI et al., 2013). Estudos demonstram que a administração de TNF- α em animais experimentais induz respostas fisiológicas semelhantes a resposta inflamatória sistêmica observada na sepse e lesões graves (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Na mucosa gástrica o TNF- α é uma citocina chave por promover a reparação da mucosa por meio da estimulação da proliferação de células epiteliais (TULASSAY; URSZENYI, 2010).

A IL-1 β aumenta a permeabilidade vascular, migração neutrofílica, além de contribuir com a geração de ERO (TARGOSZ et al., 2012), recrutamento de monócitos e interage com o receptor sensível ao carbapol (Ca₂p) presente nas células parietais, reduzindo a secreção ácida, contribuindo com a colonização da *H. pylori* (SCHEPP et al., 1998; BOLTIN; YARON, 2014). Essa interleucina inibe a secreção ácida gástrica e estimula a produção de fatores defensivos da mucosa (prostaglandina, NO) e de reparo (fator ativador de plaquetas de mastócitos) (TULASSAY; URSZENYI, 2010).

Tanto a IL-10 como a IL-6 estão envolvidas na inflamação de fase aguda bem como na manutenção e regulação da úlcera gástrica (ROGLER; ANDUS, 1998; LIU et al., 2012). A IL-10 é uma citocina produzida por monócitos e macrófagos, células Th1, linfócitos B e células Tr1. Essa interleucina desempenha importante papel na supressão de respostas inflamatórias, regulando negativamente a expressão de TNF- α em monócitos e macrófagos (MOORE et al., 1993; SUABJAKYONG et al., 2015).

As prostaglandinas endógenas regulam negativamente a liberação de mediadores inflamatórios que podem contribuir na geração da úlcera gástrica (MARTIN; WALLACE, 2006). A PGE₂ inibe a liberação de TNF- α e IL-1 β de macrófagos e da IL-8 e leucotrieno B₄ de neutrófilos (LIM et al., 2009; MORSY; EL-SHEIK, 2012).

1.2.8 Terapêutica da úlcera gástrica

Durante anos a terapêutica da úlcera gástrica foi centrada no controle da secreção ácida ou no aumento dos fatores citoprotetores. Inicialmente, para a neutralização da secreção ácida foi utilizado os antiácidos (AWAAD; EL-MELIGY; SOLIMAN, 2013), a exemplo do hidróxido de alumínio, hidróxido de magnésio que agem de forma rápida, sendo utilizados portanto para alívio de sintomas leves ou esporádicos. Atuam na neutralização do ácido clorídrico gástrico e inibição da enzima proteolítica (pepsina), por um período de 1-3h se ingerido com alimentos. Apresentam fatores limitantes como efeitos colaterais (hipercalcemia, insuficiência renal, alcalose metabólica, hipermagnesemia,

dentre outros). Entretanto, têm sido utilizados, pontualmente por serem mais acessíveis e seguros (MATON; BURTON, 1999; MEJIA; KRAFT, 2011).

Em substituição aos antiácidos foram utilizadas substâncias antissecretórias, a exemplo dos anticolinérgicos (pirenzepina e telenzepina). Eles interagem com receptores muscarínicos do tipo M_1 e apresentam baixa eficácia, além de apresentarem diversos efeitos colaterais, como taquicardia, secura na boca, cefaleia e confusão mental, o que tornou o uso dessa classe de drogas obsoleta (JAIN et al., 2007) .

Posteriormente surgiu uma classe de drogas antissecretórias, os inibidores dos receptores H_2 , a exemplo da cimetidina, ranitidina, famotidina, nizatidina e roxatidina. São eficazes na redução da secreção de ácido, porém, não inibem a secreção de gastrina e a estimulação vagal, logo, ainda há uma significativa secreção ácida pelas células parietais. Os antagonistas do receptor H_2 agem de maneira reversível e quando utilizados para o tratamento da úlcera gástrica apresentam uma faixa de cura entre 50-70% (LIPOF; SHAPIRO; KOZOL, 2006; STEWART; ACKROYD, 2011). Porém, não evitam a recidiva da úlcera e ao serem utilizados por sete dias para o tratamento de úlceras observa-se tolerância e redução da eficácia em 50% (SACHS; CHIN; HUNT, 2007, 2010). Dentre os efeitos colaterais é observado a diarreia, cefaleia, tontura, fadiga, dor muscular, constipação, ginecomastia em homens e galactorreia em mulheres (BRUTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

Os inibidores da bomba de H^+/K^+ -ATPase (omeprazol, lansoprazol, rabeprazol, pantoprazol e esomeprazol) é uma outra classe de drogas antissecretória mais eficazes na supressão da secreção ácida gástrica por inibirem a fase final da secreção, a ativação da bomba de H^+ , K^+ -ATPase . São bases fracas que se acumulam seletivamente nos canalículos das células parietais (pH é 1,0), onde são protonadas e convertidas em sua forma ativa a qual reage de modo covalente com o grupo sulfidril de cisteína no domínio extracelular da H^+/K^+ -ATPase, inibindo sua ação. Assim, tem-se uma cicatrização mais rápida da úlcera gástrica comparado aqueles que utilizam somente antagonistas H_2 (SHIN; SACHS, 2008; STEWART; ACKROYD, 2011). O uso prolongado pode resultar em hipergastrinemia, hipersecreção ácida rebote, náuseas, diarreia, tontura, taquicardia, tremores e má absorção (RICHARDSON; HAWKEY; STACK, 1998; JAIN et al., 2007).

Outra classe de medicamentos utilizados na terapêutica da úlcera gástrica é a dos citoprotetores, a exemplo do sucralfato, o misoprostol e os sais de bismuto (MEJIA; KRAFT, 2011).

O sucralfato é formado por sacarose sulfatada de alumínio e hidróxido de alumínio e atua ligando-se as lesões da mucosa gástrica formando um filme. Quando exposto ao conteúdo ácido interage com as proteínas do tecido danificado, favorecendo a angiogênese, produzindo o recrutamento de fatores de crescimento e formação de tecido de granulação, sendo sua ação mais importante na prevenção de úlcera gástrica induzida por estresse em pacientes em estado crítico (OATES; WOOD, 1991; MEJIA; KRAFT, 2011). O misoprostol por sua vez, tem sido nos últimos anos utilizado como uma ferramenta farmacológica, já que seu uso é restrito apenas a internações hospitalares. Ele atua inibindo a secreção de ácido, aumentando o fluxo sanguíneo e a secreção de muco e de bicarbonato, no entanto, ocasiona diarreias, cólicas abdominais e contrações uterinas que podem levar ao aborto (JAIN et al., 2007).

Quando a úlcera gástrica está relacionada a infecção pelo *H. pylori* é possível fazer uso de dois protocolos terapêuticos. O primeiro utiliza-se um esquema posológico que compreende 10-14 dias com inibidores da bomba de H^+/K^+ -ATPase ou antagonista dos receptores H_2 associado ao metronidazol, tetraciclina e subsalicilato de bismuto ou um segundo esquema em que se utiliza um inibidor da bomba de H^+/K^+ -ATPase, associado a claritromicina e metronidazol ou amoxicilina (NAJM, 2011).

Considerando que a terapêutica existente no mercado para o tratamento da úlcera gástrica não é 100% eficaz, que não apresenta um custo acessível para o indivíduo ou serviço de saúde, que apresentam inúmeros efeitos colaterais e muitos deles permitem a recidiva da doença se faz necessário a busca por novas alternativas terapêuticas, como os produtos naturais, para a obtenção de medicamentos mais eficazes, seguros, sem efeitos colaterais e sem recidiva da doença.

1.3 Produtos naturais

Os produtos naturais se constituíram como a principal fonte de matérias-primas, nas descobertas farmacêuticas do século passado. No entanto, foram

substituídas por compostos sintéticos, graças as novas técnicas químicas. Devido ao declínio na descoberta de novas entidades químicas nos últimos anos, a pesquisa em produtos naturais vem ganhando novo impulso, devido a diversidade de estruturas obtidas de metabólitos secundários e suas potenciais atividades biológicas (MISHRA; TIWARI, 2011).

Entre 1981 e 2010 cerca de 60% dos novos compostos químicos utilizados como medicamentos foram obtidos de produtos naturais, em especial plantas medicinais (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Nesse contexto, o Brasil possui uma biodiversidade, que representa aproximadamente 20% de todas as espécies vivas conhecidas globalmente, onde são encontrados vários biomas importantes, tais como o amazônico, mata atlântica e cerrado (VALLI et al., 2013). Além disso, a presença de grande diversidade cultural, com fortes tradições de utilização de plantas medicinais pela medicina popular e o baixo custo de matéria-prima pode ser um incentivo as empresas farmacêuticas nacionais, a procurarem uma nova direção no desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos, de produtos tradicionais fitoterápicos ou fitofármacos (PEDROLLO; KINUPP, 2015).

Atualmente, os medicamentos sintéticos utilizados para o tratamento da úlcera péptica têm apresentado fatores limitantes a exemplo dos inúmeros efeitos adversos, aumento dos casos de reincidência da doença e alto custo. Assim tem-se buscado nos produtos naturais novas alternativas terapêuticas que garantam maior acesso da população, menos efeitos colaterais e mais eficácia terapêutica que os medicamentos existentes no mercado (BANSAL; GOEL, 2012).

Nesta perspectiva, o nosso grupo de pesquisa vem estudando inúmeras espécies vegetais e substâncias isoladas frente à atividade gastroprotetora, cicatrizante e antiulcerogênica a exemplo de *Syngonanthus arthrotrichus* (BATISTA, 2004), *Herissantia crispa* (LIMA, 2008), *Maytenus rigida* (SANTOS, 2008), *Maytenus obtusifolia* (MOTA, 2009), *Praxelis clematidea* (FALCÃO, 2011), *Combretum duarteanum* (LIMA, 2011), *Xylopia langsdorffiana* (MONTENEGRO, 2014), *Hyptis suaveolens* (de JESUS, 2013), *Maytenus distichophylla* (CALDAS FILHO, 2013), *Syngonanthus bisulcatus* (BATISTA, 2013; 2015), *Syngonanthus macrolepis* (BATISTA, 2013), *p-cimeno* (LEITE, 2014) e *Syngonanthus arthrotrichus* (BATISTA, 2015).

Os produtos naturais são constituídos por inúmeros metabólitos secundários, a exemplo dos terpenos, flavonoides, flavononas, antocioninas, alguns carboidratos, alcaloides e polifenóis (O'CONNOR, 2015).

Os polifenóis são metabólitos secundários amplamente distribuídos em todas as plantas superiores, com um importante papel na defesa contra patógenos e predadores de plantas, além de proteger a planta em várias condições de estresse abióticos, como a precipitação e radiação ultravioleta (DAGLIA, 2012).

Os polifenóis são caracterizados pela presença de um ou mais anéis fenólicos, com uma ou mais substituições hidroxil. Os polifenóis consistem em uma grande variedade de estruturas químicas baseadas nas substituições da estrutura química básica, na polimerização e no grau de oxidação, sendo classificados como flavonoides e não flavonoides (FARZAEI; ADDOLLAHI; RAHIMI, 2015).

Os flavonoides possuem um esqueleto de carbono comum difenil propano, dois anéis de benzeno (o anel A e B) unidos por uma cadeia de carbono linear de três que dão origem a uma estrutura heterocíclica oxigenada. Os polifenóis flavonoides são divididos em diferentes subclasses de acordo com o estado de oxidação do anel pirano central, incluindo antocianinas, isoflavonas, flavanonas e flavonóis. O grupo de não flavonoides são constituídos por ácidos fenólicos (catecol, eugenol, ácido caféico), lignanas (pinoresinol, lariciresinol, matairesinol) e compostos hidroxicinâmicos (ácido rosmarínico, ácido clorogênico) (SUMBUL et al., 2011; FARZAEI; ADDOLLAHI; RAHIMI, 2015) .

Os polifenóis destacam-se por apresentarem uma ampla atividade biológica, como efeito antioxidante, antialérgico, anti-inflamatório, anticâncer, anti-hipertensivo e antimicrobiano. Ao longo dos últimos 20 anos, os polifenóis têm sido estudados para a prevenção de doenças crônicas, tais como doença cardiovascular, cancro, osteoporose, diabetes mellitus, e doenças neurodegenerativas. Sendo a sua atividade protetora atribuída principalmente ao seu efeito (DAGLIA, 2012).

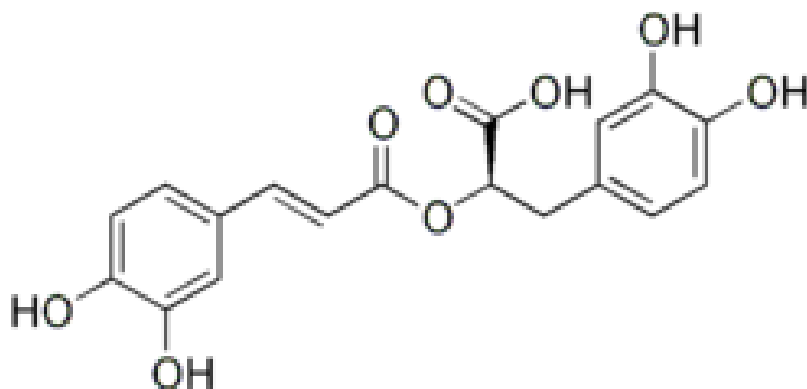
Dentre esses compostos está o ácido rosmarínico, polifenol bastante estudado e com diversas atividades biológicas já relatadas na literatura (PETERSEN et al., 2009).

1.4 Ácido rosmarínico

O ácido rosmarínico foi isolado pela primeira vez por dois químicos italianos, Scarpati e Oriente em 1958, e denominado de acordo com a planta da qual foi isolado, a *Rosmarinus officinalis* (SCARPATI; ORIENTE, 1958; PETERSEN et al., 2009).

O ácido rosmarínico consiste em um éster do ácido cafeico e do ácido 3,4 – dihidroxifenilático (PETERSEN et al., 2009). É caracterizado como um composto fenólico não flavonoide, se enquadrando como derivado hidroxinâmico (DAGLIA, 2012; TEKELOVÁ et al., 2015). Ver figura 5.

Figura 5. Estrutura química do ácido rosmarínico (PERTENSEN et al., 2009)



Esse composto fenólico tem sido isolado de muitas espécies, sendo encontrado em 39 famílias de plantas, como as da família Lamiaceae e Boraginaceae e identificado como composto ativo em diversas espécies vegetais, a exemplo da *Salvia officinalis*, *Menta x piperita*, *Thymus vulgaris*, *Melissa officinalis*, *Symphytum officinale*, dentre outras (PETERSEN et al., 2009). É importante considerar que nem todas as plantas da família Lamiaceae contém o ácido rosmarínico, sendo esse composto presente principalmente na subfamília Teucroideae (PETERSEN et al., 2009).

Vários efeitos biológicos tem sido relatados para o ácido rosmarínico, como o antialérgico (OSAKABE et al., 2004), antimicrobiano (MORENO et al., 2006), antioxidante (TEPEA et al., 2007), antiapoptótico (HUR et al., 2007), no tratamento de Alzheimer (HAMAGUCHI et al., 2009), esclerose múltipla (FALLARINI et al., 2009), anticâncer (MOON et al., 2010), anti-inflamatório

(CHU et al., 2012); neuroprotetor (ONO et al., 2012) e hepatoprotetor (DOMITROVIC et al., 2013).

O interesse pelo ácido rosmarínico tem aumentado consideravelmente na última década. A partir das atividades biológicas relatadas na literatura, esse composto passa a ter um grande potencial para a melhoria da saúde humana num futuro próximo como um produto farmacêutico ou dietético. Além disso, o ácido rosmarínico é produzido com facilidade em culturas de células o que tem permitido sua produção por diversos laboratórios (KHOJASTEH et al., 2014).

Em levantamento realizado por nosso grupo em base de dados (Science Direct e PubMed, no período de 2014-2015) não foram encontrados relatos de estudos farmacológicos a respeito da atividade gastroprotetora e antiulcerogênica para o ácido rosmarínico, o que motivou a tornar essa substância objeto de estudo do presente trabalho.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

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

2.2 Específicos

- ✓ Realizar estudo comportamental e determinar a dose letal 50% (DL50) do ácido rosmarínico usando o protocolo da OECD in vivo;
- ✓ Realizar triagem farmacológica do ácido rosmarínico, frente à atividade gastroprotetora;
- ✓ Avaliar a atividade gastroprotetora do ácido rosmarínico em modelos clássicos de indução aguda de úlcera (etanol, estresse, anti-inflamatório não esteroidal e contensão do suco gástrico);
- ✓ Investigar o efeito do ácido rosmarínico sobre os parâmetros bioquímicos (pH, concentração ácida e volume gástrico);
- ✓ Elucidar os mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora do ácido rosmarínico (quanto a ação antissecretória, citoprotetora e antioxidante);
- ✓ Avaliar a atividade imunoregulatória do ácido rosmarínico a partir da quantificação da IL-1 β , TNF- α e IL-10.

Material e métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Local da pesquisa

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Farmacologia do Trato Gastrointestinal (LFTGI), sob a orientação da Prof^a. Dr^a Leônia Maria Batista e no laboratório de Imunologia em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Giciane Carvalho Vieira, localizado no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) dentro do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB) no período de março de 2014 a dezembro de 2015. Experimentos também foram realizados no Laboratório de Farmacologia do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) em parceria com a Prof^a Dr^a Aurigena Antunes de Araújo.

3.1.2 Substância teste

O ácido rosmarínico foi adquirido da SIGMA- ALDRICH, em forma de pó, sendo acondicionado em frasco âmbar e mantido à temperatura ambiente.

3.1.3 Animais

Para o desenvolvimento dos protocolos experimentais descritos neste trabalho foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) albinos, adultos de ambos os sexos, linhagem Swiss, pesando entre 25-35 g e ratos (*Rattus norvegicus*) albinos, linhagem Wistar, pesando entre 180-250 g, oriundos do biotério Prof. Thomas George localizado no IPeFarM/UFPB. Os animais foram mantidos em condições padrão do biotério local, durante sete dias antes de cada experimento, sob a temperatura de 21 ± 1 °C, com ciclos claro-escuro de 12 horas, os animais tiveram livre acesso a água e ração Presence[®] tipo pellets.

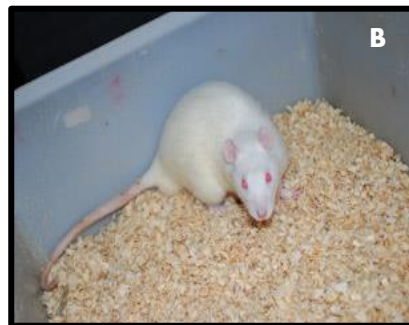
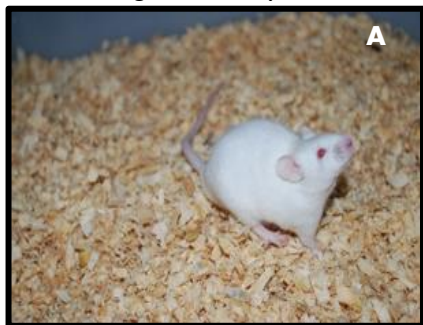
Os animais foram submetidos a um jejum que variou entre 12-36h, de acordo com a metodologia utilizada e foram distribuídos (n=5-10) em grupos controle negativo (solução salina 0,9%), controle positivo (droga de referência ou ferramenta farmacológica) e a droga teste (ácido rosmarínico), nas doses de

25, 50, 100 e 200 mg/kg por via oral ou intraduodenal. Os animais foram acomodados em gaiolas com fundo falso (tela), para que não houvesse coprofagia, com água *ad libitum* até 1 hora antes dos testes.

Seguindo a resolução nº 1000/2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária com as recomendações da Associação Americana de Medicina Veterinária (AVMA, 2013) a eutanásia dos ratos foi precedida por anestesia geral com cloridrato de quetamina 5% (150 mg/kg) e cloridrato de xilazina 2% (20 mg/kg), via intraperitoneal, e após ausência do reflexo corneal foi administrado o cloreto de potássio 1 mmol/kg, via intravenosa. Já os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical.

Todos os protocolos experimentais utilizados neste trabalho seguiram os princípios internacionais para o estudo com animais de laboratório (ZIMMERNAM, 1983) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA/UFPB) sob o registro de nº 007/2015 (ANEXO 1).

Figura 6. Camundongos Swiss (*Mus musculus*) (A) e rato Wistar (*Rattus norvegicus*) (B) utilizados em modelos experimentais (Foto: arquivo do Laboratório de Farmacologia do TGI)



3.1.4 Drogas utilizadas

Para a realização dos protocolos foram utilizadas as substâncias: ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinaethanosulfônico (HEPES) (SIGMA Chemical Co, U.S.A), ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) (SIGMA Chemical Co, U.S.A), ácido bicinchônico (SIGMA Chemical Co, U.S.A), ácido clorídrico (MERCK, Germany), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (SIGMA Chemical Co, U.S.A), albumina sérica bovina (BSA) (SIGMA Chemical Co, U.S.A), alcian blue (SIGMA Chemical Co, U.S.A), carbenoxolona (SIGMA Chemical Co, U.S.A), cimetidina (SIGMA Chemical Co, U.S.A), cloreto de potássio (SIGMA

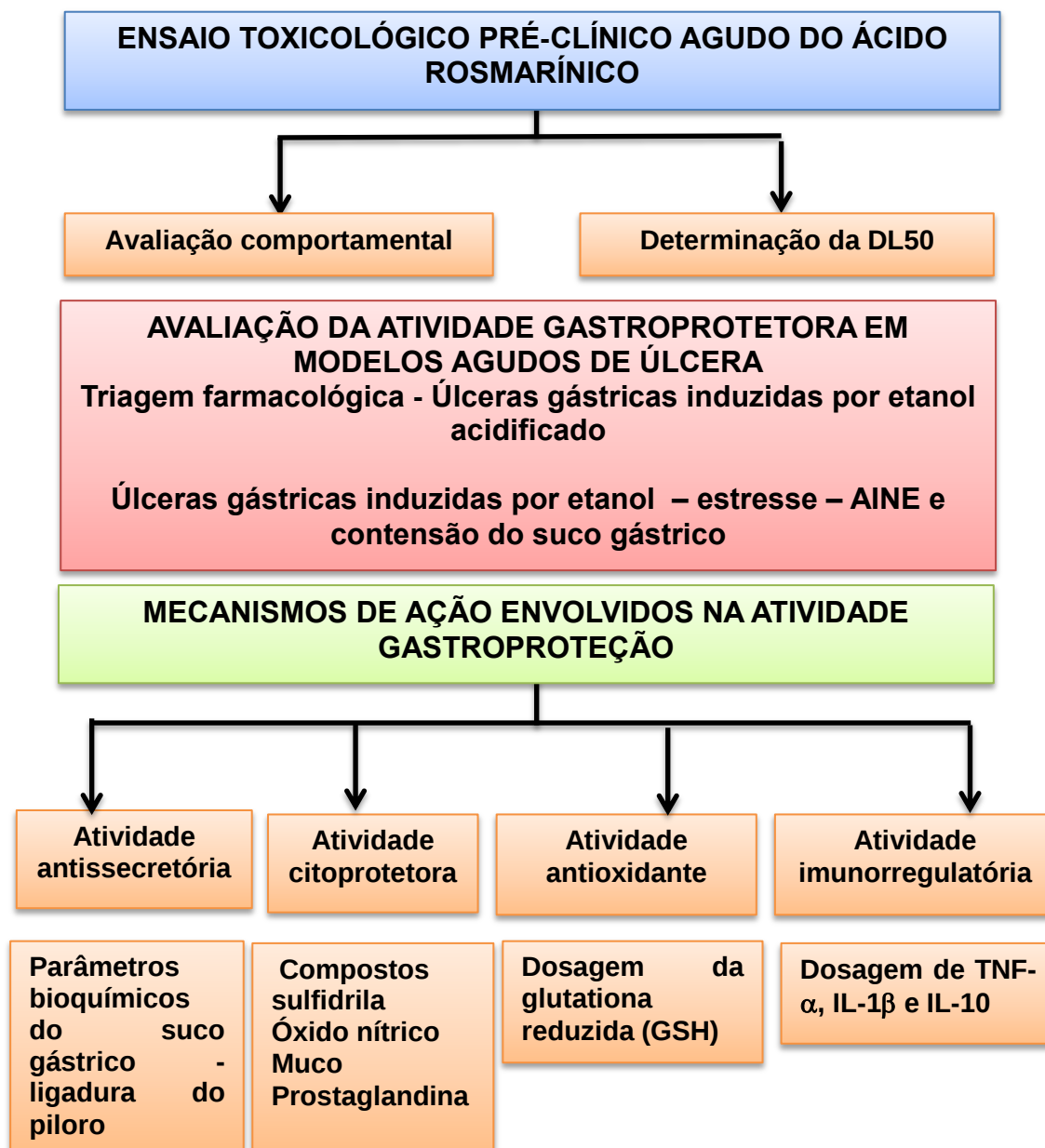
Chemical Co, U.S.A), cloreto de magnésio (SIGMA Chemical Co, U.S.A), cloreto de sódio P.A. (QUIMEX-MERCK, Brasil), etanol (MERCK, Germany), fenolftaleína (RIEDEL-DE HAËN, Germany), fosfato de sódio monobásico (SIGMA Chemical Co, U.S.A), fosfato de sódio bibásico (SIGMA Chemical Co, U.S.A), fluoreto de sódio (SIGMA Chemical Co, U.S.A), glibenclamida (SIGMA Chemical Co, U.S.A), hidróxido de sódio (QUIMEX-MERCK, Brasil), piroxicam 20 mg (HEXAL, Brasil), indometacina (SIGMA Chemical Co, U.S.A), ketamina 5% (VETANARCOL), lansoprazol (SIGMA Chemical Co, U.S.A), L-glutathione reduzida (SIGMA Chemical Co, U.S.A), N-etilmaleimida (SIGMA Chemical Co, U.S.A), N-nitro-L-arginina-metil-éster (SIGMA Chemical Co, U.S.A), sacarose (SIGMA Chemical Co, U. S. A), tween 80 (MERCK, Germany) e xilazina 2 % (DORCIPEC).

Para solubilização do ácido rosmarínico foi utilizado solução salina 0,9%. As substâncias utilizadas como controle positivo (carbenoxolona e cimetidina), assim como os bloqueadores do óxido nítrico e dos grupamentos sulfidrílicos, N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) e N-etilmaleimida (NEM), respectivamente, também solubilizados por esta substância. A indometacina foi solubilizada pelo carbonato de sódio 0,05%.

3.2 MÉTODOS

As metodologias utilizadas nesse estudo estão no fluxograma experimental representado na figura 7.

Figura 7. Fluxograma experimental



3.2.1 Ensaio toxicológico pré-clínico agudo do ácido rosmarínico

A avaliação da toxicidade aguda do ácido rosmarínico foi realizada em camundongos e compreendeu a estimativa da DL50, segundo o preconizado pelo “Guidelines for Testing of Chemicals” nº 423 (OECD, 2011), com algumas modificações, consumo de água e ração, alteração e peso dos órgãos, além das alterações comportamentais (ALMEIDA, 1999).

Neste experimento foram utilizados camundongos fêmeas, três por grupo, mais o grupo controle. Os mesmos receberam por via oral (v.o) veículo

(solução salina 0,9%) ou ácido rosmarínico (300 e 2000 mg/kg). A dose inicial foi escolhida a partir de um dos quatro níveis fixos (5, 50, 300 e 2000 mg/kg). Considerando que não há qualquer informação sobre a substância a ser testada, por razões de proteção dos animais, utilizou-se uma dose inicial de 300 mg/kg, como recomendado pelo método.

O método não permite o cálculo preciso da Dose Letal 50% (DL₅₀), no entanto, fornece uma estimativa do seu valor, classificando a substância em categorias de acordo com o “Globally Harmonized Classification System” – GHS (OECD, 2001).

Para avaliar as possíveis alterações comportamentais, sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) ou Sistema Nervoso Autônomo (SNA), os animais após tratamento foram observados para detectar possíveis sinais de toxicidade de caráter geral nos intervalos: 0, 15, 30 e 60 minutos; após 4 horas; e diariamente durante 14 dias, utilizando-se o protocolo experimental descrito por Almeida et al. (1999) (ANEXO 2).

A pesagem dos camundongos foi avaliada no primeiro dia antes da administração do ácido rosmarínico ou solução salina 0,9% e no 14^a dia. Após esse período os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e seus órgãos (coração, fígado, baço e rins) foram pesados em balança analítica para o cálculo do índice de órgãos que corresponde ao peso em miligrama (mg) do órgão dividido pelo peso em grama (g) de animal. Esses órgãos foram submetidos a uma avaliação macroscópica para identificação de sinais patológicos.

Outros parâmetros avaliados foram o consumo de água e ração. A ração foi colocada diariamente e no dia seguinte, no mesmo horário avaliado o consumo durante 14 dias. O consumo de água também foi quantificado nesse mesmo intervalo de tempo utilizando-se uma proveta.

A presença de morte nos animais durante o período dos experimentos foi utilizada para estabelecer a DL50 do ácido rosmarínico.

3.2.2 Avaliação da atividade gastroprotetora do ácido rosmarínico

Para realizar uma triagem farmacológica frente a atividade gastroprotetora do ácido rosmarínico foi utilizado o modelo de indução aguda

de úlcera induzido por etanol acidificado (HCl/etanol) em camundongos. Para avaliação desse modelo foram estabelecidas as doses de 25, 50, 100 e 200 mg/kg.

Para avaliar a atividade gastroprotetora do ácido rosmarínico frente a outros agentes lesivos foram utilizados os modelos de indução de úlcera por etanol absoluto, estresse por imobilização e frio, AINE (piroxicam) e contensão de suco gástrico (ligadura do piloro), por esses modelos garantirem a reprodutibilidade e mimetizarem as principais causas de úlcera gástrica no homem.

A partir do modelo de indução aguda pelo etanol foram também realizados ensaios histológicos, determinação de proteínas totais, dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e dosagem das interleucinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10) a partir do tecido gástrico. Esse modelo também possibilitou após análise dos resultados a escolha da melhor dose utilizada para elucidação do mecanismo de ação.

Após avaliação do efeito gastroprotetor produzido pelo ácido rosmarínico, foi investigada os possíveis mecanismos de ação envolvidos nessa gastroproteção. Para isso foram investigados os mecanismos antissecretório (determinação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico, volume do suco gástrico, pH e concentração de íons H⁺); citoprotetor (grupamentos sulfidril, óxido nítrico, muco e prostaglandina); antioxidante (dosagem da glutathiona reduzida); e a atividade imunorreguladora (Dosagem das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-10).

Os animais ao serem eutanasiados tiveram seus estômagos removidos, abertos ao longo da grande curvatura e prensados entre placas de vidro para quantificação das lesões por meio da utilização de uma lupa OLYMPUS Optical TL3 – SZ40 e expressas como Índice de Lesão Ulcerativa (ILU). O ILU foi calculado conforme o número e a severidade das lesões presentes na mucosa estomacal (SZELENYI; THIEMER, 1978). A essas lesões foram atribuídos os scores:

- ✓ Nível 1: pontos hemorrágicos e ulcerações até 1mm;
- ✓ Nível 2: ulcerações com 2 mm;

- ✓ Nível 3: ulcerações a partir de 3 mm.

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

No entanto, nos modelos que se utilizam ratos, com exceção do modelo de ligadura de piloro, a partir das fotografias (dimensão de 12 megapixels) do estômago foi determinado a Área de Lesão Ulcerativa (ALU) utilizando o programa AVSoft Bioview Spectra 4.0[®], conforme figura 8.

Figura 8. Lupa OLYMPUS Optical TL3-SZ40 (A) e estômago de rato ulcerado com etanol absoluto (B) (Foto: arquivo do Laboratório de Farmacologia do TGI)

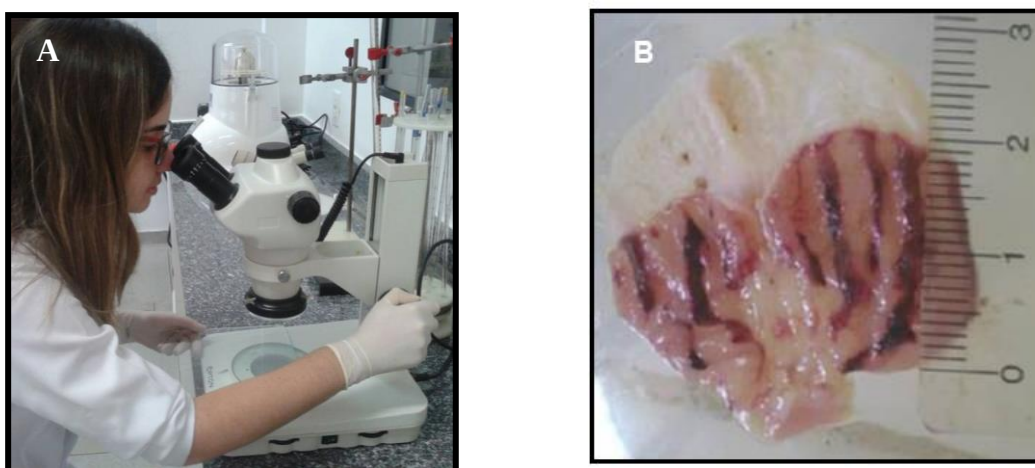
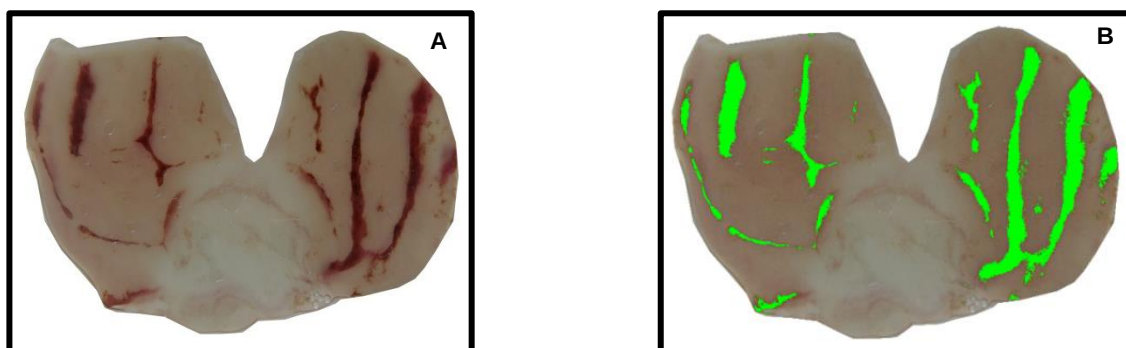


Figura 9. Representação de um estômago de rato ulcerado com etanol absoluto (A) e quantificação da área de lesão ulcerativa (B) com AVSoft Bioview Spectra 4.0[®] (Foto: arquivo do Laboratório de Farmacologia do TGI)



3.2.2.1 Modelos de indução aguda de úlcera gástrica

3.2.2.1.1 Úlcera gástrica induzida por etanol acidificado

Para realização do modelo de etanol acidificado foi utilizado a metodologia preconizada por Mizui & Doteuchi (1983) com modificações.

Após jejum de 24h e livre acesso a água até uma hora antes do experimento, camundongos machos (n=5-7) foram divididos em seis grupos e pré-tratados (v.o) com solução salina 0,9% (controle negativo), carbenoxolona 100 mg/kg (controle positivo) ou o ácido rosmarínico nas doses 25, 50, 100 e 200 mg/kg. Após 50 min os animais foram tratados com 0,2 mL de HCl/etanol 60% - 0,3M, por via oral e uma hora após, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, os estômagos removidos e seccionados ao longo da grande curvatura para determinação do ILU.

3.2.2.1.2 Úlceras gástricas induzidas por etanol

Na avaliação da atividade gastroprotetora com o agente lesivo, etanol, foi utilizado o modelo preconizado por Morimoto e colaboradores (1991), com modificações. Inicialmente, os ratos (n=6-7) foram submetidos a um jejum de 24 horas, em seguida, foram divididos em grupos e pré-tratados por via oral com salina 0,9% (controle negativo), carbenoxolona 100 mg/Kg (controle positivo) ou o ácido rosmarínico (25, 50, 100 e 200 mg/kg). Após 60 min, os animais foram tratados com 4 mL/kg de etanol absoluto (agente lesivo, v.o). Após 1h, os ratos foram eutanasiados, os estômagos removidos e abertos para determinação da área ulcerativa (AU). Em seguida, os estômagos foram imersos em nitrogênio líquido e congelados a - 80°C para doseamento dos níveis de proteínas totais, glutatona reduzida, citocinas pró-inflamatórias (TNF - α e IL-1 β) e anti-inflamatórias (IL-10). Além disso, foi realizada análise histopatológica de cada grupo.

3.2.2.1.3 Análise histológica

Para realização da histologia foram retiradas amostras de tecido do estômago medindo em média 1 cm de comprimento, os quais foram fixados em formalina tamponada, desidratados em diferentes concentrações de etanol e clarificados em xilol. Em seguida, as amostras foram incorporadas a parafina histológica e seccionadas a uma espessura de 5 µm, quando foram submetidas as colorações de hematoxilina e eosina (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS). A análise dos tecidos foi realizada a partir de um microscópio óptico e de forma aleatória por um examinador que não tinha conhecimento do grupo. A partir de cada grupo foi selecionada a lâmina com as melhores condições histológicas para a representação neste trabalho em dois aumentos (40 x e 100x) (BEHMER; TOLOSA; FREITAS-NETO, 1976)

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

Para realização deste protocolo experimental foi utilizado o modelo de Puscas et al., (1997). Para isso, foram utilizados camundongos Swiss (n=7), colocados no jejum por 24h, em seguida pré-tratados, via oral, com solução salina 0,9% (controle negativo), com cimetidina 100 mg/kg (controle positivo) ou o ácido rosmarínico (25, 50, 100 e 200 mg/kg). Após 30 min, os animais foram tratados com piroxicam 30 mg/kg (agente lesivo) por via subcutânea (s.c.) e 4 horas após essa administração, os animais foram eutanasiados, os estômagos removidos e seccionados para determinação do ILU.

3.2.2.1.5 Úlceras gástricas induzidas por estresse (imobilização e frio)

Este experimento foi baseado na metodologia de Levine et al (1971). Após jejum de 24h, os camundongos Swiss (n=5-7) foram pré-tratados com solução salina 0,9% (controle negativo), cimetidina 100 mg/Kg (controle positivo) ou o ácido rosmarínico (25, 50, 100 e 200 mg/kg), por via oral. Decorrido 30 min, os animais foram imobilizados pelas patas dianteiras e traseiras, colocados em contêntores de policloreto de vinila (PVC) (9 cm de

comprimento x 3,5 cm de diâmetro) e submetidos a uma temperatura de 4 ± 1 °C por um período de 3 h, para indução das úlceras gástricas. Após as 3h, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, os estômagos removidos e abertos para determinação do ILU.

3.2.2.2.1 Úlceras gástricas induzidas por contensão do suco gástrico

Este protocolo experimental foi descrito por Shay et al., (1945). Após jejum de 24h, os ratos (n=5-8) foram anestesiados com cloridrato de quetamina 5% (anestésico) e cloridrato de xilazina 2% (relaxante muscular), em seguida submetidos a uma incisão longitudinal abaixo da apófise xifoide para ligadura (amarração) do piloro. Esses animais foram pré-tratados por via intraduodenal (i.d.) com solução salina 0,9% (controle negativo), cimetidina 100 mg/kg (controle positivo) ou a melhor dose do ácido rosmarínico (200 mg/kg). Em seguida, as incisões dos animais foram suturadas e 4 h após a ligadura, os ratos foram eutanasiados, os estômagos retirados e abertos para determinação do ILU e determinação dos parâmetros bioquímicos.

Esta mesma metodologia foi repetida tratando os animais por via oral com as drogas testes e seus respectivos controles antes de se fazer a ligadura de piloro.

3.2.2.3 Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora do ácido rosmarínico

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

No modelo de úlcera gástrica induzida por contensão do suco gástrico, os estômagos após serem removidos foram abertos para coleta do conteúdo gástrico com o objetivo de determinar os parâmetros bioquímicos do mesmo: volume, pH e concentração de íons hidrogênio.

A avaliação dos parâmetros bioquímicos foi realizada segundo Shay et al., 1945, com modificações. O conteúdo do estômago foi pesado e em seguida foi calculado o volume do suco gástrico que foi expresso em g/4h. O pH foi aferido com o auxílio de um pHmetro digital PG 2000 (GEHAKA, Brasil),

após centrifugação do conteúdo estomacal juntamente com 10 mL de água destilada a 3000 rpm por 10 minutos e expresso em unidades. Na sequência, 10 mL do sobrenadante foi retirado e distribuído em alíquotas de 5 mL em 2 erlenmeyer, para a realização da titulação do suco gástrico e determinação da concentração de H^+ expressa em mEq/mL/4h. A titulação foi realizada com auxílio de uma bureta, utilizando-se hidróxido de sódio (NaOH) 0,01N e fenolftaleína, uma solução indicadora.

3.2.2.3.2 Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrílicos (SHs)

Para avaliar a participação dos grupamentos sulfidrila na gastroproteção mediada pelo ácido rosmarínico foi utilizado o modelo descrito por Matsuda et al. (1999). Os ratos (n=5-7) foram colocados em jejum de 24 horas. Em seguida distribuídos em seis grupos. Desses 3 grupos receberam previamente solução salina 0,9% - 10 mL/kg (i.p.) e os outros 3 grupos receberam previamente N-etilmaleimida (NEM) 10 mg/kg (i.p.), um bloqueador dos grupamentos sulfidrílicos. Após 30 minutos do pré-tratamento, os animais foram tratados por via oral com solução salina 0,9% (controle negativo), carbenoxolona 100 mg/kg (controle positivo) ou a melhor dose do ácido rosmarínico (200 mg/kg). Decorrido 1h do tratamento, os ratos receberam oralmente etanol absoluto - 4 mL/kg (agente lesivo). Após 60 min, os animais foram eutanasiados, os estômagos retirados, abertos e fotografados. A área da lesão gástrica foi determinada utilizando o programa AVSoft Bioview Spectra 4.0[®].

3.2.2.3.3 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) na gastroproteção

A avaliação da participação do óxido nítrico na gastroproteção mediada pelo ácido rosmarínico foi realizada de acordo com o modelo preconizado por Sikiric et al. (1997). Após jejum de 24h os ratos (n=5-7) foram distribuídos em seis grupos. Desses, 3 grupos receberam previamente solução salina 0,9% - 10 mL/kg (i.p.), os outros 3 grupos receberam N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) 70 mg/kg (i.p.), um agente bloqueador da enzima sintase de óxido

nítrico. Transcorrido 30 minutos do pré-tratamento, os animais foram tratados com solução salina 0,9% (controle negativo, v.o), carbenoxolona 100 mg/kg (controle positivo, v.o) ou a melhor dose do ácido rosmarínico (200 mg/kg, v.o). Após 1h do tratamento, os ratos receberam oralmente etanol absoluto - 4 mL/kg (agente lesivo). Após 60 min, os animais foram eutanasiados, os estômagos retirados, abertos e fotografados. A área da lesão gástrica foi determinada utilizando o programa AVSoft Bioview Spectra 4.0[®].

3.2.2.3.4 Determinação da concentração de muco aderido à parede gástrica

A quantificação do muco aderido à mucosa gástrica foi realizado conforme modelo proposto por Rafatullah et al. (1990) com modificações. Os ratos (n=5-8), após jejum de 24h, foram pré-tratados, por via oral, com solução salina 0,9% (controle negativo), carbenoxolona 100 mg/kg (controle positivo) e a melhor dose do ácido rosmarínico (200 mg/kg). Após 1 hora desse pré-tratamento, os animais, previamente anestesiados com cloridrato de quetamina 5% e de xilazina 2%, foram submetidos a um procedimento cirúrgico abaixo da apófise xifoide para realização da ligadura do piloro. Decorrido 4 horas, os animais foram eutanasiados, o esôfago foi pinçado para evitar perdas de conteúdo estomacal, o estômago foi retirado e lavado em água gelada e aberto ao longo da grande curvatura. Em seguida, retirou-se a porção glandular do estômago a qual foi separada, pesada e imersa, por 2 h, em 10 mL de solução de *alcian blue*. O excesso de *alcian blue* foi removido por lavagem do estômago com 7 mL de solução sacarose 0,25 mol/L, por duas vezes consecutivas, sendo a primeira por 15 minutos e a segunda por 45 minutos. Para extração do corante, complexado ao muco aderido à parede estomacal, adicionou-se a preparação 10 mL de cloreto de magnésio 0,5 mol/L, sobre agitação intermitentemente por um minuto, a cada 30 min, durante 2 horas.

Uma alíquota de 4 mL da amostra foi retirada e adicionada a uma solução de 4 mL de éter etílico, sob agitação por 2 min. Como resultado, obteve-se uma emulsão que foi centrifugada por 10 min a 3600 rpm e cujo sobrenadante foi descartado. Posteriormente, foi realizada a leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro (modelo Multisca, marca

Labsystems) a 570 nm. A determinação da concentração de *alcian blue* foi feita por intercalação em uma curva padrão com várias concentrações de *alcian blue*. Os resultados foram expressos em µg de *alcian blue*/g de tecido.

3.2.2.3.5 Avaliação da participação das prostaglandinas (PGs) na gastroproteção

A partir do modelo de Rodrigues et al. (2010) com modificações foi avaliada a participação das prostaglandinas na gastroproteção mediada pelo ácido rosmarínico. Para tanto, os ratos foram mantidos em jejum de 24 horas e distribuídos em grupos de animais, dos quais 3 foram pré-tratados com indometacina 30 mg/kg (inibidor da ciclooxygenase) e 3 grupos receberam o veículo (solução salina 0,9%), por via oral. Em seguida, os animais foram tratados oralmente com solução salina 0,9% (controle negativo), misoprostol 50 µg/kg, um análogo das prostaglandinas (controle positivo) ou o ácido rosmarínico (200 mg/kg). Após 1 hora do tratamento, os animais receberam o agente lesivo, etanol absoluto, e 60 min após os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e tiveram seus estômagos removidos, abertos e fotografados. A área da lesão gástrica foi determinada utilizando o programa AVSoft Bioview Spectra 4.0[®].

3.2.2.4 Avaliação do efeito antioxidante

3.2.2.4.1 Extração dos componentes citosólicos

Para extração dos componentes citosólicos do estômago foi retirada a porção glandular do estômago a partir do modelo de indução de úlcera pelo etanol (MORIMOTO et al., 1991) que foi adicionado ao tampão composto de HEPES (50 mM), KCl (1 M), MgCl₂ (1 M), NaCl (5 M), EDTA (0,1 M) e NaF (0,1M) na proporção de 1:3 (mg de estômago: mL de tampão), obtendo-se um homogenato de estômago que foi homogeneizado pelo aparelho FastPrep MD[®] por 30 segundos e submetido a uma centrifugação (14000 rpm, 45 min, 4°C). Em seguida, foi retirado o sobrenadante (extrato citosólico) o qual foi aliquoteado em *eppendorfs* para a determinação dos níveis de proteínas totais, GSH e citocinas.

3.2.2.4.2 Determinação das proteínas totais

A determinação das proteínas totais foi realizada conforme Smith et al., (1985). O extrato citosólico foi diluído em tampão PBS 0,1 M (pH = 7,4) na proporção de 1:20 (v/v) e em seguida centrifugado (12000 rpm, 4°C, 12 min). Na sequência 4 µL de cada amostra foi adicionado em cada poço de uma microplaca contendo 200 µL de ácido bicinchônico (pipetado anteriormente). Foi realizado também uma curva utilizando a albumina como padrão. A placa foi incubada a 37°C por 25 minutos e em seguida foi realizado a leitura em espectrofotômetro a 562 nm. Para obtenção dos valores das proteínas totais de cada amostra foi feita uma interpolação com a curva padrão de concentrações já conhecidas.

3.2.2.4.3 Determinação dos níveis de GSH

A determinação dos níveis de GSH foi realizada conforme Faure; Lafond (1995), por meio da reação com o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB). O extrato citosólico foi diluído em tampão PBS 0,1 M (pH = 7,4) na proporção de 1:10 (v/v) e em seguida centrifugado (12000 rpm, 4°C, 12 min). Na sequência 100 µL de cada amostra foi adicionado em cada poço de uma microplaca contendo 100 µL do tampão tris/EDTA (1 mM, pipetado anteriormente), e foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 412 nm. Após essa etapa, 20 µL de DTNB foi pipetado em todos os poços, a microplaca foi incubada por 15 min e foi realizada a leitura a 412 nm. Foi elaborado uma curva padrão de L-glutationa, em que os valores de GSH obtidos pela interpolação dos valores com a curva padrão foram expressos como nmol de GSH/ mg de proteínas.

3.2.2.5 Avaliação da atividade imunorreguladora

3.2.2.5.1 Determinação das interleucinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e anti-inflamatórias (IL-10)

Para a avaliação da atividade imunorregulatória a partir dos estômagos obtidos do modelo de úlcera induzida por etanol frente as citocinas (TNF- α , IL-

1 β e IL-10) o primeiro passo foi sensibilizar uma microplaca, com 96 poços e de fundo chato, com o anticorpo de captura de cada interleucina. Transcorrido 18h, a placa foi lavada com tampão de lavagem, Tween 20 0,05%, por três vezes, bloqueada com uma solução séria bovina 1% e lavada com Tween 20 0,05% (3x). Anteriormente foi preparado um homogenato da porção glandular do estômago (100 mg) em tampão fosfato salino (PBS, 600 μ L) que foi centrifugado (4000 rpm, 10 min, 4°C), em que 100 μ L do sobrenadante de cada amostra foi centrifugado na microplaca juntamente com a curva padrão. A placa foi incubada por 2h e em seguida lavada com o tampão de lavagem (3x), e adicionado 100 μ L do anticorpo secundário biotilado em cada poço. Com isso a placa foi novamente incubada por 2h e lavada (3x). A microplaca foi incubada com estreptavidina por 20 minutos e lavada (3x), após isso foi adicionado o substrato para revelação (Kit DuoSet[®] – R&D Sustems Catalog – DY999) e a placa foi novamente incubada por 20 minutos, quando a reação foi interrompida adicionando 50 μ L de uma solução de parada em cada poço. A leitura da placa foi feita em um espectofotômetro no comprimento de 450 nm, sendo os valores desconhecidos obtidos pela interpolação com a curva-padrão e expressos em pg de interleucina/mL.

3.2.3 Análise estatística

Para os resultados obtidos a partir dos ensaios de toxicidade aguda foi realizado o teste “t” de Student não pareado. Já para os resultados farmacológicos obtidos em ensaios de indução aguda de úlcera gástrica foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste (Dunnett e/ou Tukey). Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (d.p.) da média ou $\pm$ erro padrão (e.p.m.) (apenas os doseamentos) e o nível de significância mínimo foi de $p < 0,05$.

Os resultados foram analisados por meio do software, GraphPad Prism 5.0, San Diego, CA, EUA.

Resultados

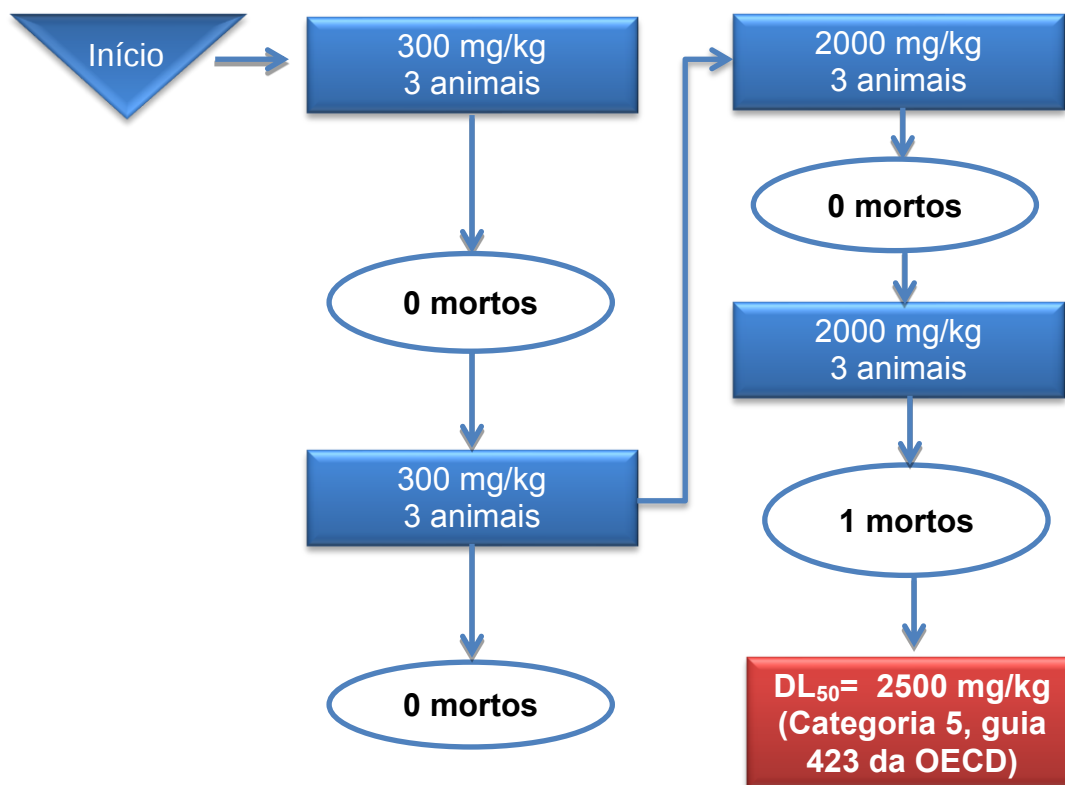
4. RESULTADOS

4.1 Ensaio toxicológico pré-clínico agudo do ácido rosmarínico

Após análise dos dados foi observado que os animais tratados com o ácido rosmarínico nas doses de 300 e 2000 mg/kg (v.o) não apresentaram nenhuma alteração comportamental quando comparada ao grupo controle negativo (solução salina 0,9%).

Durante a estimativa da DL50 não foi verificado nenhuma morte no primeiro grupo de animais tratados com o ácido rosmarínico (300 mg/kg), logo a administração foi repetida com a mesma dose e mais uma vez nenhuma morte foi constatada. Em seguida, foi observado que em um outro grupo de animais tratado com o ácido rosmarínico 2000 mg/kg, v.o, não foi observada nenhuma morte, porém, ao repetir o tratamento com outros animais nessa mesma dose foi verificada a morte de um camundongo. Com isso foi possível constatar que a DL50 do ácido rosmarínico é aproximadamente 2500 mg/kg (categoria 5 do guia 425 da OECD) , o que se configura baixa toxicidade conforme demonstrado na figura 10.

Figura 10. Determinação da DL₅₀ do ácido rosmarínico (adaptado do guia nº 423 da OECD)



Quando foi avaliado o peso relativo dos órgãos, o peso corporal, consumo de água e ração não foram observadas alterações nos grupos tratados com o ácido rosmarínico nas doses de 300 e 2000 mg/kg quando comparado ao grupo controle negativo (solução salina 0,9%) (Tabela 1).

Tabela 2. Efeito da administração oral do ácido rosmarínico na evolução ponderal, índice dos órgãos, consumo de água e de ração em camundongos fêmeas, após 14 dias

Parâmetros		Tratamentos	
Evolução ponderal (g)	Solução salina 0,9%	Ácido rosmarínico (300 mg/kg)	Ácido rosmarínico (2000 mg/kg)
Inicial	26 ± 1,2	27 ± 1,5	30 ± 6,1
Final	30 ± 1,5	28 ± 3,3	30 ± 1,0
Índice dos órgãos (mg/g)			
Fígado	59 ± 3,4	59 ± 6,8	61 ± 5,6
Coração	5,0 ± 0,6	5,0 ± 0,4	6,1 ± 1,9
Rins	12 ± 1,3	12 ± 1,5	13 ± 1,7
Baço	7,5 ± 0,6	7,4 ± 3,0	9 ± 1,9
Consumo de água (mL)			
	45 ± 11,0	43 ± 6,1	46 ± 6,2
Consumo de ração (g)			
	38 ± 12,0	38 ± 8,3	48 ± 12,0

Os resultados estão expressos como média ± d.p. (n=5-6). Teste “t” de Student não-pareado: comparado com solução salina 0,9% (controle negativo). Para avaliação dos órgãos, os valores foram expressos como índice dos órgãos que corresponde a divisão do peso dos órgãos (mg) pelo peso dos animais (g).

4.2 Avaliação da atividade gastroprotetora do ácido rosmarínico

4.2.1 Triagem farmacológica do ácido rosmarínico em modelo de indução aguda de úlcera pelo etanol acidificado

De acordo com os dados analisados, foi observado que o ácido rosmarínico (25, 50, 100 e 200 mg/kg) e a carbenoxolona (100 mg/kg) reduziram de forma significativa o Índice de Lesão Ulcerativo (ILU) em 42, 42, 40, 66 e 42% respectivamente, quando comparados ao grupo controle (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito da administração oral do ácido rosmarínico e carbenoxolona em úlceras gástricas induzidas por etanol acidificado em camundongos

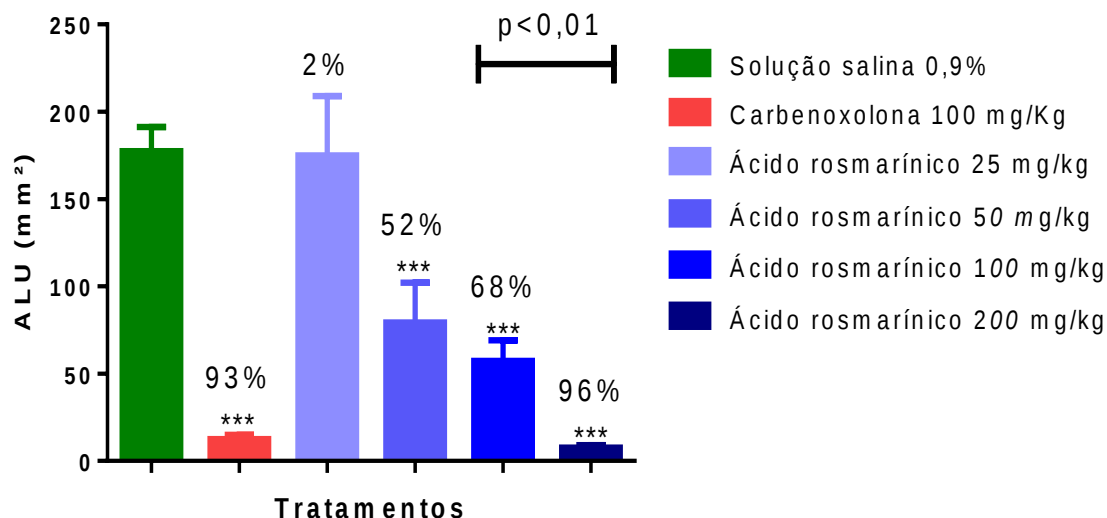
Tratamentos	Dose (mg/kg)	ILU	Inibição (%)
Solução salina 0,9%	-	232 ± 24	-
Carbenoxolona	100	135 ± 21***	42
Ácido rosmarínico	25	135 ± 21***	42
	50	138 ± 19***	42
	100	130 ± 21***	40
	200	80 ± 20***	66

Os resultados estão expressos como média ± d.p. Foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(5,31)}=32,77$ seguido do teste de Dunnett: *** $p<0,001$, comparado com o grupo controle (Solução salina 0,9%) (n= 5-7). ILU= Índice de Lesão Ulcerativo.

4.2.2 Úlceras gástricas induzidas por etanol

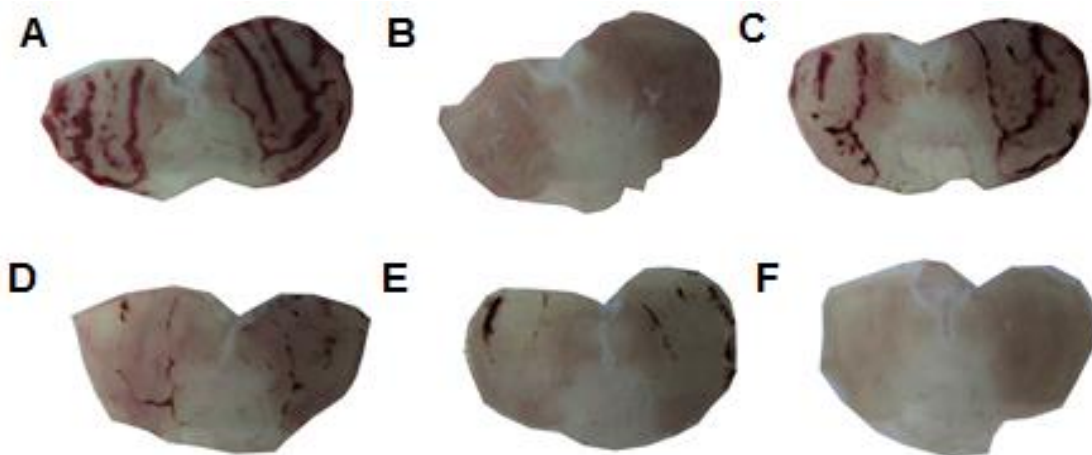
Os resultados obtidos para o modelo de indução de úlcera gástrica por etanol, em ratos, mostraram que o ácido rosmarínico nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg e a carbenoxolona (100 mg/kg) reduziram de forma significativa a área de lesão ulcerativa (ALU) em 52, 68, 96 e 93%, respectivamente, quando comparado com o grupo controle (solução salina 0,9%). A partir desse modelo foi possível selecionar a melhor dose (200 mg/kg), considerando a diferença estatística existente com as demais doses. Os resultados encontram-se expressos no gráfico 1 e ilustrados na figura 11.

Gráfico 1. Efeito da administração oral do ácido rosmarínico e carbenoxolona em úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos



Os resultados estão expressos como média $\pm$ d.p. Foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(5,35)} = 65,11$ seguido do teste de Dunnett ou Tukey. *** $p < 0,001$, comparado com o grupo controle negativo (Solução salina 0,9%) ($n = 5-7$). ALU= Área de Lesão Ulcerativa.

Figura 11. Estômagos de ratos pré-tratados (v.o) com solução salina 0,9% (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B), ácido rosmarínico (25 mg/kg) (C), ácido rosmarínico (50 mg/kg) (D), ácido rosmarínico (100 mg/kg) (E), ácido rosmarínico (200 mg/kg) (F) no modelo de etanol



4.2.3 Análise histológica

O estudo histológico dos estômagos pertencentes ao grupo normal (animais que não receberam etanol) demonstraram estrutura histológica normal com superfície epitelial, camada submucosa e muscular intactas (Figura 12.A). As fossetas gástricas e as glândulas gástricas na região do istmo se mostraram bem preservadas, com produção de muco protetor (seta vermelha) pelas

células de revestimento superficial e pelas células mucosas do colo (Figuras 13.A e 14.A).

Os animais pertencentes ao grupo salina 0,9% (controle negativo) apresentaram na mucosa lesões ulcerativas no epitélio com perda de células epiteliais (seta preta), exsudato inflamatório, tecido necrótico do tipo fibrinoide (estrela vermelha), espessamento e vascularização da muscular da mucosa, edema na submucosa, tecido fibroso com pouco infiltrado inflamatório (seta branca) (Figura 12.B). Além disso, apresentou perda de células epiteliais (seta preta) nas fossetas gástricas e glândulas gástricas na região do istmo, células em necrose e diminuição da produção de muco pelas células de revestimento superficial e pelas células mucosas do colo (Figuras 13.B e 14.B), e enquanto o grupo que recebeu carbenoxolona a 100 mg/kg não apresentou modificações histológicas, com preservação da camada de muco (seta vermelha) (Figuras 12.C, 13.C e 14.C).

O tratamento com ácido rosmarínico (200 mg/kg) preservou algumas áreas da estrutura da mucosa, quando comparada a ação lesiva do grupo controle negativo. Porém, ainda apresentou áreas com esfoliação celular, exsudato inflamatório (seta branca), espessamento e vascularização da muscular da mucosa, edema da submucosa e tecido fibroso com pouco infiltrado inflamatório (Figura 12.D). O ácido rosmarínico não preservou as células epiteliais da mucosa nem as glândulas gástricas na região do istmo e não manteve a produção de muco por parte das células epiteliais de revestimento e pelas células mucosas do colo (Figuras 13.D e 14.D).

Figura 12. Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido gástrico de ratos corados com HE em modelo de úlcera induzida por etanol. A. grupo normal, B. solução salina 0,9% (controle negativo), C. carbenoxolona 100 mg/kg, D. ácido rosmarínico (200 mg/kg). Aumento 40x

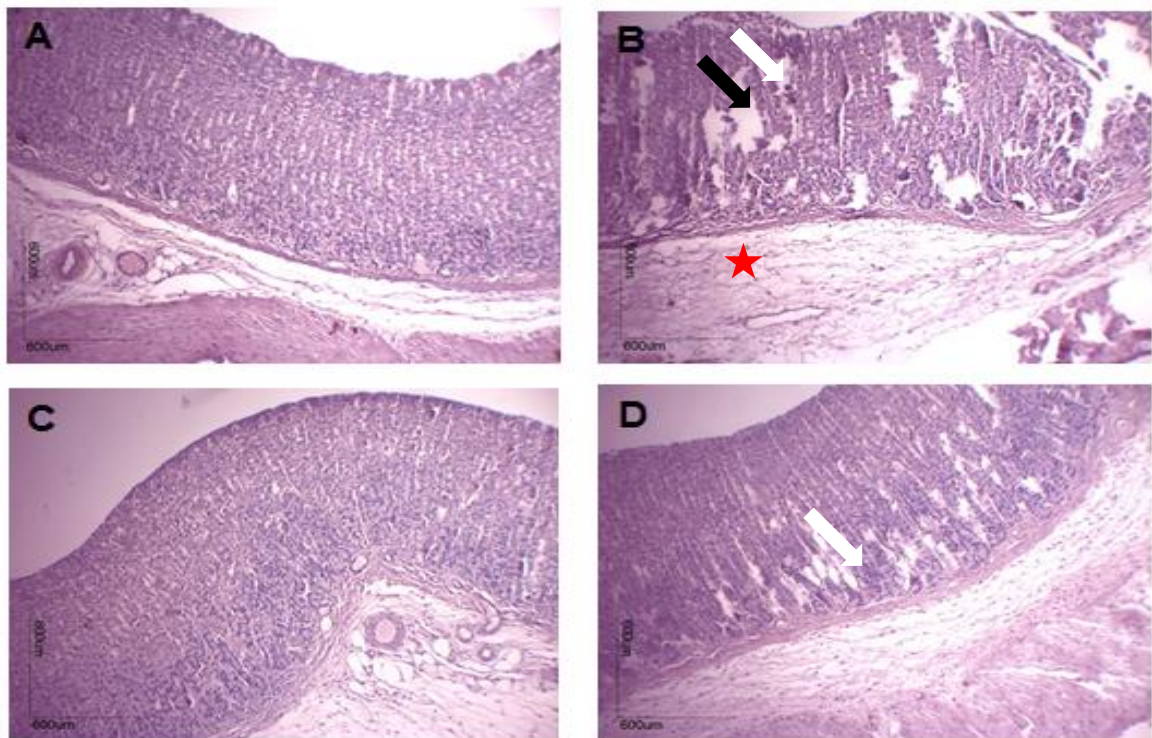


Figura 13. Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido gástrico de ratos corados com PAS em modelo de úlcera induzida por etanol. A. grupo normal, B. solução salina 0,9% (controle negativo), C. carbenoxolona 100 mg/kg, D. ácido rosmarínico (200 mg/kg). Aumento 10x

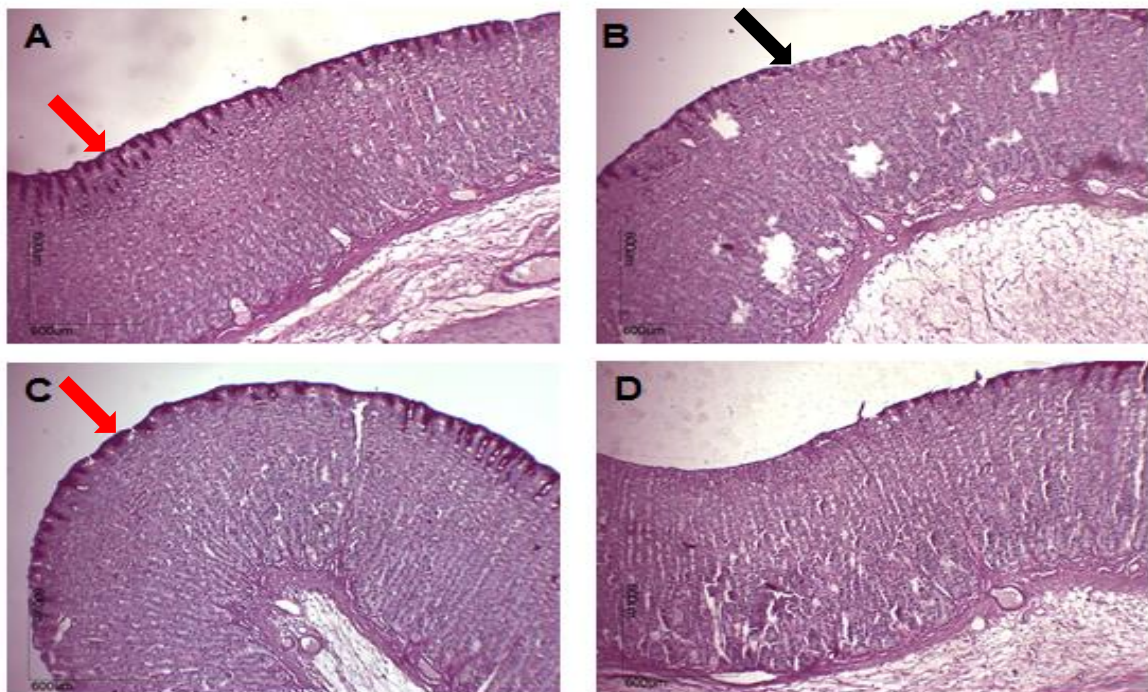
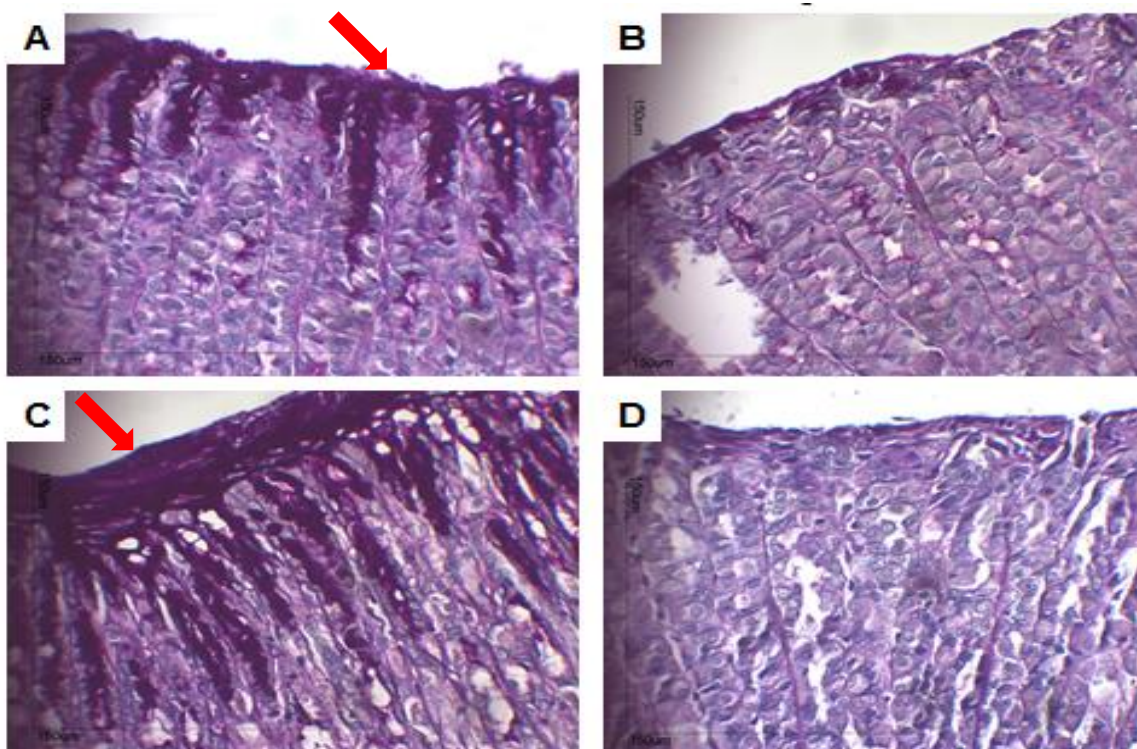


Figura 14. Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido gástrico de ratos corados com PAS em modelo de úlcera induzida por etanol. A. grupo normal, B. solução salina 0,9% (controle negativo), C. carbenoxolona (100 mg/kg), D. ácido rosmarínico (200 mg/kg). Aumento 40x



4.2.4 Úlceras gástricas induzidas por anti-inflamatório não-esteroidal

De acordo com os resultados obtidos nesse modelo de úlcera induzida por anti-inflamatório não-esteroidal (piroxicam), em que os camundongos receberam por via ácido rosmarínico nas doses de 25, 50, 100 e 200 mg/kg oral ou cimetidina (100 mg/kg), demonstraram uma inibição significativa do ILU em 36, 39, 49, 67 e 29% respectivamente, quando comparados ao grupo controle negativo (solução salina 0,9%) (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito da administração oral do ácido rosmarínico e cimetidina em úlceras gástricas induzidas por anti-inflamatório não-esteroidal em camundongos

Tratamentos	Dose (mg/kg)	ILU	Inibição (%)
Solução salina 0,9%	-	195 ± 12,0	-
Cimetidina	100	139 ± 19***	29
Ácido rosmarínico	25	124 ± 20***	36
	50	119 ± 12***	39
	100	100 ± 19***	49
	200	64 ± 20***	67

Os resultados estão expressos como média ± d.p. Foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(5,29)} = 43,40$ seguido do teste de Dunnett: *** $p < 0,001$, comparado com o grupo controle (solução salina 0,9%) (n= 5-7). ILU= Índice de Lesão Ulcerativo.

4.2.5 Úlceras gástricas induzidas por estresse (imobilização e frio)

Os resultados obtidos no modelo de úlcera induzida por estresse (imobilização e frio), em camundongos, mostrou que o ácido rosmarínico nas doses de 25, 50, 100 e 200 mg/kg e a cimetidina (100 mg/kg) reduziram significativamente as lesões ulcerativas em 39, 41, 69, 71 e 40%, respectivamente, quando comparados com o grupo controle negativo, como expresso na tabela 4.

Tabela 4. Efeito da administração oral do ácido rosmarínico e cimetidina em úlceras gástricas induzidas por estresse em camundongos

Tratamentos	Dose (mg/kg)	ILU	Inibição (%)
Solução salina 0,9%	-	250 ± 47	-
Cimetidina	100	150 ± 22***	40
Ácido rosmarínico	25	152 ± 32***	39
	50	149 ± 28***	41
	100	78 ± 15***	69
	200	72 ± 10***	71

Os resultados estão expressos como média ± d.p. Foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(5,31)} = 30,62$ seguido do teste de Dunnett: *** $p < 0,001$, comparado com o grupo controle (Solução salina 0,9%) (n= 5-7). ILU= Índice de Lesão Ulcerativo.

4.2.6 Úlceras gástricas induzidas por contensão do suco gástrico

No modelo de úlcera induzido por contensão do suco gástrico em ratos, o ácido rosmarínico (200 mg/kg) e a cimetidina (100 mg/kg) quando administrado por via oral ou por via intraduodenal inibiu significativamente o ILU em 51 e 38%, 31 e 43%, respectivamente, quando comparado aos seus respectivos controles. Esses resultados estão expressos na tabela 5.

Tabela 5. Efeito do tratamento com ácido rosmarínico (via oral e intraduodenal) e cimetidina em úlceras gástricas induzidas por ligadura do piloro em ratos

Tratamentos	Via de Administração	Dose (mg/kg)	ILU	Inibição (%)
Solução salina 0,9%	Oral	-	208 ± 29	-
Cimetidina	Oral	100	103 ± 18***	51
Ácido rosmarínico	Oral	200	130 ± 11***	38
Solução salina 0,9%	Intraduodenal	-	219 ± 21	-
Cimetidina	Intraduodenal	100	151 ± 26###	31
Ácido rosmarínico	Intraduodenal	200	124 ± 19###	43

Os resultados estão expressos como média ± d.p. Foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(2,17)} = 0,9337$ (v.o.) $F_{(2,16)} = 0,2160$ (i.d.) seguido do pós teste de Dunnett: *** $p < 0,001$, comparado com o grupo controle (salina 0,9%) via oral e ### $p < 0,001$ comparado com o grupo controle (Solução salina 0,9%) via intraduodenal, (n= 7-8). ILU= Índice de Lesão Ulcerativo.

4.3 Mecanismos de ação envolvidos no efeito gastroprotetor do ácido rosmarínico

Na perspectiva de elucidar os mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora do ácido rosmarínico foram avaliados os mecanismos antissecretórios (parâmetros bioquímicos), mecanismos citoprotetores (participação dos grupamentos sulfidríla, do óxido nítrico, do muco aderido a mucosa e de prostaglandinas), mecanismos antioxidante (por meio do dosagem dos níveis de GSH) e imunorregulatório (dosagem de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-10) dessa substância no tecido gástrico.

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

A partir do modelo de ligadura do piloro, foi avaliado os parâmetros bioquímicos do suco gástrico: volume, pH e concentrações de H^+ , após a

administração (v.o ou i.d) solução salina 0,9%, ácido rosmarínico (200 mg/kg) ou cimetidina (100 mg/kg). Nos dois tipos de administração o ácido rosmarínico não alterou os parâmetros bioquímicos quando comparado ao grupo controle negativo. A cimetidina, no entanto, reduziu o volume gástrico e a secreção de íons H^+ e aumentou o pH quando comparada ao controle negativo. Esses resultados estão expressos na tabela 6.

Tabela 6. Efeito da administração oral e intraduodenal do ácido rosmarínico e cimetidina nos parâmetros bioquímicos do suco gástrico após ligadura do piloro

Tratamentos	Via de administração	Dose (mg/kg)	pH	[H+] (mEq/mL/4)	Volume (mL)
Solução salina 0.9%	Oral	-	3,3 ± 0,3	11 ± 1,6	1,1 ± 0,2
Cimetidina	Oral	100	6,8 ± 0,6***	3 ± 0,6***	0,5 ± 0,2***
Ácido rosmarínico	Oral	200	2,9 ± 0,3	11,3 ± 1,5	1,5 ± 0,4
Solução salina 0,9%	Intraduodenal	-	3,2 ± 0,3	13,1 ± 2	1,1 ± 0,3
Cimetidina	Intraduodenal	100	5,6 ± 1,6####	5,5 ± 1,8####	0,6 ± 0,2##
Ácido rosmarínico	Intraduodenal	200	3,3 ± 0,3	13,6 ± 2,5	1,0 ± 0,4

Os resultados estão expressos como média ± d.p. Foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(2,20)} = 0,03551$ (v.o.) $F_{(2,22)} = 1,204$ (i.d.) seguido do teste de Dunnett: * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$, comparado com o grupo controle (Solução salina 0,9%) via oral e #### $p < 0,001$ ## $p < 0,01$ comparado com o grupo controle (Solução salina 0,9%) via intraduodenal, (n= 7-8).

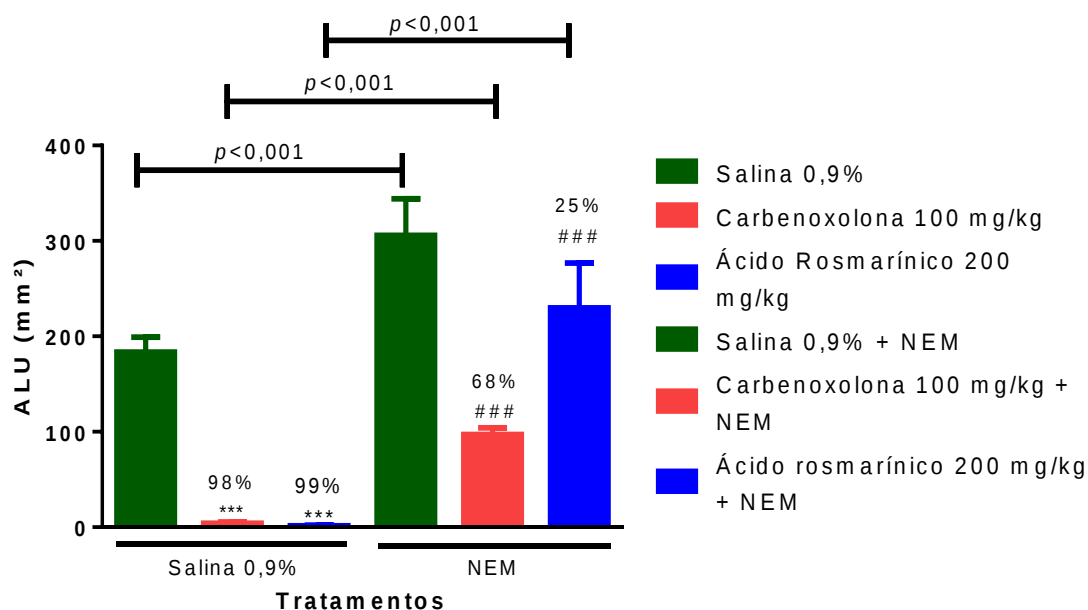
4.3.2 Avaliação dos grupamentos sulfidríla (SH) na atividade gastroprotetora do ácido rosmarínico

De acordo com os dados analisados no modelo em que se avaliou a participação dos grupamentos sulfidríla na gastroproteção foi possível observar que nos grupos previamente tratados com solução salina 0,9% (i.p) e ácido rosmarínico (200 mg/kg) (v.o) ou carbenoxolona (100 mg/kg) demonstraram uma redução significativa da ALU, em 99 e 98%, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle.

Entretanto, quando os grupos foram pré-tratados com NEM 10 mg/kg (i.p.) e tratados com salina 0,9%, ácido rosmarínico (200 mg/kg) (v.o.) ou

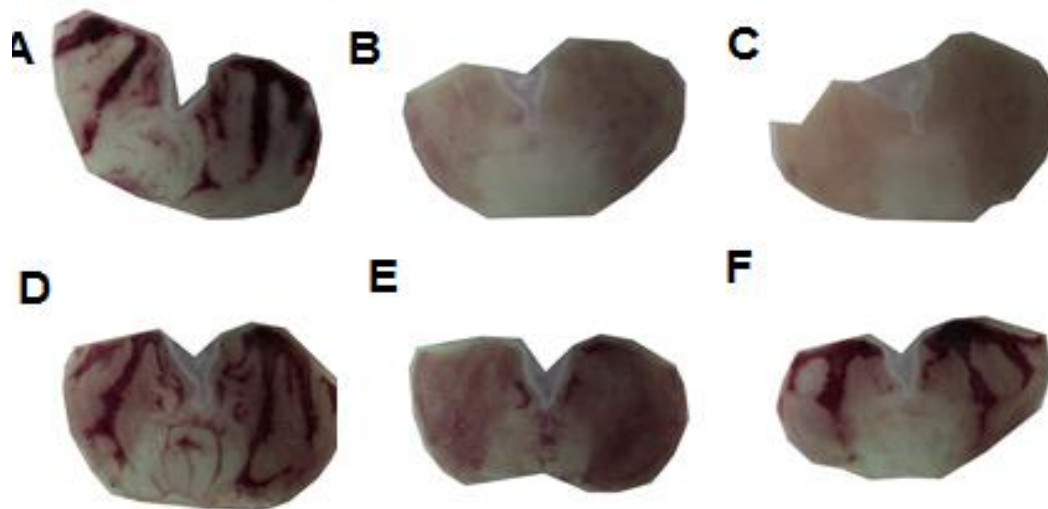
carbenoxolona (100 mg/kg) apresentaram uma exacerbação da ALU e, portanto uma redução da gastroproteção que passaram a apresentar um percentual de inibição de 25 e 68%, respectivamente quando comparados ao controle negativo, conforme encontra-se representado no Gráfico 2 e ilustrado na figura 15.

Gráfico 2. Efeito da administração oral do ácido rosmarínico e carbenoxolona após pré-tratamento com salina e NEM (i.p.) em úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos



Os resultados foram expressos como média $\pm$ d.p. (n=6-8). Foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(2,14)} = 8,584 / F_{(2,15)} = 1,740$ seguido do pós teste de Dunnett: *** $p < 0,001$ comparados a salina 0,9%; #### $p < 0,001$ comparados a salina 0,9% + NEM. A comparação entre os grupos não bloqueados e bloqueados foi feita pelo teste de Tukey e estão expressos nas barras horizontais acima de cada grupo. A porcentagem indica a proteção em relação ao respectivo controle

Figura 15. Estômagos de ratos pré-tratados com solução salina 0,9% e tratados com solução salina 0,9% (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B), ácido rosmarínico 200 mg/kg (C) ou pré-tratados com NEM e tratados com solução salina 0,9% (D), carbenoxolona 100 mg/kg (E) e ácido rosmarínico 200 mg/kg (F) no modelo de úlceras induzidas por etanol para avaliação da participação dos grupamentos sulfidríla

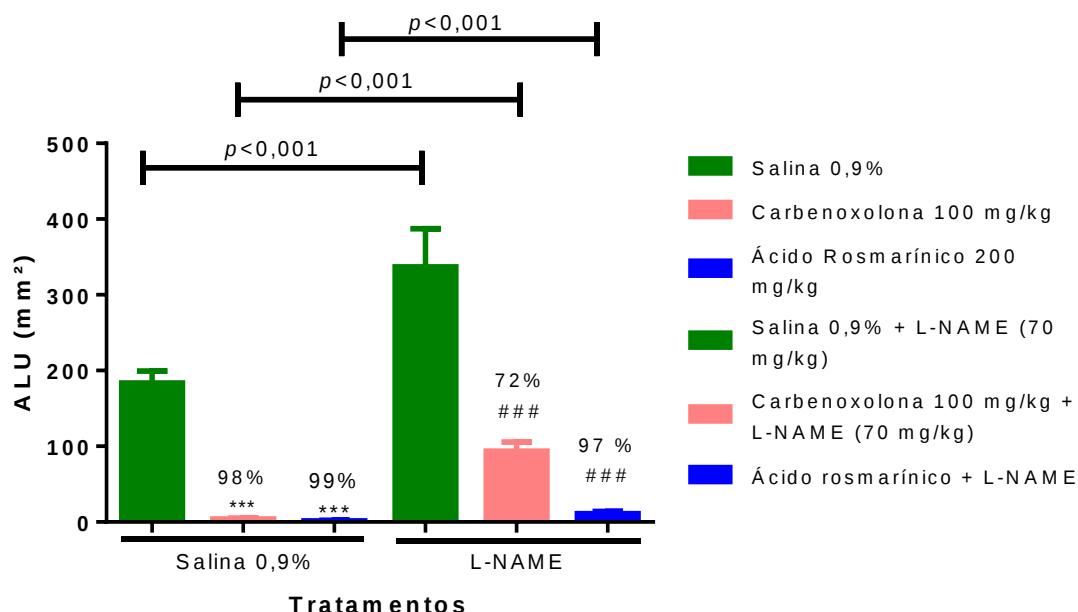


4.3.3 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) na atividade gastroprotetora do ácido rosmarínico induzida por etanol absoluto

De acordo com os dados obtidos a partir da avaliação da participação do óxido nítrico na gastroproteção produzida pelo ácido rosmarínico foi observado que os animais pré-tratados com solução salina 0,9% (i.p) e posteriormente tratados com carbenoxolona (100 mg/kg) ou ácido rosmarínico (200 mg/kg) (v.o) demonstraram uma redução da ALU, em 98 e 99%, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle.

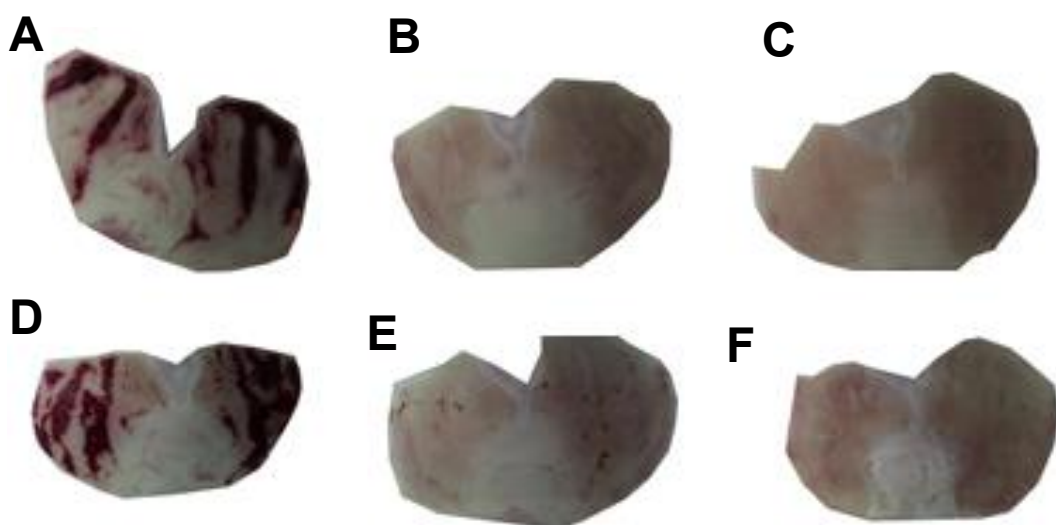
Os grupos pré-tratados com o L-NAME (70 mg/kg, v.o) e tratados com carbenoxolona (100 mg/kg) ou ácido rosmarínico (200 mg/kg) reduziu o ALU em 72 e 97%, respectivamente quando comparado ao grupo controle negativo, conservando o efeito gastroprotetor, como pode ser observado no gráfico 3 e ilustrado na figura 16.

Gráfico 3. Efeito da administração oral do ácido rosmarínico e carbenoxolona após pré-tratamento com solução salina 0,9% e L-NAME (i.p.) na úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos



Os resultados foram expressos como média $\pm$ d.p. (n=5-7). Foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(2,14)} = 8,584/F_{(5,29)} = 2,814$ seguido do pós teste de Dunnett: ***p<0,001 comparados a salina 0,9%; ###p<0,001 comparados a salina 0,9% + L-NAME. A comparação entre os grupos não bloqueados e bloqueados foi feita pelo teste de Tukey e estão expressos nas barras horizontais acima de cada grupo. A porcentagem indica a proteção em relação ao respectivo controle negativo.

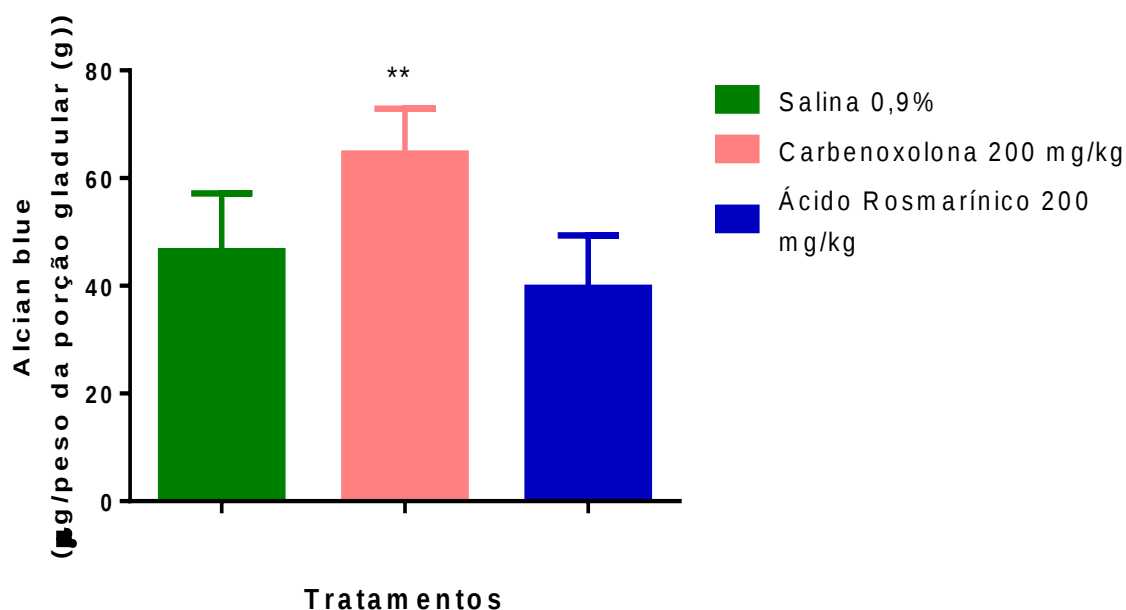
Figura 16. Estômagos de ratos pré-tratados com solução salina 0,9% e tratados com solução salina 0,9% (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B), ácido rosmarínico 200 mg/kg (C) ou pré-tratados com L-NAME e tratados com solução salina 0,9% (D), carbenoxolona 100 mg/kg (E) e ácido rosmarínico 200 mg/kg (F) no modelo de úlceras induzidas por etanol para avaliação da participação do óxido nítrico



4.3.4 Determinação da concentração de muco aderido à mucosa gástrica

Conforme os resultados obtidos a partir do modelo em que se avalia a participação do muco na gastroproteção induzida pelo ácido rosmarínico, tendo como parâmetro a concentração de *alcian blue* ligado ao muco aderido a porção glandular do estômago foi observado que o ácido rosmarínico na dose de 200 mg/kg (40 ± 9) não altera a concentração de muco ligado a mucosa quando comparado ao grupo controle negativo (47 ± 4). Entretanto, a carbenoxolona, como esperado, aumentou de maneira significativa a concentração de muco, quando comparado ao grupo controle negativo. Esses resultados estão melhor expressos no gráfico 4.

Gráfico 4. Efeito da administração oral do ácido rosmarínico e carbenoxolona sobre a concentração de muco aderida a mucosa gástrica após ligadura do piloro em ratos



Os resultados estão expressos como média $\pm$ d.p. Foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(2,19)} = 0,3390$ ($n=6-8$), seguido do pós teste de Dunnett: *** $p < 0,001$ comparado ao controle negativo (Solução salina 0,9 %).

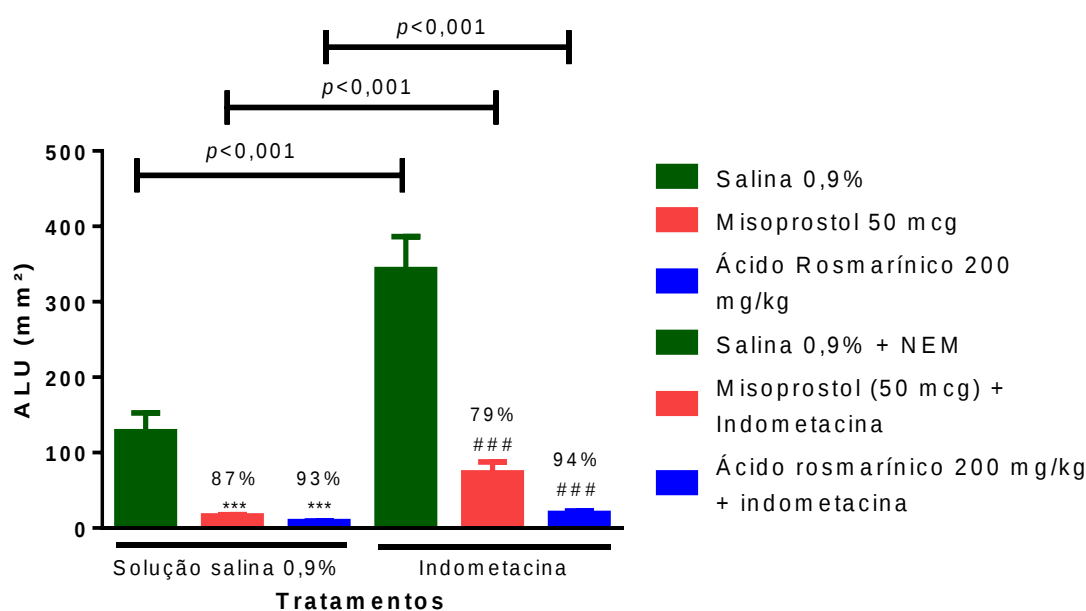
4.3.5 Avaliação da participação das prostaglandinas na atividade gastroprotetora do ácido rosmarínico induzida por etanol absoluto

Segundo os dados obtidos a partir da avaliação da participação das prostaglandinas na gastroproteção produzida pelo ácido rosmarínico foi

observado que os animais pré-tratados com solução salina 0,9% (i.p) e posteriormente tratados com ácido rosmarínico (200 mg/kg) ou misoprostol (50 µg/kg) (v.o) demonstraram uma redução da ALU, em 93 e 87%, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle.

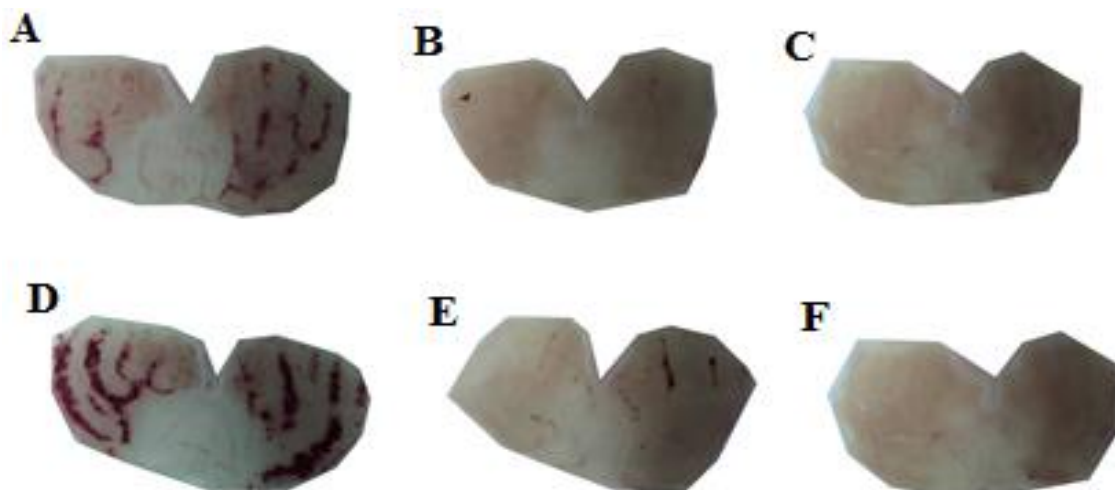
Os grupos pré-tratados com o indometacina (30 mg/kg, v.o) e tratados com com ácido rosmarínico (200 mg/kg) ou misoprostol (50 µg/kg) (v.o) reduziram o ALU em 94 e 79%, respectivamente quando comparado ao grupo controle negativo, mantendo o efeito gastroprotetor, como pode ser observado no gráfico 5 e ilustrado na figura 17.

Gráfico 5. Efeito da administração oral do ácido rosmarínico e misoprostol após pré-tratamento com solução salina 0,9% e indometacina (v.o), na úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos



Os resultados foram expressos como média $\pm$ d.p. (n=5-7). Foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(2,15)} = 7,236/F_{(5,17)} = 5,853$ seguido do teste de Dunnett: ***p<0,001 comparados a salina 0,9%; ####p<0,001 comparados a salina 0,9% + Indometacina. A comparação entre os grupos não bloqueados e bloqueados foi feita pelo teste de Tukey. A porcentagem indica a proteção em relação ao respectivo controle negativo.

Figura 17. Estômagos de ratos pré-tratados com solução salina 0,9% e tratados com solução salina 0,9% (A), misoprostol $\mu\text{g/kg}$ (B), ácido rosmarínico 200 mg/kg (C) ou pré-tratados com Indometacina e tratados com solução salina 0,9% (D), misoprostol $\mu\text{g/kg}$ (E) e ácido rosmarínico 200 mg/kg (F) no modelo de úlceras induzidas por etanol para avaliação da participação das prostaglandinas

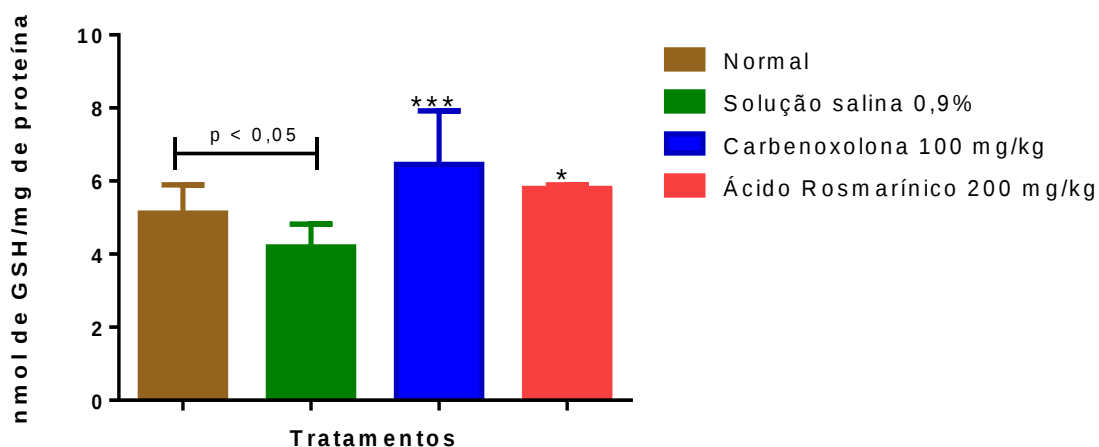


4.4 Avaliação do efeito antioxidante

4.4.1 Determinação dos níveis de GSH

A partir do modelo de úlcera induzido por etanol e partindo-se do homogenato dos estômagos foi determinado o nível de GSH nos animais pré-tratados com salina 0,9%, carbenoxolona (100 mg/kg) ou ácido rosmarínico (200 mg/kg). Os resultados obtidos demonstraram que a carbenoxolona e o ácido rosmarínico aumentaram os níveis de GSH em $7 \pm 0,6$ e $6 \pm 0,04$, respectivamente quando comparado ao grupo controle negativo ($4 \pm 0,3$). Quando o grupo controle negativo foi comparado ao grupo normal ($5 \pm 0,3$) foi também observada uma diferença significativa. Esses resultados encontram-se expressos no gráfico 6.

Gráfico 6. Efeito da administração oral do ácido rosmarínico e carbenoxolona após pré-tratamento com solução salina 0,9% e ácido rosmarínico (v.o) sobre os níveis de GSH, na úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos



Os resultados foram expressos como média $\pm$ d.p. (n=5-7). Foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(3,21)} = 1,829$ seguido do teste de Dunnett: *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ comparados a salina 0,9%.

4.5 Avaliação da atividade imunorreguladora

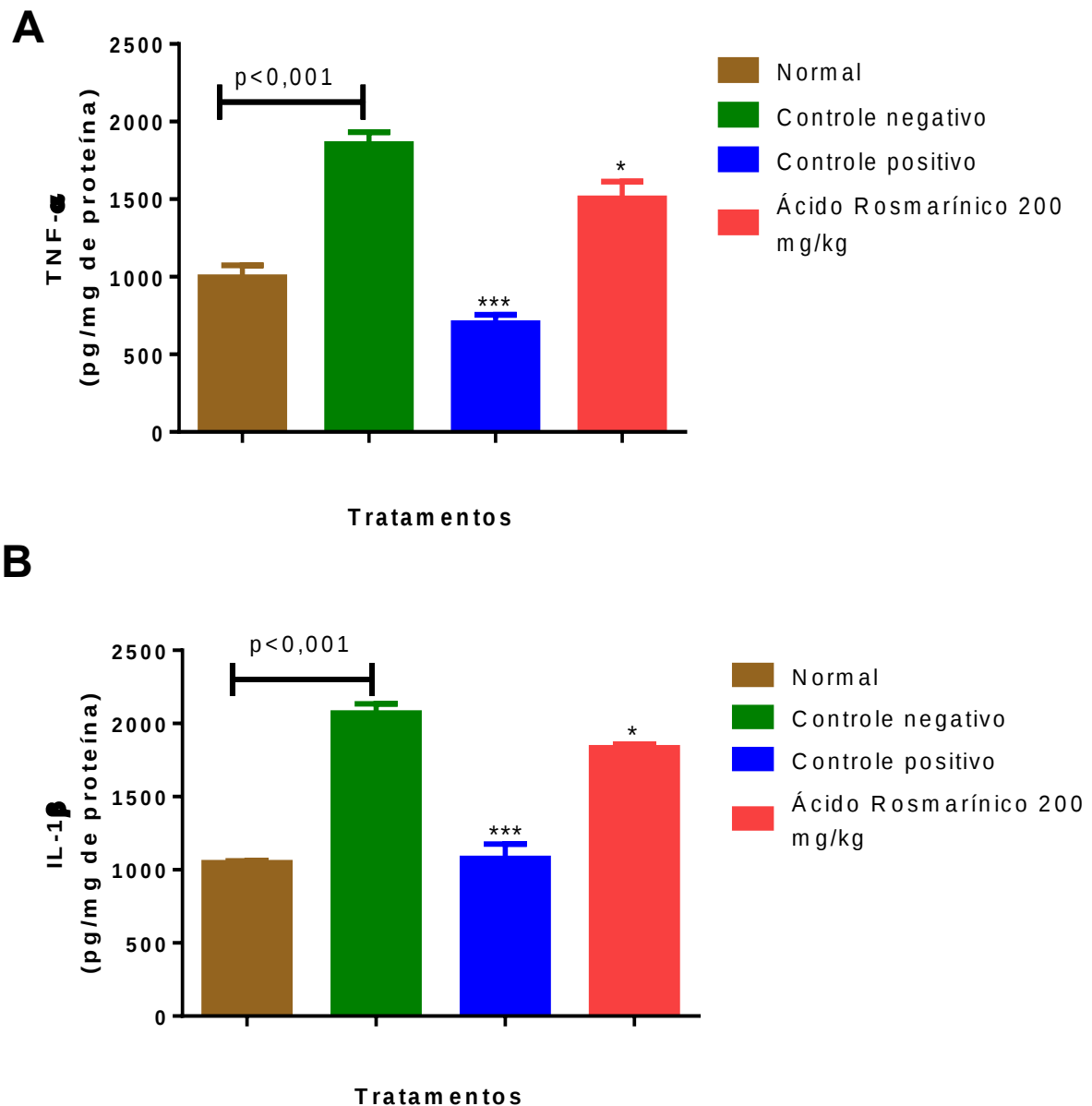
4.5.1 Determinação das interleucinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e anti-inflamatórias (IL-10)

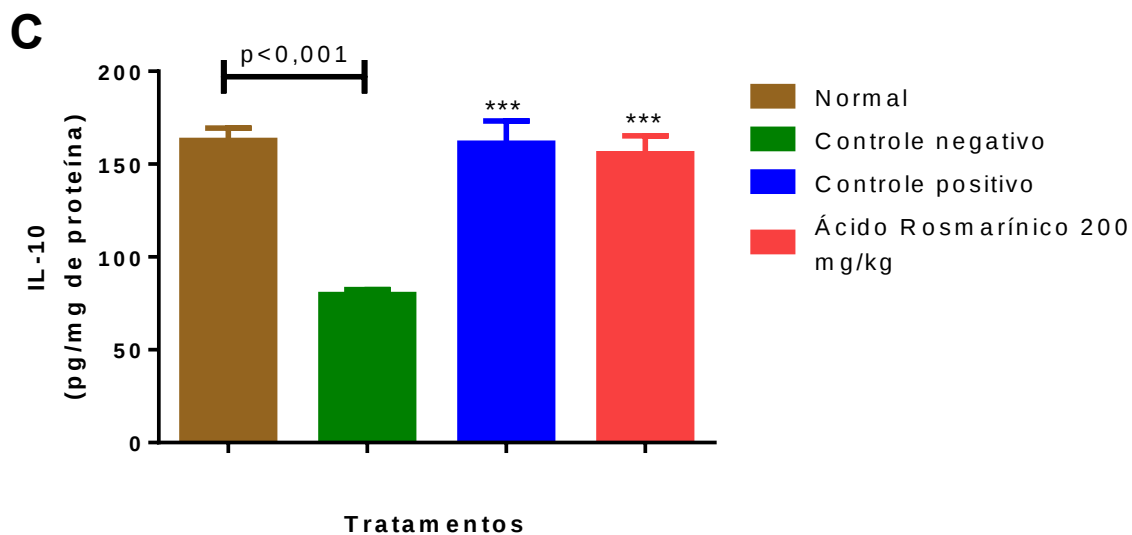
A partir do modelo de úlcera induzida por etanol absoluto (MORIMOTO et al., 1991), os níveis de interleucinas foi determinado em homogenato de estômagos de animais pré-tratados com solução salina 0,9%, carbenoxolona 100 mg/kg ou ácido rosmarínico 200 mg/kg. Os resultados obtidos demonstraram que o ácido rosmarínico e a carbenoxolona reduziram os níveis de TNF- α em 1505 ± 109 e 702 ± 53 , respectivamente quando comparada ao controle negativo (1856 ± 77), bem como houve diferença estatística entre o grupo normal (997 ± 78) e o controle negativo (gráfico 7A). O ácido rosmarínico e a carbenoxolona também reduziram os níveis de IL-1 β em 1835 ± 24 e 1078 ± 98 , respectivamente quando comparada ao grupo salina 0,9% (2072 ± 61). Além disso, foi observada diferença entre o grupo controle negativo e o grupo normal (2072 ± 62)(Gráfico 7B).

Quando se analisa o tratamento com ácido rosmarínico (200 mg/kg) ou carbenoxolona (100 mg/kg) frente os níveis de IL-10 é possível observar que ocorreu um aumento significativo em 156 ± 10 e 161 ± 12 , respectivamente,

quando comparado ao grupo salina 0,9% (80 ± 12). Entretanto ao comparar com o grupo normal (163 ± 7) foi observado que o tratamento com a droga teste manteve os níveis basais de IL-10 (Gráfico 7C).

Gráfico 7. Efeito da administração oral do ácido rosmarínico e carbenoxolona sobre os níveis de TNF- α (A), IL-1 β (B) e IL-10 (C) em estômagos submetidos ao modelo de úlcera por etanol





Os resultados estão expressos como média $\pm$ e.p.m. Foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(3,21)} = 0,8989$ (A), $F_{(3,20)} = 1,419$, $F_{(3,22)} = 0,8770$ ($n=6-8$), seguido do teste de Dunnett: *** $p < 0,001$, * $p < 0,1$ comparado ao controle negativo (Solução salina 0,9 %).

Díscussão

5. DISCUSSÃO

O perfil de morbidades existente nos dias atuais e que se configuram como agravo a saúde pública tem demandado a descoberta de novas possibilidades terapêuticas que apresentem maior eficácia, seja de fácil acesso e que tenha menos efeitos colaterais. Para isso se faz necessário a investigação e o desenvolvimento de novos medicamentos a partir de novas fontes terapêuticas a exemplo dos produtos naturais (SIDDIQUI et al., 2014). A obtenção de novas substâncias pode ser feito a partir do isolamento de constituintes obtidos de produtos naturais, em especial das plantas medicinais ou da síntese química a partir do composto isolado (CRAGG; NEWMAN, 2013; MELNIK; STOKER, 2013).

A síntese de produtos naturais tem proporcionado grandes avanços na química orgânica, bem como tem permitido a descoberta de novas rotas sintéticas para obtenção de substâncias em quantidades suficientes para realização de estudos biológicos (HOFFMAN, 2013). Portanto, a síntese de produtos naturais é uma área promissora no que se refere ao isolamento e caracterização de novos alvos moleculares, disponibilidade de novos reagentes e drogas e de novas tecnologias que podem contribuir de fato para o desenvolvimento promissor de estudos pré-clínicos e clínicos de novos medicamentos (FREEMANTLE, 2004; MICKEL et al., 2004; CRAGG; NEWMAN, 2013)

Os produtos naturais sempre desempenharam um importante papel na saúde humana. No início do século XX, cerca de 80% dos medicamentos sintéticos foram obtidos de fonte vegetal, entre 1994-2007 metade das drogas aprovadas foram baseadas em um produto natural (BUTLER, 2008; HARVEY, 2008; SIDDIQUI et al., 2014). Eles representam um grande reservatório de diversidade química, sendo utilizados atualmente como agentes anti-inflamatórios, cardioprotetores, hipoglicemiantes, hipolipemiantes, antivirais, imunomoduladores e frente os distúrbios gastrintestinais, a exemplo da úlcera péptica (SIDDIQUI et al., 2014).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários, comuns na natureza, que variam entre estruturas simples com um anel aromático a substâncias poliméricas altamente complexas (SUMBUL et al., 2011).

Estudos tem mostrado a contribuição de polifenóis para a prevenção de doenças cardiovasculares, cancro, osteoporose, doenças neurodegenerativas e prevenção da úlcera péptica (SUMBUL et al., 2011), a exemplo do ácido gálico, ácido cinâmico (NANJUNDAIAH; ANNAIAH; DHARMESH, 2011), quercetina (HU et al., 2015) e ácido clorogênico (SHIMOYAMA et al., 2013).

Além disso, plantas que contém o ácido rosmarínico como um de seus metabólitos secundários também tem apresentado esse efeito, como *Buddleja scordioides* Kunth (DIAZ-RIVAS et al., 2014), *Rosmarinus officinalis* L (AMARAL et al., 2013) e *Mentha arvensis* Linn (LONDONKAR; PONDDAR, 2009). Entretanto, nenhum estudo realizado com esta substância isolada foi encontrado frente a atividade gastroprotetora e antiulcerogênica, o que motivou a sua escolha para o desenvolvimento desse trabalho.

A úlcera péptica é uma doença que acomete uma parcela significativa da população mundial e apresenta múltiplas etiologias, sendo definida como uma descontinuidade da mucosa gástrica que pode se estender até a camada muscular da mucosa (LI et al., 2014). É causada por um desequilíbrio entre fatores agressores (físicos, químicos e biológicos) e mecanismos protetores da mucosa gástrica (LI et al., 2014).

Dessa forma, o presente trabalho foi realizado na perspectiva de investigar a toxicidade aguda e a atividade gastroprotetora do ácido rosmarínico que mimetiza a úlcera no homem.

O desenvolvimento de um fármaco envolve estudos não clínicos e clínicos para assegurar sua eficácia terapêutica. Para a determinação da segurança de um produto natural visando o seu uso em humanos, esse deve passar por estudos para avaliação de sua toxicidade (OLIVEIRA et al., 2014).

Os estudos de toxicidade são realizados na primeira fase não clínica, uma vez que compostos com elevados níveis de toxicidade não podem ser utilizados como medicamentos em humanos (OLIVEIRA et al., 2014). Assim, a toxicidade aguda é um dos testes não clínicos realizados que investiga o potencial de letalidade de uma dada substância ou a presença de sinais tóxicos, o que auxilia na seleção das doses para estudos posteriores (VALADARES, 200; UKWUANI et al., 2012).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) dispõe sobre a utilização de métodos alternativos para a obtenção de uma estimativa da dose

letal. Para isso se utiliza como referência o guia 423 da OECD guideline (*Organisation for Economic Cooperation and Development*) para testes químicos, na perspectiva de avaliar a toxicidade aguda e genotoxicidade de um dado composto. Para isso ele utiliza 3 animais de um só sexo (geralmente feminino, por geralmente serem mais sensíveis) por etapa. Dependendo da mortalidade e/ou estado do animal, 2-4 etapas serão necessárias para determinar a toxicidade aguda de uma dada substância (OECD, 2001).

Tendo como base o protocolo da OECD (2001) foi avaliada a toxicidade aguda do ácido rosmarínico. Neste experimento não foi observado nenhuma morte entre os animais tratados com 300 mg/kg da substância teste. No entanto, nos animais tratados com 2000 mg/kg da droga teste apenas um animal foi a óbito. Portanto, a DL50 (Dose Letal 50%) do ácido rosmarínico está enquadrada na categoria 5 de acordo com o Sistema de Classificação Harmonizado Global (GSH) que é de aproximadamente 2500 mg/kg de acordo com OECD 423.

Assim, os ensaios toxicológicos foram acompanhados de estudo comportamental preconizado por Almeida et al. (1999). Esse estudo tem por finalidade verificar alterações em nível de SNC e SNA, pela observação e registro de sinais ou alterações de comportamento apresentados pelos animais, presença de morte, após serem tratados por via oral, com o ácido rosmarínico na dose de 300 mg/kg. Essa substância não promoveu alterações comportamentais dentro dos parâmetros comportamentais avaliados.

O aumento ou diminuição do peso corporal do animal pode indicar importantes mudanças fisiológicas, como alterações no fígado ou hormonal, ou falhas na absorção de proteínas, aminoácidos e outros (ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2010). Durante o período do experimento (14 dias) os animais que permanecem vivos não podem perder mais de 10% do peso corpóreo inicial (RAZA et al., 2002; TEO et al., 2002). O ácido rosmarínico não apresentou alterações nesse parâmetro.

O consumo alimentar é um parâmetro importante no estudo da segurança de um produto com finalidade terapêutica (IVERSEN; NICOLAYSEN, 2003). O ácido rosmarínico também não alterou o consumo de água e ração, nas condições avaliadas.

Uma maneira de investigar se um órgão foi submetido a um dano é calculando a razão órgão/peso, sendo o peso relativo dos órgãos um sinal mais indicativo de toxicidade do que o peso absoluto (DEMMA et al., 2006). Nesta perspectiva, o índice dos órgãos foi avaliado após o ensaio de toxicidade aguda e foi observado que o ácido rosmarínico não causou mudança significativa nesse parâmetro. Além disso, não foram observadas alterações macroscópicas para os animais tratados com o ácido rosmarínico. Dessa forma, considerando os parâmetros avaliados para o ácido rosmarínico é possível inferir que se trata de uma substância de baixa toxicidade.

Estudos realizados com substâncias fenólicas como o resveratrol (WILLIAMS et al., 2009) e o ácido gálico (RAJALKSHMI; DEVARAI; DEVARAI, 2001) também apresentaram baixa toxicidade nas condições avaliadas, o que corrobora com os resultados obtidos para o ácido rosmarínico.

Considerando que a DL50 é de 2500 mg/kg, o que representa baixa toxicidade, e o que preconiza Souza Brito (1991) em que extratos brutos e derivados devem ser testados em estudos farmacológicos até a dose de 1000 mg/kg, e considerando outros estudos farmacológicos já realizados com o ácido rosmarínico foram selecionados as doses de 25, 50, 100 e 200 mg/kg para seguimento dos próximos estudos farmacológicos (ROCHA et al., 2014; ZHANG et al., 2015). O próximo passo foi avaliar o efeito gastroprotetor do ácido rosmarínico em modelos de indução aguda de úlcera gástrica.

Inicialmente foi realizado uma triagem farmacológica frente a atividade gastroprotetora utilizando como agente lesivo o etanol acidificado (HCl/etanol). Nesse modelo, o etanol/HCl promove um efeito tóxico direto sobre o epitélio, causando danos severos a mucosa gástrica (ALRASHDI et al., 2012). Este modelo é inespecífico pois envolve tanto mecanismo antissecretório (ARISAWA et al., 2006; FERREIRA et al., 2008), citoprotetor (SUZUKI, et al., 2012) e antioxidante (SZABO, 1987; SANNOMIYA et al., 2005).

No modelo de úlcera induzido por HCl/etanol o ácido rosmarínico inibiu significativamente as lesões ulcerativas quando comparado ao grupo controle negativo, sugerindo que o composto avaliado apresenta atividade gastroprotetora. Estudos realizados com o extrato metanólico da *Alchornea glandulosa* (CALVO et al., 2007) e extrato de *Byrsonima crassa* (SANNOMIYA et al., 2005), ambos ricos em compostos fenólicos demonstraram efeito

gastroprotetor no modelo em estudo, corroborando com os resultados obtidos para o ácido rosmarínico, o que permitiu a continuidade do trabalho, utilizando outros protocolos de indução aguda de úlcera.

O modelo de úlcera gástrica induzido por etanol em rato é muito utilizado, por ser reprodutível e refletir uma similar relação entre a ingesta de álcool e o desenvolvimento de úlceras pépticas (RAO et al., 2004; ROZZA et al., 2013). Além disso, a partir desse modelo é possível a realização de análise histológica, determinação dos níveis de GSH, dos níveis de citocinas e norteamiento da melhor dose a ser utilizada.

A administração oral do etanol absoluto é nociva para o estômago por afetar topicamente a mucosa gástrica, levando ao rompimento da barreira de proteção e a danos microvasculares em poucos minutos após a administração (KONTUREK et al., 1998; MOLEIRO et al., 2009).

O etanol desencadeia lesões hemorrágicas, edema submucoso, infiltração de células inflamatórias e perda de células epiteliais no estômago (MARHUENDA et al., 1993; ALRASHDI et al., 2012). A patogênese do dano gástrico causado pelo etanol ocorre de forma direta, mediado pela degranulação de mastócitos e inibição da produção de prostaglandinas e muco (PARK et al., 2004; SANNOMIYA et al., 2005) e de forma indireta que resulta na peroxidação lipídica, produção de radicais livres, liberação de citocinas e no estresse oxidativo (ALQASOUMI et al., 2009; SUZUKI, et al., 2012).

Nesse modelo o ácido rosmarínico reduziu de forma significativa as lesões induzidas pelo etanol inferindo que esta substância apresenta efeito gastroprotetor sobre a mucosa gástrica nas doses avaliadas. Estudos envolvendo, outros polifenóis, a exemplo do ácido elágico (BESERRA et al., 2011), quercetina (KAHRAMAN et al., 2003) e eugenol (SANTIN et al., 2011), exercem efeitos semelhantes corroborando assim com esses resultados.

O desenvolvimento e a extensão da lesão gástrica depende da natureza e concentração do agente agressor. Abrange ruptura da camada de mucosofosfolipídeo-bicarbonato, esfoliação da superfície epitelial, lesões nas células endoteliais microvasculares, danos vasculares, infiltrado inflamatório, edema e necrose na mucosa (TARNAWASKI; AHLUWALIA, 2013). Histologicamente, a úlcera gástrica é caracterizada por uma margem constituída pela borda

adjacente intacta que delimita a área de lesão apresentando o tecido necrosado (TARNAWASKI, 2010).

Na análise morfológica do tecido lesado por etanol e corado com hematoxilina e eosina, foi observado que os animais tratados com o ácido rosmarínico apresentaram uma redução nas lesões ulcerativas no epitélio gástrico, edema e exsudato inflamatório quando comparado ao grupo controle negativo (solução salina 0,9%), ratificando os resultados encontrados na análise macroscópica das lesões pela determinação da ALU. Resultados semelhantes foram encontrados para os compostos fenólicos diomina (ARAB et al., 2015) e resveratrol (SOLMAZ et al. 2009), o que corrobora com os resultados encontrados para o ácido rosmarínico.

Além disso, cortes da porção glandular dos estômagos obtidos a partir do modelo de úlcera induzida por etanol foram corados com PAS, com o objetivo de verificar a presença ou ausência de muco no interior das glândulas da mucosa gástrica na porção ulcerada (MCMANUS, 1964; NORDIN et L., 2014). Porém, não foi evidenciado secreção de mucopolissacarídeos no interior dessas glândulas na mucosa da região ulcerada dos animais tratados com o ácido rosmarínico. Esses resultados corroboram com o modelo de determinação de muco aderido a mucosa gástrica em que também não houve aumento na produção de muco.

A próxima etapa desse trabalho foi investigar o efeito do modelo de úlcera induzida por estresse por imobilização e frio em camundongos. Esse modelo mimetiza lesões agudas gástricas que podem aparecer na mucosa do estômago como consequência de trauma, cirurgia, sepse ou estilo de vida estressante (KWIECIEN; BRZOZOWSKI; KONTUREK, 2002; TARGOSZ et al., 2012), podendo se encontrar de forma difusa, na parede da mucosa do estômago, esôfago e intestino (JIA et al., 2007).

O estresse promove a ativação do sistema nervoso autônomo simpático (SNAS) e parassimpático (SNAP). A ativação do SNAS promove liberação de noradrenalina, a qual ativa receptores α_1 , induzindo vasoconstrição arteriolar, redução do fluxo sanguíneo, hipóxia local, isquemia e geração de espécies reativas de oxigênio que promovem peroxidação lipídica e redução dos níveis de glutathione (BANDYOPADHYAY, 1999). A estimulação parassimpática, leva a liberação de acetilcolina, que atua aumentando a motilidade gástrica e a

secreção ácida (ROBERT et al., 1989; LEVENSTEIN, 1998; SYAM et al.; 2009; MORSY, 2011). O aumento da secreção ácida e a diminuição da produção de muco e bicarbonato promovem aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio que inibe a síntese de prostaglandina no estômago (BAGCHI et al., 1999; ALQASOUMI et al., 2009).

Dentre os modelos de indução de úlcera por estresse, destaca-se o modelo de imobilização e frio, muito utilizado por apresentar resultados reprodutíveis e relevância clínica (SENAY; LEVINE, 1967; JIA et al., 2007).

O frio induz um aumento na produção de TRH por ativação do nervo vago, que por sua vez promove a liberação do hormônio estimulante da tireoide (TSH). O TSH aumenta a secreção ácida e induz a produção excessiva de radicais livres (NIIDAH; TAKEUCHI; OSABE, 1991; TANAKA et al., 2007). Além disso, a hipotermia reduz a produção e secreção de muco mediada pela histamina, promove hipóxia, aumento da motilidade gástrica e degranulação de mastócitos (TAKEUCHI et al., 1999; HIRUMA-LIMA et al., 2006; FILARETOVA et. al, 2007; RAO; VERMA, 2008).

Desta forma, o sistema neuro-imuno-endócrino está envolvido na formação de úlceras induzidas por estresse em animais. O estímulo do SNA ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e o estímulo do sistema termogênico do cérebro, esses modulam o sistema imune, desencadeando uma resposta inflamatória (TANAKA et al., 2007; FILARETOVA et., 2007).

No protocolo de úlcera gástrica induzida por estresse por imobilização e frio, o ácido rosmarínico reduziu de forma significativa as lesões ulcerativas sugerindo uma atividade gastroprotetora que poderá está relacionada a mecanismos antissecretório, já que o estresse induz aumento da secreção ácida e diminuição da secreção de muco e bicarbonato; mecanismo antioxidante, pois a imobilização e o frio induzem geração de ERO; e/ou citoprotetora, em virtude do modelo reduzir a produção de prostaglandina (ALQASOUMI et al., 2009).

Estudos realizados com outros polifenóis, como as protocianidinas (vitamina C e E) (OHTA et al., 2010) e o ácido elágico (MURAKAMI et al., 1991), apresentaram efeito gastroprotetor semelhante no modelo de úlcera induzida pelo estresse, o que corroboram com esses resultados.

Diante dos resultados, o próximo passo da pesquisa foi avaliar o efeito do ácido rosmarínico em modelo de indução de úlcera gástrica por anti-inflamatório não esteroide, utilizando como droga padrão o piroxicam (30 mg/kg).

Os AINEs são os agentes farmacológicos mais utilizados no tratamento da dor, inflamação e febre, porém, parte dos indivíduos que fazem uso desses medicamentos desenvolvem úlceras pépticas (SEVERI et al., 2009), de maneira particular, pacientes idosos e com comorbidades, que fazem uso contínuo desses medicamentos (NAJM, 2011).

Os AINEs apresentam uma ação tóxica local, pois ligam-se quimicamente a camada de células da mucosa gástrica, promovendo desestabilização dos fosfolípidos de membrana, aumento da permeabilidade, fluidez e formação de poros, o que leva a retrodifusão dos íons H^+ sobre o epitélio gástrico, com consequente dano gástrico a partir de processos de apoptose e necrose (SHOEN; VENDER, 1989; WALLACE, 2008; SOSTRES et al., 2010).

Em nível sistêmico os AINEs inibem as COXs, e portanto, a produção de prostaglandinas, o que compromete a produção de muco, bicarbonato e a regulação da secreção ácida. Como as COXs estão inibidas, o ácido araquidônico passa a ser substrato de outras enzimas, as lipo-oxigenases, que induzem a produção de LTB_4 o qual promove quimiotaxia de neutrófilos (SHIMOYAMA et al., 2013). Esses por sua vez, levam ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e radicais livres, como o peróxido de hidrogênio que ativa o fator nuclear kappa B ($NF-\kappa B$) que induz a liberação de mediadores inflamatórios como o $TNF-\alpha$ (CHATTOPADHYAY et al., 2006; WALLACE, 2008; BESERRA et al., 2011; SUSUKI et al., 2012).

Além disso, a inibição da COX-1 desencadeia complicações hemorrágicas, por reduzir os níveis de tromboxano (WALLACE, 2008). Enquanto, a inibição da COX-2 interfere na angiogênese e proliferação de células, o que promove um retardo no processo de cicatrização e restauração da integridade da mucosa (KONTUREK; KONTUREK; BRZOZOWSKI, 2005; SOSTRES et al., 2010).

Os AINEs também induzem danos a mucosa gástrica por meio de mecanismos independentes da inibição das COXs, a exemplo da inibição do

óxido nítrico (NO), sulfeto de hidrogênio (H₂S) e das poliaminas (putrescina, espermidina e espermina), que juntamente com as prostaglandinas (PGE₂ e PGI₂) mantém a integridade da mucosa e auxiliam no processo de reconstituição do tecido lesionado (OH et al., 2006; WALLACE, 2003; SAUNDERS et al., 2008).

Nesse contexto, no modelo de úlcera induzido pelo piroxicam (AINE), o ácido rosmarínico reduziu significativamente as lesões ulcerativas nas doses avaliadas, sugerindo que a atividade gastroprotetora promovida por ele pode estar relacionado a mecanismos citoprotetores e/ou antioxidantes. O ácido clorogênico (SHIMOYAMA et al., 2013), ácido elágico (BESERRA et al., 2011) e o eugenol (MORSY; FOUAD, 2008) são polifenóis que, no estudo relacionado, também apresentaram efeito gastroprotetor nesse modelo.

Na sequência a próxima etapa foi avaliar o efeito gastroprotetor sobre a mucosa gástrica após contensão do suco gástrico. Para isso foi utilizada a dose de 200 mg/kg do ácido rosmarínico, considerando que a partir desse modelo além do ILU, serão determinados parâmetros bioquímicos para inferir ou não a participação de mecanismos antissecretórios.

O modelo de úlcera induzida por ligadura de piloro mimetiza as principais queixas mencionadas na clínica referentes a transtornos gástricos, a exemplo da dispepsia, constipação crônica, gastrite e ulceração. Devido a baixa motilidade gástrica a secreção ácida permanece por mais tempo no estômago (BANSAL; GOEAL, 2012) o que leva a uma autodigestão da mucosa gástrica e resulta em ruptura da barreira da mucosa gástrica e formação de lesões ulcerativas no estômago (SHAY et al., 1945; GHARATE; KASTURE, 2013). Além disso, a ligadura de piloro estimula os mecanorreceptores na mucosa antral gástrica que ativam o reflexo vago-vagal, e consequentemente leva a ativação das vias colinérgicas, histaminérgicas e gastrinérgicas, aumentando a secreção ácida gástrica por meio de maior ativação da H⁺/K⁺-ATPase (BAGGIO; RIECK; MARQUES, 2003; ALQASOUMI et al., 2009; SCHUBERT, 2014). Assim, por meio desse modelo é possível observar alterações dos parâmetros bioquímicos relativos à secreção gástrica (FREITAS et al., 2011).

A ligadura do piloro altera a resistência da mucosa gástrica, os níveis de prostaglandina, citocinas, reduz as concentrações de GSH, o que ocasiona a

peroxidação lipídica (SINGH et al., 2008; MUTHURAMAN; SOOD, 2010). Além disso, é também observado o aumento dos níveis de Ca^{2+} e isso possibilita a geração de radicais livres, que aumentam os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), a atividade da mieloperoxidase (MPO) e reduz os níveis de GSH (LUTNICKI et al., 2006; MUTHURAMAN; SOOD, 2010).

Nesse modelo, o ácido rosmarínico, quando administrado por via oral ou por via intraduodenal (200 mg/kg) reduziu significativamente o ILU, quando comparado ao grupo controle negativo (solução salina 0,9%), o que pode sugerir que o ácido rosmarínico apresenta tanto atividade local como sistêmica. Resultados semelhantes foi encontrado em estudos desenvolvidos com flavonoides glicosídeos obtidos do extrato acetônico da *Oroxylum indicum* Vent. quando administrados por via oral (BABU et al., 2010) e extrato aquoso das sementes de *Coriandrum sativum* L., rico em polifenóis, quando administrado intraduodenalmente (AL-MOFLEH et al., 2006).

A partir dos resultados obtidos nos diferentes modelos experimentais avaliados e do efeito gastroprotetor promissor do ácido rosmarínico, o próximo passo foi elucidar os prováveis mecanismos de ação envolvidos nessa gastroproteção.

Desse modo, o próximo passo foi avaliar a atividade antissecretória gástrica, a partir da avaliação de parâmetros bioquímicos (pH, concentração de íons H^+ e volume do suco gástrico), obtidos a partir do modelo de úlceras induzidas por ligadura do piloro, pelas vias intraduodenal e oral.

De acordo com os resultados, o ácido rosmarínico não alterou os parâmetros bioquímicos (como pH, concentração de íons H^+ e volume do suco gástrico) determinados a partir do conteúdo gástrico, quando comparado ao grupo controle (solução salina 0,9%). Com isso é possível inferir que a atividade gastroprotetora do ácido rosmarínico nas condições avaliadas não está relacionada a atividade antissecretória. Corroboram com esses dados, estudos realizados com o eugenol (SANTIN et al., 2010) e ácido clorogênico (SHIMOYAMA et al., 2013) administrados intraduodenalmente e com o extrato fenólico da *Malus domestica* Borkh que não altera a secreção gástrica quando administrada por via oral (D'ARGÊNIO et al., 2008).

Considerando que o efeito gastroprotetor do ácido rosmarínico parece não está relacionado ao efeito antissecretório ou neutralizante, o próximo

passo foi investigar a participação do mecanismo citoprotetor. Nessa perspectiva se investigou a participação de grupamentos sulfidrílica, do óxido nítrico, muco e prostaglandina na gastroproteção

Os compostos não proteicos sulfidrílicos (NP-SH) endógenos auxiliam na manutenção da integridade da barreira de muco, a partir da formação de pontes dissulfeto entre suas subunidades. O NP-SH reduz a solubilidade do muco, conferindo uma maior estabilidade do mesmo (AVILA et al., 1996; ROZZA et al., 2013). Além disso, o NP-SH, principalmente o GSH, controla a cascata inflamatória de citocinas, promove a desintoxicação e excreção de ROS produzida por agentes agressores como etanol, indometacina e estresse, tendo assim um importante papel na manutenção da integridade gástrica (NAGY et al., 2007; BESERRA et al., 2011). Quando ocorre um desbalanço entre os fatores defensivos e agressivos da mucosa, devido a presença de agente lesivos, ocorre a redução da concentração de compostos NP-SH, em especial da GSH, um dos principais tióis existentes na mucosa gástrica com consequente aumento dos danos a mucosa (SZABO; VATTAY, 1990; FERREIRA et al., 2008).

No modelo de úlcera induzido por etanol absoluto, na ausência e na presença de N-Etilmaleimida (NEM), um bloqueador dos compostos sulfidrílicos foi observado que na presença do NEM ocorreu a redução do efeito gastroprotetor do ácido rosmarínico em comparação ao efeito dessa substância na ausência desse bloqueador. Isso sugere que existe a participação dos grupamentos sulfidrílica nesse efeito gastroprotetor. Santin e colaboradores (2011) demonstraram que a gastroproteção do polifenol eugenol também envolve a participação dos grupamentos sulfidrílicos em úlcera induzida por etanol.

O óxido nítrico é uma molécula implicada nos mecanismos que controlam a integridade do epitélio gástrico, por regular o fluxo sanguíneo gástrico a partir da vasodilatação dos vasos (CALVO et al., 2007). É sintetizado a partir da conversão da L-arginina em L-citrulina, pela ação da enzima sintase do óxido nítrico (NOS) (NISHIO et al., 2006; ROVERE-QUERINI; CLEMENTI; BRUNELLI, 2014). O NO está envolvido na motilidade gastrintestinal, atua como agente citoprotetor estimulando a secreção de muco gástrico, como anti-inflamatório e está envolvido nos efeitos protetores das prostaglandinas na

mucosa (CHELO et al., 1998; BRZOZOWSKI et al., 2008; SOBHIAN et al., 2011).

O NO sintetizado pela cNOS está envolvido na gastroproteção, sendo relacionado a defesa e reparo tecidual, enquanto o produzido pela iNOS está relacionado a mecanismos pró-ulcerogênicos (NISHIO et al., 2006; ROVERE-QUERINI; CLEMENTI; BRUNELLI, 2014).

O aumento nos níveis de NO reduz a produção de radicais livres, assim na presença de agentes lesivos como o etanol, o dano é menor, pois o NO protege a mucosa da ação dos radicais livres (KOCHAR et al., 2011).

No modelo de úlcera induzido por etanol em ratos, na presença do L-N-G-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME, inibidor da enzima NOS) foi observado que não ocorreu alteração do efeito gastroprotetor do ácido rosmarínico na presença do L-NAME quando comparado ao grupo sem L-NAME. Com isso é possível inferir que o óxido nítrico não está envolvido na gastroproteção promovido pelo ácido rosmarínico. Estudo realizado por Santin e colaboradores (2011) demonstrou que o eugenol apresenta um comportamento semelhante ao ácido rosmarínico.

O muco faz parte da primeira linha de defesa da mucosa gástrica, forma uma barreira semelhante a um gel contínuo que reveste toda a mucosa gástrica, mantendo um pH de 6-7 sobre a superfície da mucosa em meio ao lúmen gástrico ácido (ALLEN; FLEMSTROM, 2005; RAMSAY; AARON, 2011). O muco tem como principais características a viscosidade e aderência, que impedem a retrodifusão dos íons H^+ e promove a neutralização desses íons (MARTINS et al., 2014; ZACARIA et al., 2014). Além disso, a quantidade ou a espessura da camada de muco que recobre a camada epitelial influencia na gastroproteção (KERSS; ALLEN; GARNER, 1982; PENISSI; PIEZZI, 1999).

O muco atua como agente antioxidante protegendo a mucosa gástrica dos danos mediados pelas ERO (ARAWWAWALA; ARAMBEWELA; RATNASOORIYA, 2014), além de impedir a autodigestão do tecido pela pepsina (SILEN, 1993; RAMSAY; AARON, 2011). Ele funciona também como uma barreira para as bactérias não deixando que as mesmas atinjam o epitélio e age como lubrificante durante o peristaltismo, diminuindo os possíveis danos mecânicos (MARTINS et al., 2014).

A produção e liberação de muco é estimulada pelo sistema colinérgico, por intermédio das prostaglandinas citoprotetoras, por hormônios gastrintestinais (gastrina e secretina) e pelo NO que aumenta a concentração de mucina quando a GMPc é ativada (RAMSAY; CARR, 2011; MORSY et al., 2012).

No experimento realizado com o ácido rosmarínico em modelo de quantificação de muco foi observado que ele não produziu o aumento da produção de muco quando comparado ao controle negativo. Enquanto, a carbenoxolona (controle positivo) induziu o aumento de muco, comportamento já esperado por seu efeito gastroprotetor. Assim, a ação gastroprotetora do ácido rosmarínico não está relacionado ao aumento da produção de muco, um fator relacionado a citoproteção da mucosa gástrica. Corroboram com esse resultado os obtidos por Beserra e colaboradores (2011) para o ácido elágico, que também não induziu a produção de muco.

A manutenção da homeostase da mucosa gástrica depende da geração contínua de prostaglandina E_2 (PGE_2) e prostaciclina (PGI_2) (VERA-ARZAVE et al., 2012). Estas PGs protegem o epitélio gástrico aumentando a secreção de muco e bicarbonato, reduzindo a migração de leucócitos, mantendo o fluxo sanguíneo para a mucosa e aumentando a resistência das células epiteliais promovendo a defesa da integridade gástrica (WALLACE, 2008, BESERRA et al., 2011). A inibição das COXs pelos AINEs leva ao aumento da secreção ácida, desregulação na resposta inflamatória, recrutamento e adesão endotelial dos neutrófilos e ao estresse oxidativo (WALLACE, 2008).

Para avaliar a participação das prostaglandinas no efeito gastroprotetor do ácido rosmarínico, foi realizado o modelo de úlcera induzido por etanol em ratos pré-tratados com indometacina (v.o), um inibidor não seletivo da COX. No grupo pré-tratado com solução salina foi observado uma redução do ALU pelo ácido rosmarínico. Entretanto, no grupo pré-tratado com indometacina, o efeito gastroprotetor foi mantido o que sugere que a gastroproteção produzida pelo ácido rosmarínico não envolve a participação das prostaglandinas. Resultados semelhantes foram encontrados para outros compostos fenólicos, ácido elágico (BESERRA et al., 2011) e o ácido clorogênico (SHIMOYAMA et al., 2013).

A próxima etapa foi avaliar se a atividade gastroprotetora está relacionada a mecanismos antioxidantes a partir do homogenato de tecido gástrico obtido também do modelo de úlcera induzido por etanol.

Os radicais livres podem ser obtidos de fontes internas e externas, sendo sua produção excessiva a causa de diversas doenças, a exemplo da úlcera gástrica (LOBO et al., 2010).

No TGI, processos irritantes e inflamatórios, resultantes da ação de agentes lesivos como o etanol sobre a mucosa gástrica, tendem a gerar EROS como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (KINJO, 2008; SUZUKI et al., 2012).

Para se estabilizarem os radicais livres necessitam doar ou receber elétrons de outras moléculas, a exemplo dos lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas o que resulta em dano celular (PHAM-HUY, HE; PHAM-HUY, 2008; LOBO et al., 2010). Contudo, o organismo possui um sistema de defesa antioxidante que se subdivide em enzimático e não enzimático (BURTON et al., 2010).

Dentro do sistema não enzimático está a glutathiona reduzida (GSH). A GSH é um peptídeo que contém grupamentos tióis e se constitui como a principal linha de defesa celular contra danos oxidativos (ROSS, 1988; SOLMAZ et al., 2009). Em uma situação de estresse oxidativo, o GSH sofre a ação da glutathiona peroxidase durante a eliminação do H_2O_2 e a quantidade de GSH intracelular é rapidamente reduzida (YOUSUF et al., 2009; SOLMAZ et al., 2009).

No doseamento dos níveis de GSH em homogenato de estômago de animais tratados com o ácido rosmarínico em modelo de úlcera induzida por etanol, foi verificado o aumento significativo dos níveis da glutathiona reduzida quando comparado ao controle negativo. Esse resultado está em concordância aos resultados obtidos na avaliação dos grupamentos sulfidril. Portanto, esses resultados sugerem que a atividade gastroprotetora do ácido rosmarínico está relacionada ao seu efeito antioxidante. Estudos com os polifenóis curcumina (SWARNAKAR et al., 2005), resveratrol (SOLMAZ et al., 2009) e ácido clorogênico (SHIMOYAMA et al., 2013) apresentaram resultados semelhantes ao ácido rosmarínico.

Além da atividade antioxidante também foi avaliada a atividade imunoregulatória do ácido rosmarínico a partir da dosagem de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10) a partir de estômagos obtidos do modelo de úlcera induzida por etanol.

Durante o processo inflamatório, leucócitos, células endoteliais e macrófagos são ativados e passam a produzir e liberar citocinas pró-inflamatórias, a exemplo da IL-1 β , IL-6 e TNF- α e citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10. Essas células também produzem enzimas pró-inflamatórias, a iNOS e COX, que são responsáveis por aumentar os níveis de NO e PGE₂, respectivamente (OCAÑA-FUENTES et al., 2010).

A IL-1 β é secretado e circula sistematicamente, sendo produzida por monócitos e macrófagos, e atuam na amplificação da mensagem de dano para outras partes do corpo e outras células que não são capazes de reconhecer a presença do agente lesivo, na ativação da imunidade inata e como uma ponte entre a resposta inata e adaptativa (DINARELLO, 1996; SIMS; SMITH, 2010).

O TNF- α é uma potente citocina pró-inflamatória que possui um papel importante em diversos eventos celulares como proliferação, diferenciação e apoptose (TRACEY; CERAMI, 1993; MOON et al. 2009).

A IL-1 β e o TNF- α no dano gástrico aumentam a permeabilidade vascular, o recrutamento de neutrófilos e aumento da geração de ERO (KWIECIEN; BRZOZOWSKI; KONTUREK, 2002; KWIECIEN; KONTUREK; SLIWOWSKI, 2012; TARGOSZ et al., 2012).

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que regula e reprime a expressão de citocinas pró-inflamatórias em respostas imunológicas inatas e adaptativas. Essa citocina promove diversos mecanismos de defesa especialmente nas células epiteliais para limitar o dano pela infecção viral e bacteriana. Facilita o processo de cicatrização de injúrias causadas por infecção e inflamação, reprime respostas pró-inflamatórias e limita a ruptura do tecido causado pela inflamação (OUYANG et al., 2011).

No modelo de úlcera induzida por etanol, a dosagem de citocinas a partir do doseamento do homogenato de estômago demonstrou uma redução dos níveis de IL-1 β e TNF- α quando comparado ao grupo controle negativo (solução salina 0,9%) e aumento dos níveis da IL-10 quando comparada ao

grupo controle negativo. Entretanto, esse aumento se dá para os níveis basais, demonstrando que o ácido rosmarínico apresenta efeito anti-inflamatório no estômago durante a úlcera gástrica. Outros compostos fenólicos também apresentam efeito anti-inflamatório na mucosa ulcerada, a exemplo do ácido elágico (BESERRA et al., 2011) que também reduz os níveis de TNF- α e IL-1 β no modelo avaliado. Enquanto, o infuso da *Buddleja scordioides*, rico em compostos fenólicos, mantém os níveis de IL-10 (DÍAZ-RIVAS et al., 2015), corroborando com os resultados obtidos para o ácido rosmarínico.

Com base nos resultados obtidos, foi possível constatar que o ácido rosmarínico apresenta um promissor efeito gastroprotetor, relacionado a mecanismos antioxidantes e imunorregulatórios, nas condições avaliadas. No entanto, se faz necessário investigar novos mecanismos de ação envolvidos nessa gastroproteção.

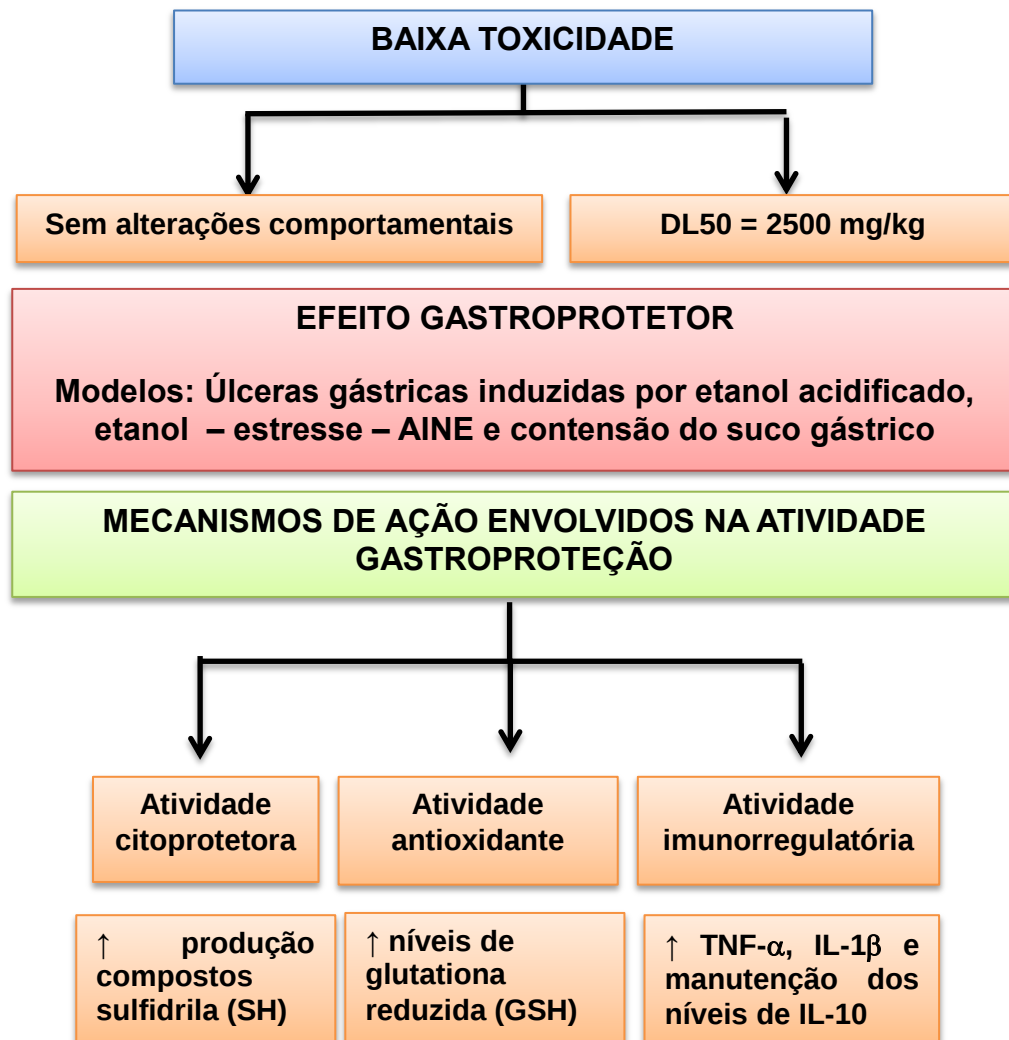
Conclusão

6. CONCLUSÃO

Com base na análise dos resultados obtidos a partir da avaliação do efeito gastroprotetor do ácido rosmarínico de indução aguda de úlcera é possível concluir que:

- ✓ O ácido rosmarínico possui baixa toxicidade aguda pré-clínica nas condições e parâmetros avaliados;
- ✓ O ácido rosmarínico apresenta atividade gastroprotetora frente a modelos de indução aguda de úlcera por agentes lesivos clássicos;
- ✓ O efeito gastroprotetor do ácido rosmarínico não envolve mecanismos antissecretórios;
- ✓ O efeito citoprotetor do ácido rosmarínico envolve a participação dos compostos sulfidrílicos;
- ✓ A atividade gastroprotetora exercida pelo ácido rosmarínico não envolve a participação do óxido nítrico, muco e de prostaglandinas;
- ✓ Que o efeito gastroprotetor do ácido rosmarínico está relacionado a mecanismos antioxidantes e imunorregulatórios.

Figura 18. Representação esquemática dos resultados obtivos a partir da avaliação da toxicidade aguda e do efeito gastroprotetor do ácido rosmarínico em modelos animais



Perspectivas

7. PERSPECTIVAS

Tendo como base a baixa toxicidade e a atividade gastroprotetora do ácido rosmarínico se faz necessário um estudo de continuidade dessa substância, como segue abaixo:

- ✓ Realizar estudo de toxicidade com doses repetidas;
- ✓ Investigar por meio do modelo crônico de indução de úlceras por ácido acético o efeito cicatrizante do ácido rosmarínico, bem como avaliar os fatores envolvidos no processo de cicatrização da úlcera, a partir da análise histológica, imunohistoquímica e contagem de células totais das amostras do estômago;
- ✓ Avaliar por meio do modelo de isquemia e reperfusão o mecanismo antioxidante envolvido na gastroproteção do ácido rosmarínico, através da determinação do malondialdeído (MDA) e da atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e óxido nítrico sintase;
- ✓ Investigar em modelo de úlcera duodenal induzida por cisteamina o efeito antiulcerogênico e análise histológica do ácido rosmarínico;
- ✓ Avaliar em processo inflamatório intestinal induzido por trinitrobenzenosulfônico (TNBS) na fase aguda e crônica com recidiva em ratos o efeito do ácido rosmarínico, além de realizar os ensaios bioquímicos: Determinação do malondialdeído (MDA); dosagem de GSH; atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e óxido nítrico sintase;
- ✓ Avaliar as amostras do cólon provenientes do modelo de retocolite ulcerativa, por meio da análise histológica e imunohistoquímica;
- ✓ Realizar os modelos de esvaziamento gástrico, trânsito intestinal e diarreia para avaliar o efeito do ácido rosmarínico na motilidade gastrintestinal.

Referências

8. REFERÊNCIAS

ABBAS, ABUL K. Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico. 4. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2013.

AGRA, M.F.; BARACHO, G.S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I.J.L.D.; COELHO, V.P.M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p.383-395, 2007.

AIT-OUFELLA, H.; TALEB, S.; MALLAT, Z.; TEDGUI, A. Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 28, p. 969-979, 2015.

ALLEN, A.; FLEMSTROM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **American Journal of Physiology**, v. 288, p. 1-19, 2005.

ALMEIDA, R.N.; FALCÃO, A.C.G.M.; DINIZ, R.S.T.; QUINTANAS-JÚNIOR, L.J.; POLARI, R.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C.D.; ANTONIOLLI, A.R.; ARAÚJO, C.C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 80, p. 72-76, 1999.

AL-MOFLEH, L.A.; ALHAIDER, A.A.; MOSSA, J.S.; AL-SOHAIBANI, M.O.; RAFATULLAH, S.; QURESHI, S. Protection of gastric mucosal damage by *Coriandrum sativum* L. pre treatment in Wistar albino rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 22, n. 1, p.64-69, 2006.

ALQASOUMI, S.; AL-SOHAIBANI, M.; AL-HOWIRINY, T.; AL-YAHYA, M.; RAFATULLAH, S. Rocket *Eruca sativa*: a salad herb with potential gastric anti-ulcer activity. **World Journal Gastroenterology**, v. 15, p. 1958-1965, 2009.

ALRASHDI, A.S.; SALAMA, S.M.; ALKIYUMI, S.S.; ABDULLA, M.A.; HADI, A.H.A.; ABDELWAHAB, S.I.; TAHA, M.M.; HUSSIANI, J.; ASYKIN, N. Mechanisms of Gastroprotective Effects of Ethanolic Leaf Extract of *Jasminum*

sambac against HCl/Ethanol-Induced Gastric Mucosal Injury in Rats. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p.1-15, 2012.

AMARAL, G.P.; CARVALHO, N.R.; BARCELOS, R.P.; DOBRACHINSKI, R.P.B.F.; PORTELLA, R.L.; SILVA, M.H.; LUGOKENSKI, T.H.; DIAS, G.R.M.; LUZ, S.C.A.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L.; VILLETTI, M.A.; SOARES, F.A.A.S.; NETTO, R.F. Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. in gastric ulcer prevention induced by ethanol in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p.48-55, 2013.

ANTONISAMY, P.; DHANASEKARAN, M.; IGNACIMUTHU, S.; DURAIPANDIYAN, V.; BALTHAZAR, J. D.; AGASTIAN, P.; KIM, J.H. Gastroprotective effect of epoxy clerodane diterpene isolated from *Tinospora cordifolia* Miers (Guduchi) on indomethacin-induced gastric ulcer in rats, **Phytomedicine**, p. 1-2, 2014.

ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M.; KANESHIMA, E. N.; GABRIEL, M.; AUDI, E. A.; MARQUES, L. C.; MELLO, J. C P. Acute and subchronic toxicological evaluation of the semipurified extract of seeds of guaraná (*Paullinia cupana*) in rodents. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1817-1820, 2010.

ARAB, H.H.; SALAMA, S.A.; OMAR, H.A.; ARAFA, E.A.; MAGHRABI, I.A. Diosmin protects against ethanol-induced gastric injury in rats: novel anti-ulcer actions. **Plos one**, v. 10, n. 3, p. 1-15, 2015.

ARISAWA, T.; SHIBATA, T.; KAMIYA, Y.; NAGASAKA, M.; NAKAMURA, M.; FUJITA, H.; ARAWWAWALA, L. D. A. M.; ARAMBEWELA, L. S. R.; RATNASOORIYA, W. D. Gastroprotective effect of *Piper betle* Linn. leaves grown in Sri Lanka. **Journal Ayurveda and Integrative Medicine**, v. 5, p.38-42, 2014.

AVILA, J.R.; ALARCÓN DE LA LASTRA, C.; MARTÍN, M.J.; MOTILVA, V.; LUQUE, L.; DELGADO, D.; ESTEBAN, J.; HERREIRAS, J. Role of endogenous sulphhydryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. **Inflammation Research**, v. 45, p. 83–88, 1996.

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.

AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. Disponível em: <https://www.avma.org/kb/policies/documents/euthanasia.pdf>. Acessado em maio de 2014.

BABU, T.B.; MANJULATHA, K.; KUMAR, G.S.; HYMAVATHI, A.; TIWARI, A.K.; PUROHIT, M.; RAO, J.M.; BABU, K.S. Gastroprotective flavonoid constituents from *Oroxylum indicum* Vent. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 1, p.117-120, 2010.

BAGCHI, M.; MILNES, M.; WILLIAMS, C.; BALMOORI, J.; STOHS, Y.X., BAGCHI, D. Acute and chronic stress-induced oxidative gastrointestinal injury in rats, and the protective ability of a novel grape seed proanthocyanidin extract. **Nutrition Research**, v. 19, p. 1189-1199, 1999.

BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; RIECK, L.; MARQUES, M.C.A. Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC in rats. **Pharmacological research**, v. 47, p. 93-98, 2003.

BALAN, T.; SANI, M. H.M.; AHMAD, S.H.M.; SUPPAIAH, V.; MOHTARRUDIN, N.; ZAKARIA, Z.A. Antioxidant and anti-inflammatory activities contribute to the prophylactic effect of semi-purified fractions obtained from the crude methanol extract of *Muntingia calabura* leaves against gastric ulceration in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 164, p. 1-15, 2015.

BANDYOPADHYAY, U.; DAS, D.; BANDYOPADHYAY, D.; BHATTACHARJEE, M.; BANERJEE, R. K. Role of reactive oxygen species in mercapto methyl imidazole-induced gastric acid secretion and stress-induced gastric ulceration. **Current Science**, v. 76, n.1, p. 55-63, 1999.

BANSAL, V.K; GOEL, R.K. Gastroprotective effect of *Acacia nilotica* young seedless pod extract: role of polyphenolic constituents. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 523-528, 2012.

BARBOSA, K. D. N.; OLIVEIRA, C. G.; SILVA, R. C. avaliação da qualidade de plantas Medicinais Comercializadas na Cidade de Anápolis-GO. **Anuário da Produção de Iniciação Científica Discente**, v. 13, p. 47-56, 2010.

BARKUN, A.; LEONTIADIS, G. Systematic review of the symptom burden, quality of life impairment and costs associated with peptic ulcer disease. **The American Journal of Medicine**, v. 123, p. 358-366, 2010.

BARWELL, J.; WOOLLEY, M. J.; WHEATLEY, M. CONNER, A. C.; POYNER, D. R. The role of extracellular loops of the CGRP receptor, a family B GPCR. **Biochemical Society Transactions**, v. 40, p. 433-437, 2012.

BATISTA, L. M.; ALMEIDA, A. B. A.; MAGRI, L. P.; TOMA, W.; CALVO, T. C.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A. R. M. Gastric antiulcer activity of *Syngonanthus arthrotrichus* SILVEIRA. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p. 328-332, 2004.

BATISTA, L. M.; ALMEIDA, A. B. A.; LIMA, G. R. M.; FALCÃO, H. S.; FERREIRA, A. L.; MAGRI, L. P.; COELHO, R. G.; CALVO, T. R.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. M. S. Gastroprotective effect of the ethanolic extract and fractions obtained from *Syngonanthus bisulcatus* Rul. **Records of Natural Products**, v. 7, n.1, p. 35-44, 2013.

BATISTA, L. M.; ALMEIDA, A. B. A.; LIMA, G. R. M.; FALCÃO, H. S.; MAGRI, L. P.; FERREIRA, A. L.; SANTOS, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. M. S. Gastroprotective effects (in rodents) of a flavonoid rich fraction obtained from *Syngonanthus macrolepis*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, p. 445-452, 2013.

BATISTA, L.M; LIMA, G.R.M; ALMEIDA, A.B.A; MAGRI, L.P; CALVO, T.R.; FERREIRA, A.L.; PELLIZZON, C.H; HIRUMA-LIMA, C.A; VILEGAS, W.; SANO,P.T; BRITO, A.R.M.S. Ulcer healing and mechanism(s) of action involved in the gastroprotective activity of fractions obtained from *Syngonanthus arthrotrichus* and *Syngonanthus bisulcatus*. **Biomed Central**, v. 15, N.1, P.391-400, 2015.

BAUER, B.; WEX, T.; KUESTER D.; MEYER T.; Malferttheiner, P. Differential expression of human β defensin 2 and 3 in gastric mucosa of *H. pylori*-infected individuals. **Helicobacter**, v. 18, p. 6-12, 2013.

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

BERI, C.L.; SOOD, R.; HEMRAJ; GUPTA, A. Stomach specific mucoadhesive microspheres as controlled drug delivery system-a review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.5, n.2, p. 21-26, 2013.

BERRIDGE, M.J. Cell Signalling Biology—Module 7. 2012, 12–24, doi:10.1042/csb0001007. Available online: <http://www.cellsignallingbiology.org> (accessed on 01 December 2015)

BESERRA, A.M.S.S.; CALEGARI, P.I.; SOUZA, M.C.; SANTOS, R.A.N.; LIMA, J.C.S.; SILVA, R.M.; BALOGUN, S.O.; MARTINS, D.T.O. Gastroprotective and ulcer-healing mechanisms of ellagic acid in experimental rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 6957-5965, 2011.

BLASER, M.J. Not all *Helicobacter pylori* strains are created equal. Should all be eliminated? **Lancet**, v. 349, p. 1020-1022, 1997.

BOLTIN, D.; NIV, Y. Pharmacological and alimentary alteration of the gastric barrier. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 28, p. 981-994, 2014.

BOTTING, R.M. Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 57, p. 113-124, 2006.

BRANCATI, S. B.; ZADORI, Z. S.; NEMETH, J.; GYIRES, K. Substance P induces gastric mucosal protection at supraspinal level via increasing the level of endomorphin-2 in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 91, p. 38-45, 2013.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

BRUTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman. 12. ed. Porto Alegre: **AGMH**, 2012.

BRZOZOWSKI, T.; KWIECIEŃ, S.; KONTUREK, P.C.; KONTUREK, S.J.; PTAK, A.; MITIS-MUSIOŁ, M.; DUDA, A.; BIELAŃSKI, W.; HAHN, E.G. Comparison of nitric oxide-releasing NSAID and vitamin C with classic NSAID in healing of chronic gastric ulcers; involvement of reactive oxygen species. **Medical Science Monitor**, v. 7, p.592–599, 2001.

BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P.C.; PAJDO, R.; PTAK-BELOWSKA, A.; KWIECIEŃ, S.; PAWLIK, M.; DROZDOWICZ, D.; SLIWOWSKI, Z.; BRZOZOWSKI, B.; KONTUREK, S.J.; PAWLIK, W.W. Physiological mediators in nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)-induced impairment of gastric mucosal defense and adaptation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 59, p. 89-102, 2008.

BRZOZOWSKI, T.; DROZDOWICZ, D.; KONTUREK, S. J.; KORBUT, R.; KRZYSIEK-MACZKA, G.; KWIECIEŃ, S.; OLSZANECKI, R.; PAJDO, R.; PTAK-BELOWSKA, A.; STRZALKO, M.; PAWLIK, W. W. Novel concept in the mechanism of injury and protection of gastric mucosa: role of rennin-angiotensin system and active metabolites of angiotensin. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 55-62, 2012.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. **The Journal of Lipid Research**, v. 50, p. 237–242, 2009.

BURTON, G.J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v.25, p. 287-299, 2011.

BUTLER, M.S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, v. 25, n. 3, p.475-516, 2008.

CALVO, T.R.; LIMA, Z.P.; SILVA, J.S.; BALLESTEROS, K.V.R.; PELLIZZON, C.H.; HIRUMA-LIMA, C.A.; TAMASHIRO, J.; BRITO, A.R.M.S.; TAKAHIRA, R.K.; VILEGAS, W. Constituents and antiulcer effect of *Alchornea glandulosa*: activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n.3, p. 451-459, 2007.

CAMPBELL, I. Gut motility and its control. **Anesthesia and intensive case medicine**, v. 16, p. 40-43, 2014.

CARLI, D.M.; PIRES, R.C.; ROHDE, S.L.; KAVALCO, C.M.; FAGUNDES, R.B. Peptic ulcer frequency differences related to *H. pylori* or AINES. **Arquivos de Gastroenterologia**. v.52, n.1, p.46-49, 2015.

CASTRO, L. P.; COELHO, L. G. V.; VIEIRA, W. L. S. V.; RODRIGUES, M. A. G. Úlcera péptica gastroduodenal. **Tratado Clínica Médica**. 2ª ed. São Paulo: Ed. Roca, 2009.

CHATTOPADHYAY, I.; BANDYOPADHYAY, U.; BISWAS, K.; MAITY, P.; BANERJEE, R.K. Indomethacin inactivates gastric peroxidase to induced reactive oxygen mediated gastric mucosal injury and curcumin protects it by preventing peroxidase inactivation and scavenging reactive oxygen. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, p. 1397-1408, 2006.

CHELO, M.; MASTROROBERTO, P.; MARCHESE, A.R.; MALTESE, G.; SANTAGELO, E.; AMANTEA, B. Nitric oxide inhibits neutrophil adhesion during experimental extracorporeal circulation. **Anesthesiology**, v. 89, p. 443-448, 1998.

CHEN, H.; LIAO, H.; LIU, Y.; ZHENG, Y.; WU, X.; SU, Z. ZHANG, X.; LAI, Z.; LAI, X.; LIN, Z.X.; SU, Z. Protective effects of pogostone from *Pogostemonis Herba* against ethanol-induced gastric ulcer in rats. **Fitoterapia**, v. 100, p. 110-117, 2015.

CHOI, S.R.; LEE, S.A.; KIM, Y.J.; OK, C.Y.; LEE, H.J.; HAHM, K.B. Role of heat shock proteins in gastric inflammation and ulcer healing. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 60, p. 5-17, 2009.

CHU, S.; SCHUBERT, M. L. Gastric secretion, **Co-gastroenterology**, v. 28, n. 6, 2012.

CHU, X.; CI, X.; HE, J.; JIANG, L.; WEI, M.; CAO, Q.; GUAN, M.; XIE, X.; DENG, X.; HE, J. Effects of a natural prolyl oligopeptidase inhibitor, rosmarinic

acid, on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **Molecules**, v. 17, p. 3586–3598, 2012.

CRAGG, G. M., NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 174-181, 2012.

D'ARGENIO, G.; MAZZONE, G.; TUCCILLO, C.; GRANDONE, I.; GRAVINA, A.G.; GRAZIANI, G.; FOGLIANO, V.; ROMANO, M. Apple polyphenol extracts prevent aspirin-induced damage to the rat gastric mucosa. **British Journal of Nutrition**, v. 100, n. 06, p.1228-1236, 2008.

DEFONESKA, A.; KAUNITZ, J. D. Gastroduodenal mucosal defense, **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 26, p. 604-610, 2010.

DE JESUS, N.Z.T.; FALCÃO, H.S.; LIMA, G.R; CALDAS FILHO, M.R.D.; SALES; I.R.P.; GOMES, I.F.; SANTOS, S.G.; TAVARES, J.F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; BATISTA, L.M. *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae), a medicinal plant protects the stomach against several gastric ulcer models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 12, n. 150, p. 982-988, 2013.

DEMMA, J.; GEBRE-MARIAM, T.; ASRES, K.; EVGETIE, W.; ENGINDAWORK, E. Toxicology study on *Glinus lotoides*: a traditionally used technical herb in Ethiopia, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 451-457, 2006.

DE PALMA, C.; CLEMENTI, E. Nitric oxide in myogenesis and therapeutic muscle repair, **Molecular Neurobiology**, v. 46, 682-692, 2012.

DÍAZ-RIVAS, J.O.; HERRERA-CARRERA, E.; GALLEGOS-INFANTE, J.A.; ROCHA-GUZMÁN, N.E.; GONZÁLEZ-LAREDO, R.F.; MORENO-JIMÉNES, M.R.; RAMOS-GÓMEZ, M.; REYOSO-CAMACHO, R.; LARROSA-PÉREZ, M.; GALLEGOS-CORONA, M.A. Gastroprotective potencial of *Buddleja sordioides* Kunth Scrophulariaceae and inflammation markers in an in vivo model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 169, p. 280-286, 2015.

DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin -1 family. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 519–550, 2009.

DING, A.; NATHAN, C.P.; STUEHR, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediate from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **Journal of Immunology**, v. 141, p. 2407–2412, 1998.

DOMITROVIC, R.; SKODA, M.; MARCHESI, V. V.; CVIJANOVIC, O.; PUGEL, E. P.; SETEFAN, M. B. Rosmarinic acid ameliorates acute liver damage and fibrogenesis in carbon tetrachloride-intoxicated mice, **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 370-378, 2013.

DUBEYKOVSKAYA, Z.; DUBEYKOVSKIY, A.; SOLAL-COHEN, J.; WANG, T.C. Secreted trefoil factor 2 activates the CXCR4 receptor in epithelial and lymphocytic cancer cell lines. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 6, 2009.

DURHAM, P.L.; VAUSE, C.V. CGRP receptor antagonists in the treatment of migraine. **CNS drugs**, v. 24, p. 539-548, 2010.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 308-323, 2007.

ERIKSSON, C.J.P. The role of acetaldehyde in the actions of alcohol. **Alcohol: Clinical and Experimental Research**, v. 25, p. 15-32, 2001.

FALCÃO, H. S. Mecanismos de ação referentes à atividade antiulcerogênica das fases clorofórmica e acetato de etila obtidas de *Praxelis clematidea* (Griseb.) R. M. King & H. Robinson (Asteraceae). Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, 2011.

FALLARINI, S.; MIGLIO, G.; PAOLETTI, T.; MINASSI, A.; AMORUSO, A.; BARDELLI, C. BRUNELLESCHI, S.; LOMBARDI, G. Clovamide and rosmarinic

acid induce neuroprotective effects in in vitro models of neuronal death. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 6, p.1072-1084, 2009.

FARFÁN LABONNE, B. E.; GUTIÉRREZ, M.; GÓMEZ-QUIROZ, L. E.; KONIGSBERG FAINSTEIN, M.; BUCIO, L.; SOUZA, V.; FLORES, O.; ORTÍZ, V.; HERNÁNDEZ, E.; KERSHENOBICH, D.; GUTIÉRREZ-RUÍZ, M. C. Acetaldehyde-induced mitochondrial dysfunctionsensitizes hepatocytes to oxidative damage. **Cell Biology Toxicology**, v. 25, P. 599-609, 2009.

FARZAEI, M. H.; ABDOLLAHI, M.; RAHIMI, R. Role of dietary polyphenols in the management of peptic ulcer. **World Journal of Gastroenterology**. v. 7,n. 21, 6499-6617, 2015.

FAURE, P.; LAFOND, J.L. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. **Birkhäuser Basel**, p. 237-248, 1995.

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DE GASTROENTEROLOGIA. **Úlceras pépticas**. Disponível em: <http://www.fbg.org.br/Textos.asp?Codigo=194>. Acesso em: 27 de dezembro 2015.

FEHER, J. The stomach, **Quantitative human physiology**, p. 701-710, 2012.

FEINMAN, M.; HAUT, E. R. Upper Gastrointestinal Bleeding. **Surgical Clinics of North America**, v. 94, p. 43-53, 2014.

FERREIRA, M. P.; NISHIJIMA, C. M.; SEITO, L. N.; DOLLEDAL, A. L.; LOPES-FERREIRA, M.; DISTASI, L. C.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. Gastroprotective effect of *Cissus sicyiodes* (Vitaceae): Involvement of microcirculation, endogenous sulfhydryls and nitricoxide. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, p. 170-174, 2008.

FILARETOVA; L.; PODVIGINA, T.; BAGAEVA, T.; BOBRYSHEV, P.; TAKEUCHI, K. Gastroprotective role of glucocorticoid hormones. **Journal of Pharmacology Sciences**, v. 104, p. 195-201, 2007.

FIORUCCI, S.; SANTUCCI, L.; FEDERICI, B.; ANTONELLI, E.; DISTRUTTI, E.; MERELLI, O.; RENZO, G.D.; COATA, G.; CIRINO, G.; SOLDATOS, P.D.; MORELLI, A. Nitric oxide-releasing NSAIDs inhibit interleukin-1 β converting enzyme-like cysteine proteases and protect endothelial cells from apoptosis induced by TNF α . **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 13, p. 421-435, 1999.

FIRN, R.D; JONES, C.G. Natural products – a simple model to explain chemical diversity. **Natural Products Reports**. V. 20, n. 4, p. 382-391, 2003.

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.

FORNAI, M.; ANTONIOLI, L.; COLUCCI, R.; BERNARDINI, N.; GHISU, N.; TUCCORI, M.; DE GIORGIO, R.; DEL TACCA, M.; BLANDIZZI, C. Emerging role of cyclooxygenase isoforms in the control of gastrointestinal neuromuscular functions. **Pharmacology Therapeutics**, v. 125, p. 62-78, 2010.

FRANKE, A.; TEYSSEN, S.; SINGER, M.V. Alcohol-related diseases of the esophagus and stomach. **Digestive Diseases**, v. 23, p. 204-213, 2005.

FREEMANTLE, M. Scaled-up synthesis of discodermolide, **Chemical & Engineering News**, v. 82, n. 9, p. 33–35, 2004.

FREITAS, F.F.B.P.; FERNANDES, H.B. PIAULINO, C.A.; PEREIRA, S.S.; CARVALHO, K.I.M.; CHAVES, M.H.; SOARES, P.M.G.; MIURA, L.M.C.V.; LEITE, J.R.S.A.; OLIVEIRA, R.C.M.; OLIVEIRA, F.A. Gastroprotective activity of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. in animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 700-708, 2011.

FRY, C. Secretions of the salivary glands and stomach. **Surgery** (Oxford), v. 27, n. 12, p. 503-506, 2009.

FUJIKAWA, A.; SHIRASAKA, D.; YAMAMOTO, S.; OTA, H.; YAHIRO, K.; FUKADA, M.; SHINTANI, T.; WADA, A.; AOYAMA, N.; HIRAYAMA, T.; FUKAMACHI, H. Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z

are resistant to gastric ulcer induction by VacA of *Helicobacter pylori*, **Nature genetics**, v. 33, p. 375-383, 2003.

GELBERG, H. B. Comparative anatomy, physiology and mechanisms of disease production of the esophagus, stomach and small intestine, **Toxicologic Pathology**, v. 42, p. 54-66, 2014.

GHARATE, M.; KASTURE, V. Evaluation of anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and antiulcer activity of Punarnavasava: an Ayurvedic formulation of Boerhavia diffusa. **Oriental Pharmacy and Experimental Medicine**, v. 13, p.121-126, 2013.

GINDZIENSKI, A.; ZWIERZ, K; SAROSIEK, J. The role of mucus and its components in protection and repair within the alimentary tract mucosa: polish experience. **Journal of Physiology Pharmacology**, v. 54, p. 127-144, 2003.

GREGORY, E. Is Smoking Still Important in the Pathogenesis of Peptic Ulcer Disease? **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 25, p. 1-7, 1997.

GROENEM, M. J. M.; KUIPERS, E. J.; HANSEN, B. E.; OUWENDDIJK, T. J. T. Incidence of duodenal ulcers and gastric ulcers in a Western population: Back to where it started. **Canadian Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 9, p. 604-608, 2009.

GROVER, J.; KUMAR, V.; SINGH, V.; BAIRWA, K.; SOBHIA, M. E.; JACHAK, S. M. Synthesis, biological evaluation, molecular docking and theoretical evaluation of ADMET properties of nepodin and chrysophanol derivatives as potential cyclooxygenase (COX-1, COX-2) inhibitors, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 80, p. 47-56, 2014.

GUSLANDI, M. Effects of ethanol on the gastric mucosa. **Digestive Disease**, v. 5, p. 21–32, 1987.

GUSTAFSSON, B.I.; BAKKE, I.; HAUSO, O.; KIDD, M.; MODLIN, I.M. FOSSMARK, R. BRENNAN, E.; WALDUM, H.L. Parietal cell activation by arborization of ECL cell cytoplasmic projections is likely the mechanism for

histamine induced secretion of hydrochloric acid. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 46, p. 531-537, 2011.

GUTH, P.H. Current concepts in gastric microcirculatory pathophysiology. **The Journal of Biology and Medicine**, v. 65, p. 677-688, 1992.

HAGYMÁSI, K. *Helicobacter pylori* infection: New pathogenetic and clinical aspects. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 21, p.6386-6399, 2014.

HAKANSON, R.; LIEBERG, G. The role of endogenous gastrin in the activation of gastric histidine decarboxylase in the rat. Effect of antrectomy and vagal denervation. **European Journal of Pharmacology**, v. 12, p. 94-103, 1970.

HAMAGUCHI, T.; ONO, K.; MURASE, A.; YAMADA, M. Phenolic Compounds Prevent Alzheimer's Pathology through Different Effects on the Amyloid- β Aggregation Pathway. **The American Journal of Pathology**, v. 175, n. 6, p.2557-2565, 2009.

HANDA, O.; NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. *Helicobacter pylori*: a ROS-inducing bacterial species in the stomach. **Inflammation Research**, v. 59, n. 12, p. 997-1003, 2010.

HAROLD, K.; GRANT, D.; MITCHEL, J. Pharmacotherapy of acid peptic disorders. **In Principles of Medical Pharmacology**, 7. ed.; Elsevier: Toronto, 2007.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery today. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 894, 2008.

HARVEY, AL.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R.J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature**, v. 14, p. 111-130, 2015.

HASEBAA, T.; SUGIMOTOB, J.; SATOB, S.; ABEC, Y.; OHNO, Y. Phytophenols in whisky lower blood acetaldehyde level by depressing alcohol

metabolism through inhibition of alcohol dehydrogenase 1 (class I) in mice. **Metabolism Clinical and Experimental**, V. 57, P. 1753-1759, 2008.

HASEGAWA, S.; HARATA, M.; NAKAMURA, M.; MIZUNO, T.; TAHARA, T.; OHTA, Y.; NAKANO, H.. Effects of sucralfate, cimetidine and rabeprazole on mucosal hydroxyproline content in healing of ethanol/HCl-induced gastric lesions. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.33, p. 628–632, 2006.

HASNI, S.; IPPOLITO, A.; ILLEI, G. G. *Helicobacter pylori* and autoimmune diseases. **Oral Diseases**, v. 17, p. 621-7, 2011.

HATAZAWA, R.; TANAKA, A.; TANIGAMI, M.; AMAGASE, K.; KATO, S.; ASHIDA, Y.; TAKEUCHI, K. Cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 accelerates the healing of gastric ulcers via EP4 receptors. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 293, p. G788–797, 2007.

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.

HERNÁNDEZ-DÍAZ, S.; MARTIN, E.M.; RODRIGUEZ, L. A. G. Risk of complications after a peptic ulcer diagnosis: effectiveness of proton pump inhibitors. **Digestive Diseases and Sciences**. v.58, p. 1653-1662, 2013.

HILALY, J. E.; ISRAILI, Z. H.; LYOUSSEI, B. Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 43-50, 2004.

HIRUMA-LIMA, C. A.; SANTOS, L. C.; PELLIZZON, C. H.; SILVEIRA, G. G.; VASCONCELOS, P. C. P.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A. R. M. *Qualea grandiflora*, a brazilian “Cerrado” medicinal plant presentes an important antiulcer activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 207-214, 2006.

HOFFMANN, W. TFF (trefoil factor family) peptide-triggered signals promoting mucosal restitution. **Cellular and Molecular life Sciences**, v. 62, p.2932-2938, 2005.

HOFFMANN, R.W. Natural Product Synthesis: Changes over Time. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 1, p.123-130, 2012.

HOLZER, P. Role of visceral afferent neurons in mucosal inflammation and defense. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 7, p. 563-569, 2007.

HONG, H. S.; LEE, J.; LEE, E.; KWON, Y.S.; LEE, E.; AHN, W.; JIANG, M. H.; KIM, J. C.; SON, Y. A new role of Substance P as an injury-inducible messenger for mobilization of CD29+ stromal-like cells. **Nature Medicine**, v. 15, p. 425–35, 2009.

HOSAKA, Y.; KOSLOWSKI, M.; NUDING, S.; WANG, G.; SCHLEE, M.; SCHAFER, C.; SAIGENJI, K.; STANGE, E.F.; WEHKAMP, J. Antimicrobial host defense in the upper gastrointestinal tract. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 20, n. 12, p.1151-1158, 2008.

HOSHINO, T.; TSUTSUMI, S.; TOMISATO, W.; HWANG, H.J.; TSUCHIYA, T.; MIZUSHIMA, T. Prostaglandin E2 protects gastric mucosal cells from apoptosis via EP2 and EP4 receptor activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 12752–12758, 2003.

HU, X.T.; DING, C.; ZHOU, N.; XU, C. Quercetin protects gastric epithelial cell from oxidative damage *in vitro* and *in vivo*. **European Journal of Pharmacology**, v. 754, p. 115-124, 2015.

HUR, Y.G.; SUH, C.H.; KIM, S.; WON, J. Rosmarinic Acid Induces Apoptosis of Activated T Cells from Rheumatoid Arthritis Patients via Mitochondrial Pathway. **Journal Of Clinical Immunology**, v. 27, n. 1, p.36-45, 2006.

IMATAKE, K.; MATSUI, T.; MORIYAMA, M. The effect and mechanism of action of capsaicin on gastric acid output. **Journal Gastroenterology**, v. 44, p. 396-404, 2009.

IVERSEN, P. O.; NICOLAYSEN, G. Water- for life. **Tidsskrift for Den Norske Laegeforening**, v. 18, p. 3402-3405, 2003.

JAIN, K. S.; SHAH, A. K.; BARIWAL, J.; SHELKE, S. M.; KALE, A. P.; JAGTAP, J. R.; BHOSALE, A. V. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 1181-1205, 2007.

JESUS, N. Z. T. Avaliação da atividade antiulcerogênica do extrato etanólico bruto e da fase hexânica de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae) em modelos animais. Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, 2012.

JIA, Q.; SU, W.; PENG, W.; LI, P.; WANG, Y. Anti-diarrhoea and analgesic activities of the methanol extract and its fractions of *Jasminum amplexicaule* Buch.-Ham. (Oleaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 2, p.299-304, 2008.

JOHANSSON, M.; SYNNERSTAD, I.; HOLM, L. Acid transport through channels in the mucous layer of rat stomach. **Gastroenterology**, v. 119, p. 1297-1304, 2000.

.KAHRAMAN, A.; ERKASAP, N.; KOKEN, T.; SERTESER, M.; AKTEPE, F.; ERKASAP, S. The antioxidative and antihistaminis properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. **Toxicology**, v. 183, p. 133-142, 2003.

KATO, S.; AIHARA, E.; YOSHII, K.; TAKEUCHI, K. Dual action of prostaglandin E₂ on gastric acid secretion through different EP receptor subtypes in the rat. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 289, p. 64-69, 2005.

KERSS, S.; ALLEN, A.; GARNER, A. A simple method for me assuring thickness of the mucus gel layer adherent to rat, frog and human gastric mucosa: Influence of feeding, prostaglandin, *N*-acetylcysteine and other agents. **Clinical Science**, v. 63, p.187-195, 1982.

KHOJASTE, A.; MIRJALILI, M.H.; HIDALGO, D.; CORCHETE, P.; PALAZON, J. New trends in biotechnological production of rosmarinic acid. **Biotechnology Letters**, v. 36, n. 12, p.2393-2406, 2014.

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

KINJO, N.; KAWANAKA, H.; AKAHOSHI, T.; YAMAGUCHI, S.; YOSHIDA, D.; ANEGAWA, G.; KONISHI, K.; TOMIKAWA, M.; TANOUE, K. TARNAWSKI, A.; HASHIZUME, M.; MAEHARA, Y. Significance of ERK nitration in portal hypertensive gastropathy and its therapeutic implications. **American Journal Physiological Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 2895, p. 1016-1024, 2008.

KLAUSZ, G.; TISZAI, A.; LÉNÁRT, Z.; GYULAI, Z.; TISZLAVICZ, L.; HÖGYE, M.; CSANÁDY, M.; LONOVICS, J.; MÁNDI, Y. *Helicobacter pylori* – induced immunological responses in patients with duodenal ulcer and in patients with cardiomyopathies. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 51, p. 311-320, 2004.

KOCHAR, N., CHANDEWAL, A., BAKAL, R., KOCHAR, P. Nitric oxide and the gastrointestinal tract. **Int. Journal of Pharmacology**, 7, 31–39, 2011.

KONISHI, Y.; HITOMI, Y. YOSHIDA, M.; YOSHIOKA, E. Pharmacokinetic Study of Caffeic and Rosmarinic Acids in Rats after Oral Administration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 12, p.4740-4746, 2005.

KONTUREK, J.W.; HENGST, K.; KONTUREK, S.J.; SITO, E.; STACHURA, J.; DOMSCHKE, W. Physiological role of cholecystokinin in gastroprotection in humans. **American Journal of Gastroenterology**, v. 93, p. 2385–2390, 1998.

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

KONTUREK, P. C.; KONTUREK, J. S.; OCHMANSKI, W. Neuroendocrinology of gastric H^+ and duodenal HCO_3^- secretion: the role of brain-gut axis. **Europeun Journal Pharmacology**, v. 499, p. 15-27, 2004.

KONTUREK, P. C.; KONTUREK, J. S. Peptic ulcer disease . **Metabolism of Human Diseases**, p. 129-135, 2014.

KOPIC, S.; GEIBEL, J. Gastric acid, calcium absorption, and their impact on bone health, **American Physiological Society**, v. 93, p. 189-268, 2013.

KUHN, M.A. Oxygen free radicals & antioxidants. **Nursing Center**. V. 103, n. 4, p. 58-63, 2003.

KULAKSIZ, H.; ARNOLD, R.; GOKE, B.; MARONDE, E.; MEYER, M.; FAHRENHOLZ, F.; FORSSMANN, W.G.; EISSELE, R. Expression and cell-specific localization of the cholecystokinin B/gastrin receptor in the human stomach. **Cell Tissue Research**, v. 299, p. 289-298, 2000.

KUMAR, V., ABBAS, A.K., FAUSTO N, A. J.C. Robins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Philadelphia, PA: **Saunders Elsevier**, 2010.

KUMAR, A.; DEWAN, B.; RAMA, T. Evaluation of anti-ulcerogenic properties from the root of *Flemingia strobilifera*. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 2, n.1, p. 33-39, 2011.

KUMAR, V.S.; SARAVANAN, D.; KUMAR, B.; JAYAKUMAR, A.. An update on prodrugs from natural products. **Asian Pacific Journal Of Tropical Medicine**, v. 7, p.54-59, 2014.

KUSTERS, J.G.; VLIET, A.H.M.; KUIPERS, E.J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n.3, p. 449-490, 2006.

KWIECIEN, S.; BRZozowski, T.; KONTUREK S.J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. **Journal Physiology and Pharmacology**, v. 53, p. 39-50, 2002.

KWIECIEN, S.; BRZozowski, T.; KONTUREK, P.C.; PAWLIK, M.W.; PAWLIK, W.W.; KWIECEN, N.; KONTUREK, S.J. Gastroprotection by

pentoxifylline against stress-induced gastric damage. Role of lipid peroxidation, antioxidizing enzymes and proinflammatory cytokines. **Journal Physiology and Pharmacology** , v. 55, p. 337-355, 2002.

KWIECIEN, S.; JASNOS, K.; MAGIEROWSKI, M.; SLIWOWSKI, Z.; PAJDO, R.; BRZOZOWSKI, B.; MACH, T.; WOJCIK, D.; BRZOZOWSKI, T. Lipid peroxidation, reactive oxygen species and antioxidative factors in the pathogenesis of gastric mucosal lesions and mechanism of protection against oxidative stress-induced gastric injury. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 65, n. 5, p. 613-622, 2014.

LABONNE, B. E. F.; GUTIÉRREZ, M.; GÓMEZ-QUIROZ, L. E.; FAINSTEIN, M. K.; BUCIO, L.; SOUZA, V.; GUTIÉRREZ-RUÍZ, M. C. Acetaldehyde-induced mitochondrial dysfunction sensitizes hepatocytes to oxidative damage. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25, n. 6, p. 599-609, 2009.

LAINE, L. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics North America** , v. 6, p. 489–504, 1996.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. Reviews in Basic and a Clinical Gastroenterology. **Gastroenterology**, v. 135, p. 41-60, 2008.

LAU, J. L.; SUNG, J.; HILL, C.; HENDERSON, C.; HOWDEN, C. W.; METZ, D. C. Systematic review of the epidemiology of complicates peptic ulcer disease: incidence, recurrence, risk factors and mortality, **Digestion**, v. 84, p. 102-113, 2011.

LEITE, L.P. Avaliação da atividade gastroprotetora do p-cimeno. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, 2014.

LEON, L.R.; WHITE, A.A.; KLUGER, M.J. Role of IL-6 and TNF in thermoregulation and survival during sepsis in mice. **American Physiological Society**, p. 269-277, 1998.

LEVENSTEIN, S. Stress and peptic ulcer: life beyond Helicobacter. **British Medical Journal**, v. 316, p. 538, 1998.

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

LI, W.; HUANG, H.; NIU, X.; FAN, T.; UM, Q.; LI, H. Protective effect of tetrahydrocoptisine against ethanol-induced gastric ulcer in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 272, p. 21-29, 2013.

LI, W.F.; HAO, D.J.; FAN, T.; HUANG, H.M., YAO, H.; NIU, X.F. Protective effect of chelerythrine against ethanol-induced gastric ulcer in mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 208, p. 18-27, 2014.

LIM, Y.J.; LEE, J.S.; KU, Y.S.; HAHM, K.B. Rescue strategies against non-steroidal anti-inflammatory drug-induced gastroduodenal damage. **Journal Gastroenterology Hepatology**, v. 24, p. 1169-1178, 2009.

LIMA, G. R. M. Atividade gastroprotetora de *Combretum duarteanum* Cambess em modelos animais. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, 2011.

LIPOF, T.; SHAPIRO, D.; KOZOL, R.A. Surgical perspectives in peptic ulcer disease and gastritis. **World Journal Gastroenterology**, v. 12, n. 20, p. 3248-3252, 2006.

LIU, Y.; TIAN, X.; GOU, L.; FU, X.; LI, S.; LAN, N.; YIN, X. Protective effect of l-citrulline against ethanol-induced gastric ulcer in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 2, p. 280-287, 2012.

LIU, T.; STERN, A.; ROBERTS, L.J. The isoprostanes: Novel prostaglandin-like products of the free radical catalyzed peroxidation of arachidonic acid. **Journal Biomedical Science**, v. 6, p. 226-235, 1999.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Review**, v. 4, p.118-126, 2010.

LONDONKAR, R. L. Studies on activity of various extracts of *Mentha arvensis* Linn against drug induced gastric ulcer in mammals. **World Journal Of Gastrointestinal Oncology**, v. 1, n. 1, p.82-88, 2009.

LOPERFIDO, S.; BALDO, V.; PIOVESANA, E.; BELLINA, L.; ROSSI, K.; GROPPPO, M.; CAROLI, A.; BÓ, N.D.; MONICA, F.; FABRIS, L.; SALVAT, H.H.; BASSI, N.; OKOLICSANYI. Changing trends in acute upper-GI bleeding: a population-based study. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 70, n.2, p. 212-224, 2009.

LOPEZ-BELMONTE, J.; WHITTLE, B.J.R.; MONCADA, S.. The action of nitric oxide donors in the prevention or induction of injury to the rat gastric mucosa. **British Journal of Pharmacology**, v.108, p. 73–78, 1993.

LU, S.C. Glutathione synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 31, p. 3143-3153, 2013.

LU, S. C. Regulation of glutathione synthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, p. 42-59, 2009.

LUTNICKI, K.; SZPRINGER, E.; WRÓBEL, J.; JAWORSKA-ADAMU. Verapamil and calcium ions in ethanol evoked gastric mucosa injury. **Annales Universitatis Mariae Curie Skłodowska Section**, p.275–281, 2006.

MACHA, M.A.; KRISHN, S.R.; JAHAN, R.; BANERJEE, K.; BATRA, S.K.; JAIN, M. Emerging potential of natural products for targeting mucins for therapy against inflammation and cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 41, p. 277-288, 2015.

MAGIEROWSKI, M.; MAGIEROWSKA, K.; KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T. Gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulfide in the mechanism of gastrointestinal integrity, protection and ulcer healing. **Molecules**, v. 20, p. 9099-9123, 2015.

MAITY, P.; BISWAS, K.; ROY, S.; BABERJEE, R.K.; BANDYOPADHYAY, U. Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer-recent mechanisms update. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 253, p. 239-338, 2003.

MAJUMBAR, D.; BEBB, J.; ATHERTON, J. *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcers. **Medicine**, v. 39, n. 3, p. 154-161, 2010.

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

MARHUENDA, E.; MARTIN, M.J.; ALARCON DE LA LASTRA, C. Antiulcerogenic activity of aescine in different experimental models. **Phytotherapy Research**, v. 7, n. 1, p. 13–16, 1993.

MARTIN, G. R.; WALLACE, J. L. Gastrointestinal inflammation: a central component of mucosal defense and repair. **Experimental Biology and Medicine**, v. 231(2), p. 130-137, 2006.

MARTINS, J. L. R.; RODRIGUES, O. R. L.; SILVA, D.M.; GALDINO, P. M.; DE PAULA, J. R.; ROMÃO, W.; DA COSTA, H. B.; VAZ, B.G.; GHEDINI, P. C.; COSTA, E. A. Mechanisms involved in the gastroprotective activity of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent on gastric lesions in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, p. 1616-1624, 2014.

MARTINSEN, T.C.; BENESTAD, S.L.; MOLDAL, T.; WALDUM, H.L. Inhibitors of gastric acid secretion increase the risk of prion infection in mice. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 46, p. 1418-1422, 2011.

MARSOLLA, P. Gastrite e Úlceras. Publicado 13/12/2009. <Disponível em: <http://www.webartigos.com/articles/29949/1/ESTRESSEELESOESGASTRICAS/pagina1.html#ixzz1CFXkJ0xG>> Acesso em: 28 de novembro de 2015.

MATON, P.N.; BURTON, M.E. Antacids revisited: a review of their clinical pharmacology and recommend therapeutic use. **Drugs**, v. 57, p. 855-870, 1999.

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

MCEWEN, B.S. Central effects of stress hormones in health and disease: understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. **Science Direct**, v. 583, p. 174-185, 2008.

MCMANUS, J.; MOWRY, R. PAS reaction staining. **Harper & Row, New York: A Hoeber International Reprint**. 1964.

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

MELINDER, C.; UDUMYAN, R.; HIYOSHI, A.; BRUMMER, R.J.; MONTGOMERY, S. Decreased stress resilience in young men significantly increases the risk of subsequent peptic ulcer disease – a prospective study of 233 093 men in Sweden. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**. v. 41, p. 1005-1015, 2015.

MELNIK, S.; STOGER, E. Green factories for biopharmaceuticals. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 1038-1046, 2013.

MICKEL, S.J; NIEDERER, D.; DAEFFLER, R.; OSMANI, A.; KUESTERS, E.; SCHMID, E.; SCHAER, K.; GAMBONI, R.; CHEN, W.C.; LOESER, E.; KINDER JR. F.R; KONIGSBERGER, K.; PRASAD, K.; RAMSEY, T.M.; REPIC, O.; WANG, R.M; FLORENCE, G.; LYOTHIER, I.; PATERSON, I. Large-scale synthesis of the anti-cancer marine natural product (+)-discodermolide. Part 5: Linkage of fragments c1-6 and c7-24 and finale. **Organic Process Research & Development**, v.8, p. 122–130, 2004.

MILLER, A.R.; NORTH, C.S.; CLOUSE, R.E.; WETZEL, R.D.; SPITZNAGEL, E.L.; ALPERS, D.H. The association of irritable bowel syndrome and somatization disorder. **Annals of Clinical Psychiatry**, v. 13, p. 25-30, 2001.

MILLS, J.C.; SHIVDASANI, R.A. Reviews in basic and clinical gastroenterology and hepatology. **Gastroenterology**, v. 140, p. 412-424, 2011.

MIRZAEI, S.M.S.; ZAHEDI, M.J.; POUR, S.S. Prevalence of *Helicobacter pylori*-negative, non-steroidal anti-inflammatory drug related peptic ulcer disease in patients referred of afzalipour hospital. **Journal of Digestive Disease**, v. 7, n. 4, p. 241-244, 2015.

MISHRA, S. Is *Helicobacter pylori* good or bad? **European Journal of Clinical Microbiology & Infect Disease**, v. 32, p. 301-304, 2012.

MISHRA, B. B., TIWARI, V. K. Natural products: na evolving role in future drug Discovery, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 4769-4807, 2011.

MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol induced gastric lesions in rats. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 33, p. 939–945, 1983.

MOCANDA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, p. 109-143, 1991.

MODLIN, I.M.; KIDD, M.; LYE, K.D; WRIGHT, N.A. Gastric stem cells: an update. **The Keio Journal of Medicine**, v. 52, p. 134–137, 2003

MOLEIRO, F. C.; ANDREO, M. A.; SANTOS, R. D. C.; MORAES, T. M.; RODRIGUES, C. M.; CARLI, C. B.; LOPES, F. C.; PELLIZZON, C. H.; CARLOS, I. Z.; BAUAB, T. M.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. Mouriri elliptica: validation of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 359-368, 2009.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, n.2, p. 1-34, 1991.

MONTENEGRO, C.A.; DE MORAIS LIMA, G. R.; GOMES, I. F.; TAVARES, J. F.; BATISTA, L. M. Gastroprotective Effect of *Xylopi* langsdorffiana A. St.-Hil.

& Tul.(Annonaceae): Involvement of Endogenous Sulfhydryls Compounds and Nitric Oxide. **Records of Natural Products**, v. 8, n. 2, 2014.

MOON, D.O.; KIM, M.O.; LEE, J.D.; CHOI, Y. H.; KIM, G. Y. Rosmarinic acid sensitizes cell death through suppression of TNF- α -induced NF- κ B activation and ROS generation in human leukemia U937 cells. **Cancer Letters**, v. 288, p. 183–191, 2010.

MOORE, K.W.; O'GARRA, A.; MALEFYR, R.W.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T.R. Interleukin-10, **Annual Review of Immunology**, n. 11, p. 165-190, 1993.

MORENO, S.; SCHEYER, T.; ROMANO, C.S.; VOJNOV, A. A. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. **Free Radical Research**, v. 40, p. 223–231, 2006.

MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; SUKAMOTO, T. Effects of the new antiulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. **Journal of Pharmacology**, v. 57, p. 495-505, 1991.

MORSY, M.M.; FOAUD, A.A. Mechanisms of gastroprotective effect of eugenol in indomethacin-induced ulcer in rats. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 1361-1366, 2008.

MORSY, M. A.; HEEBA, G. H.; ABDELWAHAB, S. A.; ROFAEIL, R. R. Protective effects of nebivolol against cold restraint stress-induced gastric ulcer in rats: Role of NO, HO-1, and COX-1,2. **Nitric Oxide**, v. 27, p. 117-122, 2012.

MORSY, M.; EL-SHEIKH, A. Prevention of Gastric Ulcers. **InTech**, 2011.

MOTA, K.S.D.L.; PITA, J.C.L.R.; ESTEVAM, E.C.; MEDEIROS, V.M.; TAVARES, J.F.; AGRA, M.F.; DINIZ, M.F.F.M.; SILVA, M.S.; BATISTA, L.M. Evaluation of the toxicity and antiulcerogenic activity of the ethanol extract of *Maytenus obtusifolia* Mart. Leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 441–446, 2008.

MOTA, K. S. L. Avaliação da atividade antiulcerogênica de *Maytenus obtusifolia* Mart. (Celastraceae) em modelos animais. Dissertação (mestrado) - Programa

de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, 2009.

MCJUNKIN, B.; SISSOKO, M.; LEVIAN, J.; UPCHURCH, J.; AHMED, A. Dramatic decline in prevalence of *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease in a endoscopy-referral population. **The American Journal of Medicine**, v. 124, n. 3, p. 260-265, 2011.

MURAKAMI, S.; ISOBE Y, K.H.; NAGAI H.H.; MURAMATU M.; OTOMO S. Inhibition of gastric H⁺, K(+) -ATPase and acid secretion by ellagic acid. **Plant Medicine**, v. 57, n. 4, p. 305-308, 1991.

MUSUMBA, C.; PRITCHARD, D. M.; PIRMOHAMED, M. Cellular and molecular mechanisms of NSAID-induced peptic ulcers. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 30, p. 517-531, 2009.

MUTHURAMAN, A.; SOOD, S. Antisecretory, antioxidative and antiapoptotic effects of montelukast on pyloric ligation and water immersion stress induced peptic ulcer in rat. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 83, p. 55-60, 2010.

NANJUNDAIAH, S. M.; ANNAIAH, H.N.M.; DHARMESH, S.M.. Gastroprotective Effect of Ginger Rhizome (*Zingiber officinale*) Extract: Role of Gallic Acid and Cinnamic Acid in H⁺,K⁺-ATPase/ *H. pylori* Inhibition and Anti-Oxidative Mechanism. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p.1-13, 2011.

NAGY, L.; NAGATA, M.; SZABO, S. Protein and non-protein sulfhydryls and disulfides in gastric mucosa and liver after gastrototoxic chemicals and sucralfate: Possible new targets of pharmacologic agents. **World Journal Gastroenterology**, v. 13, p. 2053-2060, 2007.

NAJM, W. I. Peptic ulcer disease, **Primary Care the Clinics**, v. 38, p. 383-394, 2011.

NAPOLI, C.; IGNARRO, L.J. Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. **Archives of Pharmacology Research**, v. 32, p. 1103-1108, 2009.

NARUMIYA, S. Prostanoids and inflammation: a new concept arising from receptor knockout mice, **Journal of Molecular Medicine**, v. 87, p. 1015-1022, 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981–2002. **Natural Product Reports**, v.17, p.215, 2000.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2012.

NEWTON, J.; ALLEN, A.; WESTLEY, B.M. The human trefoil peptide, TFFI, is present in different molecular forms that are intimately associated with the adherent mucus gel in normal stomach. **Gut**, v. 46, p. 312–320, 2000.

NGUYEN, T.; CHAI, J.; LI, A.; AKAHOSHI, T.; TANIGAWA, T.; TARNAWSKI, A.S. Novel roles of local IGF-1 activation in rat gastric ulcer healing: promotes actin polymerization, cell proliferation, reepithelialization and induces COX-2 in a PI3K-dependent manner. **American Journal of Pathology**, v. 170, n.4, p. 1219-1228, 2007.

NIETO, Y. B. Úlcera péptica, **Medicine**, v. 11, n. 3, p. 137-41, 2012.

NIIDAH; TAKEUCHIK; OKABE. Role of thyrotropin–releasing hormone in acid secretory response induced by lowering of body temperature in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 198, p. 137–142, 1991.

NISHIO, H.; TERASHIMA, S.; NAKASHIMA, M.; AIHARA, E.; TAKEUCHI, K. Involvement of prostaglandin E receptor EP₃ subtype and prostacyclin IP receptor in decreased acid response in damaged stomach. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 58, p. 407–21, 2006.

NIV, Y.; BANIC, M. Gastric barrier function and toxic damage, **Digestive Diseases**, v. 32, p. 235-242, 2014.

NORDIN, N.; SALAMA, S. M.; GOLBABAPOUR, S.; HAJREZAIE, M.; HASSANDARVISH, P.; KAMALIDEHGHAN, B.; MAJID, N. A.; HASHIM, N. M.; OMAR, H.; FADAIENASAB, M.; KARIMIAN, H.; TAHA, H.; ALI, H. A.; ABDULLA, M. A. Anti-Ulcerogenic Effect of Methanolic Extracts from *Enicosanthellum pulchrum* (King) Heusden against Ethanol-Induced Acute Gastric Lesion in Animal Models. **Plos One**, v. 9, p. 111925, 2014.

NUGTEREN, D.H.; HAZELHOF, E. Isolation and properties of intermediates in prostaglandin biosynthesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 326, p. 448-461, 1973.

OATES, P.J.; HAKKINEN, J.P. Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats. **Gastroenterology**, v. 94, p. 10–21, 1988.

OCAÑA-FUENTES, A.; ARRANZ, F.J.G.; SENORANS, G.R. Supercritical fluid extraction of oregano (*Origanum vulgare*) essentials oils: Anti-inflammatory properties based on cytokine response on THP-1 macrophages. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 6, p.1568-1575, 2010.

O'CONNOR, S.E. Engineering of secondary metabolism. **Annual Review of Genetics**, v. 49, p; 71-94, 2015.

OH, G.S.; PAE, H. O.; LEE, B. S.; KIM, B. N.; KIM, J. M.; KIM, H. R.; JEON, S. B.; JEON, W. K.; CHAE, H. J.; CHUNG, H. T. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor- κ B via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, p. 106-119, 2006.

OHTA, Y.; IMAI, Y.; KAIDA, S.; KAMIYA, Y.; KAWANISHI, M.; HIRATA, I. Vitamin E protects against stress-induced gastric mucosal lesions in rats more effectively than vitamin C. **Biofactors**, p.60-71, 2010.

OLIVEIRA, M. C.; LEMOS, L. M. S.; OLIVEIRA, R. G.; DALL'OGGIO, E. L.; JÚNIOR, P. T. S.; MARTINS, D. T. O. Evaluation of toxicity of *Calophyllum*

brasiliense stem bark extract by in vivo and in vitro assays. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, p. 30-38, 2014.

ONO, K.; LI, L.; TAKAMURA, Y.; YOSHIIKE, Y.; ZHU, L.; HAN, F.; MAO, X.; IKEDA, T.; TAKASAKI, J.; NISHIJO, H.; TAKASHIMA, A.; TELOW, D. B.; ZAGORSKI, M. G.; YAMANDA, M. Phenolic compounds prevent amyloid protein oligomerization and synaptic dysfunction by site-specific binding. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p. 14631–14643, 2012.

OSAKABE, N.; TAKANO, H.; SANBONGI, C.; YASUDA, A.; YANAGISAWA, R.; INOUE, K.; YOSHIKAWA, T.. Anti-inflammatory and antiallergic effect of rosmarinic acid (RA); inhibition of seasonal allergic rhinoconjunctivitis (SAR) and its mechanism. **Biofactors**, v. 21, p. 127–131, 2004.

OUYANG, W.; RUTZ, S.; CRELLIN, N.K.; VALDEZ, P.A.; HYMOWITZ, G. Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. **Annual Review of Immunology**, v. 29, n. 1, p.71-109, 2011.

PAGUIGAN, N. D.; CASTILLO, D. H. B.; CHICHIOCO-HERNANDEZ, C. L. Anti-ulcer Activity of Leguminosae Plants. **Archivos de Gastroenterologia**, v. 51, n. 1, 2014.

PAI, R.; SOREGHAN, B.; SZABO, I.L.; PAVELKSA, M.; BAATAR, D.; TARNAWSKI, A.S. Prostaglandin E₂ transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. **Nature Medicine**, v. 8, p. 289-294, 2002.

PANTALEO, N.; CHADWICK, W.; PARK, S. S.; WANG, L.; ZHOU, Y.; MARTIN, B.; MAUDSLEY, S. The mammalian tachykinin ligand-receptor system: an emerging target for central neurological disorders. CNS and Neurological Disorders. **Drug Targets**, v. 9, p. 627-635, 2010.

PARK, S.; HAHM, K.; OH, T.; JIN, J.; CHOUE, R. 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, J.M.; KIM, J.w.; HAHM, K. B. HSPA4, the “evil chaperone” of the HSP family, delays gastric ulcer healing. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 60, p. 824-826, 2015.

PARRA, T.; BENITES, J.; RUIZ, L.M.; SEPULVEDA, B.; SIMIRGIOTIS, M.,; ARECHE, C. Gastroprotective activity of eny-beyerene derivatives in mice: effects on gastric secretion, endogenous prostaglandins and non-protein sulfhydryls. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, p. 2813-2817, 2015.

PEDROLLO, C.T.; KINUPP, V.F. Sustainability or colonialism? Legislative obstacles to research and development of natural products and patents on traditional knowledge in Brazil. **Acta Botanica Brasilica**. V.29, n.3, p. 452-456, 2015.

PENISSI, A. B.; PIEZZI, R. S. Effect of dehydroleucodine on mucus production: A quantitative study. **Digestive Diseases and Sciences**., v. 44, p. 708-12, 1999.

PETERSEN, M.; ABDULLAH, Y.; BENNER, J.; EBERLE, D.; GEHLEN, K.; HÜCHERIG, S.; JANIYAK, V. KIM, H.; SANDER, M.; WEITZEL, C.; WOLTERS, S. Evolution of rosmarinic acid biosynthesis, **Phytochemistry**, v. 70, p. 1663-1679, 2009.

PETERSEN, M.; SIMMONDS, M. S. J. Rosmarinic acid, **Phytochemistry**, v. 62, p. 121-125, 2003.

PFEIFFER, A.; ROCHLITZ, H.; NOELKE, B.; TACKE, R.; MOSER, U.; MUTSCHLER, E.; LAMBRECHT, G. Muscarinic receptors mediating acid secretion in isolated rat gastric parietal cells are of M3 type. **Gastroenterology**, v. 98, p. 218–222, 1990.

PHAM-HUY, L.A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health, **International Journal of Biomedical Science**, v. 4, n.2, p. 89-96, 2008.

PROCTOR, M. J.; DEANS, C. Complications of peptic ulcers. **Surgery**, 2014.

PUSCAS, I.; PUSCAS, C.; COLTAU, M.; PASÇA, R.; TORRES, J.; MÁRQUEZ, M.; HERRERO, E.; FILLAT, O.; ORTIZ, J. A. Comparative study of the safety and efficacy of ebrotidine versus ranitidine and placebo in the prevention of piroxicam induced gastroduodenal lesions. **Arzneimittelforschung**, v. 47, p. 568-572, 1997.

RABELO, A. S.; OLIVEIRA, I. D.; GUIMARÃES, A. G.; QUINTANS, J. S. S.; PRATA, A. P. N.; GELAIN, D. P.; VENCESLAU, E. M.; SANTOS, J. P. A.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; BONJARDIM, L. R.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; SANTOS, A. D. C.; NOGUEIRA, P. C. L.; COSTA, E. V.; MORAES, V. R. S.; ARAÚJO, A. A. S. Antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant activities of aqueous extract from *Remirea maritima* (Cyperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, p. 11-17, 2013.

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

.RAJALAKSHMI, K.; DEVARAJ, H.; DEVARAJ, S.N. Assessment of the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) of gallic acid in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, p. 919-922, 2001.

RAJPUT, G.C.; MAJMUDAR, F.D.; PATEL, J.K.; PATEL, R.S.; THAKOR, B.P. PATEL, B.P.; RAJGOR, N.B. Stomach specific mucoadhesive tablets as controlled drug delivery system-a review work. **International Journal on Pharmaceutical and Biological Research**, v. 1, p. 30-41, 2010.

RAMSAY, P. T.; CARR, A. Gastric acid and digestive physiology, **Surgical the Clinics**, v. 91, p. 977-982, 2011.

RAND, M.J; LI, C.G. Nitric oxide as a neurotransmitter in peripheral nerves: nature of transmitter and mechanism of transmission. **Annual Review of Physiology**, v. 57, p. 659–682, 1995.

RAO, C.V; OJHA, O.; RADHAKRISHNAN, K.; GOVINDARAJAN, R.; RASTOGI, S.; MEHROTRA, S.; PUSHPANGADAN, P. Antiulcer of *Utleria salicifolia* rhizome extract, **Journal of Ethnopharmacology**, v.91, p. 243–249, 2004.

RAO CHV, VERMA AR, VIJAYAKUMAR M. Gastroprotective effect of standardized extract of *Ficus glomerata* fruit on experimental gastric ulcers in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.115, p. 323-326, 2008.

RAZA, M.; AL-SHABANAH, O.A.; EL-HADIYAH, T. M.; AL-MAJED, A. A. A effect of prolonged vigabratin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of swiss albino mice. **Scientia Pharmaceutica**, v. 70, p. 135-145, 2002.

REGAN, J. W. EP2 and EP4 prostanoid receptor signaling. **Life Sciences**, v. 74, n. 2-3, p.143-153, 2003.

ROBINSON, K.; KENEFECK, R.; PIDGEON, E. L.; SHAKIB, S.; PATEL, S.; POLSON, R. J.; ZAITOUN, A. M.; ATHERTON, C. *Helicobacter pylori*-induced peptic ulcer disease is associated with inadequate regulatory T cell responses. **Gut**, v. 57, n. 10, p. 1375-1385, 2008.

RIBBONS, R.A.; ZHANG, X.J.; THOMPSON, J.H.; GREENBERG, S.S.; MOORE, W.M.; KORNMEIR, C.M.; CURRIE, M.G.; LERCHE, N.; BLANCHARD, J.; CLARK, D.A.; MILLER, M.J.S. Potential role of nitric oxide in a model of chronic colitis in rhesus macaques. **Gastroenterology**, v. 108, p. 705–711, 1995.

RICHARDSON, P.; HAWKEY, C.J.; STACK, W.A. Proton pump inhibitors. **Drugs**, v. 56, n.3, p. 307-336, 1998.

ROBERT, A.; KANE, G.; REELE, S.B. Dose response inhibition in man of meal-stimulated gastric acid secretion by 15(*R*)-15-methyl prostaglandin E2, given orally. **Gut**, v. 22, p.728–731, 1981.

ROBERT, A.; LEUNG, F.W.; KAISER, D.G.; GUTH, P.H. Potentiation of aspirin-induced gastric lesions by exposure to cold in rats. Role of acid secretion, mucosal blood flow, and gastric mucosal prostanoid content, **Gastroenterology**, v. 97, p. 1147–1158, 1989.

ROCHA, J.; FIGUEIRA, M.E.; BARATEIRO, A.; FERNANDES, A.; BRITES, D.; BRONZE, R.; DUARTE, C.M.M.; SERRA, A.T.; PINTO, R.; FREITAS, M.;

FERNANDES, E.; LIMA, B.S.; FILIPE, H.M., SEPODES, B. Anti-inflammatory Effect of Rosmarinic Acid and an Extract of Rosmarinus officinalis in Rat Models of Local and Systemic Inflammation. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 116, n. 5, p.398-413, 2014.

ROCHA, B. S.; GAGO, B.; BARBOSA, R. M.; LARANJINHA, J. Diffusion of nitric oxide through the gastric wall upon reduction of nitrite by red wine: physiological impact, **Nitric oxide**, v. 22, p. 235-241, 2010.

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

ROGLER, G.; ANDUS, T. Cytokines in inflammatory bowel disease. **World Journal of Surgery**, v. 22, n. 4, p. 382-389, 1998.

ROSS, D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. **Pharmacology & Therapeutics**, v.37, p. 231-249, 1988.

ROSSONI, G.; MUSCARA, M.N.; CIRINO, G.; WALLACE, J.L. Inhibition of cyclo-oxygenase-2 exacerbates ischaemia-induced acute myocardial dysfunction in the rabbit. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, p. 1540–1546, 2002.

ROVERE-QUERINI, P.; CLEMENTI, E.; BRUNELLI, S. Nitric oxide and muscle repair: multiple actions converging on therapeutic efficacy, **European Journal of Pharmacology**, v. 730, p. 181-185, 2014.

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

SAAVEDRA, J.M.; SÁNCHEZ-LEMUS, E.; BENICKY, J. Blockade of brain angiotensin II AT1 receptors ameliorates stress, anxiety, brain inflammation and ischemia: Therapeutic implications. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, p. 1-18, 2011.

SACHS, G.; SHIN, J.M.; VAGIN, O.; LAMBRECHT, N.; YAKUBOV, I.; MUNSON, K. The gastric H, K ATPase as a drug target: past, present, and future. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 41, p. S226–S242, 2007.

SACHS, G.; SHIN, J.M.; HUNT, R. Novel approaches to inhibition of gastric acid secretion. **Current Gastroenterology Report**, v. 12, p. 437-447, 2010.

SAUNDERS, F. R.; HUGHES, A.; WALLACE, H. M. Investigating the effects of NSAIDs on the expression of regulatory components of the polyamine pathway. **Toxicology**, v. 253, p.22-23, 2008.

SAMUELSSON, B.; MORGENSTERN, R.; JAKOBSSON, P.J. Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. **Pharmacological Reviews**, v. 59, p. 207–224, 2007.

SANNOMIYA, M.; FONSECA, V. B.; DA SILVA, M. A.; ROCHA, L. R.; DOS SANTOS, L. C, HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA BRITO, A. R.; VILEGAS, W. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 1-6, 2005.

SANTIN, J.R.; LEMOS, M.; JÚNIOR, L.C.K.; MACHADO, I.D.; COSTA, P.; OLIVEIRA, A.P.; TILIA, C.; SOUZA, J.P.; SOUSA, J.P.B.; BASTOS, J.K.; ANDRADE, S.F. Gastroprotective activity of essential oil of the *Syzygium aromaticum* and its major component eugenol in different animal models. **Naunyn-schmiedeberg's Archives Of Pharmacology**, v. 383, n. 2, p.149-158, 2010.

SANTOS, V. L. Avaliação da atividade antiulcerogênica, antidiarréica e antiespasmódica do extrato etanólico bruto e fase acetato de etila obtidos da entrecasca do caule de *Maytenus rigida* mart. (celastraceae) em modelos animais. Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Produtos

Naturais e Sintéticos Bioativos, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, 2008.

SAYEHMIRI, F.; KIANI, F.; SAYEHMIRI, K.; SOROUGH, S.; ASADOLLAHI, K.; ALIKHANI, M.Y.; DELPISHEH, A.; EMANEINI, M.; BOGDANOVIC, L.; VARZI, A.M.; ZARRILLI, R.; TAHERIKALANI, M. Prevalence of cagA and vacA among *Helicobacter pylori*-infected patients in Iran: a systematic review and meta-analysis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 07, p.686-696, 2015.

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.

SCARPATI, M.L.; ORIENTE, G. Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal rosmarinus off.). **Ric. Sci.** v.28, p. 2329–2333, 1958.

SCHEPP, W.; DEHNE, K.; HERRMUTH, H.; PFEFFER, K.; PRINZ, C. Identification and functional importance of IL-1 receptors on rat parietal cells. **American Physiological Society**, p. 1094-1105, 1998.

SCHMITT, E. K.; MOORE, C. M.; KRASTEL, P.; PETERSEN, F. Natural products as catalysts for innovation: a pharmaceutical industry perspective. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, p. 497-504, 2011.

SCHUBERT, M. L.; PEURA, D. A. Controlo f gastric acid secretion in health and disease. **Gastroenterology**, v. 134, p. 1842-1860, 2008.

SCHUBERT, M. L. Gastric exocrine and endocrine secretion, **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 25, p. 529-536, 2009.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion, **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 30, n.6, p. 578-582, 2014.

SENAY, E. C.; LEVINE, R. J. Synergism between cold and restraint for rapid production of stress ulcers in rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 124, p. 1221-1223, 1967.

SENER, G.; PASKALOGLU, K.; AYANOGLU-DÜLGER, G. Protective effect of increasing doses of amotidine, omeprazole, lansoprazole, and melatonin against ethanol-induced gastric damage in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 36, p. 171–174, 2004.

SEVERI, J.A.; LIMA, Z.P.; KUSHIMA, H.; BRITO, A.R.M.S.; SANTOS, L.C.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A. Polyphenols with Antiulcerogenic Action from Aqueous Decoction of Mango Leaves (*Mangifera indica* L.). **Molecules**, v. 14, n. 3, p.1098-1110, 2009

SHAY, H.; KOMAROV, S.A.; FELS, S. S.; MERANZE, D.; GRUENSTEIN, M.; SIPIET, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. **Gastroenterology**, v. 5, p. 43-61, 1945.

SHAW, S.; HERBET, V.; COLMAN, N.; JAYATILLEKE, E. Effect of ethanol-generated free radicals on gastric intrinsic factor and glutathione. **Alcohol**, v.7, p. 153–157, 1990.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, 2004.

SHIMOYAMA, A.T.; SANTIN, J.R.; MACHADO, I.D.; SILVA, A.M.O.; MELO, I.L.P.M.; MANCHINI-FILHO, J.; FASKY, S.H.P. Antiulcerogenic activity of chlorogenic acid in different models of gastric ulcer. **Naunyn-schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 386, n. 1, p.5-14, 2012.

SHIN, J. M.; SACHS, G. Pharmacology of proton pump inhibitors, **Current Gastroenterology Reports**, v.10, n. 6, p. 528-534, 2008.

SINGH, S.; KHAJURIS, A.; TANEJA, S.C.; KHAJURIS, R.K.; SINGH, J.; JOHRI, R.K.; QAZI, G.N. The gastric ulcer protective effect of boswellic acids, a leukotriene inhibitor from *Boswellia serrata*, in rats. **Phytomedicine**, v. 15, n. 6-7, p.408-415, 2008.

SIMS, J.E.; SMITH, D.E. The IL-1 family: regulators of immunity. **Immunology**, v. 10, p. 89-103, 2010.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150 (1), p. 76-85, 1985.

STENGEL, A.; HOFMANN, T.; GOEBEL-STENGEL, M.; LEMBKE, V.; AHNIS, A.; ELBELT, U.; LAMBRECHT, N.W.G.; ORDEMANN, J.; KLAPP, B.F.; KOBELT, P. Ghrelin and NUCB2/nesfatin-1 are expressed in the same gastric cell and differentially correlated with body mass index in obese subjects. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 139, n. 6, p.909-918, 2013.

SYAM, A. F.; SADIKIN, M.; WANANDI, S. I.; RANI, A. A. Molecular mechanism on healing process of peptic ulcer. **Acta Medica Indonesiana**, v. 41, p. 95-98, 2009.

SZABO, S. "Gastric cytoprotection" is still relevant. **Journal Gastroenterology and Hepatology**. V. 29, p. 124-132, 2014.

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

SHAY, H.; KOMAROV, S.A.; FELS, S.S.; MERANZE, D. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in rat. **Gastroenterology**, v.4, p. 43-61, 1945.

SHOEN, R.T.; VENDER, R.J. Mechanisms of nonsteroidal-antiinflammatory drugs-induced gastric damage. **American Journal of Medicine**, v. 86, p. 449-457, 1989..

SIDDIQUI, A.A.; IRAM, F.; SIDDIQUI, S.; SAHU, K. Role of natural products in drug discovery process. **International Journal of Drug Development and Research**, v. 6, n. 2, p. 172-204, 2014.

SIKIRIC, P.; SEIWERTH, S.; GRABAREVIC, Z.; et al., The influence of a novel pentadecapeptide, BPC 157, on NG-nitro-L-arginine methylester and L-arginine effect on stomach mucosa integrity and blood pressure. **European Journal of Pharmacology**, v. 332, p. 23-33, 1997.

SILEN, W. Physiology of gastric function. **Surgical Basic Science**. p. 271–91, 1993.

SILVA, F. P.; MACHADO, C. C. C. Antimicrobial peptides: Clinical relevance and therapeutic implications. **Peptides**, v. 36, p. 308-314, 2012.

SOBHIAN, B.; JAFARMADAR, M.; REDL, H.; BAHRAMI, S. Nitric oxide-supplemented resuscitation improves early gastrointestinal blood flow in rats subjected to hemorrhagic shock without late consequences, **The American Journal of Surgery**, v. 20, p. 100-110, 2011.

SOLMAZ, A.; SENER, G.; CETINEL, S.; YUKSEL, M.; YEGEN, C.; YEGEN, B.C. Protective and therapeutic effects of resveratrol on acetic acid-induced gastric ulcer. **Free Radical Research**, v. 43, n. 6, p.594-603, 2009.

SOSTRES, C.; GARGALLO, C. J.; ARROYO, M. T.; LANAS, A. Adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 24, p 121-32, 2010.

SUMBUL, S.; AHMAD, M.A.; MOHD, A.; MOHD, A. Role of phenolic compounds in peptic ulcer: an overview. **Journal of Farmacy & Biollied Sciences**, v. 3, n.3, p. 361-368, 2011.

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 Journal**, v. 29, p. 938-946, 2009.

STEWART, D. J.; ACKROYD, R. Peptic ulcers and their complications, **Oesophagus and Stomach**, v. 29, n. 30, p. 568-574, 2011.

SUABJAKYONG, P.; NISHIMURA, K.; TOLDA, T.; GRIENSVEN, L.J.L.D. Structural characterization and immunomodulatory effects of polysaccharides from *Phellinus linteus* and *Phellinus igniarius* on the IL-6/IL-10 cytokine balance of the mouse macrophage cell lines (RAW 264.7). **Food & function**, v.6, p. 2834-2844, 2015.

SUZUKI, R. B.; COLA, R. F.; COLA, L. T. B.; FERRARI, C. G.; ELLINGER, F.; THEREZO, A. L.; SILVA, L. C.; ETEROVIC, A.; SPERANÇA, M. A. Different risk factors influence peptic ulcer disease development in a Brazilian population, **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 38, p. 5404-5411, 2012.

SWARNAKAR, S.; GANGULY, K.; KUNDUS, P.; BANERJEE, A.; MAITY, P.; SHARMA, A.V. Curcumin Regulates Expression and Activity of Matrix Metalloproteinases 9 and 2 during Prevention and Healing of Indomethacin-induced Gastric Ulcer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 10, p.9409-9415, 2004.

SZABO, S.; BROWN, A. Prevention of ethanol-induced vascular injury and gastric mucosal lesions by sucralfate and its components: possible role of endogenous sulphhydryls. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 4, p. 493–497, 1987.

SZABO, S.; VATTAY, P. Experimental gastric and duodenal ulcers. Advances in pathogenesis. **Gastroenterology Clinical North America**, v.19, p. 67–85, 1990.

SZABO, S., NAGY, L., PLEBANI, M. Glutathione, protein sulfhydryls and cysteine proteases in gastric mucosal injury and protection. **Clinica Chimica Acta**, v. 206, p. 95 105, 1992.

SZABO, S. “Gastric cytoprotection” is still relevant. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, 29, n. 4, p. 124-132, 2014.

TAKAYAMA, C.; FARIA, F. M.; ALMEIDA, A. C. A.; VALIM-ARAÚJO, D. A. O.; REHEN, C. S.; DUNDER, R. J.; SOCCA, E. A. R.; MANZO, L. P.; ROZZA, A. L.; SALVADOR, M. J.; PELLIZON, C. H.; HIRUMA-LIMA, C. A.; FERREIRA, A. L.; SOUZA-BRITO, A. R. M. Gastroprotective and ulcer healing effects of essential oil from *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, p. 147-155, 2011.

TAKEUCHI, K.; AIHARA, E.; SASAKI, Y.; NOMURA, Y.; ISE, F. Involvement of cyclooxygenase-1, prostaglandin E2 and EP1 receptors in acid induced HCO_3^-

secretion in the stomach. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.57, p.661–676, 2006.

TAKEUCHI K, KATO S, AMAGASE K. Prostaglandin EP receptors involved in modulating gastrointestinal mucosal integrity. **Journal of Pharmacological Sciences**; 114: 248–261, 2010.

TANAKA, K.; TSUTSUMI, S.; ARAI, Y.; HOSHINO, T.; SUZUKI, K.; TAKAKI, E.; ITO, T.; TAKEUCHI, K. NAKAI, A.; MIZUSHIMA, T. Genetic evidence for a protective role of heat shock factor 1 against irritant-induced gastric lesions. **Molecular Pharmacology**, v. 71, p. 985-993, 2007.

TARGOSZ, A.; MAGLEROWSKI, M.; SZCZYRK, U.; BRZOZOWSKI, T. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, interacts with gastric oxidative metabolism and enhances stress-induced gastric lesions. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 63, n.5, p. 515-524, 2012.

TARNAWSKI, A.; STACHURA, J.; DURBIN, T.; SARFEH, I.J.; GERGELY, H. Increased expression of epidermal growth factor receptor during gastric ulcer healing in rats. **Gastroenterology**, v. 102, p. 695-698, 1992.

TARNAWSKI, A. Molecular mechanism of ulcer healing. **Drug News Perspect**, v. 13, p. 158–168, 2000.

TARNAWSKI, Andrzej S.. Cellular and Molecular Mechanisms of Gastrointestinal Ulcer Healing. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, n. 1, p.24-33, 2005.

TARNAWSKI, A. S., AHLUWALIA, A. Molecular mechanisms of epithelial regeneration and neovascularization during healing of gastric and esophageal ulcers. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 16-27, 2012.

TARNAWSKI, A.; AHLUWALIA, A.; JONES, M. K. Gastric cytoprotection beyond prostaglandins: cellular and molecular mechanisms of gastroprotective and ulcer healing actions of antacids, **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, p. 126-132, 2013.

TEKELOVÁ, D.; TOTH, J.; CZIGLE, S.Z. KOUTSOULAS, A. Hydroxycinnamic derivatives content in plant organs linked to harvest time of *Salvia officinalis* L. cv. 'Krajová' Obsah hydroxyš korícových derivátov v rastlinných orgánoch *Salvia officinalis* L. cv. 'Krajová' v závislosti od termínu zberu. **Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae**, v 1, p 40-46, 2015.

TEO, S.; STIRLING, D.; THOMAS, S.; HOBERMAN, A.; KIORPES, A.; KHETANI, V. A 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d, l-methylphenidate in Sprague Dawley rats. **Toxicology**, v. 179, p. 183-196, 2002.

TEPEA, B.; EMINAGAOGLUB, O.; AKPULATA, H.A.; AYDIN, E. Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata*(L.) subsp.*verticillata* and *S. verticillata*(L.) subsp. *Amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm. **Food Chemistry**, v. 100, p. 985–989, 2007.

THIM, L.; MADSEN, F.; POULSEN, S.S. Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 32, p. 519–527, 2002.

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

TRACEY, K.J.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor: an updated review of its biology, **Critical Care Medicine**, v. 21, p. 415–422, 1993.

TRAVAGLI, R.A.; HERMANN, G. E.; BROWNING, K.N.; ROGERS, R.C. Brainstem circuits regulating gastric function. **Annual Review of Physiology**, v. 68, p. 279-305, 2006.

TULASSAY, Z.; HERSZÉNYI, L. Gastric mucosal defense and cytoprotection. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 24, p. 99-108, 2010.

TUORKEY, M.; KAROLIN, K. Anti-ulcer activity of curcumin on experimental gastric ulcer in rats and its effect on oxidative stress/antioxidant, IL-6 and

enzyme activities. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 22, p. 488-485, 2009.

TYTGAT, G. N. J. Etiopathogenetic Principles and Peptic Ulcer Disease Classification. **Digestive Diseases**, v. 29, p. 454-458, 2011.

UKWUANI, A. N.; ABUBAKAR, M. G.; HASSAN, S. W.; AGAIE, B. M. Toxicological studies of hydromethanolic leaves extract of *Grewia crenata*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 4, p. 245-249, 2012.

URUSHIDANI, T.; FORTE, J. G. Signal transduction and activation of acid secretion in the parietal cell. **The Journal of Membrane Biology**, v. 159, p. 99-111, 1997.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após “era do teste DL₅₀”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.2, p.93-98, 2006.

VALLI, M.; SANTOS, R.N.; FIGUEIRA, L.D.; NAKAJIMA, C.H.; CASTRO-GAMBOA, I.; ANDRICOPULO, A.D.; BOLZANI, V.S. Development of a natural products database from the biodiversity of Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 76, p. 439-444, 2013.

VALKO, M.; JOMOVA, K.; RHODES, C.J.; KUCA, K.; MULISEK, K. Redox- and non-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease, **Archives of Toxicology**, p. 1-37, 2015.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.

VERA-ARZAVE, C.; ANTONIO, L.C.; ARRIETA, J.; CRUZ-HERNÁNDEZ, G.; VELÁZQUEZ-MÉNDEZ, A.M.; REYES-RAMÍREZ, A.; SÁNCHEZ-MENDOZA, M.E. Gastroprotection of suaveolol, isolated from *Hyptis suaveolens*, against

ethanol-induced gastric lesions in Wistar rats: role of prostaglandins, nitric oxide and sulfhydryls, **Molecules** , v.17, p. 8917–8927, 2012.

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

WALLACE, J.L.; MCKNIGHT, W.; MIYASAKA, M.; TAMATANI, T.; PAULSON, J.; ANDERSON, D.C.; GRANGER, D.N.; KUBES, P. Role of endothelial adhesion molecules in NSAID-induced gastric mucosal injury. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v. 265, p. 993–998, 1993.

WALLACE, J.L.; SOLDATO, P.D. The therapeutic potential of NO-NSAIDs. **Publishing Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 17, p. 11-20, 2003.

WALLACE, J. L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? **Physiological Reviews**, v. 88, p.1547-1565, 2008.

WEN, S.; MOSS, S.F. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. **Cancer letter**, v. 282, p. 1-8, 2009.

WHITTLE, B.J.R.; LASZLO, F.; EVANS, S.M.; MONCADA, S. Induction of nitric oxide synthase and injury in the rat jejunum provoked by indomethacin. **British Journal of Pharmacology**, v. 116, p. 2286–2290, 1995.

WILLIAMS, L.D.; BURDOCK, G.A.; EDWARDS, J.A.; BECK, M.; BAUSCH, J. Safety studies conducted on high-purity trans-resveratrol in experimental animals. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 9, p.2170-2182, 2009.

WILLIAMS, L.D.; BURDOCK, G.A.; EDWARDS, J.A.; BECK, M.; BAUSCH, J. Safety studies conducted on high-purity trans-resveratrol in experimental animals. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 9, p.2170-2182, 2009.

WROBLEWSKI, L.E.; PEEK-JÚNIOR, R. M.; WILSON, K. T. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 713-739, 2010.

WU, J.Q.; KOSTEN, T.R.; ZHANG, X.Y. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. **Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 46, p. 200-206, 2013.

XUE, L.; AIHARA, E.; WANG, T.C.; MONTROSE, M.H. Trefoil factor 2 requires Na/H exchanger 2 activity to enhance mouse gastric epithelial repair. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 44, p. 38375-38382, 2011.

YANDRAPU, H.; SAROSIEK, J. Protective Factors of the Gastric and Duodenal Mucosa: An Overview. **Current Gastroenterology Reports**, v. 17, n. 6, p.23-31, 2015.

YOUSUF, S.; ATIF, F.; AHMAD, M.; HODA, N.; ISHRAT, T.; KHAN. B.; ISLAM, F. Resveratrol exerts its neuroprotective effect by modulating mitochondrial dysfunctions and associated cell death during cerebral ischemia. **Brain Research**, v.1250, p.242-253, 2009.

YUHKI, K.I.; KOJIMA, F.; KASHIWAGI, H.; KAWABE, J.I.; FUJINO, T.; NARUMIYA, S.; USHIKUBI, F. Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases: novel insights from knockout mouse studies, **Pharmacology & therapeutics**, v. 129, p. 195-205, 2011.

ZACARIA, Z.A.; BALAN, T.; SUPPAIAH, V.; AHMAD, S.; JAMALUDIN, F. Mechanism(s) of action involved in the gastroprotective activity of *Muntingia calabura*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, p. 1184-1193, 2014.

ZATERKA, S.; EISIG, J.N.; CHINZON, D.; ROTHSTEIN, W. Factors related to *Helicobacter pylori* prevalence in an adult population en Brazil. **Helicobacter**, v. 12, p. 82-88, 2007.

ZELICKSON, M.S.; BRONDER, C.M.; JOHNSON, B.L.; CAMUNAS, J.A.; SMITH, D.E.; RAWLINSON, D.; VON, S.; STONE, H.H.; TAYLOR, S.M. *Helicobacter pylori* is not the predominant etiology for peptic ulcers requiring operation. **The American Journal of Surgery**, v. 77, p. 1054-1060, 2011.

ZHANG, Y.; CHEN, X.; YANG, L.; ZU, Y.; LU, Q. Effects of rosmarinic acid on liver and kidney antioxidant enzymes, lipid peroxidation and tissue ultrastructure in aging mice. **Food Function**, v. 6, n. 3, p.927-931, 2015.

ZIMMERNAM, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, p. 109-110, 1983.

ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL (CEUA)



CERTIDÃO

João Pessoa, 11 de Junho de 2015.
CEUA nº 007/2015.

Ilmo(a): Profa. Dra. Leônia Maria Batista
Departamento de Ciências Farmacêutica – CCS – UFPB

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de 16/04/2015 analisou e **APROVOU** a execução do projeto **AValiação DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DE ÁCIDO ROSMARÍNICO EM MODELOS ANIMAIS.**

Com previsão de empregar 240 ratos WISTAR e 162 camundongos;

Animais do Biotério do Prof. Thomas George.

Para serem utilizados no período de 11/06/2015 a 11/06/2016.

Atenciosamente,

Isania Gisella Albuquerque Gonçalves
Profa. Dra. Isania Gisella Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPB

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Universidade Federal da Paraíba
www.ufpb.br/ceua/ - ceua@ufpb.br

ANEXO II

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

Observações complementares.: _____

