



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**LARISSA LUCENA PÉRICO**

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO  
ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA  
DE *Serjania marginata* Casar. FRENTE À DOENÇA  
ULCEROSA PÉPTICA EXPERIMENTAL**



Botucatu – SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**LARISSA LUCENA PÉRICO**

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO  
ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA  
DE *Serjania marginata* FRENTE À DOENÇA ULCEROSA  
PÉPTICA EXPERIMENTAL**

**ORIENTADORA: PROF. ADJA. CLÉLIA AKIKO HIRUMA LIMA**

**COORIENTADORA: PROFA. DRA. LÚCIA REGINA MACHADO  
DA ROCHA**

Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu UNESP, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (área de concentração: Farmacologia).

**Botucatu – SP**

**2014**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Périco, Larissa Lucena.

Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antiulcerogênica de *Serjania marginata* Casar. frente à doença ulcerosa péptica experimental / Larissa Lucena Périco. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Clélia Akiko Hiruma-lima

Coorientador: Lúcia Regina Machado da Rocha

Capes: 21001006

1. Úlcera péptica - Tratamento. 2. Estômago - Úlceras. 3. Mucosa gástrica. 4. Plantas medicinais.

Palavras-chave: Atividade antiulcerogênica; Muco gástrico; Peroxidação lipídica; *Serjania marginata* Casar; Úlceras pépticas.

# **BANCA EXAMINADORA**

---

**1º. Titular/ Presidente**

**Profa Adja. Clélia Akiko Hiruma-Lima (UNESP/Botucatu)**

---

**2º. Titular**

**Profa Dra Alessandra Gambero (Universidade São Francisco/Bragança Paulista)**

---

**3º. Titular**

**Profa Dra Patricia Fidelis de Oliveira Gregolini (UNESP/Botucatu)**

**Auxílio Financeiro:**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
(CAPES)

BIOTA- FAPESP/SP



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por permitir que tudo pudesse ser realizado.

Agradeço à **minha família** que sempre me apoiou nos momentos difíceis e compartilhou minhas alegrias. Aos meus pais, **Luzia e Vanderlei**, que são exemplos de ética e profissionalismo e que sempre me incentivaram nesta busca ao conhecimento e ao crescimento profissional, sempre com muito amor e carinho. Ao meu irmão, **Rafael**, pelo apoio, amor, carinho e compreensão. Agradeço a Deus pela família que tenho.

A **Tainara B. Ferrari** que sempre esteve comigo me apoiando e me aconselhando. Ela me abraçou nos dias de choro e também sorriu comigo nos momentos de alegria. Obrigada pela verdadeira amizade e companheirismo desde o momento em que cheguei em Botucatu, e que permanecerão pela vida. Ao **Caio** (Pajé), seu noivo, pela amizade e companheirismo.

A **Profª Adj. Clélia Akiko Hiruma-Lima** que me aceitou em seu laboratório sem ao menos me conhecer. Por todos esses anos de ensinamentos, pela amizade, pelo apoio, pelo exemplo de determinação profissional, de competência, de ética na pesquisa.

A **Profª Dra Lúcia Regina Machado da Rocha** por sua confiança, por suas observações didáticas e por ceder seu laboratório para realização deste projeto.

Ao **Prof. Tit. Wagner Vilegas** (UNESP – São Vicente-SP) e sua aluna **Silvia Cristina Heredia Vieira** (UNESP- Araraquara-SP) pela coleta, extração e análise fitoquímica da planta que foi objeto de estudo deste trabalho.

Aos professores do **Departamento de Farmacologia** que contribuíram para a minha formação.

A equipe do **Laboratório de Ensaio Biológicos com Produtos Naturais** por toda ajuda e apoio prestados. **Raquel** (Pocotó), **Fernando** (Fer, Ferdi, Paraíba ou Tocantins), **Catarine** (Cat), **Ellen, Flávia** (Kalose), **Celi, Juliana, Vinícius** (Garboso), **Stefanni** (Waka), **Júlia, Bruna** (Piripaki), **Paty, Juan, Maycon, Edlaine e Tamires** sem a colaboração de cada um de vocês este trabalho não seria concluído. Em especial agradeço a **Pocotó** por sua amizade, experiência, orientação e ensinamentos que tanto me fizeram crescer no mestrado; **Fernando** por seu companheirismo em praticamente

todos os experimentos, pela amizade, alegria, risadas, piadas, bom humor e fofocas durante estes anos de convivência.

As meninas do Bura (**Paula Fernanda de Lima e Cinthia M. Ormond**) pela alegria, pelas risadas, noites de comida japa, espetinho do “Véio” e apoio em muitos e muitos momentos.

Aos funcionários e ex-funcionários do Departamento de Fisiologia **Lilian, Juliano e Sr Júnior** pelos cuidados com os animais, e a **Janete** pelos cuidados com o Departamento e por ser uma pessoa tão irreverente e animada. Em especial ao ex-técnico do Departamento de Fisiologia, **Dr. Hélio Kushima (Pom-Pom ou “Pai”)**, pelas inúmeras ajudas e pelos conhecimentos e habilidades que vão além da farmacologia.

Aos **professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Farmacologia)**. Obrigada pelos ensinamentos transmitidos durante estes anos.

Aos **funcionários da Seção de Pós-Graduação** por todos os auxílios e informações prestadas.

A **CAPES, Projeto Biota/FAPESP e a “Bolsa-Pai”** pelo apoio financeiro.

**OBRIGADA!**

**“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”.**

**Claude Lévi-Strauss**

## PRÓLOGO

O desenvolvimento do projeto de mestrado possibilitou a formação específica em Farmacologia, com estudos direcionados para a caracterização de atividade farmacológica de produtos naturais no tratamento doença ulcerosa péptica. Durante a execução do projeto de mestrado, foram realizadas outras atividades, no intuito de enriquecer a minha formação profissional e científica.

### **Trabalhos apresentados na forma de painel em eventos científicos**

- ➔ **Périco, L. L.**; Ganev, E. G.; Heredia Vieira, S. C.; Vilegas, W.; Rocha, L. R. M.; Hiruma-Lima, C. A. Evaluation of toxicity and antiulcerogenic activities of the hydroalcoholic extract (leaves) from *Serjania marginata* in rodents. In: 5<sup>th</sup> International Symposium of Post Graduation and Research (V SINPOSPq), 2012, Ribeirão-Preto – SP – Brasil.
- ➔ Hiruma-Lima, C. A.; Rocha, L. R. M.; **Périco, L. L.**, Nishida, S. M. Difundindo e Popularizando a Ciência na UNESP: Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico – Reprodução de A à Z. durante o Simpósio da Rede Nacional de Educação e Ciência, 2013, Petrópolis – RJ, Brasil.
- ➔ Beserra, F. P.; **Périco, L. L.**; Polo, C. M.; Lopes, J. A.; Saldanha, L. L.; Rocha, L. R. M.; Dokkedal, A. L.; Hiruma-Lima, C.A. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae) sobre os parâmetros bioquímicos em modelos agudos de úlcera gástrica, durante o XII Workshop da Pós-Graduação do Instituto de Biociências de Botucatu, 2013, Botucatu – SP, Brasil.
- ➔ Beserra, F. P.; **Périco, L. L.**; Santos, R. C.; Kushima, H.; Saldanha, L. L.; Rocha, L. R. M.; Dokkedal, A. L.; Hiruma-Lima, C.A. Efeito antidiarreico de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae) envolve alterações no trânsito e secreção intestinal, durante o I Simpósio Internacional de Práticas Integrativas e Complementares na Atenção Básica à Saúde. Faculdades de Ciências Farmacêuticas, 2013, Araraquara – SP, Brasil.
- ➔ **Périco, L. L.**; Beserra, F. P.; Lopes, J. A.; Heredia Vieira, S. C.; Vilegas, W.; Rocha, L. R. M.; Hiruma-Lima, C. A. Anti-edematogenic activity of hydroalcoholic extract from *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae): Role of

PGE<sub>2</sub>. In: III International Symposium on Drug Discovery. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2013, Araraquara – SP, Brasil.

- ➔ **Périco, L. L.** Avaliação da atividade antiulcerogênica, antidiarreica e anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico das folhas de *Serjania marginata* (Sapindaceae), durante o III Simpósio de Farmacologia da UNESP – Botucatu, 2013, Botucatu – SP, Brasil.
- ➔ Beserra, F. P.; **Périco, L. L.**; Santos, R. C.; Saldanha, L. L.; Dokkedal, A. L.; Rocha, L. R. M.; Hiruma-Lima, C.A. Gastroprotective Effect of *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae) involves the participation of nitric oxide and increase gastric mucus secretion. In: III International Symposium on Drug Discovery. Faculdades de Ciências Farmacêuticas, 2013, Araraquara – SP, Brasil.
- ➔ Beserra, F. P.; **Périco, L. L.**; Lopes, J. A.; Nishijima, C. M.; Santos, R. C.; Saldanha, L. L.; Rocha, L. R. M.; Dokkedal, A. L.; Hiruma-Lima, C.A. From popular use to preclinical validation: a study of the anti-inflammatory Effect of hydroalcoholic extract from the leaves of *Cissus sicyoides* Linn. (Vitaceae) in rodents, durante IER. Congreso Internacional de Productos Fitofarmacêuticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacêuticos de Colombia, 2013, Bogotá – Colômbia.
- ➔ **Périco, L.L.**; Beserra, F. P.; Ganev, E. G.; Heredia Vieira, S. C.; Vilegas, W.; Rocha, L. R. M.; Hiruma-Lima, C. A. Evaluation of the mechanisms of action involved in the gastroprotection of *Serjania marginata* in rodents, durante o 45° Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE), 2013, Ribeirão-Preto – SP, Brasil.

#### **Trabalho apresentado na forma oral durante evento científico**

- ➔ **Périco, L. L.** Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antiulcerogênica de *Serjania marginata* frente à doença ulcerosa péptica experimental, durante o II Simpósio de Farmacologia da UNESP – Botucatu, 2012, Botucatu – SP, Brasil.

### **Participação em eventos científicos**

- ➔ XI Workshop da Pós-Graduação – UNESP, 05/2012, Botucatu – SP, Brasil.
- ➔ II Simpósio de Farmacologia da UNESP, 06/2012, Botucatu – SP, Brasil.
- ➔ 5<sup>th</sup> International Symposium of Post Graduation and Research (V SINPOSPq), 09/2012, Ribeirão-Preto – SP, Brasil.
- ➔ Simpósio da Rede Nacional de Educação e Ciência – Novos Talentos da Rede Pública, 05/2013, Petrópolis – RJ, Brasil.
- ➔ XII Workshop da Pós-Graduação – UNESP, 06/2013, Botucatu – SP, Brasil.
- ➔ III Simpósio de Farmacologia da UNESP, 06/2013, Botucatu – SP, Brasil.
- ➔ III International Symposium on Drug Discovery – UNESP, 07/2013, Araraquara – SP, Brasil.
- ➔ 45° Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE), 10/2013, Ribeirão-Preto – SP, Brasil.

### **Extensão Universitária**

- ➔ Monitora do curso “Reprodução de A a Z”, como parte das atividades do Programas de Extensão Universitária “Difundindo e Popularizando a Ciência na UNESP: Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico”, realizado no Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu, 01/2012, Botucatu – SP, duração de 48 horas.
- ➔ Monitora do curso “Reprodução de A a Z”, como parte das atividades do Programas de Extensão Universitária “Difundindo e Popularizando a Ciência na UNESP: Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico”, realizado no Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu, 01/2013, Botucatu – SP, duração de 48 horas.
- ➔ Expositora das atividades do Projeto de Extensão Universitária “Difundindo e Popularizando a Ciência na UNESP: Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico” do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu, durante o evento de

extensão universitária “Venha conhecer o IB”, 08/2013, Botucatu – SP, durante 5 horas.

### **Cursos realizados**

- ➔ Mini-curso: “Planejamento de Experimentos”, durante o XI Workshop da Pós-Graduação do Instituto de Biociências de Botucatu, 05/2012, Botucatu – SP, duração de 5 horas.
- ➔ Mini-curso: “Como escrever artigos científicos” no 5<sup>th</sup> International Symposium of Post Graduation and Research (V SINPOSPq), 09 /2012, Ribeirão Preto – SP, duração de 4 horas.
- ➔ Seminário Técnico: “Cromatografia – HPLC; CG e SP” – Allcrom –UNESP, 04/2013 -Botucatu-SP, duração de 8 horas.
- ➔ Mini-curso: “Quimioprevenção do câncer com produtos naturais”, durante o XII Workshop da Pós-Graduação no Instituto de Biociências de Botucatu, 06/2013, Botucatu – SP, duração de 8 horas.

### **Aula Prática ministrada**

- ➔ I Curso de Inverno em Farmacologia e Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Farmacologia), do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP – Botucatu, 07/2013, Botucatu – SP, duração de 1 hora.

### **Disciplinas cursadas**

- ➔ Abordagem Estatística em Farmacologia I Fundamentos – 1 crédito.
- ➔ Abordagem Estatística em Farmacologia II Aplicabilidade – 2 créditos.
- ➔ Classificação de Receptores Farmacológicos - 3 créditos.
- ➔ Farmacocinética – 5 créditos.
- ➔ Farmacodinâmica: Receptores e Interação Droga-Receptor – 3 créditos.
- ➔ Plantas Medicinais: Abordagens de Estudo Interdisciplinar – 6 créditos.
- ➔ Tópicos Especiais em Farmacologia - Métodos de Purificação e Análise de Produtos Naturais – 3 créditos.
- ➔ Farmacologia do Sistema Nervoso Autônomo Simpático – 3 créditos.

→ Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico de Ciências e Biologia – 6 créditos.

→ **Total de créditos em disciplinas – 32 créditos**

#### **Artigo Aceito para Publicação**

→ Carvalho, K. I. M.; Bonamin, F.; Santos, R. C. dos.; Périco, L. L.; Beserra, F. P.; Sousa, D. P. de.; Barbosa Filho, J. M.; Rocha, L. R. M.; Hiruma-Lima, C. A. Geraniol — a flavoring agent with multifunctional effects in protecting the gastric and duodenal mucosa. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.** Article in press.

## RESUMO

Úlceras pépticas abrange tanto as úlceras gástricas, quanto as úlceras duodenais e tem sido uma grande ameaça para a população mundial ao longo dos últimos dois séculos. A patogênese complexa e multifatorial desta doença ocorre devido a um desequilíbrio entre os fatores agressores (ácido clorídrico, pepsina, etanol, DAINes, estresse, *Helicobacter pylori*, entre outros) e os protetores (muco, bicarbonato, prostaglandinas, fluxo sanguíneo) da mucosa do estômago ou duodeno. Numa tentativa de proteger a mucosa gástrica do ácido clorídrico, melhorar a cicatrização da úlcera, e prevenir a sua recorrência, o controle farmacológico da secreção ácida tem representado durante muito tempo um objetivo dos fármacos antiulcerogênicos. Dentre as opções disponíveis no mercado, temos os antagonistas de receptores H<sub>2</sub> e os inibidores da bomba de prótons. Algumas destas drogas podem promover não somente uma gama de efeitos colaterais, mas também uma menor eficácia no tratamento de úlceras e principalmente não evita a sua recidiva. Assim, a necessidade de agentes mais efetivos e seguros é premente. Por isso, esforços científicos têm sido dirigidos para encontrar o tratamento adequado a partir de produtos naturais, como nova fonte de fármacos antiúlcera. *Serjania marginata* Casar., uma espécie comumente encontra no Cerrado brasileiro, tem sido descrito por sua indicação popular no tratamento de dores gástricas, porém, não existem estudos sobre suas atividades farmacológicas para o tratamento ou prevenção das úlceras pépticas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade gastroprotetora do extrato hidroalcoólico das folhas de *Serjania marginata* (EHSM) em diferentes modelos experimentais *in vivo*. Foi inicialmente realizado um teste de toxicidade aguda e da performance motora para avaliar a possível toxicidade e efeitos neurotóxicos do extrato, porém este não causou nenhuma alteração nestes modelos experimentais, demonstrando portanto a segurança de uso para continuidade dos estudos com esta espécie. Foi observado que o EHSM, administrado oralmente, possui uma ação protetora frente as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto e isquemia-reperfusão (dose de 250 mg/kg). Porém, o extrato não foi efetivo em proteger a mucosa gástrica e duodenal quando desafiado com DAINes ou cisteamina. O EHSM é capaz de agir localmente na mucosa gástrica. A ação antiulcerogênica do extrato é devido ao aumento de muco aderido a mucosa gástrica que forma um revestimento protetor sobre o epitélio e fortalece a barreira mucosa. Foi observado que o EHSM é capaz de restabelecer o fluxo sanguíneo do tecido gástrico mesmo quando submetido ao

efeito do etanol. O extrato ainda atua diminuindo a peroxidação lipídica e a infiltração de neutrófilos para a região da mucosa gástrica, e não possui atividade antissecretória. O EHSM não foi capaz de alterar o trânsito intestinal e de prevenir ou combater as diarreias provocadas por agentes catárticos. *Serjania marginata* também apresenta uma potente atividade antimicrobiana frente às principais bactérias do trato gastrointestinal, como a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Helicobacter pylori*. Desta forma, podemos concluir que o extrato de *S. marginata* pode ser uma opção terapêutica para o tratamento das úlceras gástricas ao exercer um efeito gastroprotetor pelo aumento de muco gástrico (sem alterar o pH do meio) e prevenir a peroxidação lipídica e a infiltração de neutrófilos para o local. Aliado a ação gastroprotetora o extrato também exerce uma efetiva ação antimicrobiana, inclusive no combate a um dos principais indutores de úlcera no homem, a *H. pylori*.

**Palavras-chave:** *Serjania marginata* Casar.; atividade antiulcerogênica; peroxidação lipídica; muco gástrico; infiltração de neutrófilos; úlceras pépticas.

## ABSTRACT

Peptic ulcer disease includes both gastric and duodenal ulcers and has been a major threat to the world's population over the past two centuries. The complex and multifactorial pathogenesis of this disease occurs due to an imbalance between aggressive (hydrochloric acid, pepsin, ethanol, NSAIDs, stress, *Helicobacter pylori*, among others) and protective factors (mucus, bicarbonate, prostaglandins, blood flow) of the mucosa of stomach or duodenum. In an attempt to protect the gastric mucosa from hydrochloric acid, improve ulcer healing and prevent recurrence, the pharmacological control of acid secretion has long represented an aim of antiulcerogenic drugs. Among the options available in the market, we have the H<sub>2</sub> receptor antagonists and proton pump inhibitors. Some of these drugs can promote not only a range of side effects, but also a decrease in effectiveness in the treatment of ulcers and primarily not prevent its recurrence. Thus, the necessity of more effective and safe agents is clearly pressing. Hence, scientific efforts are conducted to find the adequate treatment from natural products, such as source of drugs. *Serjania marginata* Casar., a specie commonly found in the Brazilian Cerrado, has been described by its popular indication to treat stomach aches, however, there are no studies on their pharmacological activities for the treatment or prevention of peptic ulcers. Therefore, the aim of this study was to evaluate the gastroprotective activity of the hydroalcoholic extract from leaves of *Serjania marginata* (EHSM) in different experimental models. It was initially performed a test of acute toxicity and motor performance to evaluate the possible toxicity and neurotoxic effects of the extract, however this did not cause any changes in these experimental models, thus demonstrating the safety of use for continuing studies with this species. It was observed that EHSM, orally administered, has a protective action against the gastric lesions induced by absolute ethanol and ischemia-reperfusion (dose of 250 mg/kg). However, the extract was not effective in protecting the gastric and duodenal mucosa when challenged with NSAIDs or cysteamine. The EHSM is able to act locally in the gastric mucosa. The antiulcerogenic action of the extract is due to an increased in the mucus adhered to the gastric mucosa that forms a protective coating over the epithelium and strengthens the mucosal barrier. It was observed that EHSM is able to restore blood flow in the gastric tissue when subjected to the effect of ethanol. The extract also acts by decreasing lipid peroxidation and neutrophil infiltration to the region of gastric mucosa and has no anti-secretory

activity. The EHSM was not able to alter the intestinal transit and to prevent or combat the diarrhea caused by cathartic agents. *Serjania marginata* also exhibits potent antimicrobial activity against major bacteria of the gastrointestinal tract, such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Helicobacter pylori*. Thus, we can conclude that the extract of *Serjania marginata* may be a therapeutic option for the treatment of gastric ulcers when exercising gastroprotective effect by increasing gastric mucus (without changing the pH of the medium) and preventing lipid peroxidation and infiltration of neutrophils to the site. Combined with the gastroprotective action, the extract also exerts an effective antimicrobial action, including the combat to the major inducer of ulcer in man, *H. pylori*.

**Key-words:** *Serjania marginata* Casar.; antiulcerogenic activity; lipid peroxidation; gastric mucus; neutrophil infiltration; peptic ulcer.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

<b>Figura 1</b> - Imagem ilustrativa de úlceras duodenais e gástricas.....	29
<b>Figura 2</b> - Ilustração dos fatores de protetores da mucosa.....	32
<b>Figura 3</b> - Esquema de atuação de algumas enzimas antioxidantes.....	41
<b>Figura 4</b> - Estrutura química de fármacos com propriedades antagonistas de receptores H <sub>2</sub> .....	44
<b>Figura 5</b> - Estrutura química de fármacos inibidores da bomba de prótons.....	46
<b>Figura 6</b> - <i>Serjania marginata</i> Casar.....	50

### ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

<b>Figura 1</b> - Evolução do peso corporal (g) de camundongos machos tratados com dose única do EHSM (5000 mg/kg). Média do peso (g) dos animais monitorados durante 14 dias.....	66
<b>Figura 2</b> - Evolução do peso corporal (g) de camundongos fêmeas tratadas com dose única do EHSM (5000 mg/kg). Média do peso (g) dos animais monitorados durante 14 dias.....	66
<b>Figura 3</b> - Avaliação do número de quedas dos camundongos tratados oralmente com EHSM (5000 mg/kg) no modelo de Rota Rod.....	68
<b>Figura 4</b> - Avaliação das diferentes doses de EHSM (125; 250 e 500 mg/kg) e carbenoxolona (100 mg/kg) frente ao modelo de úlceras gástrica induzidas por etanol absoluto em ratos.....	69
<b>Figura 5</b> - Efeito gastroprotetor do EHSM (125; 250 e 500 mg/kg) frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos.....	70

<b>Figura 6</b> - Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica (MDA) em animais pré-tratados com EHSM submetidos ao modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol absoluto.....	71
<b>Figura 7</b> - Avaliação do fluxo sanguíneo gástrico em ratos pré-tratados com EHSM frente ao modelo úlceras gástricas induzidas por etanol.....	72
<b>Figura 8</b> - Efeito gastroprotetor do EHSM (250 mg/kg) nos níveis de GSH e na atividade da MPO frente ao modelo de úlcera gástrica induzidas por isquemia e reperfusão em ratos.....	73
<b>Figura 9</b> - Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica (MDA) em animais pré-tratados com EHSM submetidos ao modelo de úlceras gástricas induzidas por isquemia-reperfusão em ratos.....	74
<b>Figura 10</b> - Avaliação do efeito gastroprotetor do EHSM frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por indometacina (DAINE).....	75
<b>Figura 11</b> - Avaliação do efeito gastroprotetor do EHSM (250 mg/kg) frente ao modelo de úlceras duodenais induzidas por cisteamina.....	76
<b>Figura 12</b> - Quantificação de muco aderido a mucosa gástrica em ratos pré-tratados com o EHSM (250 mg/kg) .....	78
<b>Figura 13</b> - Avaliação da ação local e sistêmica do EHSM na proteção gástrica de úlceras induzidas por etanol absoluto.....	81
<b>Figura 14</b> - Determinação dos níveis de PGE <sub>2</sub> em animais submetidos ao pré-tratamento com EHSM (125 e 250 mg/kg) no modelo de úlceras gástricas induzidas por DAINES.....	82
<b>Figura 15</b> - Avaliação do EHSM (125; 250 e 500 mg/kg) sobre a motilidade intestinal.....	83

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Efeito do tratamento agudo com o EHSM (5000 mg/kg) sobre os órgãos de camundongos machos (g) no modelo de toxicidade aguda.....	67
<b>Tabela 2</b> - Efeito do tratamento agudo com o EHSM (5000 mg/kg) sobre os órgãos de camundongos fêmeas (g) no modelo de toxicidade aguda.....	67
<b>Tabela 3</b> - Efeitos do EHSM (250 mg/kg) administrados oralmente (v.o) ou intraduodenalmente (i.d) nos parâmetros do suco gástrico no modelo de ligadura do piloro em ratos.....	77
<b>Tabela 4</b> - Efeitos do EHSM (250 mg/kg) em lesões gástricas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com NEM (um bloqueador de compostos sulfidrílicos), L-NAME (inibidor da NO sintase) ou Ruthenium Red (bloqueador de TRPV).....	80
<b>Tabela 5</b> - Avaliação do EHSM sobre o modelo de indução de diarreia em camundongos.....	84
<b>Tabela 6</b> - Avaliação do efeito do extrato EHSM sobre o crescimento em <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>H. pylori</i> .....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AINES – anti-inflamatórios não esteroidais

CaCO<sub>3</sub> – carbonato de cálcio

CAT - catalase

CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

COX – Ciclooxigenase

COX-1 – Ciclooxigenase tipo 1

COX-2 – Ciclooxigenase tipo 2

DAINEs – Drogas anti-inflamatórias não esteroidais

EHSM – extrato hidroalcoólico das folhas de *Serjania marginata*

EROs – espécies reativas de oxigênio

*E. coli* – *Escherichia coli*

GABA – ácido gama aminobutírico

GI – gastrintestinal

GPx – glutathiona peroxidase

GSH – glutathiona reduzida

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio

H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase – bomba de prótons

*H. pylori* – *Helicobacter pylori*

IBP – inibidores da bomba de prótons

ID - intraduodenal

IL-8 – interleucina - 8

IL-6 – interleucina – 6

I/R – isquemia-reperfusão

kg - quilograma

L - litro

L-NAME – N-nitro-L-arginina metil éster

MDA – malondialdeído

mg – miligrama

mL – mililitro

mm<sup>2</sup> – milímetro quadrado

MIC – concentração inibitória mínima

MPO - mieloperoxidase

NEM – N-etilmaleimida

NO – óxido nítrico

c NOS – óxido nítrico constitutivo

e NOS – óxido nítrico endotelial

i NOS – óxido nítrico induzível

n NOS – óxido nítrico neuronal

NOS – óxido nítrico sintase

$O_2^-$  - ânion superóxido

OH – radical hidroxila

PGs – prostaglandinas

$PGE_2$  – Prostaglandina tipo  $E_2$

r.p.m – rotações por minuto

*S. aureus* – *Staphylococcus aureus*

SH – compostos sulfidrílicos

SOD – superóxido dismutase

TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral  $\alpha$

TRPV-1 – receptor de potencial transitório vanilóide 1

USD – dólar dos EUA

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

V.O – via oral

$\mu g$  - micrograma

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>28</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>29</b>
1. Úlceras Pépticas.....	29
2. Homeostasia da mucosa gástrica.....	31
1.2.1. Fatores protetores da mucosa.....	32
3. Fatores agressores da mucosa.....	36
4. Radicais livres e defesa antioxidante.....	39
5. Estratégias Terapêuticas.....	42
6. <i>Serjania marginata</i> Casar.....	48
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>50</b>
1. Objetivo Geral.....	50
2. Objetivos específicos.....	50
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>51</b>
<b>3. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO.....</b>	<b>52</b>
1. Introdução.....	53
2. Material e Métodos.....	55
2.1 Drogas e Substâncias Químicas.....	55
2.2 Material Vegetal e Extração.....	55
2.3 Animais.....	56
2.4 Práticas Experimentais.....	56
2.4.1 - Toxicidade aguda e screening hipocrático.....	56
2.4.2 - Avaliação da performance motora – Rota Rod.....	57
2.4.3 - Úlceras gástricas induzidas por etanol absoluto.....	57
2.4.4 - Determinação do fluxo sanguíneo em úlcera gástrica induzida por etanol absoluto.....	57
2.4.5 - Modelo de indução de úlceras gástricas por Isquemia e Reperfusão.....	58
2.4.6 - Úlceras gástricas induzidas por DAINES.....	58

2.4.7 - Modelo de indução de úlceras duodenais por Cisteamina.....	59
2.4.8 - Avaliação da atividade antissecretória do EHSM e análise dos parâmetros do suco gástrico.....	59
2.4.9 - Quantificação do muco gástrico aderido.....	60
2.4.10 - Determinação do papel dos grupamentos sulfidrílicos na citoproteção.....	60
2.4.11 - Determinação do papel do Óxido Nítrico (NO) na citoproteção.....	61
2.4.12 - Determinação do envolvimento dos receptores vanilóides na citoproteção.....	61
2.4.13 - Análise do efeito sistêmico do EHSM.....	61
2.4.14 - Determinação dos níveis de (PGE <sub>2</sub> ).....	62
2.4.15 - Determinação da Mieloperoxidase (MPO).....	62
2.4.16 - Determinação da Glutathiona (GSH).....	63
2.4.17 - Quantificação de malondialdeído (MDA).....	63
2.4.18 - Motilidade gastrointestinal.....	64
2.4.19 - Diarreia induzida por óleo de rícino.....	64
2.4.20 - Atividade sobre o crescimento em <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Helicobacter pylori</i> .....	64
2.5 Análise Estatística.....	65
3. Resultados.....	65
(a) Toxicidade aguda e screening hipocrático.....	65
(b) Avaliação da performance motora.....	67
(c) Atividade gastroprotetora.....	68
(i) Lesão gástrica induzida por etanol absoluto.....	68
(ii) Lesão gástrica induzida por isquemia/reperfusão.....	72
(iii) Lesão gástrica induzida por DAINÉ.....	74
(d) Úlcera duodenal induzida por cisteamina.....	75
(e) Avaliação dos mecanismos de ação.....	76
(i) Atividade antissecretória.....	76
(ii) Quantificação do muco aderido à mucosa gástrica.....	77
(iii) Determinação do papel dos grupamentos sulfidrílicos, NO e nervos sensíveis à capsaicina na gastroproteção.....	78
(iv) Avaliação da atividade local e sistêmica de EHSM.....	81

(v) Quantificação de PGE <sub>2</sub> na mucosa gástrica.....	81
(f) Avaliação da Motilidade intestinal.....	82
(g) Avaliação do efeito antidiarreico.....	83
(h) Ensaios <i>in vitro</i> .....	84
(i) Avaliação da ação antimicrobiana de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>H. pylori</i> .....	84
4. Discussão.....	85
5. Conclusão.....	97
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
ANEXOS.....	127

## APRESENTAÇÃO

A maneira de exposição dos capítulos foi feita com o objetivo de encaminhar o artigo para a publicação em revista científica, o que facilita e agiliza o processo de publicação dos resultados.

O **capítulo 1** contém uma abordagem ampla sobre as úlceras pépticas, a homeostasia da mucosa gástrica, os fatores protetores e agressores da mucosa, bem como o tratamento e problemática atual sobre a terapêutica. Este capítulo também contém informações sobre o objeto de estudo (o extrato de *Serjania marginata* Casar.), etnofarmacologia e os estudos fitoquímicos. Encontra-se também descrito no capítulo os objetivos (geral e específicos) o trabalho.

No **capítulo 2** encontra-se o artigo: “Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Serjania marginata* Casar. nas lesões gástricas experimentais: papel do muco na gastroproteção”. Este estudo mostra os resultados do efeito gastroprotetor em diversos modelos experimentais de úlcera péptica, assim como a elucidação de seus mecanismos de ação.

# CAPÍTULO 1

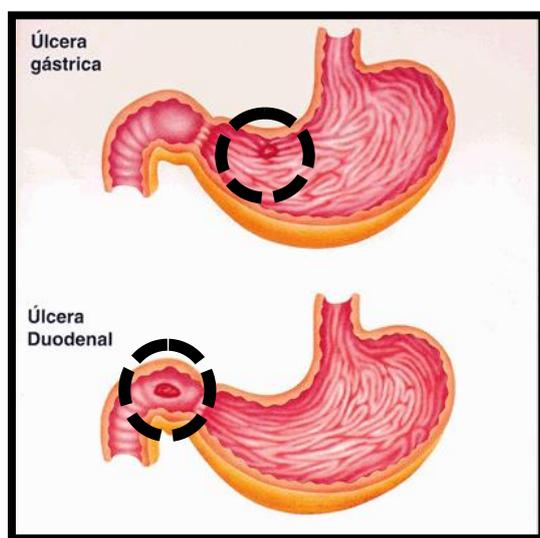
## 1.INTRODUÇÃO

### 1.1 Úlceras pépticas

As úlceras pépticas abrangem tanto as úlceras gástricas, quanto as úlceras duodenais (MALFERTHEINER et al., 2009); e a cada ano a doença ulcerosa péptica afeta 4 milhões de pessoas no mundo (ZELICKSON et al., 2011). Ela continua a ser uma das principais causas de morbidade e, em alguns casos, é uma causa subjacente da mortalidade por complicações posteriores, tais como perfuração ou sangramento (BARKUN & LEONTIADIS, 2010).

As úlceras são lesões necróticas profundas caracterizadas por rompimento na integridade da mucosa e perda de tecido superficial, levando a uma inflamação local na muscular (SRIKANTA et al., 2010; MERRIAM-WEBSTER, 2014).

A localização típica da úlcera duodenal é no bulbo, onde os conteúdos gástricos entram em contato com o intestino delgado. No estômago, normalmente, as úlceras se localizam na menor curvatura, porém, podem ocorrer em qualquer localização a partir do piloro até a cárdia (MALFERTHEINER et al., 2009) (Fig. 1).



**Figura 1:** Imagem ilustrativa de úlceras duodenais e gástricas.  
(Disponível em [http://www.gastrosite.com.br/s\\_estomago.php](http://www.gastrosite.com.br/s_estomago.php) - Acessado em 11/11/2013).

A complicação mais frequente e severa das úlceras pépticas é o sangramento, no qual existem relatos de sua ocorrência de 50–170 casos por 100.000 pacientes, com o maior risco em pessoas com mais de 60 anos (MALFERTHEINER et al., 2009). A

perfuração é menos frequente do que o sangramento e ocorre em 2-10% dos pacientes com doença ulcerosa péptica (BERTLEFF & LANGE, 2010). Entre os pacientes com úlcera duodenal, 6% a 11% apresentam perfuração e, dentre aqueles com úlcera gástrica, 2% a 5% pode resultar em perfurações gástricas (CASALI et al., 2012).

Sabe-se que a úlcera péptica é uma doença comum com grande incidência clínica e com chances de cura com as terapêuticas atuais, porém, o tratamento e principalmente as medidas preventivas que evitem as elevadas taxas de recidivas da doença ainda são um grande desafio no campo médico. Os custos com as doenças ulcerosas pépticas por pacientes são de 163 à 866 dólares por ano (BARKUN & LEONTIADIS, 2010).

Dados epidemiológicos têm demonstrado marcantes variações de incidência geográfica, prevalência e suas complicações. O desenvolvimento da úlcera tem sido associado ao surgimento da urbanização com aumento da incidência em indivíduos nascidos a partir do século 19 (SUSSER & STEIN, 1962; SONNENBERG, 2006).

A compreensão da doença mudou significativamente com a descoberta de *Campylobacter pyloridis* (renomeada para *Helicobacter pylori* em 1989 devido a uma revisão taxonômica) em 1982 por Barry Warren e Robin Marshall (WARREN & MARSHALL, 1983; MARSHALL & WARREN, 1984). Esta descoberta mudou o conceito de úlcera, de uma doença relacionada à secreção de ácido para uma doença infecciosa. A terapia supressiva de ácido, que se seguiu durante décadas de domínio de intervenções cirúrgicas (resseção gástrica subtotal, várias formas de vagatomia), foi substituída por antibioticoterapia que tinha como alvo a erradicação da *Helicobacter pylori* (NIH CONSENSUS CONFERENCE, 1994; MALFERTHEINER et al., 2007). A erradicação da *H. pylori* como cura para a úlcera péptica recebeu um reconhecimento enorme quando o prêmio Nobel para Medicina e Fisiologia foi concedido para Warren e Marshall em 2005. Este reconhecimento, no entanto, não encerrou o assunto sobre o tratamento das úlceras pépticas. O tratamento da doença ulcerosa e suas complicações continuam ainda sendo um desafio (MALFERTHEINER et al., 2009). A busca por novas moléculas se faz necessária, pois a terapêutica atual revelou a incidência de efeitos colaterais, interações com outros fármacos e a recidiva depois da interrupção do tratamento medicamentoso (DEVAULT & TALLEY, 2009). Adicionalmente, drogas anti-inflamatórias não esteroidais (DAINEs) e baixas doses de aspirina, comumente

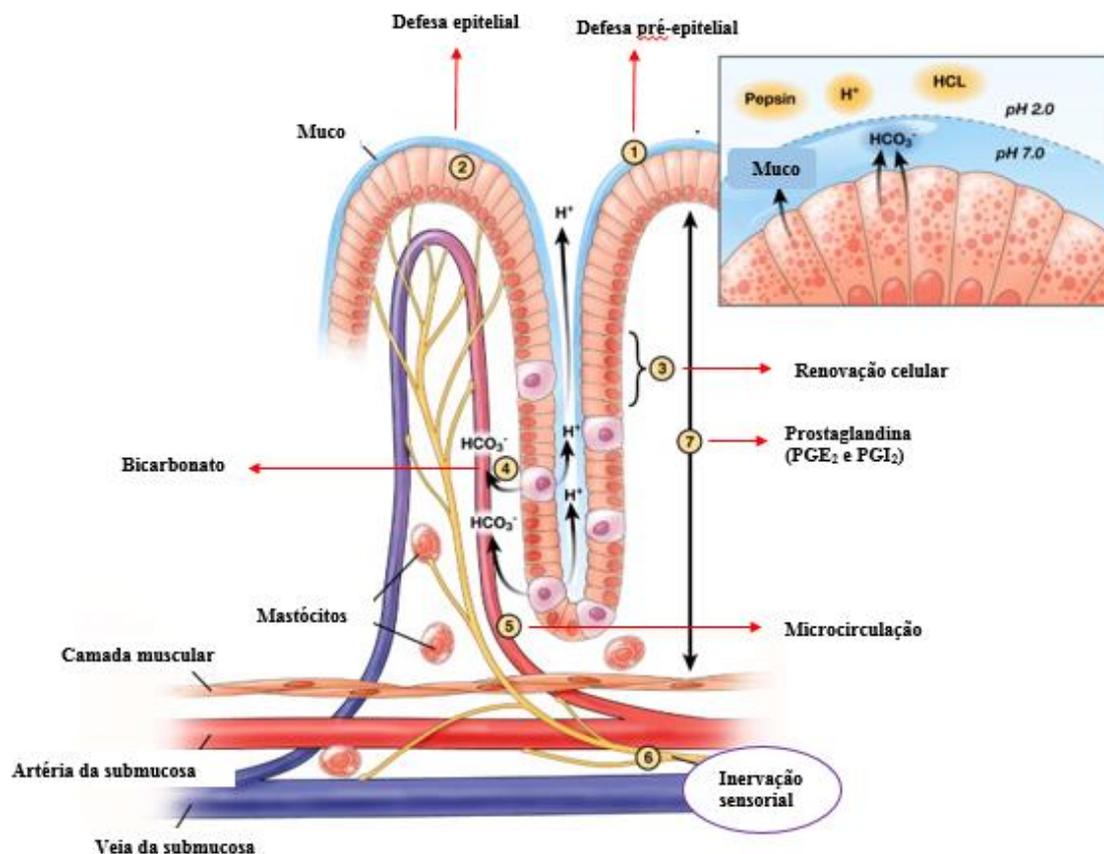
utilizados para a prevenção de eventos cardiovasculares, são causas muito importantes das úlceras e suas complicações, até mesmo em pacientes *H. pylori* negativos (GARCIA RODRIGUEZ et al., 2007; GABRIEL et al., 1991).

A patogênese complexa e multifatorial da úlcera vem sendo estudada durante décadas, e sabe-se que ocorre devido a um desequilíbrio entre os fatores agressores (ácido e pepsina) e os protetores da mucosa (CHOI et al., 2009; AMARAL et al., 2013).

## **1.2 Homeostasia da mucosa gástrica**

O trato gastrintestinal, por ser um órgão em comunicação com o exterior, está continuamente exposto aos agentes lesivos. Dentre os agentes lesivos temos os fatores agressores endógenos, tais como o ácido clorídrico, a pepsina e os fatores exógenos, como estresse, tabagismo, consumo de álcool, deficiências nutricionais e infecções (OYAGI et al., 2010). Entretanto, a excessiva ingestão de DAINES e a infecção por *H. pylori* são as principais causas da doença (RAMAKRISHNAN & SALINAS, 2007).

Em resposta aos fatores agressores da mucosa há os fatores protetores, dentre os quais estão: o componente pré-epitelial (muco, bicarbonato e barreira fosfolipídica) que é a primeira linha de defesa e o componente epitelial [uma camada contínua de células epiteliais superficiais conectadas por junções firmes, geração de bicarbonato, muco, fosfolipídios, prostaglandinas (PGs), e proteínas de choque térmico] que constitui a segunda linha de defesa da mucosa (LAINE et al., 2008). Outros mecanismos de defesa incluem a contínua renovação celular (acompanhada de fatores de crescimento e PGE<sub>2</sub>), a manutenção do fluxo sanguíneo através dos microvasos na mucosa, a geração de óxido nítrico, PGs e inervação sensorial (LAINE et al., 2008) (Fig.2).



**Figura 2:** Ilustração dos fatores de protetores da mucosa (Adaptado de Tarnawski et al., 2013).

### 1.2.1 Fatores protetores da mucosa

A barreira muco-bicarbonato é a primeira linha de defesa da mucosa gástrica (LAINE et al., 2008). O muco é composto por glicoproteínas de elevado peso molecular com um esqueleto de proteínas e cadeias laterais de oligossacarídeos ligadas a resíduos de serina ou treonina por ligações O-glicosídicas. São produzidos por várias células epiteliais especializadas, especialmente células caliciformes. Ele desempenha um papel protetor importante através da formação de uma barreira física, química e imunológica entre o lúmen e a superfície epitelial (NIV & BOLTIN, 2012). A barreira muco-bicarbonato secretada pelo epitélio, serve como uma barreira contra a autodigestão provocada pelo ácido e pepsina (ALLEN & FLEMSTROM, 2005). Portanto, qualquer perturbação quantitativa ou qualitativa dessa secreção pode ser deletéria. A secreção de muco-bicarbonato é mediada por  $\text{PGE}_2$ , juntamente com o óxido nítrico, compostos sulfidrílicos, fatores de crescimento e peptídeos (PHILLIPSON et al., 2008; NIV & BOLTIN, 2012). A camada de muco mantém um pH neutro estável acima da mucosa e

impede um ataque enzimático por pepsina. A inibição da enzima ciclooxigenase por DAINÉ ou aspirina impede a secreção de muco e expõe a mucosa aos efeitos tóxicos do ácido e enzimas digestivas, assim como, qualquer agente que interfira com a secreção de muco pode causar úlcera péptica (NIV & BOLTIN, 2012).

A integridade da mucosa gástrica é extremamente dependente da contínua geração de PGs pelas enzimas ciclooxigenases, a COX-1 (expressa constitutivamente) e COX-2 (expressa em resposta a lesão e/ou inflamação) (LAINE et al., 2008; HALTER et al., 2001). As PGs mantêm a integridade da mucosa e oferece proteção contra agentes ulcerogênicos e necrosantes (TARNAWSKI, 1998; LAINE et al., 2008; TARNAWSKI, 2012). Elas inibem a secreção ácida, estimulam a secreção de muco e bicarbonato, aumentam o fluxo sanguíneo e acelera a cicatrização da úlcera. As PGs também inibem a ativação de mastócitos e leucócitos aderidos ao endotélio vascular (LAINE et al., 2008). Adicionalmente, as PGs mantêm e melhoram os mecanismos de defesa celular pela estabilização das membranas lisossomais, mitocondrial e celular, previne a apoptose e/ou preserva o citoesqueleto celular e o transporte de íons (TARNAWSKI, 1987). A supressão da síntese de PG pelas DAINÉs torna a mucosa mais susceptível a lesões (TARNAWSKI, 1998; LAINE et al., 2008; HALTER et al., 2001; KOBAYASHI & ARAKAWA, 1995; ATAY, 2000).

Outro fator protetor da mucosa gástrica de grande importância é o NO (Óxido Nítrico). A biossíntese do NO é conduzida por uma família de isoenzimas (NO-sintases), incluindo a NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) e NOS induzível (iNOS) (FANG et al., 2010). Como o nome sugere, nNOS e eNOS são expressas constitutivamente em neurônios e células endoteliais, respectivamente (MA & WALLACE, 2000). Em contrapartida, iNOS não é normalmente expressa nos tecidos, mas pode ser induzida em várias situações patológicas (ANGGARD, 1994). Em condições fisiológicas normais, o NO é sintetizado conforme a demanda. Este NO, é derivado de NOS constitutiva expressa (eNOS) ou (nNOS). A atividade destas isoformas de NOS podem durar um tempo muito curto usualmente segundos ou minutos. Por outro lado, a molécula que causa danos celulares é sintetizada pela NOS induzida (iNOS) e esta enzima uma vez ativada, produz NO por longos períodos que duram horas ou até mesmo dias. A citotoxicidade normalmente está correlacionada com os produtos da iNOS e não com os produtos das duas cNOS (eNOS e nNOS) (CHO, 2001).

Se o NO for produzido em pequenas quantidades, geralmente exerce efeitos benéficos para o TGI. Tem sido descrito que o NO protege contra danos na mucosa gástrica e promove a cicatrização de úlcera, mas ao mesmo tempo, se a sua produção for em grandes quantidades, o NO promove ou até mesmo iniciar as respostas inflamatórias quando combinado com outras espécies reativas de oxigênio (EROs) em todo o TGI (CHO, 2001).

Durante a cicatrização da úlcera no TGI, o NO regula o fluxo sanguíneo e estimula diretamente a secreção de muco gástrico, ativando a guanilato ciclase solúvel (CHO, 2001). As NOs constitutivas (nNOs e eNOS) também contribuem para a inibição de secreção ácida no estômago (ESPLUGUES et al., 1994). Os estudos realizados *in vivo* e *in vitro* por Ziche e colaboradores (1994) confirmam a função do NO em promover a angiogênese. O NO também induz o estresse oxidativo na fita de DNA e inibe as enzimas envolvidas na reparação do DNA (DEROJAS-WALKER, 1995).

Além do NO, os compostos sulfidrílicos (SH) também participam na manutenção da integridade da mucosa, particularmente quando EROs estão envolvidas na fisiopatologia do dano tecidual (SZABO, 1991; LOGUERCIO & DI PIERRO, 1999). Os grupamentos SH e também agentes que modificam os grupos SH, evitam as erosões hemorrágicas agudas causadas pelo etanol, DAINES ou estresse em modelos animais (SZABO, 1987). As EROs são geradas no processo inflamatório e, iniciam uma reação em cadeia que resulta na peroxidação lipídica e morte celular (TARIQ et al., 2006). Os grupamentos sulfidrílicos ligam-se aos radicais livres formados durante este processo ou produzidos após a exposição a estes agentes nocivos, protegendo assim a mucosa gástrica (AVILA et al., 1996).

Vários compostos SH, quando administrados oralmente, são citoprotetores e previnem as lesões gástricas (ROBERT, 1984). Os grupamentos SH participam da produção e manutenção de muco, uma vez que suas subunidades glicoprotéicas são unidas entre si por pontes de dissulfeto que, se diminuída, tornam o muco hidrossolúvel (AVILA et al., 1996); ligam-se à radicais livres derivados do oxigênio, que medeiam os danos aos tecidos e desempenham um papel importante na síntese de proteínas (SALIM, 1993).

A circulação sanguínea gástrica mantém a estrutura e a função do estômago, estando associada com a patogênese e com o processo de cicatrização das lesões

gastrointestinais. O fluxo sanguíneo na mucosa gástrica, regulado por fatores neurais e humorais, também é modificado por fatores metabólicos locais (RODRÍGUEZ-TÉLLEZ et al., 2001). Fatores derivados do endotélio que são produzidos por células endoteliais vasculares, induzem ao relaxamento ou contração dos vasos sanguíneos e são também reconhecidos como mediadores básicos que regulam a circulação no estômago. O distúrbio na circulação gástrica em combinação com a presença de ácido está intimamente associado com a patogênese das lesões gástricas induzidas por DAINES. O fluxo sanguíneo e a oxigenação na superfície da mucosa circundante à úlcera péptica são alterados durante a cicatrização, dependendo da qualidade do processo de cicatrização gástrico. O aumento na circulação sanguínea com elevação de oxigênio circulante nas margens da úlcera é importante para uma rápida cicatrização (RODRÍGUEZ-TÉLLEZ et al., 2001).

Adicionalmente, o fluxo sanguíneo na mucosa normal remove o ácido que se difunde através de um epitélio lesionado e fornece a energia metabólica necessária para apoiar o transporte e outras funções. Assim, manter um fluxo adequado é crucial para a integridade da mucosa (RODRÍGUEZ-TÉLLEZ et al., 2001).

Subjacente à superfície do epitélio do estômago há uma densa rede de capilares. Além de fornecer nutrientes e oxigênio para o epitélio, a microcirculação também remove, dilui, e neutraliza substâncias tóxicas que se difundem da mucosa para o lúmen (WALLACE & GRANGER, 1996). Quando o ácido ou outros agentes irritantes entram no compartimento subepitelial, os neurônios sensoriais aferentes são capazes de desencadear um aumento rápido no fluxo sanguíneo na mucosa que permite o tamponamento de ácido e a rápida remoção de substâncias tóxicas, limitando assim a sua penetração nas camadas mais profundas da mucosa (WALLACE & GRANGER, 1996).

Os nervos sensoriais aferentes, quando adequadamente estimulados, liberam o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), nas proximidades das arteríolas da submucosa (HOLZER & LIPPE, 1988). O CGRP é capaz de dilatar estes vasos, através da mediação da via do NO e, assim, causar um aumento rápido no fluxo sanguíneo da mucosa. A ablação dos neurônios sensoriais aferentes de forma crônica (através da administração da capsaicina, por exemplo) diminui a resposta hiperêmica e assim, reduz a resistência da mucosa gástrica às lesões (PESKAR, 2001; HOLZER, 2007). A inibição da síntese de NO com a utilização de L-NAME também anula a resposta

hiperêmica e aumenta consideravelmente a susceptibilidade do estômago à lesão (WALLACE & MCKNIGHT, 1990). Um aporte constante de plasma para os vasos sanguíneos subepiteliais são cruciais para o reparo no microambiente (WALLACE, 2001). Além do NO, as PGs parecem ser importantes na manutenção do fluxo sanguíneo durante o processo de reconstituição da mucosa. A administração de DAINES tem promovido uma redução no fluxo sanguíneo da mucosa (ASHLEY, 1985; KITAHORA & GUTH, 1987; GANA, 1987; WALLACE et al., 1994) e, assim, reduzindo o pH nos locais com danos epiteliais, levando à inibição de reconstituição e ao desenvolvimento das lesões hemorrágicas. Por outro lado, a administração de PGs evitam estes efeitos prejudiciais das DAINES (WALLACE & MCKNIGHT, 1990).

### **1.3 Fatores agressores da mucosa**

Como descrito no item 1.1, dentre os fatores agressores à mucosa gástrica há fatores endógenos e exógenos. Um dos agentes exógenos mais irritantes para a mucosa é o etanol. O etanol penetra rapidamente e facilmente na mucosa gástrica, causando um dano à membrana, esfoliação e erosão nas células (SIDAHMED et al., 2013). A lesão por etanol afeta predominantemente a porção glandular do estômago (SIDAHMED et al., 2013) e pode ser atribuída há alguns mecanismos como a indução de úlcera pela formação de radicais livres derivados do oxigênio (KWIECIEN, 2002; BANDYOPADHYAY et al., 2001); decréscimo nas concentrações dos grupamentos sulfidrílicos no conteúdo da mucosa gástrica (GARDÈS-ALBERT et al., 1993; LI, 1990); ruptura do muco endógeno e a secreção de ácido gástrico, bem como danos na mucosa gástrica com lesões hemorrágicas (RAJASEKARAN, 2012); apoptose celular (PIOTROWAKI et al., 1997; HOSHINO et al., 2002); indução de peroxidação lipídica e diminuição dos níveis de glutatona reduzida (DAS et al., 2012). O etanol também induz lesão no endotélio vascular da mucosa, causando alterações na microcirculação e gerando isquemia, que tem como resultado a produção de radicais livres (PAN et al., 2008). Outro agente exógeno altamente prejudicial para a mucosa gástrica são as DAINES, utilizadas para o tratamento da inflamação e processos dolorosos.

No mundo todo, 35 milhões de pessoas consomem DAINES diariamente, e cerca de 30% desses usuários podem desenvolver toxicidade do TGI de tal forma que pode ser exigida a intervenção médica. Também foi estimado que um terço dos custos dos

tratamentos de pacientes com artrite está relacionada ao tratamento dos efeitos adversos atribuídos as DAINEs (DHIKAV et al., 2003).

O uso de DAINEs está associada com a ocorrência de efeitos adversos, incluindo erosões da mucosa gástrica, úlceras, hemorragias e perfuração, bem como um aumento do risco de complicações graves de úlceras crônicas pré-existentes (WALLACE, 2001). A continuidade do seu uso na presença de úlceras resulta no atraso do processo de cicatrização (REUTER et al., 1996; MIZUNO et al., 1997; SCHMASSMANN, 1998; HALTERETAL, 2001). A fisiopatologia das lesões gástricas dependentes das DAINEs, pelo menos em parte, é resultante da redução na capacidade de produção de PGs através da inibição da ciclooxigenase (COX), e, em parte, por mecanismos independentes da COX, como a diminuição de NO, poliaminas e sulfeto de hidrogênio (MUSUMBA, 2009). A combinação dos mecanismos dependente e independente da COX leva a lesão por danos oxidativos no tecido, o que parece desempenhar um papel fundamental na patogênese (HIRAISHI, 2000; MAITY et al., 2009). Dados clínicos e experimentais indicam que as DAINEs retardam a cicatrização das úlceras por interferir com as ações dos fatores de crescimento, diminuição da proliferação epitelial celular nas margens da úlcera, redução da angiogênese, e atraso na maturação e granulação do tecido (SCHMASSMANN, 1998). De fato, a PGE<sub>2</sub> promove a cicatrização de úlceras gastrointestinais, aumentando a angiogênese através da superexpressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (HATAZAWA, 2007; TAKEUCHI et al., 2010). O VEGF promove a cicatrização da úlcera, através da estimulação da formação de novos microvasos, e em contrapartida a indometacina, uma DAINE, interfere neste processo através de uma regulação negativa da sua expressão (TARNAWSKI, 2003).

O efeito das DAINEs no duodeno e intestino grosso podem ocorrer através de diferentes manifestações que incluem ulcerações, estenoses, colite, sangramento, e perfuração, dentre outros (HOWCHEN, 2001). Ao contrário dos mecanismos de lesão da mucosa gástrica induzida pelas DAINEs, aqueles envolvidos no duodeno são menos conhecidos. Apesar das PGs estarem presentes em todo o trato digestivo e serem inibidas após a utilização das DAINEs, há uma diferença significativa entre o trato distal e proximal na concorrência de outros fatores patogênicos que podem aumentar os danos. Entre eles, a ausência de ácido e a presença de bactérias e bile no intestino são as diferenças mais acentuadas, o que pode induzir mecanismos particulares de danos induzidos por DAINEs a nível de TGI distal. Os danos induzidos por DAINEs no

epitélio intestinal são por conseguinte derivados de um efeito direto ou local após a administração oral, um efeito local recorrente devido a recirculação êntero-hepática do fármaco e efeito sistêmico após absorção (LANAS, 2003).

Outro importante agente indutor de úlceras pépticas é a bactéria espiralada *Helicobacter pylori*, um bacilo gram-negativo considerado um dos principais fatores etiológicos no desenvolvimento da doença ulcerosa péptica (FAHEY et al., 2002). A infecção com esta bactéria leva a uma infiltração na mucosa com células inflamatória (MARSHALL & WARREN, 1994; DIXON et al., 1996). Há uma resposta inflamatória na mucosa com a ativação de citocinas no epitélio, tais como a IL-8, IL-6 e TNF- $\alpha$  (CROWE et al., 1995).

Nos EUA, a relevância relatada para a *Helicobacter pylori* varia de < 10% a cerca de 80%, com as maiores taxas encontradas em pacientes de menores condições socioeconômicas (GOH et al., 2011; MALATY, 2007). Clinicamente a infecção está presente na maioria das vezes das doença ulcerosa péptica, porém nota-se que apenas 20% dos indivíduos infectados desenvolvem úlcera e apenas um quarto dos pacientes desenvolvem as complicações da úlcera tais como sangramento gastrointestinal na porção superior (MALATY, 2007).

O Instituto Nacional de Saúde em consenso concluiu que pacientes infectados com *H. pylori* requerem tratamento com agentes antimicrobianos além de fármacos antissecretórios (NIH, 1994). Pesquisadores tem estudado alguns agentes antimicrobianos e a eficácia destes em erradicar a bactéria com um único tratamento ou com uma terapia de combinação. O regime de um único fármaco não é normalmente adotado em decorrência do potencial desenvolvimento de resistência ao antibiótico, especialmente os macrolídeos e aos metronidazóis, que são a chave para a terapia contra a *H. pylori*.

Atualmente, a primeira linha mais efetiva para a erradicação da *H. pylori* é uma terapia tripla que inclui a combinação de um inibidor de bomba protônica com a amoxicilina e claritromicina ou metronidazol (HUNG et al., 2009). Inibidores da bomba de prótons tem efeito sinérgico em combinação com alguns antibióticos, aumentando assim o pH para níveis adequados para a atividade do antibiótico (CASELLI et al., 2001).

O tratamento apropriado de antibióticos com inibidores da bomba de prótons ou antagonistas de receptores  $H_2$  erradicam a infecção em mais de 90% dos casos (GRAHAM, 1993). Em pacientes sem complicações, a erradicação da *H. pylori* é efetiva em prevenir o retorno da úlcera. Nos casos de sangramento da úlcera péptica, a erradicação da *H. pylori* é tão eficaz quanto a manutenção da medicação para redução da secreção ácida para a prevenção do retorno das hemorragias nas úlceras (GISBERT et al., 2004). Atualmente, terapias comumente utilizadas contra o *H. pylori* apresentam efeitos colaterais, como a resistência aos antibióticos, principalmente aos macrolídeos e aos metronidazóis (WONG et al., 2013); diarreia, náusea, vômito e dores de estômago (SARBACKER & MONTFORT, 2011). Portanto, a necessidade de se descobrir novos agentes com potencial atividade anti-*H. pylori* é de grande preocupação (BAKER, 2007). Um composto é considerado um antibacteriano potente quando apresenta uma concentração inibitória mínima (MIC) de igual ou menor valor que 250  $\mu\text{g/mL}$  (MORAES et al., 2008).

Além das úlceras pépticas em pacientes infectados com a bactéria *H. pylori*, há também os casos em que não ocorre a presença deste micro-organismo. A prevalência das úlceras péptica idiopáticas é influenciada por um desbalanço entre os fatores protetores e agressores. A definição de úlceras pépticas idiopáticas requer a exclusão de fatores agressores, como a *H. pylori*, terapia com DAINES/aspirina e doenças infecciosas, devendo-se levar em conta os mecanismos de defesa como a secreção de mucina e bicarbonato (NIV & BOLTIN, 2012). A prevalência da úlcera péptica idiopática está aumentando, independentemente das taxas de infecção da *H. pylori*. Um esforço concentrado deve ser feito para excluir completamente a infecção por esta bactéria e o tratamento com DAINES (NIV & BOLTIN, 2012), através da utilização de altas doses de inibidores da bomba de prótons (NIV & BOLTIN, 2012).

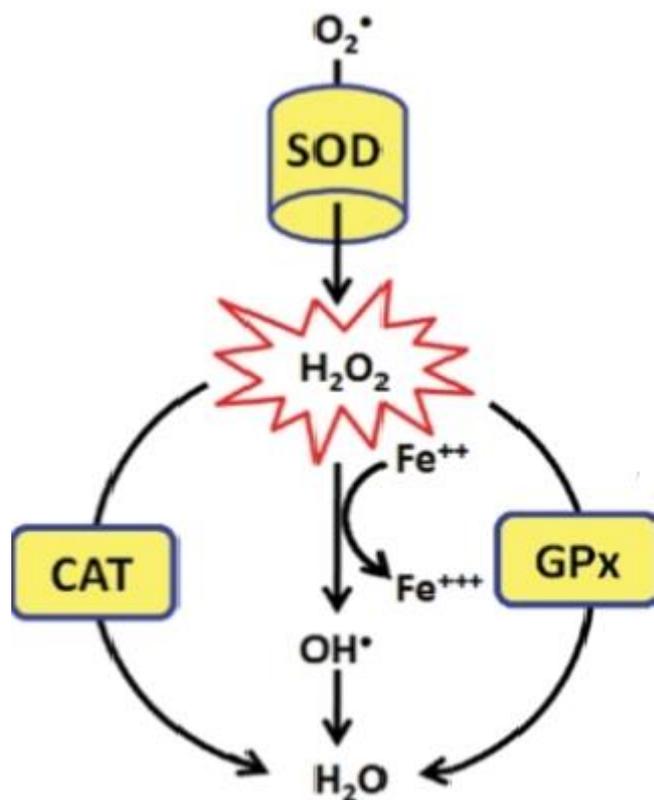
#### **1.4 Radicais livres e defesa antioxidante**

Os radicais livres são definidos como moléculas, átomos ou íons que contêm um ou mais elétrons desemparelhados. Por causa do elétron não emparelhado, radicais livres prontamente doam ou aceitam elétrons, tornando-os altamente reativo (ARTHUR, 1988).

As EROs são os produtos finais gerados por um processo metabólico celular normal (TANDON et al., 2004). O estresse oxidativo resulta do acúmulo das EROs e da incapacidade do sistema antioxidante em superá-los. Assim, nesta situação, a produção excessiva de EROs afeta a integridade celular (KUROSE et al., 1997). O estresse oxidativo no tecido gástrico contribui para a formação de lesão na mucosa gastrintestinal (NANJUNDAIAH, 2011). Os antioxidantes, que são compostos com habilidade de quelar os radicais (TACHAKITTIRUNGROD, 2007), tem sido descritos como protetores da mucosa gástrica frente à ulcerações (TANDON et al., 2004).

Para a defesa contra ataques de radicais livres, as células desenvolveram diferentes sistemas antioxidantes para manter a homeostase celular (CNUBBEN et al., 2001). O organismo possui sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos são as Catalases (CAT), Glutaciona Peroxidase (GPx) e Superóxido Dismutase (SOD) (SINDHU et al., 2005). O sistema antioxidante não enzimático, por sua vez, é formado por substâncias como flavonóides da dieta, vitamina E, polifenóis, albumina, carotenóides, ácido úrico, vitaminas e a Glutaciona, sendo a última a mais importante (DEVASAGAYAM, 2004).

A SOD tem a função de remover o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) do ambiente celular, que é rapidamente convertido em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela superóxido dismutase (SOD) ou radical hidroxila (-OH) (IMLAY, 2003; MCCORD & FRIDOVICH, 1970; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1981). A GPx e a CAT atuam decompondo o  $H_2O_2$  (Fig. 3).



**Figura 3.** Esquema de atuação de algumas enzimas antioxidantes (Disponível em: [http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=2835884\\_omcl0301\\_0002\\_fig005&req=4](http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=2835884_omcl0301_0002_fig005&req=4)., Acessado em 5/11/2013).

O etanol está envolvido na formação de radicais livres de oxigênio, e como consequência reduz os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e induz a peroxidação lipídica (DAS et al., 2012). O GSH é um antioxidante intracelular que inibe o estresse oxidativo (YOSHIKAWA et al., 1993) e exerce um importante papel contra a lesão gástrica induzido pelo etanol (MUTOH et al., 1990). Além da redução de GSH, o etanol exerce seus efeitos aumentando a peroxidação lipídica através de dois mecanismos, por maior produção de EROs e/ou pela diminuição dos níveis de antioxidantes endógenos (JORDÃO JR. et al., 1998; ROZZA et al., 2011). O malondialdeído (MDA) é o principal produto, sendo portanto considerado um marcador de lesões gástricas mediados por EROs (KWIECIEN, 2002). A superóxido dismutase (SOD) também exerce um papel importante na proteção contra lesões oxidativas na mucosa gástrica por diminuição da produção das EROs (CHATTOPADHYAY et al., 2006). A SOD é a enzima antioxidante mais importante da mucosa gástrica e atua como uma enzima de defesa contra a peroxidação lipídica induzida por EROs nos tecidos (SEKHAR et al., 2011). Também foi estabelecido que um dos mais importantes efeitos colaterais

provocados pelas DAINES no sistema digestório é representado pela ativação da oxidação do tecido (MAITY et al., 2009). Em particular, a administração aguda de indometacina em ratos normais tem resultado em aumento nos níveis de MDA (COLUCCI et al., 2009; KARAKAYA et al., 2009). A indometacina também ativa na área de lesão um infiltrado inflamatório de células que gera as EROs (IMLAY, 2003; MCCORD & FRIDOVICH, 1970; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1981).

Outro sistema está envolvido com a regulação de equilíbrio redox, o sistema de Trx/TrxR (tiorredoxina e tiorredoxina redutase) (MUSTACICH & POWIS, 2000). A importância do sistema Trx/ TrxR envolve alguns aspectos como as funções celulares, particularmente no que diz respeito ao crescimento celular e proteção contra danos oxidativos e apoptose (MUSTACICH & POWIS, 2000).

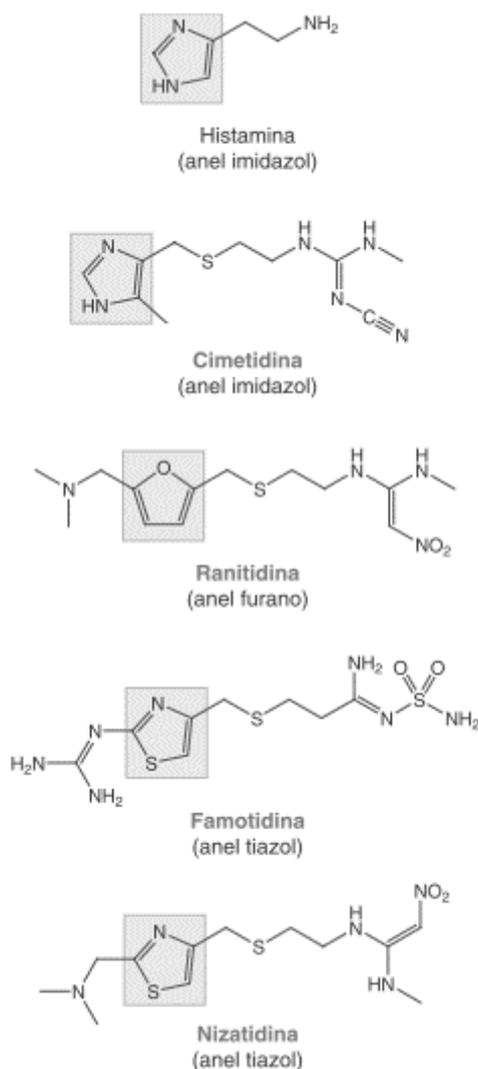
### **1.5 Estratégias Terapêuticas**

Desde que William Prout (1823) descobriu o ácido clorídrico gástrico e Rudolf Heidenhain (1875) e Camillo Golgi (1893) identificaram a célula parietal como célula secretora de ácido, o mecanismo fundamental para a secreção ácida provou ser uma área interessante para investigação (AIHARA et al., 2003). Foi descoberto que o ácido gástrico é secretado no momento da ingestão de alimentos ou bebidas alcoólicas, tanto por um reflexo via condicionada quanto por via descondicionada. Ambos os reflexos envolvem a estimulação de vários receptores das células parietais, que por sua vez, resulta em transferência de sinal para moléculas de  $H^+/K^+$ -ATPase. Além disso, foi determinado que o ácido gástrico representa a causa subjacente relacionada a doença ulcerosa. Numa tentativa de proteger a mucosa gástrica do ácido gástrico, melhorar a cicatrização da úlcera, e prevenir a sua recorrência, o controle farmacológico da secreção de ácido gástrico tem representado há muito tempo um objetivo desejável (AIHARA et al., 2003). Dentre as opções disponíveis no mercado para a terapia estão os antiácidos, anticolinérgicos, antagonistas de receptores  $H_2$ , inibidores da bomba de prótons (IBP), a erradicação da *H. pylori* com uma terapia medicamentosa tripla e os citoprotetores.

Há muito tempo atrás, as pessoas com dores de estômago comumente utilizavam pós efervescentes para aliviar o desconforto. Por conseguinte, foi descoberto que  $CaCO_3$  (carbonato de cálcio), um antiácido, tamponava o ácido gástrico. Depois da demonstração da presença de ácido clorídrico no estômago, a terapia antiácida se tornou

um tratamento popular para doença péptica relacionada à acidez como as úlceras pépticas (AIHARA et al., 2003). Os antiácidos, tais como bicarbonato de sódio, carbonato de cálcio, hidróxido de alumínio, hidróxido de magnésio, ou a preparação combinada, fornece prontamente um alívio efetivo da dor através de neutralização do ácido intraluminal (FEURLE, 1975). O tempo efetivo com que os antiácidos duram no estômago humano é muito curto para exercerem um efeito neutralizante. Os antiácidos não são comumente utilizados para o tratamento da úlcera péptica. Para prolongar os efeitos dos antiácidos, fármacos anticolinérgicos, como a propantelina, foram simultaneamente administradas para retardar o esvaziamento destes agentes no duodeno. Os anticolinérgicos também podem inibir a secreção ácida por si só, mas as doses capazes de inibirem a secreção ácida quase invariavelmente induzem efeitos adversos, tais como boca seca, visão turva, taquicardia e disfunção da vesícula. Em contraste com os anticolinérgicos, os antagonistas seletivos de receptores  $M_1$ , tal como pirenzepina, foram clinicamente utilizados, e seus efeitos colaterais são menos frequentes. Tais agentes são úteis tanto para o alívio da dor quanto para a melhora da cicatrização da úlcera, através da inibição da secreção de ácido (AIHARA et al., 2003).

Desde que a histamina foi considerada um mediador para a secreção ácida, vários grupos procuraram um antagonista capaz de inibir a secreção de ácido estimulada pela histamina (AIHARA et al., 2003). Depois de um trabalho cuidadoso, Black e colaboradores (1972) conseguiram desenvolver o primeiro antagonista de receptor  $H_2$ , a burimamida, seguida pela metiamida (BLACK et al., 1972). Com alterações mínimas, Brimblecombe e colaboradores (1975) eventualmente desenvolveram a cimetidina, que é largamente prescrita no mundo todo para o tratamento da doença péptica relacionada ao ácido (BRIMBLECOMBE et al., 1975). Por modificação na estrutura química da cimetidina, os potentes antagonistas de receptores  $H_2$ , ranitidina, famotidina, e nizatidina foram desenvolvidos, resultando no tratamento de doenças relacionadas com o ácido, incluindo refluxo gastroesofágico (Fig. 4).

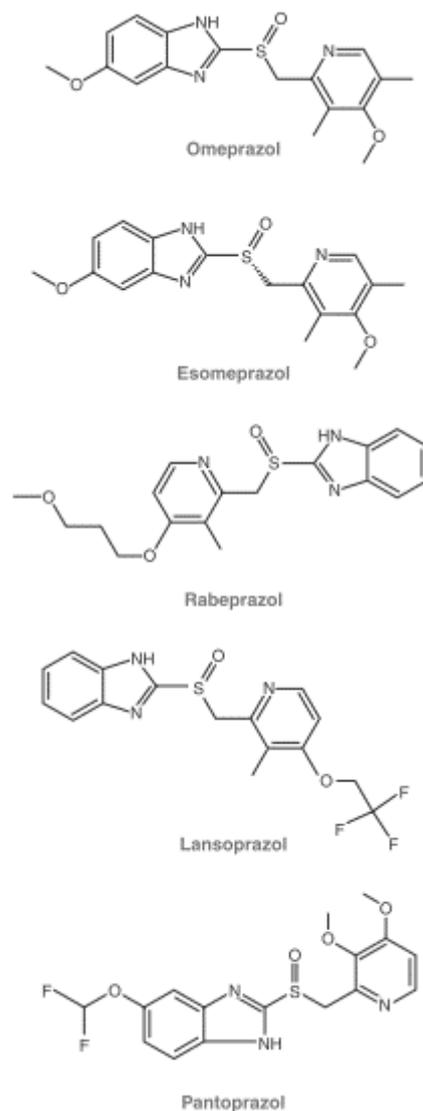


**Figura 4:** Estrutura química de fármacos com propriedades antagonistas de receptores  $H_2$  (Adaptado de Nagel & Shields, 2009).

Estes novos compostos foram descobertos mais tarde por inibirem a secreção de ácido gástrico estimulada não somente pela histamina, mas também pelo carbacol e gastrina em seres humanos e animais. Paralelamente ao desenvolvimento desta farmacoterapia, houve uma grande redução no uso de intervenções cirúrgicas para o tratamento da úlcera. A cimetidina inibe fortemente as enzimas do citocromo P450 (CYP), particularmente a CYP3A4 (RENDIC, 1999). Em contraste, tem sido relatado que a inibição da CYP pela ranitidina é relativamente fraca comparada à cimetidina (AIHARA et al., 2003).

A identificação da bomba de prótons,  $H^+/K^+$ -ATPase, como a via final da secreção ácida forneceu uma oportunidade única de desenvolver uma nova classe de agentes que inibiriam a secreção ácida. Um grupo de pesquisadores da Companhia AB

Hassle na Suécia descobriram por acaso que derivados do benzimidazol poderiam potencialmente inibir a secreção de ácido gástrico em glândulas gástricas isoladas de coelho ou cobaia pela estimulação da dibutilil-cAMP (FELLENIOUS et al., 1981, 1982). Estas descobertas resultaram na hipótese de que estes compostos poderiam inibir a bomba de prótons na célula parietal. Após triagem de um vasto número de derivados, o primeiro inibidor da bomba de prótons (ex. omeprazol) foi finalmente descoberto. O omeprazol foi prontamente utilizado para o tratamento das doenças pépticas relacionadas ao ácido, incluindo úlceras gastrointestinais, refluxo gastroesofágico, e síndrome de Zollinger-Ellison. Semelhante ao desenvolvimento dos antagonistas de receptores de  $H_2$ , o lansoprazol, pantoprazol e rabeprazol foram desenvolvidos subsequentemente por modificação na estrutura química do omeprazol (LEE, 1992; ROBINSON et al., 1997; SATOH et al., 1989; WILLIAMS & POUNDER, 1999) (Fig. 5).



**Figura 5:** Estrutura química de fármacos inibidores da bomba de prótons (Adaptado de Nagel & Shields, 2009).

Como esperado, o omeprazol e o lansoprazol são capazes de inibir a secreção de ácido gástrico estimulada pela ACh, gastrina, e histamina de maneira dose-relacionada. O omeprazol aumenta a cicatrização de úlceras devido ao seu potente e persistente efeito antissecretório (AIHARA et al., 2003).

Vários fatores podem contribuir para a doença ulcerosa péptica, sendo um dos principais a infecção pela bactéria *H. pylori*. Desde que Marshall e Warren (1984) descobriram a bactéria *H. pylori* no estômago, ela tem sido reconhecida por representar um fator de risco não somente para gastrites e úlceras, mas também para recidivas de úlceras já curadas (OSATO & GRAHAM, 1999). São bactérias exclusivas que conseguem viver no ambiente ácido do estômago (PEURA & CROWE, 2010). A

erradicação eficaz da *H. pylori* reduz as taxas de recidivas de úlceras (HOLLANDER et al., 2013). O tratamento mais adequado para a erradicação da bactéria é uma terapia tripla (RANG & DALE, 2007). A terapia tripla geralmente compreende um inibidor da bomba de prótons combinado aos antibacterianos amoxicilina e metronidazol ou claritromicina (RANG & DALE, 2007).

Outros medicamentos utilizados para a terapia das úlceras pépticas são os fármacos citoprotetores. Recebem este nome por promoverem a defesa da mucosa. Dentre os fármacos citoprotetores podemos citar o misoprostol, o sucralfato e a carbenoxolona.

As PGs podem ser utilizadas no tratamento da doença ulcerosa péptica, visto que promovem a redução da secreção gástrica de ácido e aumenta a secreção de bicarbonato, produção de muco e fluxo sanguíneo. O misoprostol é um análogo de PGs utilizado na prevenção de úlceras pépticas induzidas por DAINES. Os efeitos adversos mais freqüentes consistem em desconforto abdominal e diarreia (NAGEL & SHIELDS, 2009). Também podem ocorrer contrações uterinas, de modo que o fármaco não deve ser utilizado durante a gravidez, pois leva a um abortamento (RANG & DALE, 2007). Por conta deste último motivo descrito, o fármaco foi retirado do mercado (SHERRIS et al., 2005).

O sucralfato, um sal complexo de sulfato de sacarose e hidróxido de alumínio, é um agente de revestimento utilizado para aliviar os sintomas da doença ulcerosa péptica. Tem pouca capacidade de modificar o pH gástrico. Na verdade, no ambiente ácido do estômago, esse complexo forma um gel viscoso, que se liga a proteínas de carga positiva, aderindo, assim, às células epiteliais gástricas (incluindo as áreas de ulceração). O gel protege a superfície luminal do estômago da degradação pelo ácido e pela pepsina. Como o sucralfato é pouco solúvel, ocorre pouca absorção sistêmica, com ausência de toxicidade sistêmica. A constipação é um dos poucos efeitos adversos do sucralfato. Além disso, o sucralfato pode ligar-se a fármacos como antibióticos da quinolona, fenitoína e varfarina, limitando a sua absorção (NAGEL & SHIELDS, 2009).

A carbenoxolona, um componente da raiz do alcaçuz e derivado do ácido glicirrízico, vem sendo utilizada na Europa há muitos anos como um composto antiulceroso com uma modesta eficácia. O seu mecanismo exato ainda não está claro,

mas é possível que a mesma possa alterar a composição e a quantidade de mucina. Infelizmente, trata-se de um congênera esteroide e o seu uso é limitado devido à sua significativa atividade mineralocorticoide (BRUNTON, 2001). A carbenoxolona tem sido usada apenas como uma ferramenta farmacológica.

Muitos fármacos são descritos para o tratamento das úlceras pépticas, em busca da supressão de ácido e pepsina. Entretanto, alguns destes fármacos podem promover não somente uma gama de efeitos colaterais, mas também uma menor eficácia no tratamento de úlceras (JAIN et al., 2007). Assim, a necessidade de agentes mais efetivos e seguros é evidente (VIANA et al., 2013). Por isso, os esforços são dirigidos para encontrar o tratamento adequado a partir de produtos naturais, como nova fonte de recursos, (SANDERS, 1996), através do qual, alguns extratos de plantas podem ser valiosos como uma nova fonte terapêutica no tratamento de úlceras gástricas (SCHMEDA-HIRSCHMANN & YESILADA, 2005). Os efeitos benéficos de extratos de plantas (isoladas ou em combinação) na prevenção de lesões gástricas têm sido avaliadas por vários estudos experimentais; no qual se busca ações com atividade antissecretória, citoprotetora e antioxidante, isolados ou em combinação, para proteger a mucosa gástrica (AL MOFLEH, 2010). Alguns compostos químicos isolados a partir de plantas medicinais apresentam atividade antiulcerogênica (LEWIS & HANSON, 1991). Dentre as principais classes de compostos bioativos com capacidade de oferecer gastroproteção estão os alcalóides, saponinas, xantonas, triterpenos e taninos (RAMIREZ & ROA, 2003; BAGGIO et al., 2005; MORIKAWA et al., 2006; KLEIN et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2010).

### **1.6 *Serjania marginata* Casar.**

O gênero *Serjania* pertence à família Sapindaceae e a maioria de suas espécies é encontrada no bioma Cerrado (SILVA, 1998). Segundo Napolitano e colaboradores (2005), a rica flora do Cerrado brasileiro tem sido pouco estudada para a validação da eficácia e efeitos terapêuticos de extratos brutos ou componentes isolados obtidos da grande diversidade de famílias botânicas da flora Brasileira.

Espécies da família Sapindaceae possuem isoprenóides e polifenóis (HEGNAUER, 1973), saponinas (VOUTQUENNE et al., 2002), triterpenos (CHÁVEZ & DELGADO, 1994), diterpenos (ORTEGA, 2001), flavonóides (MAHMOUD et al., 2001), lecitinas (FREIRE et al., 2002) e hidrogéis (GORIN et al., 2006). As sementes

das plantas desta família são caracterizadas predominantemente por sua abundância em óleos, algumas das quais apresentam intensa atividade inseticida e são ricas em cianolipídeos (SPTIZER, 1996).

A família Sapindaceae é uma das vinte famílias botânicas pertencentes à ordem Sapindales, algumas com grande ocorrência no Brasil e na região amazônica. Esta ordem reúne inúmeras plantas de grande valor medicinal e econômico. Na família Sapindaceae destacam-se os gêneros: *Paullinia*, *Cupania* e *Serjania*, muitas das quais usadas para a pesca por serem consideradas narcóticas para os peixes. Apresentam também, significativos efeitos farmacológicos, especialmente sobre o Sistema Nervoso Central (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002).

Estudos realizados em nosso laboratório com a espécie medicinal *Serjania erecta* apontam para a potencialidade terapêutica desta planta na prevenção das úlceras gástricas (ARRUDA et al., 2009). Além da *Serjania erecta*, a farmacopéia do Chaco da Bolívia aponta as folhas da *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae) como uma espécie medicinal comumente utilizada para o tratamento de dores gástricas (BOURDY, 2004). Porém, não existem estudos que comprovem esta indicação popular para a espécie.

A planta objeto deste estudo faz parte do Projeto Biota/FAPESP (Proc. 2009/52237-9) intitulado “Fitoterápicos padronizados para o tratamento de doenças crônicas” e está sendo estudada sob o ponto de vista fitoquímico por pesquisadores do projeto, a qual realiza os experimentos fitoquímicos. Os estudos fitoquímicos realizados até o momento mostram a presença de saponinas, flavonóides, esteróides livres e taninos no extrato hidroalcoólico das folhas de *Serjania marginata* (Fig. 6).



**Fig. 6.** *Serjania marginata* Casar. Foto gentilmente cedida por Silvia Cristina Heredia Vieira (UNESP – Araraquara)

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Estudar o extrato hidroalcoólico das folhas de *Serjania marginata* (EHSM) frente às ulcerações pépticas experimentais, obtendo dados que possam inferir sobre o potencial terapêutico deste extrato.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito protetor do EHSM sobre a mucosa gástrica ou duodenal de roedores submetidos à indução de úlceras experimentais por diferentes agentes lesivos;
- Estudar os possíveis mecanismos de ação envolvidos na ação antiulcerogênica, focando as possíveis ações antioxidante, anti-inflamatória e antissecretória;
- Estudar o EHSM frente a modelos experimentais de motilidade gastrointestinal e diarreia;
- Determinar os parâmetros de toxicidade aguda a fim de obtermos resultados que possam inferir sobre a possível segurança do uso do EHSM.

## **CAPÍTULO 2**

### 3. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

#### FORMATO: JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY

##### **EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Serjania marginata* Casar. NAS LESÕES GÁSTRICAS EXPERIMENTAIS: PAPEL DO MUCO NA GASTROPROTEÇÃO.**

Larissa Lucena Périco <sup>a</sup>, Fernando Pereira Beserra <sup>a</sup>, Raquel de Cássia dos Santos <sup>a</sup>,  
Silvia Cristina Heredia Vieira <sup>b</sup>, Wagner Vilegas <sup>b</sup>, Taís Maria Bauab <sup>c</sup>, Lúcia Regina  
Machado da Rocha <sup>a</sup>, Clélia Akiko Hiruma-Lima <sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Univ. Estadual Paulista-UNESP - Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, cp 510, CEP 18618-970, Botucatu, SP, Brasil.

<sup>b</sup> Univ. Estadual Paulista-UNESP - Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, cp 355, CEP 14801-970, Araraquara, SP, Brasil.

<sup>c</sup> Univ. Estadual Paulista-UNESP – Departamento de Ciências Biológicas, cp 970, CEP 14801-970, Araraquara, SP, Brazil.

#### **Resumo**

Relevância etnofarmacológica: Estudos etnofarmacológicos indicam que as folhas de *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae), uma planta medicinal comumente encontrada no Cerrado brasileiro, possui indicação popular para o tratamento de dores gástricas.

Objetivo do estudo: estudar o extrato hidroalcoólico das folhas de *Serjania marginata* (EHSM) frente às ulcerações pépticas experimentais.

Material e métodos: Como parte do estudo farmacológico o EHSM foi testado frente à toxicidade aguda e a performance motora. A atividade antiulcerogênica do EHSM foi avaliada em roedores (ratos e camundongos) frente a diversos agentes ulcerogênicos incluindo etanol absoluto, isquemia-reperfusão, drogas anti-inflamatórias não esteroidais (DAINEs), cisteamina e ligadura do piloro. O efeito protetor do EHSM foi avaliado analisando os parâmetros do suco gástrico, muco, compostos sulfidrílicos, óxido nítrico, receptores vanilóides, atuação local ou sistêmica, bem como os níveis de glutathiona (GSH), malondialdeído (MDA) e a atividade da mieloperoxidase (MPO) na mucosa gástrica e duodenal. A ação antidiarreica (medida pela motilidade

gastrointestinal e a indução de diarreia induzida por óleo de rícino) e atividade antimicrobiana *in vitro* do EHSM contra o *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e a *Helicobacter pylori* também foram avaliadas.

Resultados: O EHSM (5000 mg/kg) não apresentou sinais de toxicidade aguda nem de neurotoxicidade, nos mostrando a sua segurança para continuar os estudos. A administração oral do EHSM (250 mg/kg) protegeu a mucosa gástrica frente ao agente lesivo etanol com 60,13% e também protegeu a mucosa gástrica de danos promovidos pela isquemia e reperfusão gástrica em 58,31% quando comparado ao grupo veículo. Não possui atividade frente às DAINes nem a indução de úlceras duodenais induzidas por cisteamina. O EHSM exerce sua proteção devido a um aumento no muco aderido a mucosa gástrica, a manutenção do fluxo sanguíneo adequado mesmo quando este é comprometido pelo etanol. O extrato foi capaz de diminuir a peroxidação lipídica (MDA) e a atividade da mieloperoxidase (MPO) do tecido gástrico. O extrato não exerce atividade sobre a motilidade gastrintestinal nem possui ação antidiarreica, mas contém ação antimicrobiana predominantemente contra a *H. pylori*.

Conclusão: As folhas de *Serjania marginata* apresentou ação gastroprotetora corroborando assim, com a sua indicação popular para o tratamento das dores gástricas.

**Palavra chave:** *Serjania marginata* Casar.; Sapindaceae; atividade antiulcerogênica; úlceras pépticas; ação gastroprotetora.

## 1 Introdução

Úlceras pépticas abrange tanto as úlceras gástricas, quanto as úlceras duodenais e tem sido uma grande ameaça para a população mundial ao longo dos últimos dois séculos, com uma alta morbidade e mortalidade (MALFERTHEINER, 2009). As úlceras são lesões necróticas profundas caracterizadas por rompimento na integridade da mucosa levando a uma inflamação local, e está se tornando muito comum durante as condições de estresse (SRIKANTA et al., 2010).

A patogênese complexa e multifatorial da úlcera vem sendo estudada durante décadas, e sabe-se que ocorre devido a um desequilíbrio entre os fatores agressores e os protetores da mucosa do estômago ou duodeno. A fisiopatologia da úlcera envolve um desbalanço entre os fatores agressores (ácido clorídrico, pepsina e a infecção pela bactéria *Helicobacter pylori*) e os fatores protetores (mucina, PGs, bicarbonato, fatores

de crescimento e óxido nítrico) (MISHRA et al., 2013). Além disso, o aumento na incidência das úlceras (CHOI et al., 2009; CORREA & HOUGHTON, 2007) é associado com os fatores agressores contra a mucosa gástrica e duodenal, como a exposição ao etanol, estresse, tabagismo, deficiências nutricionais e a ingestão frequente de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) (BELAICHE et al., 2002; SHAKER et al., 2010).

Desde que Prout (1823) descobriu o ácido clorídrico gástrico e Heidenhain (1875) e Golgi (1893) identificaram a célula parietal como célula secretora de ácido, o mecanismo fundamental para a secreção ácida provou ser uma área interessante para investigação (AIHARA et al., 2003). Numa tentativa de proteger a mucosa gástrica do ácido gástrico, melhorar a cicatrização da úlcera, e prevenir a sua recorrência, o controle farmacológico da secreção de ácido gástrico tem representado há muito tempo um objetivo desejável (AIHARA et al., 2003). Dentre as opções disponíveis no mercado para a terapia antiulcerogênica estão os antiácidos, anticolinérgicos, antagonistas de receptores  $H_2$ , Inibidores da Bomba de Prótons (IBP), a erradicação da *H. pylori* com uma terapia medicamentosa tripla e os citoprotetores.

Muitos fármacos têm sido descritas para o tratamento das úlceras pépticas, em busca da supressão de ácido e pepsina. Entretanto, alguns destes fármacos podem promover não somente uma gama de efeitos colaterais, mas também uma menor eficácia no tratamento de úlceras (JAIN et al., 2007). Assim, a necessidade de agentes mais efetivos e seguros é nitidamente evidente (VIANA, 2013). Por isso, os esforços são dirigidos para encontrar o tratamento adequado a partir de produtos naturais, como nova fonte de recursos, (SANDERS, 1996), através do qual, alguns extratos de plantas podem ser valiosos como uma nova fonte terapêutica no tratamento de úlceras gástricas (SCHMEDA-HIRSCHMANN & YESILADA, 2005). Um grande número de compostos tem sido isolados de plantas medicinais e as classes químicas mais comuns de compostos bioativos que tem sido identificados em possuir atividade são os alcalóides, saponinas, xantonas, triterpenos e taninos, entre outras (SOUZA ALMEIDA et al., 2011).

O gênero *Serjania* pertence à família Sapindaceae e a maioria de suas espécies são encontrada no bioma Cerrado (SILVA, 1998). A farmacopeia do Chaco da Bolívia

aponta as folhas da *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae) como uma espécie medicinal comumente utilizada para o tratamento de dores gástricas (BOURDY, 2004).

Com base na indicação popular da planta, este trabalho visou estudar o extrato hidroalcoólico das folhas de *Serjania marginata* (EHSM) frente às ulcerações pépticas experimentais, obtendo dados que possam inferir sobre o potencial terapêutico de tal composto.

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Drogas e Substâncias Químicas

De acordo com o protocolo experimental, as drogas utilizadas foram: Etanol Absoluto (Labimpex, Brasil), carbenoxolona, capsaicina, cisteamina, n-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), netilmaleimida (NEM), ruthenium red, indometacina, alcian blue, óleo de rícino (Sigma, USA), lanzoprasol (comercializado pela Farmácia Cruz Vermelha Manipulações, Brasil), sulfato de morfina (Cristália, Brasil), sucralfato (EMS-Sigma Pharma, Brasil), cloridrato de loperamida (Janssen-Cilag, Brasil). O veículo utilizado para a diluição do extrato hidroalcoólico das folhas de *Serjania marginata* (EHSM) foi uma solução de salina (0,9%NaCl, 10mL/Kg) utilizada como controle negativo.

### 2.2 Material Vegetal e Extração

Foram coletadas, em fevereiro de 2011, folhas da *Serjania marginata*, em um fragmento de Cerrado localizado no loteamento S 21° 59' 41,8" e W 55° 19' 24,9", no Assentamento Lagoa Grande, distrito de Itahum, no município de Dourados-MS, a 429 m de altitude. A planta foi identificada por especialista e as exsicatas foram depositadas nos Herbários DDMS (n°4677) e no BOTU (n°027797). As folhas foram secas em estufa de ar circulante a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  e trituradas em moinho tipo Wiley com peneira de 10 mesh. O extrato foi obtido pelo processo de percolação exaustiva (Etanol 70%) (EtOH 70%) (PRISTA *et al.*, 1995). Após a extração, o líquido foi rotaevaporado sob pressão reduzida e liofilizado para completa remoção da água. O preparo do extrato bem como a caracterização fitoquímica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Serjania marginata* (EHSM) foram realizados pela aluna de doutorado Silvia Cristina Heredia Vieira do Instituto de Química de Araraquara – SP.

## 2.3 Animais

Para os procedimentos experimentais foram utilizados ratos Wistar machos (180 – 250g) e camundongos albinos Swiss machos e fêmeas (25-30 g) provenientes do Biotério Central da UNESP (Botucatu) ou da empresa Anilab-Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda (Paulínia, SP). Os animais foram divididos em grupos (com um número máximo de 10 indivíduos) de acordo com o tratamento fornecido ao longo de cada experimento, mantidos em gaiolas metabólicas para evitar coprofagia, e em sala climatizada sob temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  e ciclo de claro-escuro de 12 horas. O regime alimentar foi efetuado com ração Presence® e água fornecida ad libitum e, quando em jejum, os animais foram privados apenas de ração por um período de no máximo 16 horas. Os animais foram deixados de jejum antes dos ensaios porque as drogas padrões e EHSM foram sempre administrados oralmente (gavagem) utilizando uma solução de salina (0,9% NaCl, 10mL/Kg) como veículo. Todas as práticas experimentais estão de acordo com os protocolos experimentais, submetidos e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu. Todas as práticas experimentais que façam uso de animal foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal sob os nº 359,360/11 – CEEA, Anexos 1 e 2.

## 2.4 Práticas experimentais

### 2.4.1 - Toxicidade aguda e screening hipocrático

Foram utilizados camundongos Swiss albinos machos e fêmeas (n=7-10), divididos em grupos: um grupo tratado com o veículo (salina 0,9%NaCl, 10 mL/kg) e os demais tratados com uma dose aguda de 5000 mg/kg do EHSM. Os tratamentos foram realizados oralmente e os parâmetros comportamentais foram observados aos 30, 60, 120, 240 e 360 min. após a administração do extrato, bem como foi observado o número de mortes (Anexos 3 e 4). O peso corporal dos animais foi avaliado diariamente por 14 dias após o início dos experimentos. No décimo quarto dia, os animais foram eutanasiados e os seguintes órgãos foram retirados: coração, fígado, pulmão, baço, rins, testículos, ovários e úteros. Estes órgãos foram pesados para se realizar uma determinação analítica e comparativa em relação aos animais submetidos ao tratamento com o veículo indicando ou não efeito tóxico agudo dos extratos vegetais. (MALONE & ROBICHAUD, 1962; SOUZA BRITO, 1994).

2.4.2 - Avaliação da performance motora – Rota Rod (DUNHAM & MIYA, 1957 com modificações):

Com a finalidade de evitar um resultado falso positivo (ação relaxante muscular ou sedativo) do EHSM na avaliação da ação analgésica, os camundongos foram submetidos ao teste rota-rod (Insight®) que consiste em uma barra com o diâmetro de 2,5 cm subdividida em compartimentos, baseados em Dunham & Miya (1957). A rotação da barra tem velocidade constante de 05 rpm. Os animais foram tratados (v.o) com EHSM (5000 mg/kg) ou veículo (salina 0,9% NaCl, 10 mL/kg) 1 hora antes ou com diazepam (2mg/kg i.p, controle positivo) 30 min antes de serem submetidos ao teste de performance motora. Foi analisado o número de quedas de cada animal durante os 3 min de observação.

#### Avaliação da atividade gastroprotetora

2.4.3 - Úlceras gástricas induzidas por etanol absoluto (ROBERT et al., 1979 com modificações):

Ratos machos foram distribuídos em 5 grupos (n = 7) e passaram por um jejum de 16 horas antes de receberem uma dose oral do veículo (salina 0,9% NaCl, 10 mL/kg), carbenoxolona (100 mg/kg) e EHSM (125, 250 e 500 mg/kg de peso corporal). Após 60 minutos, todos os grupos foram tratados por via oral com 1 mL de etanol absoluto para induzir úlceras gástricas. Depois de mais 1 h, os animais foram eutanasiados, os estômagos retirados e abertos ao longo da maior curvatura, a extensão das lesões foi medida através do software V-Brane Labiris Pro; as medições da lesão foram expressas como mm<sup>2</sup>. Amostras do tecido foram coletadas e armazenadas a -80°C para caracterizações enzimáticas.

2.4.4 - Determinação do fluxo sanguíneo em úlcera gástrica induzida por etanol absoluto (KWIENCIEN et al., 2002; ROBERT et al, 1979 com modificações):

Ratos Wistar machos receberam tratamentos orais com veículo (salina 0,9%NaCl, 10 mL/kg), carbenoxolona 100 mg/kg ou EHSM 250 mg/kg. Grupo controle que não recebeu tratamento (sham) foi adicionado no experimento para avaliar o fluxo sanguíneo em condições normais. Decorrida uma hora após os tratamentos, 1 mL de etanol (99.5%) foi administrado oralmente. Após uma hora, os animais foram

anestesiados antes da incisão na cavidade abdominal para facilitar o acesso ao estômago, As medições foram realizadas em cinco áreas da porção glandular do estômago, onde os valores médios destas medições foram calculados e expressos como unidade de perfusão (PU) comparados com o grupo controle (sham). O fluxo sanguíneo foi medido com o Laser Doppler (Morr Instruments, modelo VMS-LDF2, monitor de perfusão sanguínea e temperatura Millwey, Axminster, UK).

2.4.5 - Modelo de indução de úlceras gástricas por Isquemia e Reperfusão (UEDA et al., 1989 com modificações):

Os ratos foram divididos em três diferentes grupos e tratados somente com veículo (salina 0,9% NaCl, 10 mL/kg), EHSM na dose de 250 mg/kg ou Lansoprazol na dose de 30 mg/kg, após um período de 16 horas de jejum. Realizada a administração oral, os animais foram anestesiados (Ketamina 0,8 mg/kg e Xilazina 0,4 mg/Kg - via intramuscular), e decorridos 30 minutos foi realizada uma incisão de aproximadamente 3 cm, do lado esquerdo do abdômen onde a artéria celíaca foi isolada com um clamp que permaneceu durante 30 minutos. Após este período de isquemia, o clamp foi removido (para permitir a reperfusão) permanecendo assim os 60 minutos subsequentes. No final desse período, os animais foram eutanasiados e o estômago removido, aberto ao longo da maior curvatura para exame das áreas de lesões utilizando-se o programa AvSoft BioView. Amostras do tecido foram coletadas e armazenadas a -80°C para caracterizações enzimáticas.

2.4.6 - Úlceras gástricas induzidas por DAINEs (Drogas Anti-inflamatórias não esteroidais) (GUIDOBONO et al., 1997 com modificações):

Após 16 h de jejum, os ratos dos diferentes grupos experimentais, foram tratados com o EHSM em doses variáveis (125, 250 e 500 mg/kg), com 30 mg/kg de lansoprazol ou veículo (salina 0,9%, 10mL/kg). Trinta minutos após o tratamento, as lesões foram induzidas por administração oral de 10 mL/kg da Indometacina (AINEs), solubilizada em Carbonato de Sódio 0,5% na dose de 50 mg/kg. Os animais foram eutanasiados 6 h após a administração da Indometacina e os estômagos retirados e abertos ao longo da maior curvatura, a extensão das lesões foi medida através do software V-Brane Labiris Pro; as medições das lesões foram expressas como mm<sup>2</sup>.

2.4.7 - Modelo de indução de úlceras duodenais por Cisteamina (SZABO, 1978 com modificações):

Após 2 horas de jejum os ratos foram tratados por via oral com veículo (salina 0,9% NaCl, 10 mL/kg), Lansoprazol 30 mg/kg e EHSM 250 mg/kg. Decorridos 30 minutos da administração foi iniciada a indução de úlcera duodenal por administração oral de cisteamina em duas doses de 300 mg/kg com intervalo de 4 horas entre elas. Transcorridas 24 horas após o início do jejum, os animais foram eutanasiados e o duodeno retirado para mensuração das lesões. A contagem das lesões foi feita através de score, onde 0= Ausência de lesão, 1= Erosão superficial da mucosa, 2= Lesões necrosantes, 3= Lesões perfurantes da mucosa.

2.4.8 - Avaliação da atividade antissecretória do EHSM e análise dos parâmetros do suco gástrico:

Foi adotado o modelo descrito por Shay *et al.* (1945) com modificações, nos quais os parâmetros do suco gástrico foram avaliados pelo efeito dos diferentes tratamentos administrados oral ou intraduodenalmente, no intuito de avaliar o efeito local ou sistêmico do EHSM. Os animais que receberam o tratamento intraduodenalmente foram anestesiados, após 16 horas de jejum, e sofreram uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide para a amarradura de piloro. A administração das drogas veículo (salina 0,9%NaCl, 10 mL/kg, lansoprazol 30 mg/kg, EHSM 250 mg/kg) foi realizada logo após a amarradura, e decorridas 4 horas todos os animais foram eutanasiados. No caso dos animais submetidos ao tratamento oral, inicialmente receberam os tratamentos citados anteriormente e após 30 minutos foi realizada a ligadura do piloro; então decorrida 4 horas e 30 minutos foram eutanasiados. O conteúdo estomacal foi coletado e, em seguida determinado o peso do conteúdo gástrico, volume do suco gástrico, o pH. Água destilada foi adicionada para completar um volume de 10 mL, e a solução resultante foi centrifugada a 3.500 rpm por 20min. Retirou-se o sobrenadante e titulou-o com solução de NaOH 0,01N, utilizando-se a fenolftaleína como indicador. A concentração total do ácido foi expressa em mEq/mL/4h.

#### 2.4.9 - Quantificação do muco gástrico aderido (RAFATULLAH et al., 1990):

Ratos após aproximadamente 16 horas de jejum foram tratados com veículo (salina 0,9% NaCl, 10 mL/kg), carbenoxolona (200 mg/kg) ou EHSM (250 mg/kg). Após 1 hora do tratamento fez-se uma incisão abdominal e foi realizada a ligadura do piloro. Transcorridas 4 horas da ligadura do piloro os animais foram mortos e a região glandular dos estômagos foram colocadas em solução de Alcian Blue (Alcian blue w/v 0,1%, sacarose 0,16 mol/l, acetato de sódio 0,05 mol/l, pH 5,8) por duas horas. Os estômagos foram lavados em solução de sacarose 0,25M e mantidos em solução de Cloreto de Magnésio 0,5M por mais 2 horas, agitando-os periodicamente. Transcorridas 2 horas do último procedimento, os estômagos foram retirados, secos, pesados e descartados. Na solução foi adicionado éter dietílico na proporção 1:1, após agitação e centrifugação o sobrenadante foi descartado e a concentração de Alcian Blue mensurada em espectrofotômetro com  $\lambda=598$  nm. A produção de muco foi expressa pela relação entre a quantidade de alcian blue e a massa da região glandular do estômago.

#### 2.4.10 - Determinação do papel dos grupamentos sulfidrílicos na citoproteção (MATSUDA et al., 1999; ROBERT et al., 1979 com modificações):

Ratos em jejum de 16 horas foram divididos em grupos de acordo com os pré-tratamentos + tratamentos recebidos (Salina + Salina, NEM + Salina, Salina + Carbenoxolona, NEM + Carbenoxolona, Salina + EHSM e NEM + EHSM). Os grupos controles abrangeram todos os animais pré-tratados com solução salina (injeção intraperitoneal de 10 mL/kg), e os grupos teste, todos os animais pré-tratados com N-etilmaleimida (NEM, um bloqueador dos grupamentos sulfidrílicos) na dose de 10 mg/kg. Após 30 minutos de realizado os pré-tratamentos os grupos receberam por via oral os tratamentos veículo (salina 0,9% NaCl, 10 mL/kg), Carbenoxolona (100 mg/kg) ou EHSM (250 mg/kg). Depois de uma hora, os animais receberam por via oral 1mL de etanol para indução da ulceração. Decorrida 1 hora da indução da úlcera, os animais foram eutanasiados e os estômagos removidos para contagem das lesões através do software V-Brane Labiris Pro; as medições da lesão foram expressas como mm<sup>2</sup>.

2.4.11 - Determinação do papel do Óxido Nítrico (NO) na citoproteção (MATSUDA et al., 1999; ROBERT et al., 1979 com modificações):

Ratos sob jejum de 16 h foram divididos em grupos de acordo com os pré-tratamentos + tratamentos recebidos (Salina + Salina, L-NAME + Salina, Salina + Carbenoxolona, L-NAME + Carbenoxolona, Salina + EHSM e L-NAME + EHSM). Os grupos controles abrangeram todos os animais pré-tratados com solução salina (injeção intraperitoneal de 10 mL/kg), e os grupos teste, todos os animais pré-tratados com N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, um inibidor da óxido nítrico sintase, análogo da L-arginina) na dose de 70 mg/kg. Após 30 minutos dos pré-tratamentos os grupos receberam por via oral os tratamentos veículo (salina 0,9% NaCl, 10 mL/kg), Carbenoxolona (100 mg/kg) ou EHSM (250 mg/kg). Depois de uma hora, os animais receberam por via oral 1mL de etanol para indução da ulceração. Decorrida 1 hora da indução da úlcera, os animais foram eutanasiados e os estômagos removidos para contagem das lesões através do software V-Brane Labiris Pro; as medições da lesão foram expressas como mm<sup>2</sup>.

2.4.12 - Determinação do envolvimento dos receptores vanilóides na citoproteção (MATSUDA et al., 1999; ROBERT et al., 1979 com modificações):

Para avaliar o envolvimento dos receptores vanilóides do tipo 1 no efeito gastroprotetor do EHSM, os animais foram pré-tratados pela via sub-cutânea com o bloqueador não-seletivo do receptor vanilóide Ruthenium Red na dose de 6 mg/kg ou com solução salina 0,9%. Trinta minutos após o pré-tratamento, os animais receberam por via oral veículo (salina 0,9% NaCl, 10 mL/kg) ou EHSM na dose de 250 mg/kg e por via intraperitoneal capsaicina na dose de 5 mg/kg. Decorridos 90 min. do pré-tratamento, todos os grupos foram tratados com 1 mL de etanol absoluto, via oral, para a indução de úlceras gástricas. Trinta minutos da indução da lesão gástrica, todos os animais foram eutanasiados para a caracterização da área de lesão gástrica através do software V-Brane Labiris Pro; as medições da lesão foram expressas como mm<sup>2</sup>.

2.4.13 - Análise do efeito sistêmico do EHSM:

Para avaliar o efeito sistêmico do EHSM em ulcerações gástricas experimentais foi realizado o modelo de ligadura de piloro (SHAY, 1945) seguida da administração de

etanol absoluto (ROBERT et al., 1979). Ratos, sob jejum de 16 horas, foram divididos aleatoriamente em 6 grupos experimentais. Animais de 3 grupos foram anestesiados e submetidos a cirurgia para ligadura do piloro duodenal e administração intraduodenal de veículo (salina 0.9%NaCl, 10 mL/kg), sucralfato (1000 mg/kg) ou EHSM (250 mg/kg). Os 3 grupos restantes foram submetidos apenas aos tratamentos com veículo (salina 0.9%NaCl, 10 mL/kg), sucralfato (1000 mg/kg) ou EHSM (250 mg/kg) por via oral. Decorrido 1 hora dos tratamentos orais ou intraduodenais, administrou-se 1 mL de etanol absoluto em todos os animais. Após 1 hora da administração do etanol, os animais foram eutanasiados para a caracterização da área de lesão gástrica através do software AvSoft BioView; as medições da lesão foram expressas como mm<sup>2</sup>.

#### 2.4.14 - Determinação dos níveis de Prostaglandina (PGE<sub>2</sub>)

A metodologia empregada foi segundo Curtis et al., (1995) com modificações. Os animais foram divididos aleatoriamente nos grupos Branco (animal saudável e sem tratamento); veículo (salina 10 mL/kg); indometacina (50 mg/kg); EHSM 125 mg/kg; EHSM 125 mg/kg + Indometacina (50 mg/kg); EHSM 250 mg/kg; EHSM 250 mg/kg + Indometacina (50 mg/kg). Primeiramente os animais foram pré-tratados com veículo, EHSM 125 e 250 mg/kg, 1 hora após o pré-tratamento, os animais foram tratados pela via oral com Indometacina 50 mg/kg. Após 1 hora do tratamento oral, os animais foram eutanasiados tiveram os estômagos retirados às mucosas raspadas, o tecido foi picotado e suspenso em tampão fosfato de sódio a 10 mM, pH 7,4. A solução obtida foi incubada a 37°C por 20 minutos. O nível de PGE<sub>2</sub> foi mensurada com um kit de dosagem imunoenzimático da R&D Systems (U.S.A) e as absorbâncias foram lidas á 480 nm.

#### 2.4.15 - Determinação da Mieloperoxidase (MPO):

A atividade da MPO foi mensurada de acordo com o método proposto por Krawisz et al. (1984). Amostras de tecido gástrico foram descongeladas e em seguida o material foi picotado e transferido para um tubo de vidro, adicionando-se tampão HTAB (Brometo de hexadeciltrimetilamônio), de modo a se obter uma proporção 1:20 (p/v). O material foi então homogeneizado, usando o homegeneizador Heidoph. O homegeneizado resultante foi dividido em 2 alíquotas de 1 mL, armazenadas em eppendorfs. O material foi sonicado por 10 segundos e submetido a um triplo processo de congelamento-descongelamento. Após o último descongelamento, a alíquota foi

centrifugada a 8300 rpm por 10 minutos a 4°C. Em uma placa de 96 canais, foram adicionados 50 µL do sobrenadante de cada amostra em pocinhos distintos, 150 µL do tampão de reação (cloridrato de orto-dianisidina). Em seguida, foi determinado o incremento de absorvância a 450 nm usando um espectrofotômetro. Os resultados serão expressos em U de MPO/g de tecido.

#### 2.4.16 - Determinação da Glutathiona (GSH):

A determinação do conteúdo de glutathiona reduzida foi realizada de acordo com o método descrito por Anderson (1985). Para efetuar a determinação do conteúdo de glutathiona reduzida, fragmentos da mucosa gástrica foram descongelados, picotados e posteriormente homogeneizados com uma solução de TCA 5% em uma proporção final de 1:20 (p/v), descontando-se 1mL de TCA já contido no eppendorf devido ao congelamento da amostra. Após a homogeneização, o material foi centrifugado a 4000rpm por 10 min a 4°C. 20 µL do sobrenadante foram colocados em uma placa de 96 poços, onde se adicionou 140 µL de NADPH, 5 µL de PBS e 20 µL de DTNB. A placa foi colocada no leitor de placas do espectrofotômetro, onde permaneceu incubada por 5 min em uma temperatura de 30°C. Após este período adicionou-se 15 µL de glutathiona redutase e o incremento de absorvância a 412 nm foi registrado no espectrofotômetro. A concentração de glutathiona foi calculada a partir da curva obtida por interpolação em uma curva padrão realizada com glutathiona e os resultados expressos como nmol/g de tecido.

2.4.17 - Quantificação de malondialdeído (MDA) (OHKAWA, et al., 1979 com modificações):

Este método é utilizado para avaliar o nível de peroxidação lipídica do tecido. Tiras de tecido gástrico armazenadas do modelo de etanol absoluto e de isquemia e reperfusão foram homogeneizados com KCl 1.15% (1:5). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 9000 rpm por 10 min. a 4°C e o sobrenadante foi coletado. Em tubos de ensaio foram adicionados 400 µL de água destilada, 200 µL de lauril 8.1%, 1500 µL de ácido acético 20% pH 3.5 e 1500 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8% diluído em ácido acético 20% e 400µL de amostra. A solução foi incubada a 95°C por 1h em banho-maria e posteriormente foi centrifugada a 4000 rpm por 10 min., foi coletado 200 µL de cada amostra e adicionado em placa de 96 poços. O malondialdeído

(MDA) formado reage com o TBA produzindo uma reação colorimétrica que foi determinada utilizando um espectrofotômetro com comprimento de onda de 532 nm. Os resultados foram expressos em nmol de MDA/g de tecido.

#### Estudo da ação do EHSM sobre a motilidade gastrointestinal e diarreia

2.4.18 – Motilidade gastrintestinal (STICKNEY & NORTHUP, 1959 com modificações):

Camundongos após 6 horas de jejum, foram tratados com veículo (salina 0,9%NaCl, 10 mL/kg), morfina 2,5 e 5 mg/kg por via subcutânea ou EHSM (125, 250 e 500 mg/kg) via oral. Após 1 hora do pré-tratamento, foi administrado por via oral o carvão ativado (1g/kg) e após 30 minutos os animais foram eutanasiados e feita a relação entre a distância percorrida pelo carvão ativado e o tamanho total do intestino delgado.

2.4.19 - Diarreia induzida por óleo de rícino (AWOOUNTERS et al., 1978 modificado por Mkherjee et al., 1998):

Camundongos Swiss machos, após 16 horas de jejum, foram tratados por via oral com veículo (salina 0,9%NaCl, 10 ml/kg), EHSM (125 e 250 mg/kg) ou loperamida (10 mg/kg). Após 1 hora foi administrado por via oral 0,2 mL de óleo de rícino (agente indutor de diarreia) e cada animal foi colocado em caixas individuais forradas com papel filtro e observados durante 4 horas. Foram avaliados o tempo inicial de evacuação aquosas e a consistência das fezes.

#### Ensaio *in vitro*

2.4.20 - Atividade sobre o crescimento em *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Helicobacter pylori*

EHSM foi avaliado nas seguintes concentrações: 7,81; 15,62; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 ou 1000 µg/ mL na presença de *H. pylori* (ATCC 43504 isolado de pacientes com úlcera duodenal). O extrato foi avaliado também na presença de *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922). As bactérias foram mantidas, durante a realização dos ensaios, em meio de cultura nutriente-ágar, sendo repicadas periodicamente. Foi utilizado omeprazol (*H. pylori*) e ampicilina para as demais bactérias como controles

positivos, respectivamente. As placas foram examinadas visualmente e espectrofotometricamente, determinando-se a concentração inibitória mínima (MIC) do EHSM. Os resultados só foram considerados válidos quando o MIC dos controles apresentou valores dentro daqueles estabelecidos pelo Comitê Nacional para Padrões de Laboratório Clínicos (NCCLS, 2002 e 2003).

## 2.5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

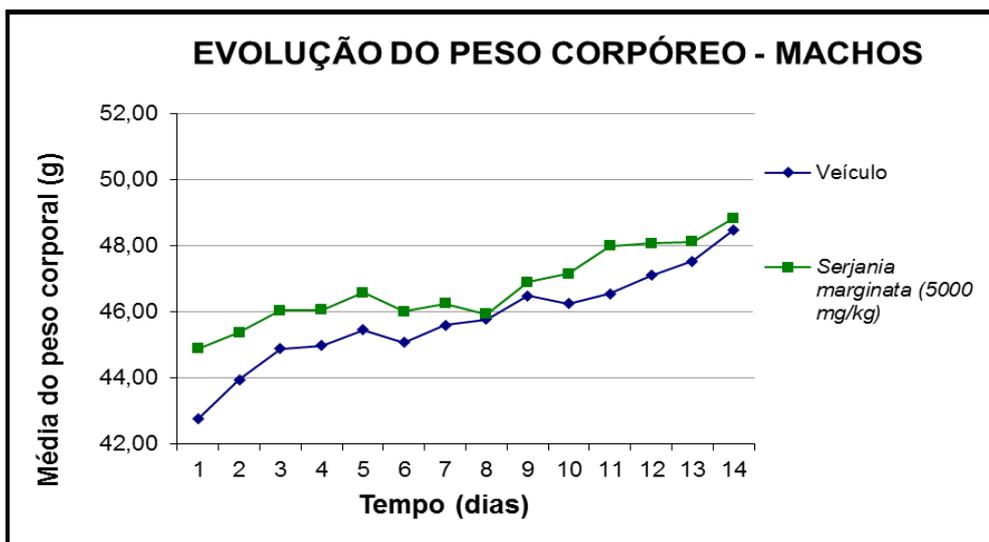
Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão da média dos parâmetros obtidos. Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de Dunnett; Tukey; Kruskal-Wallis ou Dunn para comparação entre três grupos ou mais; teste de Student (t) para comparação entre dois grupos. A análise estatística dos resultados considerou como nível de significância mínima de  $p < 0.05$ .

## 3 Resultados

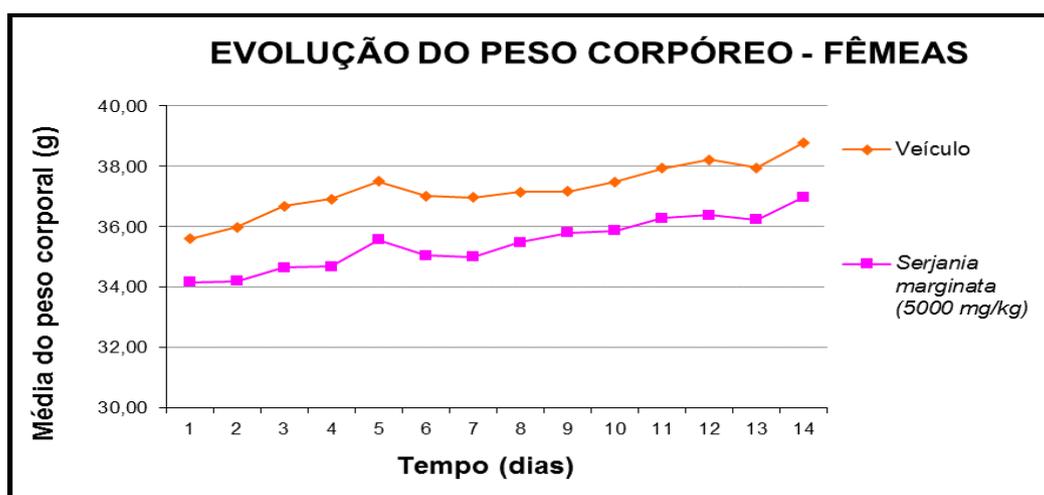
O estudo farmacológico dos efeitos do EHSM, foram avaliados em modelos experimentais de úlceras pépticas agudas frente a diversos agentes lesivos e também foi realizado teste de toxicidade aguda e performance motora para avaliar a sua segurança e excluir um possível efeito tóxico.

### a. Toxicidade aguda e screening hipocrático

A administração oral de 5000 mg/kg de EHSM em camundongos machos e fêmeas não provocou alterações nos parâmetros comportamentais analisados (Anexos 3 e 4). Após os 14 dias subsequentes da administração oral do EHSM, nenhum dos animais morreu e nenhuma mudança significativa no peso corporal diário (Fig. 1 e 2) e no peso dos órgãos (Tabela 1 e 2) foi observada ao final deste período. Este resultado nos assegura a continuidade dos estudos farmacológicos com esta espécie utilizando a via oral e nos leva a continuar com os ensaios biológicos.



**Fig. 1.** Evolução do peso corporal (g) de camundongos machos tratados com dose única do EHSM (5000 mg/kg). Média do peso (g) dos animais monitorados durante 14 dias (n=7-8). Os pontos representam as médias de peso dos grupos para cada dia de observação. Teste t “Student”.



**Fig. 2.** Evolução do peso corporal (g) de camundongos fêmeas tratadas com dose única do EHSM (5000 mg/kg). Média do peso (g) dos animais monitorados durante 14 dias (n=10). Os pontos representam as médias de peso dos grupos para cada dia de observação. Teste “t” de Student.

**Tabela 1.** Efeito do tratamento agudo com o EHSM (5000 mg/kg) sobre os órgãos de camundongos machos (g) no modelo de toxicidade aguda.

Toxicidade Machos – arcoseno (relação peso órgão/peso animal)							
	N	Coração	Rins	Pulmões	Fígado	Baço	Testículos
<b>Veículo (Salina 10 mL/kg)</b>	8	3,99±0,07	6,47±0,12	4,30±0,12	13,10±0,20	3,18±0,16	4,14±0,11
<b>EHSM (5000 mg/kg)</b>	7	3,93±0,13	6,68±0,24	4,41±0,15	14,80±1,05	4,34±0,88	4,13±0,12

Os resultados foram expressos na forma de média ± erro padrão da média. Significância estatística foi determinada por Teste “t” de Student.

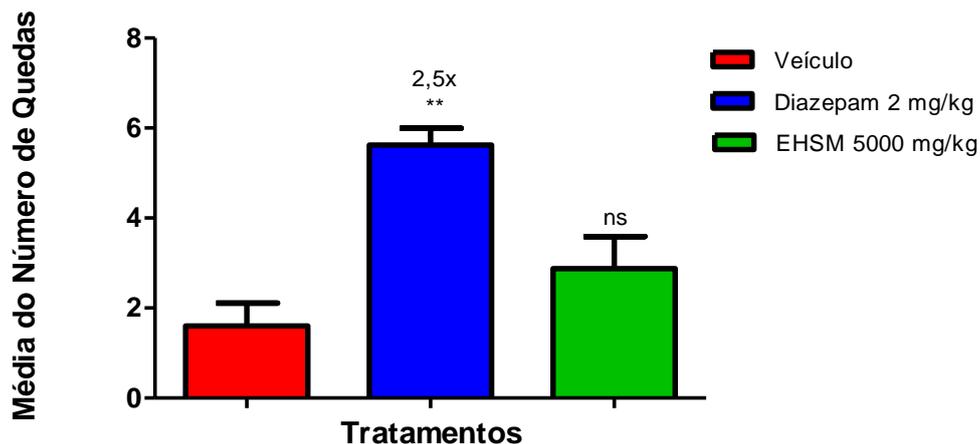
**Tabela 2.** Efeito do tratamento agudo com o EHSM (5000 mg/kg) sobre os órgãos de camundongos fêmeas (g) no modelo de toxicidade aguda.

Toxicidade Fêmeas – arcoseno (relação peso órgão/peso animal)								
	N	Coração	Rins	Pulmões	Fígado	Baço	#Ovários*100	Útero
<b>Veículo (Salina 10 mL/kg)</b>	10	4,14±0,08	5,99±0,19	5,13±0,20	13,90±0,36	3,38±0,11	10,32±1,28	2,29±0,31
<b>EHSM (5000 mg/kg)</b>	10	3,92±0,17	5,97±0,10	4,66±0,15	13,58±0,22	3,50±0,17	8,83±1,26	2,10±0,34

Os resultados foram expressos na forma de média ± erro padrão da média. Significância estatística foi determinado por teste “t” de Student. # Os valores reais foram multiplicados por 100 para que fosse possível a realização da conversão dos dados em arcoseno e posterior análise estatística.

### **b. Avaliação da performance motora**

Para excluir uma possível atividade neurotóxica do EHSM foi realizado o teste que avalia a coordenação motora dos animais tratados com o extrato através do aparato Rota Rod (performance motora). Neste modelo experimental, o tratamento oral com o EHSM na dose de 5000 mg/kg não produziu alterações no número de quedas ( $2.87 \pm 0.71$ ) dos animais durante o período avaliado (180 segundos), quando comparado ao grupo controle (veículo) ( $1.60 \pm 0.50$ ). O grupo tratado com diazepam apresentou um aumento significativo no número de quedas ( $5.62 \pm 0.37$ ), como mostra a figura 3.

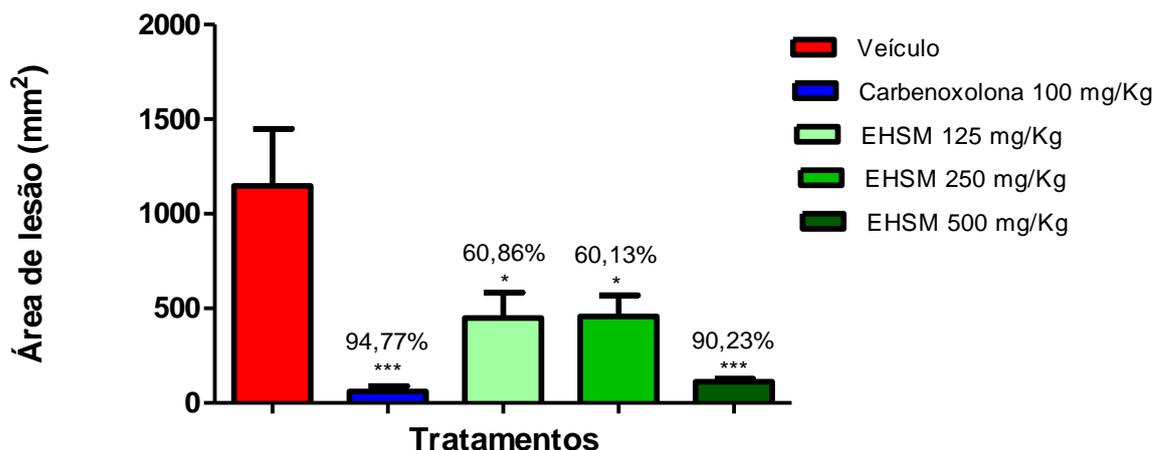


**Fig. 3.** Avaliação do número de quedas dos camundongos tratados oralmente com EHSM (5000 mg/kg) no modelo de Rota Rod. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunn; \*\* $p < 0.01$ . ns = diferença não significativa. O número de vezes (x) indica o aumento no número de quedas em relação ao grupo controle negativo tratado com o veículo.

### c. Atividade gastroprotetora

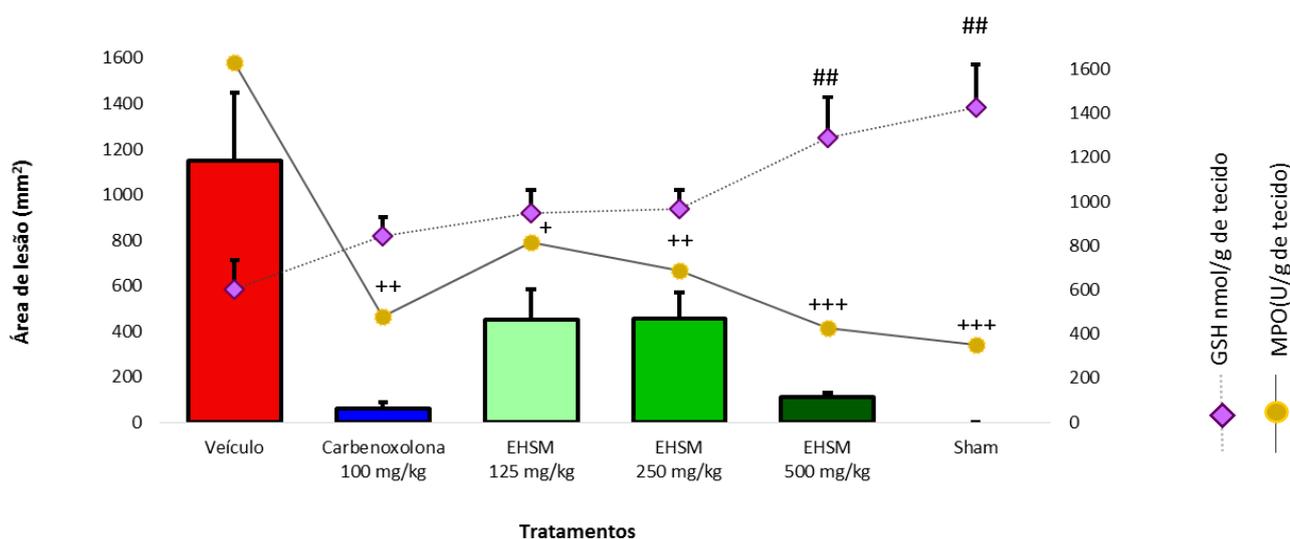
#### i) Lesão gástrica induzida por etanol absoluto

No modelo de úlcera gástrica induzida por etanol, o EHSM administrado oralmente nas doses de 125, 250 ou 500 mg/kg protegeu significativamente a mucosa gástrica da úlcera induzida pelo agente lesivo em 60,86%; 60,13% ou 90,23%, respectivamente, como mostrado na Fig.4. O controle positivo, carbenoxolona (100 mg/kg), protegeu em 94,77% a mucosa gástrica quando comparado ao grupo controle negativo (veículo). Não houve diferença significativa entre as doses testadas ( $p > 0.05$ ).



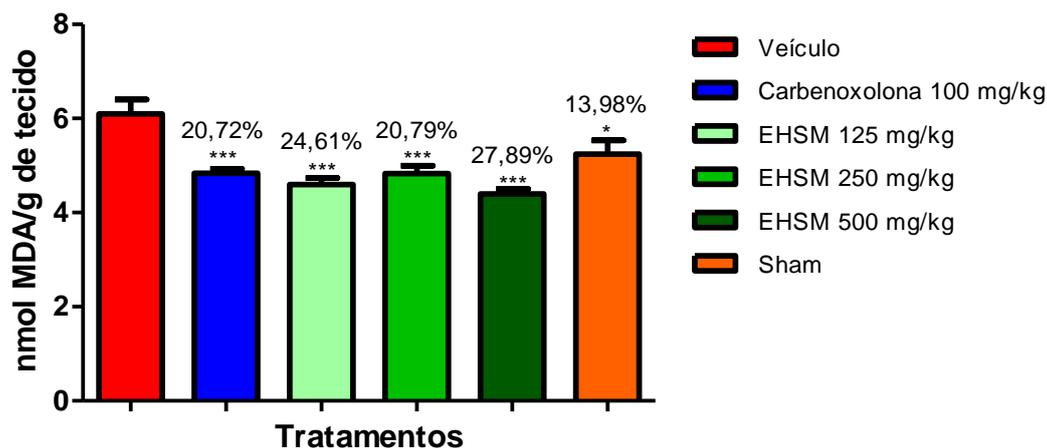
**Fig. 4.** Avaliação das diferentes doses de EHSM (125; 250 e 500 mg/kg) e carbenoxolona (100 mg/kg) frente ao modelo de úlceras gástrica induzidas por etanol absoluto em ratos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=7-8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnett; \*p<0.05 e \*\*\*p<0.001 comparado com o grupo controle (veículo). Porcentagem indica a proteção em relação ao veículo.

A figura 5 mostra o efeito gastroprotetor do EHSM e os parâmetros bioquímicos incluindo o conteúdo da glutathiona reduzida (GSH) e a atividade da mieloperoxidase no tecido da mucosa gástrica de animais com lesões gástricas induzidas por etanol e tratados com EHSM. Os dados obtidos nos mostra um aumento significativo nos níveis de MPO e uma diminuição no conteúdo da GSH no estômago de animais pré-tratados com veículo comparado ao sham (animal submetido ao mesmo estresse do jejum, mas que não recebeu nenhum tratamento). Os níveis de glutathiona reduzida na mucosa gástrica se mantiveram nas doses de 125 e 250 mg/kg e aumentou significativamente na dose de 500 mg/kg em ratos pré-tratados com EHSM, já os níveis de MPO diminuíram significativamente em todas as doses (125; 250 e 500 mg/kg). Os dados obtidos de animais tratados com EHSM (Fig. 5) foram semelhantes com os aqueles observados de animais sham e nos mostra os possíveis efeitos benéficos do EHSM na mucosa gástrica. A carbenoxolona na dose de 100 mg/kg, utilizada como controle positivo, teve uma manutenção nos seus níveis de GSH e uma redução nos níveis de MPO, assim como o EHSM.



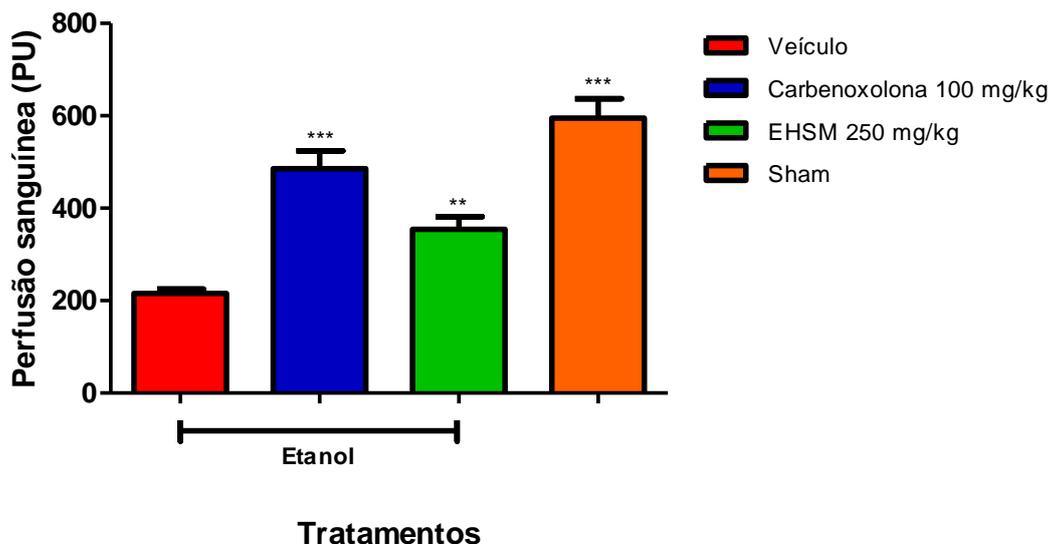
**Fig 5.** Efeito gastroprotetor do EHSM (125, 250 e 500 mg/kg) frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=7-8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnett; ## p<0.01 para o conteúdo de GSH e + p<0.05; ++ p<0.01 e +++ p<0.001 para a atividade da MPO comparado com o grupo veículo.

Também no modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol absoluto foi avaliado os níveis de peroxidação lipídica. O EHSM nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica em 24,61%; 20,79% e 27,89%, respectivamente em relação ao grupo veículo (salina 10 mL/kg). O grupo controle positivo (carbenoxolona 100 mg/kg) foi capaz de reduzir os níveis da peroxidação lipídica em 20,72% em relação ao veículo, e o grupo sham reduziu os níveis do malondialdeído, utilizado como um marcador de peroxidação lipídica, em 13,98% quando comparado ao grupo veículo (fig. 6).



**Fig. 6.** Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica (MDA) em animais pré-tratados com EHSM submetidos ao modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol absoluto. Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  e.p.m (n-7-8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett; \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ . A porcentagem indica a redução na peroxidação lipídica em relação ao grupo controle negativo.

O etanol é responsável por causar lesões hemorrágicas no tecido gástrico pela isquemia e hipóxia tecidual. O EHSM (250 mg/kg) foi capaz de manter o fluxo sanguíneo mesmo em detrimento da ação isquêmica causada pelo etanol no tecido gástrico em relação ao grupo tratado com veículo. A carbenoxolona (100 mg/kg), como esperado, manteve o fluxo em relação ao grupo controle negativo. O grupo sham também mantém o fluxo sanguíneo em relação ao grupo veículo, considerando que este não foi submetido ao agente isquêmico (fig. 7).

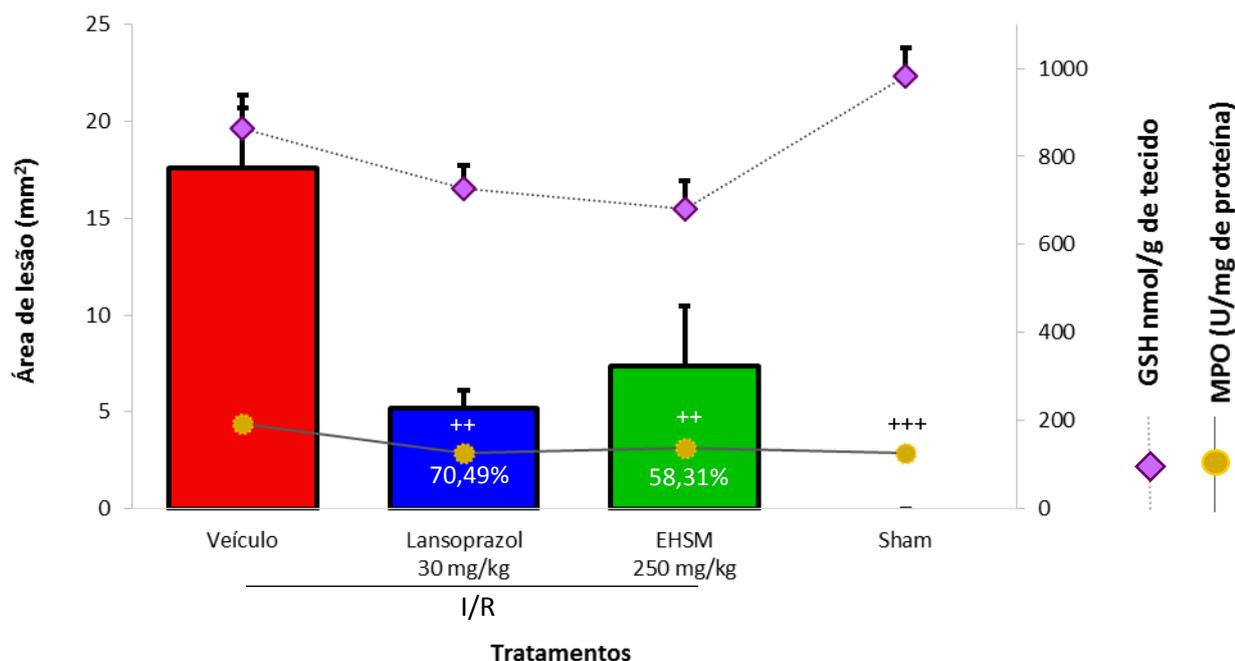


**Fig 7.** Avaliação do fluxo sanguíneo gástrico em ratos pré-tratados com EHSM frente ao modelo úlceras gástricas induzidas por etanol. Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  e.p.m (n=10) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett; \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 em relação ao grupo controle veículo.

## ii) Lesão gástrica induzida por isquemia/reperfusão

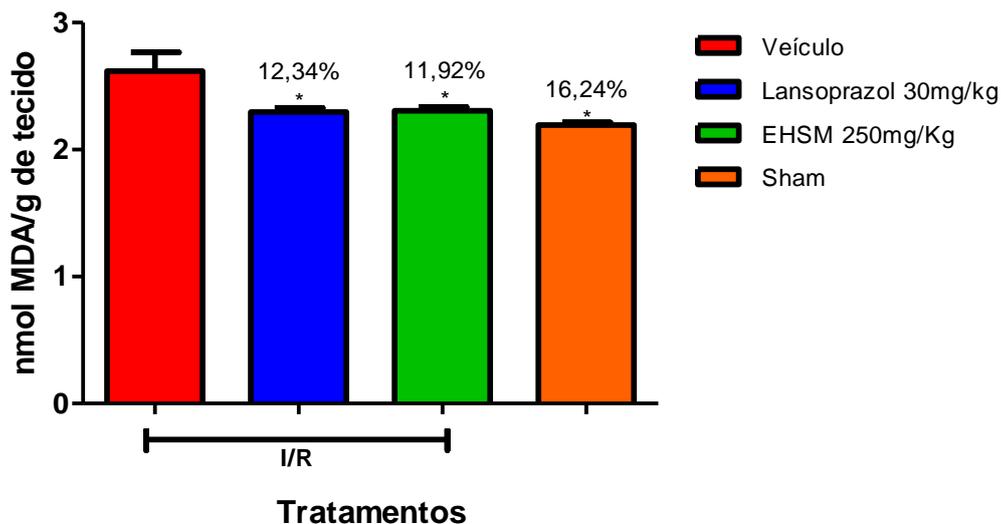
A partir dos resultados expostos anteriormente, foi escolhida uma única dose (250 mg/kg) do EHSM para a caracterização dos mecanismos de ação do extrato.

O presente estudo avaliou a possibilidade do EHSM em proteger a mucosa gástrica de ratos submetidos ao dano oxidativo induzido pela isquemia-reperfusão. Como esperado, houve um aumento na área de lesão dos estômagos dos animais tratados com veículo (fig. 8). O tratamento oral com lansoprazol (utilizado como controle positivo na dose de 30 mg/kg) e o EHSM (250 mg/kg) diminuíram significativamente a extensão das lesões ulcerativas em 70,49% e 58,31%, respectivamente, em relação ao grupo tratado com veículo. O efeito tanto do EHSM como do lansoprazol não foi mediado pela GSH porque os níveis de GSH diminuíram em relação ao grupo veículo. O grupo sham teve seus níveis de GSH mantidos estáveis em relação ao controle negativo. Em relação à atividade da mieloperoxidase tanto o lansoprazol quanto o EHSM foram capazes de diminuir a atividade da enzima mieloperoxidase (fig. 8).



**Fig. 8.** Efeito gastroprotetor do EHSM (250 mg/kg) nos níveis de GSH e na atividade da MPO frente ao modelo de úlcera gástrica induzidas por isquemia e reperfusão em ratos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=7-8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnett; \* $p < 0.05$  para a área de lesão; ++  $p < 0.01$  e +++  $p < 0.001$  para a atividade da MPO comparado com o grupo veículo. A porcentagem indica a proteção em relação ao grupo veículo. Para fins de adequação estatística os valores de MPO foram divididos por 100.

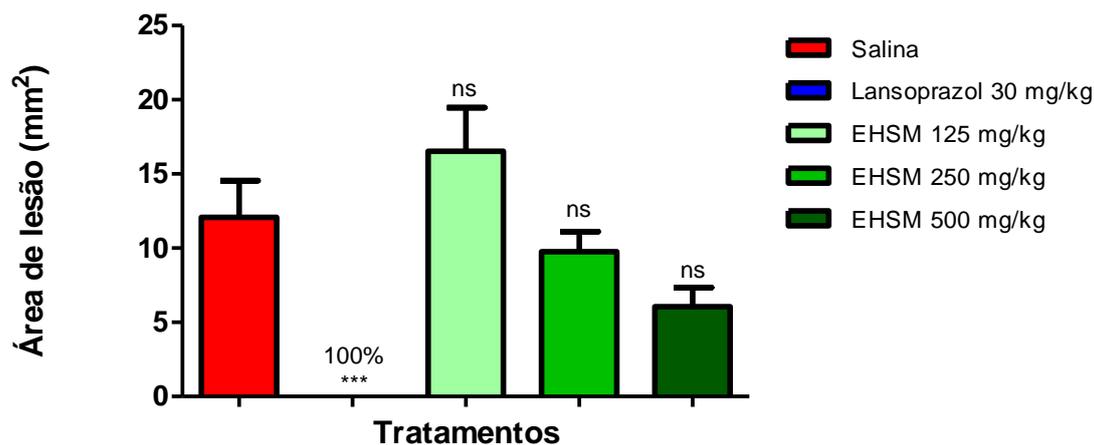
O EHSM também foi avaliado quanto a sua capacidade em reduzir a peroxidação lipídica (MDA) na mucosa gástrica após o período de isquemia-reperfusão (fig. 9). Neste modelo, o EHSM reduziu a peroxidação lipídica provocada pelas lesões ulcerativas de forma significativa, com 11,92% de redução em relação ao grupo controle negativo tratado com veículo. O grupo controle positivo (lansoprazol 30 mg/kg) também reduziu os níveis de MDA, com média de 12,34% em relação ao controle negativo (veículo), e o sham (animal operado porém sem sofrer o procedimento de isquemia e reperfusão) teve o seu nível de MDA de 16,24% menor que o controle negativo (fig. 9).



**Fig. 9.** Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica (MDA) em animais pré-tratados com EHSM submetidos ao modelo de úlceras gástricas induzidas por isquemia-reperusão em ratos. Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  e.p.m (n-7-8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett; \* $p < 0,05$ . A porcentagem indica a redução na peroxidação lipídica em relação ao grupo veículo.

### iii) Lesão gástrica induzida por DAINE

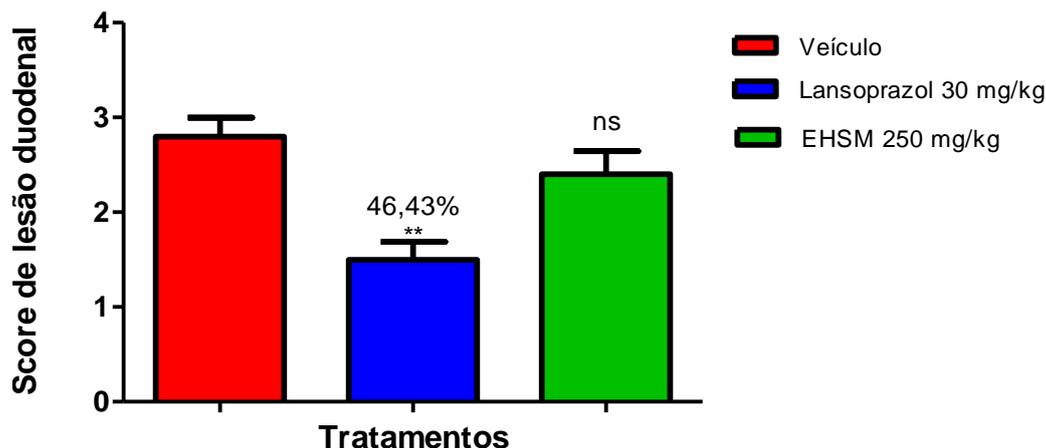
O EHSM foi testado frente a um modelo de indução de úlceras por indometacina (DAINE). Todas as doses do EHSM avaliadas neste modelo não apresentaram um efeito gastroprotetor em relação ao grupo veículo (controle negativo) (fig. 10). O grupo controle positivo lansoprazol apresentou proteção de 100% em relação ao grupo veículo.



**Fig. 10.** Avaliação do efeito gastroprotetor do EHSM frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por indometacina (DAINE). Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  e.p.m (n-7-8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett; \*\*\* $p < 0,001$ . A porcentagem indica a proteção em relação ao grupo veículo.

#### **d. Úlcera duodenal induzida por cisteamina**

Em adição ao efeito protetor exercido pelo EHSM em modelos experimentais gástricos *in vivo*, EHSM foi avaliado frente a lesões duodenais induzidas pela cisteamina em ratos, modelo que causa dano perfurante e lesões extensas no tecido duodenal (Carvalho, *in press*). O tratamento prévio com o EHSM na dose de 250 mg/kg não preveniu o surgimento de lesões ulcerativas perfurantes induzidas por cisteamina, com índice de lesão duodenal próximo ao grupo tratado com solução salina (fig. 11). O lansoprazol, utilizado como controle positivo, foi capaz de reduzir a lesão duodenal em 46,43% quando comparado ao grupo veículo.



**Fig. 11.** Avaliação do efeito gastroprotetor do EHSM (250 mg/kg) frente ao modelo de úlceras duodenais induzidas por cisteamina. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunn; \*\* $p < 0.01$ . ns = diferença não significativa. A porcentagem indica a proteção em relação ao grupo veículo.

### e. Avaliação dos mecanismos de ação

#### i. Atividade antissecretória

Após ter caracterizado a ação gastroprotetora do EHSM, avaliamos os possíveis mecanismos de ação envolvidos nesta atividade antiulcerogênica. Foi avaliado o efeito do EHSM sobre os parâmetros do suco gástrico para verificar uma possível ação antissecretória. Através do modelo de ligadura do piloro, o EHSM administrado pela via oral, não foi capaz de alterar nenhum dos parâmetros do suco gástrico observados (tabela 3). Em contrapartida o lansoprazol, utilizado como controle positivo neste experimento, aumentou o pH, reduziu volume e reduziu a concentração de  $H^+$  do suco gástrico.

O efeito sistêmico do EHSM foi avaliado pela administração através da via intraduodenal. O tratamento com EHSM reduziu o peso do conteúdo gástrico e o volume do suco gástrico. O lansoprazol, alterou todos os parâmetros avaliados (tabela 3).

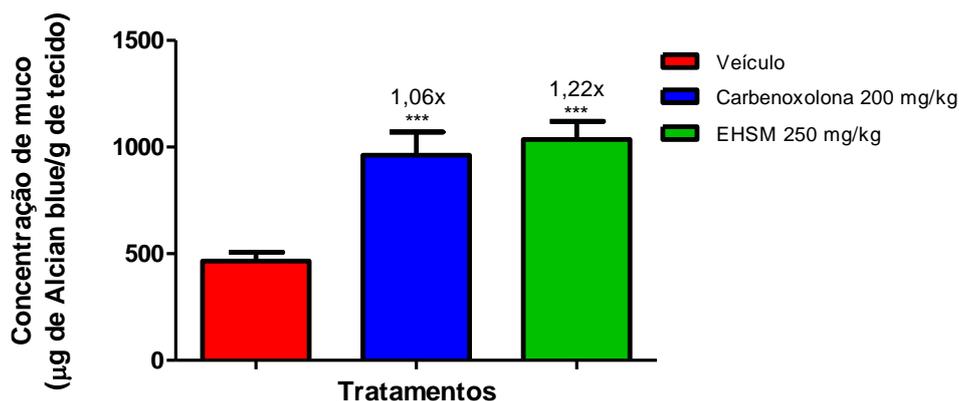
**Tabela 3.** Efeitos do EHSM (250 mg/kg) administrados oralmente (v.o) ou intraduodenalmente (i.d) nos parâmetros do suco gástrico no modelo de ligadura do piloro em ratos.

Via	Tratamento	Peso do conteúdo gástrico	pH	Volume do suco gástrico	Concentração de hidrogênio H <sup>+</sup> (mEq/L)
V.O	Veículo	3,010 ± 0,4199	1,377 ± 0,0936	3,367 ± 0,4193	8,853 ± 0,4372
	Lansoprazol 30 mg/kg	1,609 ± 0,2351	5,927 ± 0,4588***	1,756 ± 0,2892*	3,663 ± 0,3115***
	EHSM 250 mg/kg	3,027 ± 0,5256	1,619 ± 0,1625	3,330 ± 0,6044	8,830 ± 0,5585
I.D	Veículo	5,451 ± 0,4204	1,409 ± 0,03680	5,829 ± 0,4235	15,98 ± 1,606
	Lansoprazol 30 mg/kg	1,571 ± 0,1906 ***	6,060 ± 0,3546 ***	1,860 ± 0,2112 ***	8,286 ± 0,8077*
	EHSM 250 mg/kg	2,983 ± 0,3681 ***	1,703 ± 0,06716	3,350 ± 0,3417 ***	15,87 ± 2,359

Os resultados foram expressos na forma de média ± e.p.m (n-7-8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguido pelo teste *a posteriori* de Dunnett; \*p<0.05 e \*\*\*p<0,001 em relação ao grupo tratado com veículo.

## ii. Quantificação do muco aderido à mucosa gástrica

Outro possível mecanismo de ação relacionado com a gastroproteção do EHSM é a produção de muco. A atividade gastroprotetora pode estar relacionada com o fortalecimento dos mecanismos de defesa da mucosa gástrica. O efeito do EHSM no aumento de muco aderido a mucosa gástrica foi avaliado através da ligadura de piloro em ratos. A administração oral de EHSM (250 mg/kg) resultou em um aumento significativo de muco nos estômagos dos ratos em 1,22 vezes em relação ao grupo veículo. O controle positivo utilizado neste experimento, carbenoxolona 200 mg/kg, também elevou significativamente a quantidade de muco aderido em 1,06 vezes quando comparado ao grupo controle negativo (veículo) (fig. 12).



**Fig. 12.** Quantificação de muco aderido a mucosa gástrica em ratos pré-tratados com o EHSM (250 mg/kg). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnett; \*\*\*p < 0.001. O número de vezes (x) indica o aumento na quantidade de muco aderido à mucosa gástrica em relação ao grupo veículo.

### iii. Determinação do papel dos grupamentos sulfidrílicos, NO e nervos sensíveis à capsaicina na gastroproteção

Para avaliar a participação do EHSM sobre os compostos sulfidrílicos os animais foram pré-tratados com NEM (bloqueador de compostos sulfidrílicos). A gastroproteção que antes era verificada nos tratamentos com a carbenoxolona (100 mg/kg) ou EHSM (250 mg/kg) quando pré-tratados com salina 0,9% (98,32% e 60,6%, respectivamente) não foi perdida no pré-tratamento com NEM (carbenoxolona protegeu 57,24% e o EHSM protegeu 53,93% a mucosa gástrica). Os resultados indicam que tanto a carbenoxolona quanto o EHSM não dependem dos grupamentos sulfidrílicos para exercerem sua ação gastroprotetora (tabela 4). Embora o pré-tratamento com o NEM aumente a área de lesão, ambas as drogas ainda exercem ação gastroprotetora significativa.

Na tabela 4 também podemos ver os resultados obtidos no estudo do envolvimento do óxido nítrico na atividade antiulcerogênica do EHSM. Observa-se que a ação gastroprotetora, frente ao agente lesivo etanol, proporcionada tanto pela carbenoxolona quanto pelo EHSM nos grupos de animais pré-tratados com veículo (proteção de 97,06% e 56,42%, respectivamente), não foram revertidas quando os grupos foram pré-tratados com L-NAME (inibidor da NO sintase), (proteção de 71,07% e 67,65%, respectivamente). Nas comparações entre grupos de mesmo tratamento, constatou-se diferença estatisticamente significativa apenas no grupo controle negativo,

animais tratados com solução salina 0,9%. Esses resultados indicam que tanto a carbenoxolona quanto o EHSM não possuem efeito antiulcerogênico de forma dependente do óxido nítrico.

O envolvimento de receptores de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV-1) na ação do EHSM foi analisado em animais pré-tratados com Ruthenium red (bloqueador de TRPV), e submetidos à indução de úlceras gástrica por etanol. Em animais pré-tratados com salina e tratados com capsaicina e EHSM, obtivemos 53,87% e 76,82% de proteção, respectivamente. Quando administrado Ruthenium red a proteção que antes era evidenciada em animais tratados com capsaicina foi perdida, mas o EHSM continuou a exercer sua ação protetora (79,53%) (tabela 4). Constatou-se que ao contrário da capsaicina, o EHSM não teve sua ação protetora revertida, indicando que sua ação antiulcerogênica não seja exercida via TRP.

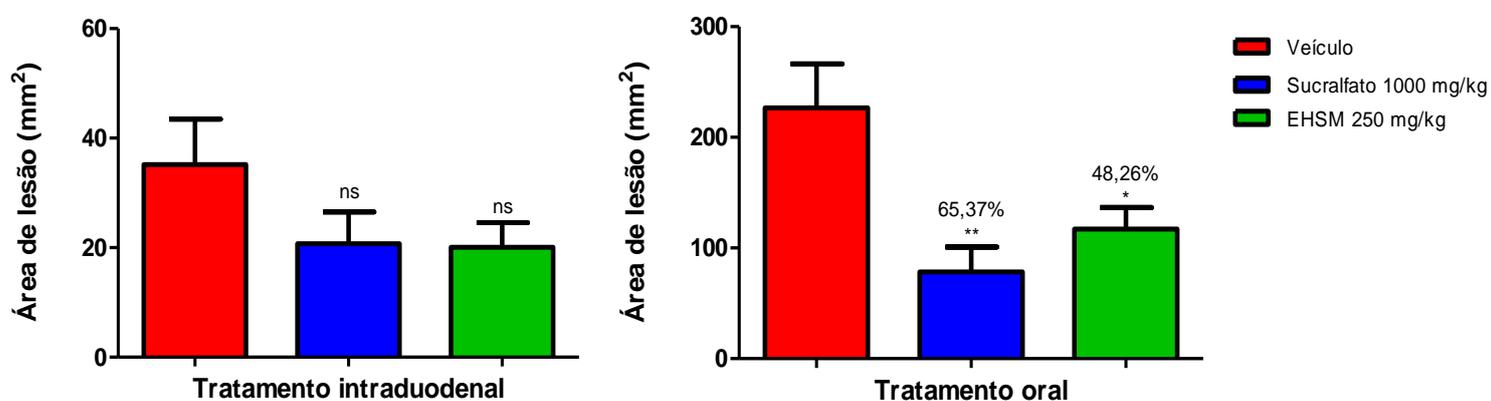
**Tabela 4.** Efeitos do EHSM (250 mg/kg) em lesões gástricas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com NEM (um bloqueador de compostos sulfidrílicos), L-NAME (inibidor da NO sintase) ou Ruthenium Red (bloqueador de TRPV).

Pré-tratamento (i.p)	Tratamento (v.o)	Dose	Área de lesão	Inibição da lesão gástrica
Salina	Salina	-	259,1 ± 63,85	-
Salina	Carbenoxolona	100 mg/kg	4,368 ± 2,676***	98,32
Salina	EHSM	250 mg/kg	102,1 ± 21,11*	60,6
NEM	Salina	-	369,9 ± 74,53ns	-
NEM	Carbenoxolona	100 mg/kg	158,2 ± 42,86*; ns	57,24
NEM	EHSM	250 mg/kg	170,1 ± 40,08*; ns	53,93
Salina	Salina	-	256,3 ± 62,99	-
Salina	Carbenoxolona	100 mg/kg	7,559 ± 4,322***	97,06
Salina	EHSM	250 mg/kg	111,7 ± 25,45*	56,42
L-NAME	Salina	-	575,5 ± 30,54####	-
L-NAME	Carbenoxolona	100 mg/kg	166,5 ± 99,33***; ns	71,07
L-NAME	EHSM	250 mg/kg	186,2 ± 57,98**; ns	67,65
Salina	Salina	-	146,4 ± 25,71	-
Salina	Capsaicina	5 mg/kg	67,54 ± 22,01*	53,87
Salina	EHSM	250 mg/kg	33,95 ± 14,25**	76,82
Ruthenium Red	Salina	-	321 ± 45,82##	-
Ruthenium Red	Capsaicina	5 mg/kg	214,6 ± 41,29ns; #	-
Ruthenium Red	EHSM	250 mg/kg	65,71 ± 29,72***; ns	79,53

Os resultados foram expressos na forma de média ± e.p.m. e a significância estatística foi determinada pela ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett; \*p<0,05; \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 representa a diferença em relação ao grupo tratado com salina. ANOVA com teste *a posteriori* de Tukey; #p<0,05; ##p<0,01 e ###p<0,001 representa a diferença em relação aos pré-tratamentos. (ns = diferença não significativa). A porcentagem indica a proteção em relação ao grupo tratado com salina.

#### iv. Avaliação da atividade local e sistêmica de EHSM

Para investigar se o EHSM atua por via local ou sistêmica, animais passaram pelo procedimento experimental de ligadura de piloro e posteriormente, receberam o etanol absoluto pela via oral. Neste modelo, os animais receberam o EHSM por duas vias: oral, para avaliar seu efeito local e intraduodenal para verificar se apresenta efeito sistêmico. A análise foi feita comparando os resultados entre esses dois tratamentos (fig. 13). Observou-se que os ratos tratados com EHSM (250 mg/kg) e o sucralfato (1000 mg/kg) por via oral apresentaram significativa ação protetora (48,26% e 65,37%, respectivamente). No entanto, quanto submetidos aos tratamentos intraduodenal o EHSM e o sucralfato perderam sua gastroproteção.

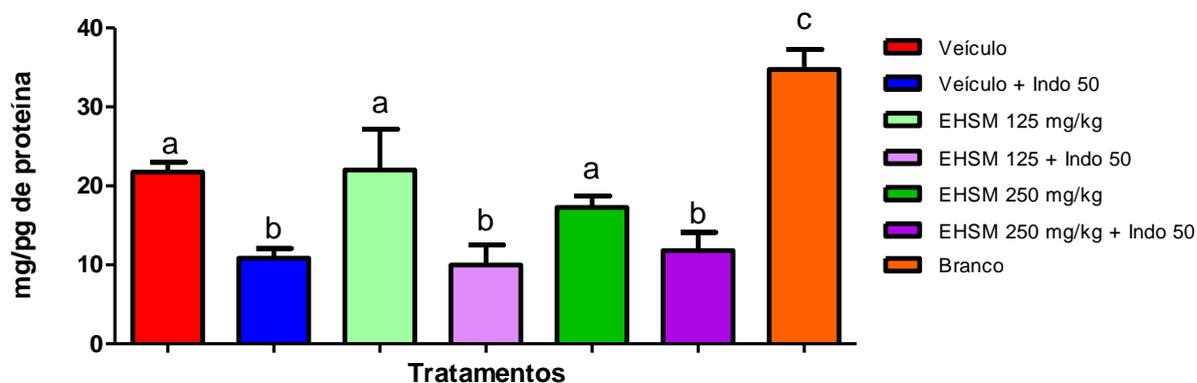


**Fig. 13.** Avaliação da ação local e sistêmica do EHSM na proteção gástrica de úlceras induzidas por etanol absoluto. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnett; \* $p < 0.05$  e \*\* $p < 0.01$ . ns = diferença não significativa. A porcentagem indica a proteção em relação ao grupo veículo.

#### v. Quantificação de PGE<sub>2</sub> na mucosa gástrica

Outro mecanismo de ação avaliado foi o envolvimento das PGs na atividade do EHSM. A figura 14 demonstra que a administração da indometacina (50 mg/kg), o inibidor da síntese de PGE<sub>2</sub> foi capaz de reduzir significativamente a síntese deste prostanóide. A administração de EHSM (125 e 250 mg/kg) isoladamente não promoveu a estimulação da síntese de PGE<sub>2</sub>, apresentando os níveis próximos aos dos animais tratados somente com o veículo. Já a administração do EHSM (125 e 250 mg/kg) em

associação com indometacina (50 mg/kg) não foram capazes de manter os níveis de PGE<sub>2</sub> elevados.

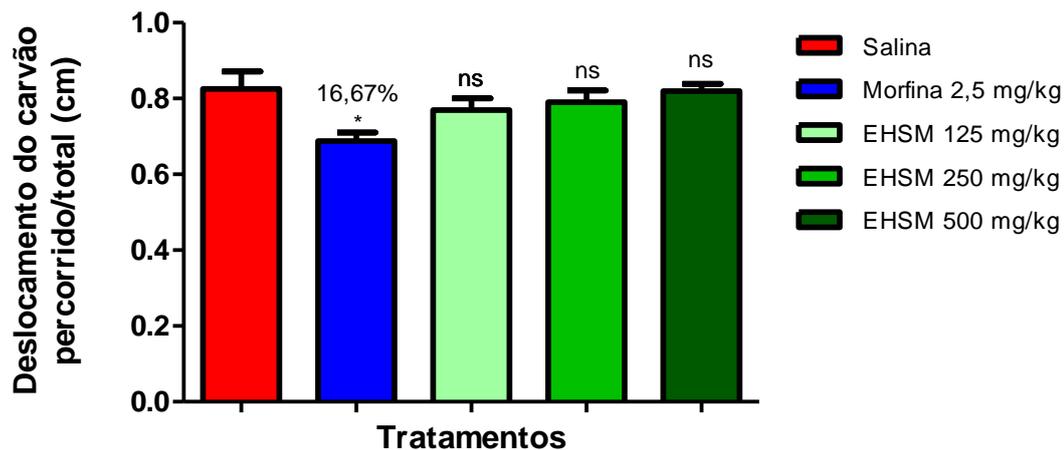


**Fig. 14.** Determinação dos níveis de PGE<sub>2</sub> em animais submetidos ao pré-tratamento com EHSM (125 e 250 mg/kg) no modelo de úlceras gástricas induzidas por DAINES. Os resultados foram expressos na forma de média ± e.p.m (n-7-8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA com teste *a posteriori* de Tukey; letras diferentes representam diferenças estatística de  $p < 0,05$ . INDO 50 = tratamento com indometacina 50 mg/kg.

#### f. Avaliação da motilidade intestinal

Uma vez comprovada a atividade antiulcerogênica do EHSM, também avaliamos se o extrato altera o trânsito gastrintestinal. Extratos que alteram o trânsito intestinal interferem na absorção e também podem interferir na sua ação terapêutica e de outras substâncias.

Foi avaliado primeiramente o potencial efeito do EHSM na motilidade intestinal de camundongos em diferentes doses do extrato (fig. 15). Os resultados indicam que não houve interferência do EHSM na motilidade intestinal, em nenhuma das doses testadas, quando comparado com o grupo veículo. Somente os animais tratados com morfina (2,5 mg/kg) reduziram de modo significativo o trânsito intestinal em 16,67%.



**Fig. 15.** Avaliação do EHSM (125; 250 e 500 mg/kg) sobre a motilidade intestinal. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnett; \* $p < 0.05$  e \*\*\* $p < 0.001$ . ns = diferença não significativa. A porcentagem indica a redução na motilidade em relação ao grupo veículo.

#### **g. Avaliação do efeito antidiarreico**

O EHSM também foi avaliado frente a um modelo de indução de diarreia para avaliar os seus possíveis efeitos. O EHSM não foi eficaz em reduzir as evacuações induzidas pelo agente catártico, óleo de rícino (tabela 5). O controle positivo, loperamida, reduziu de modo significativo o início das evacuações, bem como reduziu a quantidade destas evacuações líquidas.

**Tabela 5.** Avaliação do EHSM sobre o modelo de indução de diarreia por óleo de rícino em camundongos

Tratamento	Dose (mg/Kg)	Tempo inicial evacuação aquosa (minutos)	Quantidade de evacuações			Inibição %
			normal	semi-sólida	líquida	
<b>Veículo</b>		78,63 ±12,13	1,37±0,46	1,75±0,52	4,25±0,95	
<b>Loperamida</b>	10	218,8±14,56 ***	0,37±0,18 ns	0,12±0,12 ns	0,87±0,51 *	79,53
<b>EHSM</b>	125	76,43±9,35 ns	1,14±0,76 ns	0,18±0,63 ns	3,42±1,15 ns	19,53
<b>EHSM</b>	250	98,13±7,04 ns	1,50±0,37 ns	0,87±0,35 ns	4,50±1,01 ns	0

Os resultados foram expressos como média ± e.p.m e a significância estatística foi determinada pela ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett para o tempo de início das evacuações aquosas e Kruskal-Wallis seguido de Dunn para a quantidade de evacuações. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . (ns= diferença não significativa). Os números indicam a porcentagem de inibição da quantidade de evacuações líquidas em relação ao grupo veículo.

#### **h. Ensaios *in vitro***

##### **i. Avaliação da ação antimicrobiana sobre *S. aureus*, *E. coli* e *H. pylori***

Na tabela 6 estão os resultados do efeito do EHSM no crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Helicobacter pylori*. Neste estudo avaliamos a atividade antimicrobiana *in vitro* do EHSM frente a bactéria *E. coli*, e este teve uma concentração inibitória mínima (MIC) de 250 µg/mL. O EHSM quando testado frente a *S. aureus* obteve um MIC de 125 µg/mL. A *H. pylori*, importante bactéria causadora de úlceras, foi inibida com 75 µg/mL do EHSM. Como controle positivo foi utilizado o omeprazol para *H. pylori*, ampicilina para as demais bactérias.

**Tabela 6.** Avaliação do efeito do extrato EHSM sobre o crescimento em *S. aureus*, *E. coli* e *H. pylori*

<b>Bactéria</b>	<b>EHSM (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	125
<i>Escherichia coli</i>	250
<i>Helicobacter pylori</i>	75

Os números indicam o MIC do extrato nas diferentes avaliações

### 3.4 Discussão

Na família Sapindaceae destacam-se os gêneros: *Paullinia*, *Cupania* e *Serjania*, muitas das quais usadas para a pesca por serem consideradas narcóticas para os peixes. Apresentam também, significativos efeitos farmacológicos, especialmente sobre o Sistema Nervoso Central (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002).

No teste de toxicidade, em camundongos machos e fêmeas, os resultados mostram que o tratamento agudo com EHSM não apresentou sinais de toxicidade aguda em nenhum dos parâmetros analisados. Não foram registrados alteração do peso corporal nem alterações dos pesos dos órgãos vitais após tratamento com a dose inicial de 5000 mg/kg de EHSM. O acompanhamento do peso corpóreo do animal é um importante indicador para a avaliação da toxicidade de uma substância (JAHN & GUNZEL, 1997). Em continuidade, foi realizada a avaliação do desempenho motor de camundongos na barra giratória (Rota Rod).

O modelo de Rota Rod nos permite detectar agentes que causam relaxamento e/ou que produzem falta de coordenação motora (COSTA, 2013). Este teste avalia a habilidade do animal em se manter equilibrado em uma haste em rotação. O aparelho de Rota Rod tem uma superfície cilíndrica movendo ao redor de um eixo numa aceleração de 5 rpm. Trata-se de um método não-específico, uma vez que mede indistintamente, efeitos neurológicos, estimulantes e depressores sobre a coordenação motora, aos quais também é atribuído o termo neurotoxicidade (DALLMEIER & CARLINI, 1981). Os benzodiazepínicos, como o diazepam, utilizado como controle positivo neste experimento, foi introduzido na clínica por ser descrito como uma droga ansiolítica, hipnótica, anticonvulsivante e miorelaxante (MILIĆ et al., 2012). Eles

afetam negativamente a coordenação motora e o equilíbrio (VERSTER et al., 2002; LICATA et al., 2009). O diazepam farmacologicamente age como um agonista não seletivo de receptores GABA<sub>A</sub>, e a ativação das subunidades  $\gamma$ ,  $\alpha_1$  e  $\alpha_5$  do receptor, potencializa os efeitos do GABA, levando a ataxia e o relaxamento muscular (MILIĆ et al., 2012; RANG & DALE, 2007). O resultado obtido neste trabalho mostra que o EHSM administrado oralmente na dose de 5000 mg/kg v.o (mesma dose utilizada na toxicidade aguda) não alterou a performance motora dos animais, indicando ausência de possíveis efeitos neurotóxicos por parte do extrato. Em conjunto, os resultados do teste de toxicidade aguda e barra giratória demonstram ausência de efeitos tóxicos o que viabiliza a continuidade com estudos farmacológicos do EHSM. Porém novos estudos se fazem necessários para avaliar a toxicidade crônica em doses repetidas.

A partir desses resultados, a atividade gastroprotetora do EHSM foi avaliada frente a diversos agentes lesivos, entre eles, o etanol, que é um dos agentes mais irritantes para a mucosa gástrica. O etanol leva a formação de danos microvasculares a saber: a ruptura do endotélio vascular que resulta em aumento da permeabilidade vascular, a formação de edemas e de descolamento epitelial (SZABO et al., 1995; ABDULLA et al., 2010). O etanol é conhecido como um agente causal de lesões gástricas por alterar os fatores protetores, incluindo o decréscimo na produção de muco e na circulação sanguínea dentro da mucosa (CHOI et al., 2009; INEU et al., 2008). Além disso, a lesão gástrica causada, pode ser devido a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), diminuição na proliferação celular, e uma resposta inflamatória exacerbada (CHOI et al., 2009; INEU et al., 2008). A morte de células da mucosa gástrica induzida por etanol inclui a necrose e apoptose, ambos são processos considerados ativos, regulados e controláveis (HENRIQUEZ et al., 2008; VANLANGENAKKER et al., 2008; LUO et al., 2013). Normalmente é aceito que a apoptose é um evento complexo controlado por gene endógeno iniciado por vários fatores tais com isquemia (FANG et al., 2012) e hipóxia (SERMEUS et al., 2012). No experimento realizado, o EHSM inibiu, de modo significativo, as lesões induzidas pelo etanol, nas três doses avaliadas (125, 250 e 500 mg/kg).

O etanol é reconhecido por reduzir os níveis de grupamentos sulfidrílicos não-proteicos, como o GSH (glutationa reduzida), aumentando assim as EROs que tem efeitos ulcerogênicos relevantes (NATALE et al., 2004). O malondialdeído [(1,1,3,3-

tetrametoxipropano;  $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$ ] é produzido quando as EROs atacam as gorduras poli-insaturadas (MARNETT, 1999). Ele mesmo é uma EROs e pode ser detectado facilmente, podendo ser utilizado comumente como um marcador de peroxidação lipídica e estresse oxidativo (NIELSEN et al., 1997). O etanol induz a peroxidação lipídica (DAS et al., 2012). A infiltração de neutrófilos para o interior da mucosa gástrica é também um processo crítico na patogênese das úlceras (ELLIOT & WALLACE, 1998; NISHIDA et al., 1998). Já foram observados que a infiltração de neutrófilos na mucosa gástrica induzida por etanol está estreitamente relacionada com a gênese da lesão (LA CASA et al., 2000). A infiltração de neutrófilos dentro da mucosa pode ser determinada pela enzima mieloperoxidase (MPO), que serve como um indicador chave na infiltração de neutrófilos em várias injúrias gástricas experimentais (COSKUN et al., 1996; TAKEUCHI et al., 1998).

Além da avaliação da área de lesão, parâmetros bioquímicos como a glutatona, malondialdeído e mieloperoxidase, também foram avaliados. A GSH é um antioxidante endógeno e suas propriedades antioxidantes estão relacionadas com a presença do grupo tiol na sua estrutura (SZABO et al., 1992). O GSH exerce um papel fundamental no sistema de defesa endógeno por quelar substâncias tóxicas e reagir com peróxidos e radicais de oxigênio tóxicos para proteger as células de danos. Outro indicador importante de habilidades protetoras de novos fármacos pode ser a inibição da enzima MPO no tecido gástrico. A MPO é um marcador de infiltração/agregação de neutrófilos e sua presença pode levar a um aumento nas lesões ulcerogênicas (NAITO et al., 1998). Nossos resultados indicam que o EHSM pode participar dos efeitos gastroprotetores frente a lesão gástrica induzida por etanol por manter ou aumentar os níveis de GSH (antioxidante endógeno) e diminuir a atividade da MPO (um marcador de inflamação) no tecido gástrico.

A administração de etanol também causa um aumento nos níveis da peroxidação lipídica (MDA) (ZHAO et al., 2009) e este efeito foi abolido pelo EHSM. Este resultado nos mostra que o efeito do EHSM foi associado com uma diminuição na peroxidação lipídica.

Um dos principais fatores protetores na mucosa gástrica é o fluxo sanguíneo local, que exerce um papel importante na mucosa e também na cicatrização de danos. O fluxo sanguíneo contribui para a proteção por suprir a mucosa com oxigênio e bicarbonato,

por remover os íons  $H^+$  e agentes tóxicos através da difusão do lúmen para a mucosa. Um baixo fluxo sanguíneo na mucosa predispõe a lesões, enquanto que um fluxo sanguíneo elevado protege contra agentes agressores (SØRBYE & SVANES, 1994).

O etanol causa uma constrição nas vênulas da submucosa com subsequente paralisação no fluxo sanguíneo na microcirculação da mucosa, bem como dilatação da artéria e extravasamento de plasma a partir do leito vascular, o que mostra que pode ocorrer formação de erosões na mucosa gástrica (SANTOS & RAO, 2001; OATES & HAKKINEN, 1988). O EHSM foi capaz de inibir a estase no fluxo sanguíneo significativamente, levando assim a uma proteção da mucosa frente ao agente lesivo etanol.

A partir destes resultados, foi escolhida a menor dose efetiva de EHSM (250 mg/kg) para ser estudada nos experimentos subsequentes. O modelo de isquemia-reperusão (I/R) gástrica se assemelha a úlcera gástrica induzida pelo estresse, onde elevada quantidade de radicais livres, secreção ácida (NAKAMOTO et al., 1998), pepsina (KOTANI et al., 2007), óxido nítrico (NO), infiltração de neutrófilos (ABDALLAH et al., 2009) e um desequilíbrio redox (EL-ABHAR et al., 2003) exerce um papel importante nesta patogênese. Este trabalho verificou o efeito anti-inflamatório do EHSM no modelo de lesão gástrica induzida por I/R. O EHSM reduziu a infiltração de neutrófilos como evidenciado por uma diminuição na atividade da MPO, um marcador específico de inflamação aguda.

A restauração do fluxo sanguíneo (reperusão), inicia uma cascata de mudanças, incluindo a liberação de EROs no local e aumento na adesão de neutrófilos nas células endoteliais (ABDALLAH et al., 2009). A exposição da mucosa gástrica ao estresse oxidativo induzido pela oclusão da artéria celíaca (WADA et al., 1996), leva a geração da peroxidação lipídica, expressa por um aumento nos níveis de MDA no tecido (KWIECIEN et al., 2002). Nossos resultados demonstram que o EHSM apresenta um efeito antioxidante contra a lesão causada pela I/R, pois conseguiu reduzir os níveis do MDA.

Os resultados demonstram que a atividade antiulcerogênica da *Serjania* é mediada pela atividade antioxidante (redução de MDA e manutenção de GSH); pela

atividade anti-inflamatória (diminuição na infiltração de neutrófilos - MPO), e também pela manutenção do fluxo sanguíneo na mucosa.

Drogas antissecretórias, como os inibidores de bomba de prótons (KITANO et al., 1997), bem como os antioxidantes e quelantes de radicais livres (YOSHIKAWA et al., 1989; 1991) fornecem uma proteção contra as lesões gástricas induzidas por I/R. O lansoprazol, utilizado neste modelo experimental como controle positivo, e outros compostos relacionados, atuam como potentes inibidores da bomba de prótons, sua ação depende do bloqueio da subunidade  $\alpha$  da  $H^+/K^+$ -ATPase gástrica, a enzima responsável pela última etapa na secreção de ácido clorídrico pelas células parietais (MATHESON & JARVIS, 2001; SACHS, 1997).

Tem sido reconhecido que a integridade da mucosa gástrica depende do balanço entre os mecanismos agressivos e defensivos, e o sucesso do tratamentos farmacológicos em prevenir ou cicatrizar as lesões ulcerativas pode não depender apenas do bloqueio da secreção ácida, mas também da melhora dos fatores protetores da mucosa (DAJANI & KLAMUT, 2000; PESKAR & MARICIC, 1998). O lansoprazol exerce sua ação gastroprotetora, pela melhora na barreira de muco gástrico. Evidências indiretas também foram obtidas de que há um aumento na biodisponibilidade de compostos sulfidrílicos e possivelmente a PG poderia explicar a ação protetora destes bloqueadores de bomba de prótons em nível da mucosa gástrica (BLANDIZZI et al., 1999)

Outro agente altamente prejudicial para a mucosa gástrica são as drogas anti-inflamatórias não esteroidais (DAINEs), utilizadas para o tratamento da inflamação e dor.

As lesões gástricas causadas pelas DAINEs são devidas, principalmente, à capacidade que elas têm de depletar os níveis de PGs via inibição das enzimas ciclooxigenases (WALLACE, 2008). As DAINEs também exercem sua ação sistemicamente e localmente, acarretando a hipermotilidade, reduzindo o muco, a secreção de bicarbonato e o fluxo sanguíneo (GARNER et al., 1984). Além do mais, as DAINEs também aumentam a secreção ácida gástrica, inibem os níveis de óxido nítrico, permitem a infiltração de neutrófilos juntamente com espécies reativas de oxigênio e radicais livres (WALLACE, 2008). Existe uma crescente evidência de que um aumento

nas PGs endógenas podem aumentar a resistência da mucosa gástrica contra substâncias ulcerogênicas como as DAINES (WALLACE & WHITTE, 1985). O EHSM não apresentou atividade gastroprotetora quando o agente lesivo foi a DAINE, demonstrando que essa via não é recrutada para a atividade farmacológica do extrato.

Em continuidade, o EHSM foi avaliado no modelo agudo de úlcera duodenal induzido por cisteamina. As úlceras duodenais são um problema de saúde pública que afetam aproximadamente 10% da população mundial e é de 2 a 3 vezes mais prevalente que as úlceras gástricas (CHAN & LEUNG, 2002). Se a úlcera duodenal não for tratada ou se for tratada parcialmente, algumas complicações como a perfuração, estenose e hemorragia podem se desenvolver (MILOSAVLJEVIC et al., 2011).

A administração da cisteamina tem sido reconhecida por induzir úlceras duodenais em ratos, e este modelo experimental de indução, tem sido frequentemente estudado para o desenvolvimento de novas medicações. A patogênese deste modelo inclui a secreção de ácido gástrico liberado pela gastrina, o esvaziamento gástrico retardado, inibição da secreção de bicarbonato das glândulas duodenais de Brunner, e um estresse oxidativo exacerbado com a formação em excesso de compostos sulfidrílicos (POULSEN et al., 1985).

De acordo com Khomenko et al. (2009), nos animais tratados com a cisteamina, a geração de radicais livres levam a aumento nas lesões duodenais. O EHSM não foi capaz de reduzir as úlceras duodenais geradas pelo agente indutor cisteamina frente a este modelo.

Após avaliar o EHSM frente a diferentes agentes indutores de úlcera gástrica e duodenal, passamos a avaliar os mecanismos de ação deste extrato. Um fator importante na proteção é a inibição da secreção ácida (KONTUREK et al., 2005). Para avaliarmos a ação do EHSM sobre a secreção ácida gástrica utilizamos o modelo de ligadura de piloro. A ligadura do piloro permite avaliar a ação antissecretória de novos compostos antiulcerogênicos e também analisar o conteúdo estomacal à medida que a secreção gástrica é acumulada no estômago (SHAY, 1945). É um procedimento importante que nos mostra as possíveis mudanças nos parâmetros bioquímicos do conteúdo gástrico após vários tratamentos (TOMA et al., 2004). Foi observado que EHSM não alterou a

secreção de ácido clorídrico local (administração oral) e sistemicamente (administração intraduodenal), indicando assim que este não possui atividade antissecretória.

Outro mecanismo de ação investigado foi o de quantificação de muco aderido à mucosa gástrica. Está bem documentado a importância da função do muco contra a injúria causada pelo ácido proveniente do lúmen, bactéria e danos físicos ao epitélio (CHEN et al., 2005; PHILLIPSON et al., 2008). A produção de muco é um importante fator protetor e consiste numa viscosa, elástica e aderente barreira formada por água e glicoproteínas que cobre a mucosa gástrica totalmente. As propriedades protetoras da barreira de muco depende não somente da estrutura mas também da quantidade ou espessura da mucosa cobrindo a superfície da mucosa (LAINE et al., 2008). O EHSM foi capaz de aumentar significativamente a quantidade de muco aderido e este é um dos mecanismos de ação pelo qual o extrato atua protegendo a mucosa gástrica.

A carbenoxolona, um protótipo utilizado como controle positivo neste experimento, é um derivado sintético do ácido glicirrízico da raiz do alcaçuz, e tem sido estudada por seus efeitos antiulcerogênicos em experimentos com animais e seres humanos (DEREKANKO & LONG, 1981; KHAN & SULLIVAN, 1968; OKABE et al., 1976; WOTKINSON, 1968). Além disso, vários estudos mostram o mecanismo de ação do fármaco, como a inibição da atividade péptica (HENMAN, 1970), estimulação na secreção de muco (GOODIER et al., 1967), inibição da difusão de ácido (CROSS & RHODES, 1972) ou um aumento na produção de PGs (DEMBINSKA-KIEC et al., 1991; MARTIN et al., 1983; PESKAR et al., 1976), todos estes mecanismos descritos como fatores protetores da mucosa. Porém a carbenoxolona não é usada na terapêutica por conta da sua significativa atividade mineralocorticoide.

Além do muco, outros mecanismos de defesa também foram investigados, como os compostos sulfidrílicos (SH), o óxido nítrico (NO) e o receptor TRPV-1 (receptor de potencial transitório vanilóide 1), que são importantes fatores na manutenção da integridade da mucosa (SZABO & NAGY, 1992; HOLZER, 2006).

Os compostos sulfidrílicos (SH) tem uma grande importância por manterem a integridade da mucosa, com a finalidade básica de fortalecer as pontes de dissulfeto e reduzir a formação de radicais livres derivados de oxigênio, relacionando-se com a proteção celular (KONTUREK et al., 1990; MATSUDA et al., 1999). Os efeitos

gastroprotetores dos compostos SH incluem também processos redutores e de proteção celular frente ao estresse oxidativo induzidos por diversos agentes e circunstâncias, como aqueles que ocorrem com as exposições tóxicas como o próprio etanol na mucosa gástrica (TAKEUCHI et al., 1989; KONTUREK, et al., 1990). Em contrapartida, a redução dos níveis normais de SH tem impacto significativo na mucosa, tornando-a susceptível ao ataque de substâncias ulcerogênicas, afetando o mecanismo defensivo da mucosa e dessa forma, facilitando a formação de lesões gástricas (GLAVIN & SZABO, 1992; KO & CHO, 1995). Para avaliarmos um possível envolvimento antioxidante no efeito gastroprotetor proporcionado pelo EHSM, analisamos sua ação em animais pré-tratados com N-etilmaleimida (NEM), um bloqueador dos compostos sulfidrílicos. Os resultados obtidos indicam que mesmo na presença do bloqueador dos compostos sulfidrílicos, o EHSM não deixou de exercer sua gastroproteção, indicando assim, que seu efeito protetor na mucosa é dada de maneira independente da integridade de compostos sulfidrílicos endógenos, e também que, sua influência sobre o muco não depende desses compostos.

Outro fator protetor da mucosa gástrica de grande importância é o NO (Óxido Nítrico). O NO promove vasodilatação, redução da peroxidação lipídica e também existem relatos de seu envolvimento com agente anti-inflamatório nos tecidos (CHO, 2001; ANCHA et al., 2003). De acordo com Wallace e Miller (2000), o NO é também um importante regulador da secreção de muco no estômago e seus efeitos são produzidos pela estimulação da guanilato-ciclase nas células epiteliais. Assim, NO parece ser produzido na célula epitelial em resposta à ativação de receptores colinérgicos e provoca a liberação de muco para essas células, garantindo assim, a integridade da mucosa. O NO também é responsável tanto pela mediação das funções teciduais normais, quanto pelas lesões na mucosa gástrica. Assim, é um mediador das defesas e do reparo na mucosa gastrointestinal, porém ele também pode contribuir com as injúrias teciduais em algumas doenças do trato digestório e alterar a motilidade gástrica (WALLACE et al., 1999 ; CHO, 2001). Para termos um indicativo de uma possível modulação no fluxo sanguíneo por parte do EHSM, avaliamos o envolvimento deste com o óxido nítrico. O EHSM não deixou de exercer sua gastroproteção quando pré-tratado com o L-NAME (inibidor da NO sintase), o que nos indica que a ação gastroprotetora exercida pelo extrato também não é dependente da regulação do óxido nítrico.

Entre os vários fatores gastroprotetores, a microcirculação gástrica desempenha um papel importante na manutenção da barreira gástrica (BRZOZOWSKI et al., 2001; KWIECIEN et al., 2002). Os nervos sensoriais estão envolvidos na regulação da circulação sanguínea na mucosa gástrica (JAWOREK et al., 2002; PAWLIK et al., 1998). A mucosa gástrica é densamente inervada pelos neurônios aferentes sensíveis a capsaicina contendo peptídeos vasodilatadores, como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (STERNINI et al., 1987). A capsaicina afeta estes nervos por duas maneiras diferentes; uma baixa dose estimula os nervos sensíveis, acompanhado por uma liberação de CGRP, enquanto que altas doses de capsaicina leva a remoção ou inativação funcional destes nervos (WARZECHA et al., 2000). A liberação de CGRP pelos neurônios sensíveis a capsaicina tem sido relacionado com a manutenção da integridade da mucosa porque a remoção da função destes neurônios resulta numa diminuição na reatividade do CGRP na mucosa e leva a um agravamento nas lesões gástricas induzidas por vários compostos (BRZOZOWSKI et al., 1996; KWIECIEN et al., 2002). A capsaicina, o ingrediente ativo da pimenta, se liga ao receptor vanilóide, VR-1 (SCHUBERT, 2004). Neste modelo experimental foi possível observar que o EHSM não exerce sua ação gastroprotetora através da ativação dos neurônios sensíveis a capsaicina, pois mesmo com o bloqueio dos receptores VR-1 dos neurônios sensíveis através do pré-tratamento com Rhutenium red (bloqueador de TRPV) foi observada a ação gastroprotetora exercida pelo EHSM.

Quando uma substância que não possua ação sistêmica é avaliada, ela exercerá proteção significativa apenas quando administrada oralmente, perdendo sua proteção no tratamento intraduodenal. O sucralfato, utilizado neste modelo como controle positivo, no ambiente ácido do estômago, forma um gel viscoso, que se liga a proteínas de carga positiva, aderindo, assim, às células epiteliais gástricas (incluindo as áreas de ulceração). O gel protege a superfície luminal do estômago da degradação pelo ácido e pela pepsina. Esta droga é considerada citoprotetora e possui pouca absorção sistêmica (NAGEL & SHIELDS, 2009). O resultado obtido com esta droga validou que o sucralfato perdeu sua ação gastroprotetora quando administrado pela via intraduodenal. Com relação ao EHSM, os resultados confirmaram que, do mesmo modo que o sucralfato, quando o extrato é administrado pela via intraduodenal, ele perde sua atividade protetora anteriormente verificada no tratamento oral.

Deste modo, concluímos que o EHSM apresenta atividade quando administrado por via oral, atuando localmente.

Como descrito anteriormente, as PGs apresentam importante papel na manutenção da integridade da mucosa. Com base nos resultados no modelo agudo de úlcera induzida por DAINE, optamos pela quantificação de PGE<sub>2</sub>, numa tentativa de esclarecer se a ausência de atividade frente a este agente lesivo estaria relacionada a uma participação desta via no mecanismo de ação antiulcerogênico, visto que o bloqueio desta via resultou em ausência de atividade do EHSM. A administração do EHSM isoladamente não promoveu a estimulação da síntese de PGE<sub>2</sub>, mas manteve os níveis semelhantes aos dos animais tratados com veículo. O EHSM quando associado à indometacina (DAINE) também não foi capaz de manter os níveis de PGE<sub>2</sub> na mucosa gástrica. Estes resultados indicam, portanto, que a via das PGs não é utilizada para a atividade de EHSM.

Além de avaliar a atividade antiulcerogênica de *Serjania marginata*, avaliamos a atividade do extrato no trânsito intestinal normal. A motilidade intestinal é um estado contínuo de contração, relaxamento e secreção (TEMBHURNE & SAKARKAR, 2010). Estas funções são controlados pelo sistema neuromotor (KAMM, 2000), que por sua vez regula vários sistemas de receptores, como o colinérgico (GHOSH, 2005), adrenérgico (DONOSO et al., 2002), serotoninérgico (KISO et al., 2001; NAGAKURA et al., 1996), opioidérgico (GUTSTEIN & AKIL, 2006; STERNINI et al., 2004) e os canais de cálcio (RAMASWAMY et al., 1986; AMOS et al., 2003). Um grande número de fatores como agentes químicos, vida estressante, drogas, estado emocional, bem como condições fisiológicas e patológicas podem alterar a motilidade intestinal e o tempo de trânsito (PAUL & SAHA, 2012).

Os principais agentes farmacológicos que diminuem a motilidade são os opiáceos. A ação da morfina (utilizada como controle positivo), arquétipo dos opiáceos, sobre o trato alimentar é complexa; aumenta o tono e as contrações rítmicas do intestino, mas diminui a atividade propulsora (RANG & DALE, 2007).

Os resultados obtidos com o EHSM sobre a motilidade intestinal nos mostra que o extrato não é capaz de aumentar, nem de reduzir a motilidade. A alteração na motilidade

interfere no processo de absorção, alterando os níveis plasmáticos de diversas substâncias; fato que pode causar prejuízos ao organismo.

Além da motilidade intestinal, verificamos possíveis efeitos do EHSM no modelo de diarreia aguda induzida pelo agente catártico óleo de rícino. A diarreia é a eliminação frequente de fezes líquidas, e isto geralmente é acompanhado por cólicas abdominais e, algumas vezes, náuseas e vômitos. Pode ser vista como um mecanismo fisiológico para livrar rapidamente o intestino de substâncias tóxicas ou irritantes. Há numerosas causas, inclusive doença subjacente, infecção, toxinas e até ansiedade. As repercussões variam desde leve desconforto e inconveniência até uma emergência médica que exige internação, hidratação e reposição eletrolítica por via parenteral (RANG & DALE, 2007). Durante um episódio de diarreia, há um aumento de motilidade do trato gastrintestinal, acompanhado por um aumento de secreção, juntamente com uma diminuição da absorção de líquidos, o que leva a uma perda de eletrólitos (particularmente  $\text{Na}^+$ ) e água (RANG & DALE, 2007).

A loperamida, utilizada neste modelo como controle positivo, é o fármaco de escolha para a diarreia sendo componente de vários antidiarreicos patenteados. Tem uma ação relativamente seletiva sobre o trato gastrintestinal, reduz a frequência das cólicas abdominais, diminui a eliminação de fezes e abrevia a duração da doença (RANG & DALE, 2007). A loperamida é um exemplo de composto efetivo pois tem como alvo a secreção e a motilidade. Este análogo opióide mu, diminui efetivamente estas atividades, tem mínimos efeitos centrais devido sua pouca penetração na barreira hematoencefálica, e é relativamente livre de efeitos colaterais (KAMM, 2000).

Os resultados obtidos com o EHSM nos mostra que ele não interfere no evento diarreico, nem diminui uma possível diarreia.

A diarreia é um problema de saúde pública (RODAS et al., 2011). A bactéria enteropatogênica *Escherichia coli* é considerada importante na sua causa, tanto em animais quanto em seres humanos (ABBA et al., 2009; GARCIA et al., 2010; HILL et al., 1991; NGUYEN et al., 2006). Enquanto muitas cepas ocorrem como membros comensais da microbiota no trato intestinal de animais e seres humanos, algumas cepas são, no entanto, agentes patogênicos importantes que fazem com que um largo espectro de doenças, variem de auto-limitante até potencialmente fatais (SUSSMAN, 1997;

WRAY & WOODWARD, 1997; KAPER et al., 2004; NATARO et al., 2011). O EHSM foi eficaz em inibir a bactéria *E. coli*.

Enterotoxinas estafilocócicas (*Staphylococcus aureus*) são uma família de enterotoxinas termoestáveis que são uma das principais causas de gastroenterite (BALABAN & RASOOLY, 2000; LE LOIR et al., 2003; THOMAS et al., 2007). A intoxicação alimentar com estes estafilococos é devido a ingestão destas enterotoxinas (TANG & STRATTON, 2010). Clinicamente, é caracterizada por uma curta incubação depois da ingestão destas toxinas pré-formadas. Dentre os sintomas clínicos ocorre um início de náusea, vômito seguido de dores abdominais e diarreia (TODD, 1985). A inibição do crescimento de *S. aureus* por *S. marginata* é importante indicativo de ação bactericida desta espécie vegetal (tabela 6). O EHSM foi capaz de inibir o crescimento deste micro-organismo.

A relação entre a infecção pela *Helicobacter pylori* e as úlceras pépticas tem sido amplamente estudada. A maioria dos estudos relatam uma diminuição na incidência e/ou prevalência das úlceras pépticas ao longo do tempo, provavelmente devido a uma diminuição da doença associada a *H. pylori* (HOLLANDER et al., 2013). Inicialmente a infecção por esta bactéria era responsável por 95% das úlceras pépticas, mas estudos recentes relatam que a prevalência está entre 36 a 73% dependendo dos fatores étnicos, geográficos e socioeconômicos (WANG & PEURA, 2011). O EHSM foi capaz de inibir o crescimento de *H. pylori*. Este resultado aumenta ainda mais o potencial terapêutico de *Serjania marginata* frente a distúrbios gastrintestinais.

Os estudos fitoquímicos realizados, mostram a presença de flavonóides, taninos, saponinas e esteróides livres no EHSM.

Os flavonóides tem sido descritos por sua atividade antiulcerogênica (LA CASA et al., 2000), propriedades antioxidantes (TAPAS et al., 2008; FERREIRA et al., 2010) e anti-inflamatórias (SANDHAR et al., 2011). São capazes de ativar o sistema de defesa da mucosa através da estimulação da secreção de muco e por quelar as EROs e os radicais livres produzidos pelo etanol (ABDELWAHAB et al., 2011). Alguns estudos tem mostrado que os efeitos farmacológicos da ingestão de flavonóides tipicamente não promove ou apresenta baixa toxicidade (HAVSTEEN, 2002).

Por outro lado, os taninos são conhecidos por proteger a camada mais externa da mucosa e tornar-lá menos permeável e mais resistentes à lesão ou irritação química e mecânica (ASUZU & ONU, 1990). Os taninos formam uma película de proteção e promovem a precipitação de proteínas sobre a úlcera, a fim de prevenir o desenvolvimento de úlcera. Esta película ajuda na prevenção da absorção de substâncias tóxicas e combate o ataque de enzimas proteolíticas (JOHN & ONABANJO, 1990; NWAFOR et al., 1996).

Além disso, as saponinas são conhecidas por exercerem suas atividades protetoras na ulceração pela ativação de fatores de proteção na membrana da mucosa (CHOUHDARY et al., 2013), como um aumento na quantidade de muco celular (ADÃO et al., 2011).

Considerando todas estes relatos sobre as diferentes substâncias encontradas no EHSM, é plausível sugerir que a atividade gastroprotetora do EHSM envolve, a ação sinérgica dos flavonóides, taninos e saponinas.

### **3.5 Conclusão**

O presente estudo demonstrou claramente a atividade gastroprotetora do EHSM frente a agentes lesivos como o etanol e isquemia e reperfusão. A dose do EHSM que melhor responde nestes modelos experimentais gastroprotetores é a de 250 mg/kg. Dentre os mecanismos de ação avaliados, foi possível observar que o EHSM diminuiu a peroxidação lipídica e a infiltração de neutrófilos, bem como aumentou o muco aderido a mucosa gástrica e manteve o fluxo sanguíneo adequado quando este foi interrompido. O extrato atua funcionando localmente sobre a mucosa gástrica. Em adição a estes resultados, o EHSM não foi capaz de alterar a motilidade intestinal, nem reduzir a diarreia. Por fim, tem-se que o extrato mostrou-se seguro em relação à toxicidade aguda e a neurotoxicidade e ainda apresentou uma importante atividade antimicrobiana. Desta forma, conclui-se que a *Serjania marginata* mostra-se promissora na prevenção de úlceras gástricas.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABBA, K. et al. Pathogens associated with persistent diarrhoea in children in low and middle income countries: systematic review. **BMC Infect. Dis.**, v. 9, p. 88, 2009.

ABDALLAH, D. M.; EL-ABHAR, H. S.; ABDEL-AZIZ, D. H. TEMPOL, a membrane-permeable radical scavenger, attenuates gastric mucosal damage induced by ischemia/reperfusion: a key role for superoxide anion. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 603, p. 93-97, 2009.

ABDELWAHAB, S. I. et al. The methanolic extract of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. and its major compound pinostrobin induces antiulcerogenic property in vivo: possible involvement of indirect antioxidant action. **J. Ethnopharmacol.** v. 137, p. 963–970, 2011.

ABDELWAHAB, S. I. Protective mechanism of gallic acid and its novel derivative against ethanol-induced gastric ulcerogenesis: involvement of immunomodulation markers, Hsp70 and Bcl-2-associated X protein. **Int. Immunopharmacol.**, v. 16, p. 296-305, 2013.

ABDULLA, M. A. et al. Anti-ulcer activity of *Centella asiatica* leaf extract against ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. **J. Med. Plants Res.**, v. 4, p. 1253-1259, 2010.

ADÃO, C. R.; SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. A new steroidal saponin with anti-inflammatory and antiulcerogenic properties from the bulbs of *Allium ampeloprasum* var. porrum. **Fitoterapia.** v. 82, p. 1175–1180, 2011.

AMOS, S.; BINDA, L.; KUNLE, O. F.; OKAFOR, I.; EMEJE, M.; AKAH, P. A.; WAMBEBE, C.; GAMANIEL, K. Smooth muscle contraction induced by *Indigofera dendroides* leaf extracts may involve calcium mobilization via potential sensitive channels. **Phytother. Res.**, v. 17, p. 792-796, 2003.

ANCHA, H. et al. Somatostatin-induced gastric protection against ethanol: involvement of nitric oxide and effects on gastric mucosal blood flow. **Regul. Pept.**, v. 110, n. 2, p. 107-113, 2003.

ANDERSON, M. E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods Enzymol.**, v. 113, p. 548-555, 1985.

AIHARA, M. et al. Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 8, p. 3218-3224, 1997.

AIHARA, T. et al. Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: past, present, and future. **Pharmacol. Ther.**, v. 98, p. 109-127, 2003.

ALLEN, A.; FLEMSTROM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 288, n. 1, p. C1-C19, 2005.

AL MOFLEH, I. A. Spices, herbal xenobiotics and the stomach: friends or foes? **World J. Gastroenterol.**, v. 16, p. 2710-2719, 2010.

ANGGARD, E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. **Lancet**, v. 343, p. 1199-1206, 1994.

ARRUDA, A. P. C. C. B. N. et al. Gastroprotective Effect of *Serjania erecta* Radlk (Sapindaceae): Involvement of Sensory Neurons, Endogenous Nonprotein Sulfhydryls, and Nitric Oxide. **J. Med. Food**, v. 12, n. 6, p. 1411-1415, 2009.

ARTHUR, M. J. P. Reactive oxygen intermediates and liver injury. **J. Hepatol.**, v. 6, p. 125-131, 1988.

ASHLEY, S. W.; SONNENSCHNEIN, L. A.; CHEUNG, L. Y. Focal gastric mucosal blood flow at the site of aspirin-induced ulceration. **Am. J. Surg.**, v. 205, p. 53-59, 1985.

ASUZU, I. U.; ONU, O. U. Anti-ulcer activity of the ethanolic extract of *Combretum dolycopetalum* root. **Int. J. Crude. Drug Res.** v. 28, p. 27-32, 1990.

ATAY, S.; TARNAWSKI, A. S.; DUBOIS, A. Eicosanoids and the stomach. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v. 1, p. 105-124, 2000.

AVILLA, J. R. et al. Role of endogenous sulphhydryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. **Inflamm. Res.**, v. 45, p. 83-88, 1996.

AWOUTERS, F. et al. Delay of castor oil diarrhoea in rats: a new way to evaluate inhibitors of prostaglandin biosynthesis. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 30, p. 41-45, 1978.

BAGGIO, C. H. et al. Gastroprotective mechanisms of indole alkaloids from *Himatanthus lancifolius*. **Planta Med.**, v. 71, p. 733-738, 2005.

BAKER, D. D.; CHU, M.; OZA, U. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Nat. Prod. Rep.**, v. 24, n. 6, p. 1225-1244, 2007.

BANDYOPADHYAY, D. et al. Gastric toxicity and mucosal ulceration induced by oxygen-derived reactive species: protection by melatonin. **Curr. Mol. Med.**, v.1, p. 501-513, 2001.

BARKUN, A.; LEONTIADIS, G. Systematic review of the symptom burden, quality of life impairment and costs associated with peptic ulcer disease. **Am. J. Med.**, v. 123, n. 4, p. 358-366, 2010.

BELAICHE, J. et al. Observational survey of NSAID-related upper gastro-intestinal adverse events in Belgium. **Acta Gastroenterol.**, v. 65, p. 65-73, 2002.

BERTLEFF, M. J. O. E.; LANGE, J. F. Perforated peptic ulcer disease: a review of history and treatment. **Dig. Surg.**, v. 27, p.161-169, 2010.

BLACK, J. W. et al. Definition and antagonism of histamine H<sub>2</sub> -receptors. **Nature**, v. 236, p. 385-390, 1972.

BLANDIZZI, C. et al. Acid-independent gastroprotective effects of lansoprazole in experimental mucosal injury. **Dig. Dis. Sci.**, v. 44, p. 2039-2050, 1999.

BOURDY, G.; CHAVEZ, L. R. M.; ROCA-COULTHARD, A. Pharmacopoeia in a shamanistic society: the Izoceño-Guaraní (Bolivian Chaco). **J. Ethnopharmacol.**, v. 91, p. 189-208, 2004.

BRIMBLECOMBE, R. et al. Cimetidine, a non-thiourea H<sub>2</sub> -receptors. **J. Int. Med. Res.**, v. 3, p. 86-92, 1975.

BRZOZOWSKI, T. et al. Role of capsaicin-sensitive sensory nerves in gastroprotection against acid-independent and acid-dependent ulcerogens. **Digestion**, v. 57, p. 424-432, 1996.

BRZOZOWSKI, T. et al. Brain-gut axis in gastroprotection by leptin and cholecystikinin against ischemia-reperfusion induced gastric lesions. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 52, n. 4, pt. 1, p. 583-602, 2001.

CARVALHO, K. I. M. et al. Geraniol — a flavoring agent with multifunctional effects 5 in protecting the gastric and duodenal mucosa. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.** Article in press.

CASALI, J. J. et al. Epidemiological analysis and use of rapid urease test in patients with perforated peptic ulcers. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 39, n.2, p. 93-98, 2012.

CASELLI, M. et al. "Cervia Working Group Report": guidelines on the diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori* infection. **Dig. Liver Dis.**, v. 33, p. 75, 2001.

CHAN, F. K.; LEUNG, W. K. Peptic-ulcer disease. **Lancet**, v. 360, p. 933-941, 2002.

CHATTOPADHYAY, I. et al. Indomethacin inactivates gastric peroxidase to induce reactive-oxygen-mediated gastric mucosal injury and curcumin protects it by preventing peroxidase inactivation and scavenging reactive oxygen. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 40, p. 1397-1408, 2006.

CHÁVEZ, M. I.; DELGADO, G. Isolation and relay synthesis f 11 $\alpha$ -hydroperoxy diacetyl hederagenin, a novel triterpenoid derivative from *Serjania triquetra* (Sapindaceae). Biogenetic implications. **Tetrahedron**, v. 13, p. 3869-3878, 1994.

- CHEN, S. H. et al. Protective effects of *Ginkgo biloba* extract on the ethanol-induced gastric ulcer in rats. **World J. Gastroenterol.**, v. 11, p. 3746-3750, 2005.
- CHO, C. H. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders. **J. Physiol. Paris**, v. 95, n. 1-6, p. 253-256, 2001.
- CHOI, E-Y. et al. Protective effects of a polysaccharide from *Hizikia fusiformis* against ethanol toxicity in rats. **Food Chem. Toxicol.**, v. 47, p. 134-139, 2009.
- CHOUDHARY, M. K.; BODAKHE, S. H.; GUPTA, S. K. Assessment of the antiulcer potential of *Moringa oleifera* root-bark extract in rats. **J. Acupunct. Meridian Stud.** v. 6, p. 214–220, 2013.
- CNUBBEN, N. H. et al. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 10, n. 4, p. 141-152, 2001.
- COLUCCI, R. et al. Characterization of mechanisms underlying the effects of esomeprazole on the impairment of gastric ulcer healing with addition of NSAID treatment. **Dig. Liver Dis.**, v.41, p. 395-405, 2009.
- CORREA, P.; HOUGHTON, J. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, v. 133, p. 659-672, 2007
- COSKUN, T. et al. Cold restraint stress-induced gastric mucosal dysfunction-role of nitric oxide. **Dig. Dis. Sci.**, v. 41, n. 5, p. 956-963, 1996.
- COSTA, E. A. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of LQFM002 — A 4-nerolidylcatechol derivative. **Life Sci.**, v. 92, p. 237-244, 2013.
- CROSS, S.; RHODES J. Carbenoxolone: its protective action against bile damage to gastric mucosa in canine pouches (abstract). **Gastroenterology**, v. 62, p. A737, 1972.
- CROWE, S. E. et al. Expression of interleukin 8 and CD54 by human gastric epithelium after *Helicobacter pylori* infection in vitro. **Gastroenterology**, v. 108, n. 1, p. 65-74, 1995.

CURTIS, C. H.; GALL, D. C. Macromolecular transport by rat gastric mucosa. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. C1033-G1040, 1992.

DAJANI, E. Z.; KLAMUT, M. J. Novel therapeutic approaches to gastric and duodenal ulcers: an update. **Expert Opin. Invest. Drugs.**, v. 9, p. 1537-1544, 2000.

DALLMEIER, K.; CARLINI, E. A. Anesthetic, hypothermic, myorelaxant and anticonvulsant effects of synthetic eugenol derivatives and natural analogues. **Pharmacology**, v. 22, p.113-127, 1981.

DAS, A. K. et al. Gastroprotective effect of *Achyranthes aspera* Linn. leaf on rats. **Asian Pac. J. Trop. Med.**, v. 5, p. 197-201, 2012.

DEVAULT, K. R.; TALLEY, N. J. Insights into the future of gastric acid suppression. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 6, p. 524-532, 2009.

DEMBINSKA-KIEC, A. et al. Effect of carbenoxolone on the biological activity of nitric oxide: relation to gastroprotection. **Br. J. Pharmacol.**, v. 104, p. 811-816, 1991.

DEREKANKO, M. J.; LONG J. F. Carbenoxolone sodium protects rat gastric mucosa against ethanol-induced necrosis. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 166, p. 394-397, 1981.

DEROJAS-WALKER, T. Nitric oxide induces oxidative damage in addition to deamination in macrophage DNA. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 8, p. 473-477, 1995.

DEVASAGAYAM, T. P. A. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. **J. Assoc. Physicians India**, v. 52, p. 794-804, 2004.

DHIKAV, V. et al. Non-steroidal drug-induced gastrointestinal toxicity: mechanisms and management. **J. Indian Clin. Med.**, v. 4, p. 315-322, 2003.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: Ed. UNESP, 2002.

DIXON, M. F. et al. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney system. **Am. J. Surg. Pathol.** v. 20, p. 1161–1181, 1996.

DONOSO, M. V. et al. Alpha2-Adrenoceptors control the release of noradrenaline but not neuropeptide Y from perivascular nerve terminals. **Peptides**, v. 23, p. 1663-1671, 2002.

DUNHAM, N. W.; MYIA, T. S. A note on a simple apparatus for detection of neurological deficit in rats and mice. **J. Am. Pharm. Assoc.**, v. 46, p. 208-209, 1957.

EL-ABHAR, H. S.; ABDALLAH, D. M.; SALEH, S. Gastroprotective activity of *Nigella sativa* oil and its constituent, thymoquinone against gastric mucosal injury induced by ischemia/reperfusion in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 84, p. 251-258, 2003.

ELLIOT, S. N.; WALLACE, J. L. Neutrophil-mediated gastrointestinal injury. **Can. J. Gastroenterol.**, v. 12, n. 8, p. 559-568, 1998.

ESPLUGUES, J. V. et al. Involvement of endogenous nitric oxide in the inhibition by endotoxin and interleukin-1 beta of gastric acid secretion. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 9, suppl. 1, p. S45-S49, 1994.

FAHEY, J. W. et al. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo [a] pyrene-induced stomach tumors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 99, n. 11, p. 7610-7615, 2002.

FANG, E. F. et al. A lectin with anti-HIV-1 reverse transcriptase, antitumor, and nitric oxide inducing activities from seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. extralong autumn purple bean. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, n. 4, p. 2221-2229, 2010.

FANG, J. et al. Overexpression of microRNA-378 attenuates ischemia-induced apoptosis by inhibiting caspase-3 expression in cardiac myocytes. **Apoptosis**, v. 17, p. 410-423, 2012.

FELLENIIUS, E. et al. Substituted benzimidazoles inhibit gastric acid secretion by blocking (H<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)ATPase. **Nature**, v. 290, p. 159-161, 1981.

FELLENIIUS, E. et al. Inhibition of acid secretion in isolated gastric glands by substituted benzimidazoles. **Am. J. Physiol.**, v. 243, p. G505-G510, 1982.

FERREIRA, J. F. S. et al. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. **Molecules** v. 15, p. 3135–3170, 2010.

FEURLE, G. E. Effect of rising intragastric pH induced by several antacids on serum gastrin concentrations in duodenal ulcer patients and in a control group. **Gastroenterology**, v. 68, p. 1-7, 1975.

FORD, A. C.; MOAYYEDI, P. Dyspepsia. **BMJ**, v. 347, p. 1-5, 2013.

FORNAI, M. et al. Mechanisms of protection by pantoprazole against NSAID-induced gastric mucosal damage. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 372, p. 79-87, 2005.

FREIRE, M. G. M. et al. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 40, p. 61-68, 2002.

GABRIEL, S. E.; JAAKKIMAINEN, L.; BOMBARDIER, C. Risk for serious gastrointestinal complications related to use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A meta-analysis. **Ann. Intern. Med.**, v. 115, p. 787-796, 1991.

GANNA, T. J.; HUHLWYCH, R.; KOO, J. Focal gastric mucosal blood flow in aspirin-induced ulceration. **Ann. Surg.**, v. 205, p. 399-403, 1987.

GAO, Y. *Ganoderma lucidum* polysaccharide fractions accelerate healing of acetic acid-induced ulcers in rats. **Med. Food**, v. 7, n. 4, p. 417-421, 2004.

GARCIA, A.; FOX, J. G.; BESSER, T. E. Zoonotic enterohemorrhagic *Escherichia coli*: a one health perspective. **ILAR J.**, v. 51, p. 221-232, 2010.

GARCIA RODRIGUEZ, L. A.; BARREALES, T. L. Risk of upper gastrointestinal complications among users of traditional NSAIDs and COXIBs in the general population. **Gastroenterology**, v. 132, p. 498-506, 2007.

GARDÈS-ALBERT, M. et al. Oxygen-centered free radicals and their interactions with EGb 761 or CP 202. In: FERRADINI, C.; DROY-LEFAIX, M. T.; CHRISTEN, Y.

(Ed.). **Advances in *Ginkgo biloba* extract research: *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) as a free-radical scavenger.** New York: Elsevier Science, 1993. p. 1-11.

GARNER, A. et al. Gastric mucosal protective mechanisms: roles of epithelial bicarbonate and mucus secretions. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 19, p. S79-S86, 1984.

GISBERT, J. P. et al. *H. pylori* eradication therapy vs. antisecretory non-eradication therapy (with or without long-term maintenance antisecretory therapy) for the prevention of recurrent bleeding from peptic ulcer. **Cochrane Database Syst. Rev.**, v. 2, CD004062, 2004.

GLAVIN, G. B.; SZABO, S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. **FASEB J.**, v. 6, p. 825-831, 1992.

GOH, K. L. et al. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and public health implications. **Helicobacter**, v. 16, suppl. 1, p.1-9, 2011.

GOODIER, J. E. W.; HORWICH, L.; GALLOWAY, R. W. Morphological observation on gastric ulcers treated with carbenoxolone sodium. **Gut**, v. 8, p. 544-547, 1967.

GOODMAN, L. S. et al. (Ed.). **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.** 10. ed. New York: McGraw Hill, 2001. p. 1006-1019.

GORIN, A. J. P. et al. Characterization of carbohydrate components of unusual hydrogel formed by seed coats of *Magnosia pubescens* (Tingui). **Carbohydr. Res.**, v. 286, p. 325-333, 1996.

GHOSH, M. N. Quantitative study of antagonists on isolated preparations. In: GHOSH, M. N. (Ed.). **Fundamentals of experimental pharmacology.** 3. ed. Kolkata: Hilton & Company, 2005. p. 134-147.

GRAHAM, D. Y. Treatment of peptic ulcers caused by *Helicobacter pylori*. **N. Engl. J. Med.**, v. 328, p. 349-350, 1993.

GUIDOBONO, F. et al. Protection by amylin of gastric erosions induced by indomethacin or ethanol in rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 120, p. 581-586, 1997.

GUTSTEIN, H. B.; AKIL, H. Opioid analgesics. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (Eds.). **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11. ed. New York: McGraw-Hill, 2006. p. 547-590.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Formation of thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts: the role of superoxide and hydroxyl radicals. **FEBS Lett.**, v. 128, p. 347-352, 1981.

HALTER, F. et al. Cyclooxygenase-2 implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. **Gut**, v. 49, p. 443-453, 2001.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 96, p. 67-202, 2002.

HEGNAUER, R. **Chemotaxonomie der Pflanzen IV**. Basel: Birkhäuser Verlag, 1973.

HENMAN, F. D. Inhibition of peptic activity by carbenoxolone and glycyrrhetic acid. **Gut**, v. 11, p. 344-351, 1970.

HENRIQUEZ, M. et al. Cell death by necrosis, a regulated way to go. **Current Molecular Medicine**. v. 8, p. 187-206, 2008.

HILL, S. M.; PHILLIPS, A. D.; WALKER-SMITH, J. A. Enteropathogenic *Escherichia coli* and life threatening chronic diarrhoea. **Gut**, v. 32, p. 154-158, 1991.

HIRAISHI, H.; SHIMADA, T.; TERANO, A. Involvement of oxidative stress in the pathogenesis of NSAID-induced gastric mucosal damage. **J. Gastroenterol.**, v. 35, p. 567-569, 2000.

HOLLANDER, W. J. et al. *Helicobacter pylori* and nonmalignant diseases. **Helicobacter**, v. 18, suppl. 1, p. 24-27, 2013.

HOLZER, P. **Physiology of the gastrointestinal tract**. 4. ed. Berlin: Springer, 2006. Chap. 31, p. 817-839.

HOLZER, P. Role of visceral afferent neurons in mucosal inflammation and defense. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 7, p. 563-569, 2007.

HOLZER, P.; LIPPE, I. T. Stimulation of afferent nerve endings by intragastric capsaicin protects against ethanol-induced damage of gastric mucosa. **Neuroscience**, v. 27, p. 981-987, 1988.

HOLZER, P.; SAMETZ, W. Gastric mucosal protection against ulcerogenic factors in the rat mediated by capsaicin-sensitive afferent neurons. **Gastroenterology**, v. 91, p. 975-981, 1986.

HOSHINO, T. et al. Effects of prostaglandin E<sub>2</sub> on gastric irritant-induced apoptosis. **Dig. Dis. Sci.**, v. 47, p. 2370-2379, 2002.

HOWCHEN, C. W. Clinical Implications of prostaglandin inhibition in the small bowel. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, v. 4, p. 953-969, 2001.

HUNG, I. F. et al. Clarithromycin-amoxicillin containing triple therapy: a valid empirical first-line treatment for *Helicobacter pylori* eradication in Hong Kong? **Helicobacter**, v. 14, p. 505, 2009.

IMLAY, J. A. Pathways of oxidative damage. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 57, p. 395-418, 2003.

INEU, R. P. et al. Diphenyl diselenide reverses gastric lesions in rats: involvement of oxidative stress. **Food Chem. Toxicol.**, v. 46, p. 3023-3029, 2008.

JAIN, K. S. et al. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 15, p. 1181-1205, 2007.

JAHN, A. I.; GÜNZEL, P. K. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? **Reprod. Toxicol.**, v. 11, n. 2-3, p. 171-178, 1997.

JAWOREK, J. et al. Sensory nerves in central and peripheral control of pancreatic integrity by leptin and melatonin. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 53, p. 51-74, 2002.

JOHN, T. A.; ONABANJO, A. O. Gastroprotective effect of an aqueous extract of *Entandrophragma utile* bark in experimental ethanol-induced peptic ulceration in mice and rats. **J. Ethnopharmacol.** v. 29, p. 87–93, 1990.

JORDÃO JR., A. A. et al. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina**, Ribeirão Preto. v. 31, p. 434-449, 1998.

KAMM, M. A. Why the enteric nervous system is important to clinicians. **Gut**, v. 47, suppl. 4, p. iv8- iv9, 2000.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 123-140, 2004.

KARAKAYA, K. et al. Mitigation of indomethacin-induced gastric mucosal lesions by a potent specific type V phosphodiesterase inhibitor. **World J. Gastroenterol.**, v. 15, p. 5091-5096, 2009.

KHANM, M. H.; SULLIVAN, F. M. The pharmacology of carbenoxolone sodium. In: ROBSON, J. M.; SULLIVAN, F. M. (Ed.). **Symposium on carbenoxolone sodium**. London: Butterworths, 1968. p. 5-14.

KHOMENKO, T. et al. Role of iron in the pathogenesis of cysteamine-induced duodenal ulceration in rats. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 296, p. G1277-G1286, 2009.

KISO, T. et al. A novel 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist, YM-31636, increases gastrointestinal motility without increasing abdominal pain. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 431, p. 35-41, 2001.

KITAHORA, T.; GUTH, P. H. Effect of aspirin plus hydrochloric acid on the gastric mucosal microcirculation. **Gastroenterology**, v. 93, p. 810-817, 1987.

KITANO, M. et al. Effects of cimetidine on acute gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. **Pharmacology**, v. 55, p. 154-164, 1997.

KLEIN JR, L. C. et al. Antiulcerogenic activity of extract, fractions, and some compounds obtained from *Polygala cyparissias* St. Hillaire & Moquin (Polygalaceae). **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 381, p. 121-126, 2010.

KO, J. K.; CHO, C. H. The role of non-protein sulfhydryl compounds in gastric adaptive cytoprotection against ethanol-induced mucosal damage in rats. **Inflamm. Res.**, v. 44, n. 6, p. 242-244, 1995.

KOBAYASHI, K.; ARAKAWA, T. Arachidonic acid cascade and gastric mucosal injury, protection, and healing: topics of this decade. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 21, suppl. 1, p. S12-S17, 1995.

KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Berne & Levy physiology**. 6. ed. Philadelphia: Mosby, 2009. 485 p.

KONTUREK, P. K. et al. Role of epidermal growth factor, prostaglandin, and sulfhydryls in stress-induced gastric lesions. **Gastroenterology**, v. 99, n. 6, p. 1607-1615, 1990.

KONTUREK, S. J. et al. From nerves and hormones to bacteria in the stomach; nobel prize for achievements in gastrology during last century. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 56, p. 507-530, 2005.

KOTANI, T. et al. Pathogenic importance of pepsin in ischemia-reperfusion-induced gastric injury. **Life Sci.**, v. 80, p. 1984-1992, 2007.

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

KUROSE, I. et al. Oxidative stress - mediated apoptosis of hepatocytes exposed to acute ethanol intoxication. **Hepatology**, v. 25, n. 2, p.368-378, 1997.

KWIECIEN, T.; BRZOZOWSKI, S. J.; KONTUREK, S. J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. **J. Physiol. Pharmacol.**, v.53, p. 39-50, 2002.

LA CASA, C. et al. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **J. Ethnopharmacol.**, v. 71, n. 1-2, p. 45-53, 2000.

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

LANAS, A.; PANÉS, J.; PIQUÉ, J. M. Clinical Implications of COX-1 and/or COX-2 inhibition for the distal gastrointestinal tract. **Curr. Pharm. Des.**, v. 9, p. 2253-2266, 2003.

LEE, H. et al. Lansoprazole and omeprazole have similar effects on plasma gastrin levels, enterochromaffin-like cells, gastrin cells and somatostatin cells in the rat stomach. **Digestion**, v. 51, p. 125-132, 1992.

LEWIS, D. A.; HANSON, P.J. Anti-ulcer drugs of plant origin. **Progr. Med. Chem.**, v. 28, p. 201-231, 1991.

LI, T.; ZHANG, X. J. Involvement of sulfhydryls in the protective mechanism of gastric mucosa. **Sheng Li Xue Bao**, v. 42, p. 571-577, 1990.

LICATA, S. C. et al. Contribution of alpha1 subunit-containing gamma-aminobutyric acidA (GABA<sub>A</sub>) receptors to motor-impairing effects of benzodiazepines in squirrel monkeys. **Psychopharmacology**, v. 203, p. 539-546, 2009.

LOGUERCIO, C.; DI PIERRO, M. The role of glutathione in the gastrointestinal tract: a review. **Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 31, p. 401-407, 1999.

LUO, X-J. et al. Expression of apoptosis-associated microRNAs in ethanol-induced acute gastric mucosal injury via JNK pathway. **Alcohol**, v. 47, p. 481-493, 2013.

MAHMOUD, I. et al. Two new flavonol glycosides from leaves of *Koelreuteria paniculata*. **Die Pharmazie**, v. 56, p. 580-582, 2001.

MAITY, P. et al. Indomethacin, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, develops gastropathy by inducing reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathology and

associated apoptosis in gastric mucosa: a novel role of mitochondrial aconitase oxidation. **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 3058-3068, 2009.

MALATY, H. M. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 21, n. 2. p. 205-214, 2007.

MALFERTHEINER, P. et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. **Gut**, v. 56, p. 772-781, 2007.

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

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. A hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Llooydia**, v. 25, p. 320-322, 1962.

MARSHALL, B. J.; WARREN, J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet**, v. 323, p. 1311-1315, 1984.

MARTIN, A. et al. Effect of carbenoxolone on gastric prostaglandin E release and cytoprotection in the rat. **Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.**, v. 12, p. 409-411, 1983.

MÁRTIN, M. J.; JIMÉNEZ, M. D.; MOTILVA, V. New issues about nitric oxide and its effects on the gastrointestinal tract. **Curr. Pharm. Des.**, v. 7, p. 881-908, 2001.

MATHESON, A. J.; JARVIS, B. Lansoprazole: an update of its place in the management of acid-related disorders. **Drugs**, v. 61, p. 1801-1833, 2001.

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

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. II. The mechanism of the mediation of cytochrome c reduction by a variety of electron carriers, **J. Biol. Chem.**, v. 245, p. 1374-1377, 1970.

MERRIAM-WEBSTER, 2014. Disponível em: <<http://www.merriam-webster.com/dictionary/ulcer>>. Acesso em: 11 de jan. 2014.

MILIĆ, M. et al. The role of  $\alpha_1$  and  $\alpha_5$  subunit-containing GABA<sub>A</sub> receptors in motor impairment induced by benzodiazepines in rats. **Behav. Pharmacol.**, v. 23, p. 191-197, 2012.

MILOSAVLJEVIC, T. et al. Complications of peptic ulcer disease. **Dig. Dis.**, v. 29, p. 491-493, 2011.

MISHRA, V. et al. Anti-secretory and cytoprotective effects of chebulinic acid isolated from the fruits of *Terminalia chebula* on gastric ulcers. **Phytomedicine**, v. 20, p. 506-511, 2013.

MIZUNO, H. et al. Induction of cyclooxygenase 2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by the specific antagonist delays healing in mice. **Gastroenterology**, v. 112, p. 387-397, 1997.

MORAES, T. M. et al. *Hancornia speciosa*: indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. **J. Ethnopharmacol.**, v. 120, p. 161-168, 2008.

MORIKAWA, T. et al. Triterpene saponins with gastroprotective effects from tea seed (the seeds of *Camellia sinensis*). **J. Nat. Prod.**, v. 69, p. 185-190, 2006.

MUKHERJEE, P. K. et al. Screening of antidiarrhoeal profiles of some plant extracts of specific region of West Bengal, India. **J. Ethnopharmacol.**, v. 60, p. 85-89, 1998.

MUSUMBA, C.; PRITCHARD, D. M.; PIRMOHAMED, M. Review article: cellular and molecular mechanisms of NSAID-induced peptic ulcers. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 30, p. 517-531, 2009.

MUSTACICH, D.; POWIS, G. Thioredoxin reductase. **Biochem. J.** v. 346, p. 1-8, 2000.

MUSUMBA, C.; PRITCHARD, D. M.; PIRMOHAMED, M. Review article: cellular and molecular mechanisms of NSAID-induced peptic ulcers. **Aliment Pharmacol Ther.** v. 30, p. 517-31, 2009.

MUTOH, H. et al. Protective role of intracellular glutathione against ethanol-induced damage in cultured rat gastric mucosal cells. **Gastroenterology**, v. 98, n. 6, p. 1452-1459, 1990.

NAGAKURA, Y. et al. Compounds possessing 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonistic activity inhibit intestinal propulsion in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 311, p. 67-72, 1996.

NAGEL, D. S.; SHIELDS, H. M. Farmacologia integrativa da inflamação: doença ulcerosa péptica. In: GOLAN, D. E.; TASHJIAN, A. H.; ARMSTRONG, E. J. **Princípios de Farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 758-770.

NAITO, Y. et al. Neutrophils, lipid peroxidation, and nitric oxide in gastric reperfusion injury in rats. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 24, p. 494-502, 1998.

NAKAMOTO, K. et al. The role of endogenous acid in the development of acute gastric ulcer induced by ischemia-reperfusion in the rat. **Life Sci.**, v. 62, p. PL63-PL69, 1998.

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. **Evid Based Complement Altern. Med.**, p. 1-13, 2011.

NAPOLITANO, D. R. et al. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. **J. Ethnopharmacol.**, v. 99, p. 37-41, 2005.

NATALE, G. et al. Mechanisms of gastroprotection by lansoprazole pretreatment against experimentally induced injury in rats: role of mucosal oxidative damage and sulfhydryl compounds. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 195, p. 62-72, 2004.

NATARO, J. P. et al. *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*. In: VERSALOVIC, J. et al. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 10. ed. Washington, DC: ASM Press, 2011. p. 603-626.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS. **Método de referência para testes de diluição em caldo para a**

**determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras.** 2. ed. Wayne, 2002. (NCCLS document M27-A2).

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS. **Método dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico.** Wayne, 2003. (NCCLS document M7-A6).

NGUYEN, R. N. et al. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 12, p. 597-603, 2006.

NIH CONSENSUS CONFERENCE. Helicobacter pylori in peptic ulcer disease. NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. **JAMA**, v. 272, p. 65-69, 1994.

NISHIDA, K.; OHTA, Y.; ISHIGURO, I. Contribution of nitric oxide synthases to neutrophil infiltration in the gastric mucosal lesions in rats with water immersion restraint stress. **FEBS Lett.**, v. 425, p. 243-248, 1998.

NIV, Y.; BOLTIN, D. Secreted and membrane-bound mucins and idiopathic peptic ulcer disease. **Digestion**, v. 86, p. 258-263, 2012.

NWAFOR, P. A.; EFFRAIM, K. D.; JACKS, T.W. Gastroprotective effect of aqueous extract of *Khaya senegalensis* bark on indomethacin-induced ulceration in rats. **West Afr. J. Pharmacol. Drug Res.** v. 12, p. 46–50, 1996.

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

OHKAWA, I.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem.**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OKABE, S. et al. Effects of carbenoxolone Na on acute and chronic gastric ulcer models in experimental animals. **Am. J. Dig. Dis.**, v. 21, p. 618-625, 1976.

ORTEGA, A. et al. Methylodonates, a new type of diterpene with modified derodane skeleton from *Dodenaea viscosa*. **Tetrahedron**, v. 57, p. 2981-2989, 2001.

OSATO, M.; GRAHAM, D. Clinical spectrum of *Helicobacter pylori* infection. **Prog. Basic Clin. Pharmacol.**, v. 11, p. 2-20, 1999.

OYAGI, A. et al. Protective effects of a gastrointestinal agent containing Korean red ginseng on gastric ulcer models in mice. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 10, p. 1-9, 2010.

PAN, J. S. et al. Oxidative stress disturbs energy metabolism of mitochondria in ethanol-induced gastric mucosa injury. **World J. Gastroenterol.**, v. 14, n. 38, p. 5857-5867, 2008.

PAUL, S.; SAHA, D. Evaluation of antimotility effect of *Alpinia conchigera* griff on charcoal induced gastrointestinal motility in mice. **Asian J. Pharm. Res.**, v. 2, p. 71-74, 2012.

PAWLIK, W. W. et al. Myoelectric bowel activity in ischemia/reperfusion damage. Role of sensory neurons. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 49, p.543-551, 1998.

PESKAR, B. M.; HOLLAND, A.; PESKAR, B. A. Effect of carbenoxolone on prostaglandin synthesis and degradation. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 28, p. 146-148, 1976.

PESKAR, B. M.; MARICIC, N. Role of prostaglandins in gastroprotection. **Dig. Dis. Sci.**, v. 43, suppl. 9, p. 23S-29S, 1998.

PESKAR, B. M. Neural aspects of prostaglandin involvement in gastric mucosal defense. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 52, n. 4, pt. 1, p. 555-568, 2001.

PEURA, D. A.; CROWE, S. E. *Helicobacter pylori*. In: FELDMAN, M.; FRIEDMAN, L. S.; BRANDT, L. J. (Ed). **Sleisenger and Fordtran's gastrointestinal and liver disease**. 9. ed. Philadelphia: Saunders, 2010. p. 833-845.

PIOTROWAKI, J. et al. Gastric mucosal apoptosis induced by ethanol: effect of antiulcer agents. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v. 42, p. 247-254, 1997.

PHILLIPSON, M. et al. The gastric mucus layers: constituents and regulation of accumulation. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 295, p. G806-G812, 2008.

POULSEN, S. S.; OLSEN, P. S.; KIRKEGAARD, P. Healing of cysteamine-induced duodenal ulcers in the rat. **Dig. Dis. Sci.**, v. 30, p. 161-167, 1985.

PRISTA, L. N. **Tecnologia farmacêutica**. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995-2008. v. I, II.

RAFATULLAH, S, et al. Evaluation of turmeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 29, p. 25-34, 1990.

RAJASEKARAN, A.; SIVAKUMAR, V.; DARLINQUINE, S. Role of *Blepharis maderaspatensis* and *Ammannia baccifera* plant extracts on in vitro oxygen radical scavenging, secretion of gastric fluid and gastroprotection on ulcer induced rats. **Pharm. Biol.**, v. 50, p. 1085-1095, 2012.

RAMAKRISHNAN, K.; SALINAS, R. C. Peptic ulcer disease. **Am. Fam. Physician**, v. 76, n.7, p.1005-1012, 2007.

RAMASWAMY, S.; RAJASEKARAN, M.; BAPNA, J. S. Role of calcium in prolactin analgesia. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v. 283, p. 56-60, 1986.

RAMIREZ, R. O.; ROA JR., C. C. The gastroprotective effect of tannins extracted from duhat (*Syzygium cumini* Skeels) bark on HCl/ethanol induced gastric mucosal injury in Sprague–Dawley rats. **Clin. Hemorheol. Microcircul.**, v. 29, p. 253-261, 2003.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

RENDIC, S. Drug interactions of H<sub>2</sub> -receptor antagonists involving cytochrome P450 (CYPs) enzymes: from the laboratory to the clinic. **Croat. Med. J.**, v. 40, p. 357-367, 1999.

REUTER, B. K. et al. Exacerbation of inflammation associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2. **J. Clin. Invest.**, v. 98, p. 2076-2085, 1996.

ROBERT, A. et al. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. **Gastroenterology**, v. 77, p. 433-443, 1979.

ROBERT, A. Mechanisms of cytoprotection. In: PATON, W.; MITCHELL, J.; TURNER, P. P. (Ed.). INTERNATIONAL CONGRESS OF PHARMACOLOGY, 9., 1984, New York. **Proceedings...** New York: Macmillan, 1984. p. 355-359.

ROBINSON, M. et al. Effects of oral rabeprazole on oesophageal and gastric pH in patients with gastro-oesophageal reflux disease. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 11, p. 973-980, 1997.

RODAS, C. et al. Enterotoxins, colonization factors, serotypes and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains isolated from hospitalized children with diarrhea in Bolivia. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 15, p. 132-137, 2011.

RODRÍGUEZ-TÉLLEZ, M. et al. Anti-inflammatory agents less dangerous for gastrointestinal tract. **Curr. Pharm. Des.**, v. 7, p. 951-976, 2001.

ROZZA, A. L. et al. Gastroprotective mechanisms of *Citrus lemon* (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and  $\beta$ -pinene: involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E<sub>2</sub>. **Chem. Biol. Interact.**, v. 189, n. 1, p. 82-89, 2011.

SACHS, G. Proton pump inhibitors and acid-related diseases. **Pharmacotherapy**, v. 17, p. 22-37, 1997.

SALIM, A. S. Sulfhydryl-containing agents: new approach to the problem of refractory peptic ulceration. **Pharmacology**, v. 46, p. 281-288, 1993.

SANDERS, S. W. Pathogenesis and treatment of acid peptic disorders: comparison of proton pump inhibitors with other antiulcer. **Clin. Ther.**, v. 18, p. 2-34, 1996.

SANDHAR, H.K. et al. A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. **Int. Pharm. Sci.** v. 1, p 24-41, 2011.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. 1,8-cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. **Dig. Dis. Sci.**, v. 46, p. 331-337, 2001.

SARBACKER, G. B.; MONTFORT, E. Clinical considerations for the treatment of *H pylori* infection. Dezembro de 2011. Disponível em: <[http://www.uspharmacist.com/continuing\\_education/ceviewtest/lessonid/107963/](http://www.uspharmacist.com/continuing_education/ceviewtest/lessonid/107963/)>.

Acesso em: 11 de jan. de 2014.

SATOH, H. et al. Antisecretory and anti-ulcer activities of a novel proton pump inhibitor AG-1749 in dogs and rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 248, p. 806-815, 1989.

SCHMASSMANN, A. Mechanism of ulcer healing and effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Am. J. Med.**, v. 104, p. 43-51, 1998.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; YESILADA, E. Traditional medicine and gastroprotective crude drugs. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 1-66, 2005.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Curr Opin Gastroenterol.** v. 20, n. 6, p. 519-25, 2004.

SEKHAR, R.V. et al. Glutathione synthesis is diminished in patients with uncontrolled diabetes and restored by dietary supplementation with cysteine and glycine. **Diabetes Care**, v. 34, p. 162-167, 2011.

SERMEUS, A. et al. Hypoxia-induced modulation of apoptosis and BCL-2 family proteins in different cancer cell types. **PLoS One**, v. 7, p. e47519, 2012.

SHAKER, E.; MAHMOUD, H.; MNAA, S. Anti-inflammatory and anti-ulcer activity of the extract from *Alhagi maurorum* (camelthorn). **Food Chem. Toxicol.**, v. 48, p. 2785-2790, 2010.

SHAY, H. A simple for the uniform production of gastric ulceration in rat. **Gastroenterology**, v. 5, p. 43-61, 1945.

SHERRIS, J. et al. Misoprostol use in developing countries: results from a multicountry study. **International Journal of Gynecology and Obstetrics.** v. 88, p. 76-81, 2005.

SIDAHMED, H. M. et al. Gastroprotective effect of desmosdumotin C isolated from *Mitrella kentii* against ethanol-induced gastric mucosal hemorrhage in rats: possible involvement of glutathione, heat-shock protein-70, sulfhydryl compounds, nitric oxide, and anti-*Helicobacter pylori* activity. **BMC Complement. Alternat. Med.**, v. 13, p. 1-15, 2013.

SILVA, S. R. **Plantas do cerrado**: utilizadas pelas comunidades da região do grande Sertão Veredas. Brasília: Fundação Pró-Natureza, Funatura, 1998.

SINDHU, R. K. et al. Dysregulation of hepatic superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in diabetes: response to insulin and antioxidant therapies. **Clin. Exp. Hypertens.**, v. 26, n. 1, p. 43-53, 2004.

SØRBYE, H.; SVANES, K. The role of blood flow in gastric mucosal defence, damage and healing. **Dig. Dis.**, v. 12, p. 305-317, 1994.

SONNENBERG, A. Causes underlying the birth-cohort phenomenon of peptic ulcer: analysis of mortality data 1911–2000, England and Wales. **Int. J. Epidemiol.**, v. 35, p. 1090-1097, 2006.

SOUZA ALMEIDA, E. S. Pharmacological mechanisms underlying the anti-ulcer activity of methanol extract and canthin-6-one of *Simaba ferruginea* A. St-Hil. in animal models. **J. Ethnopharmacol.**, v. 134, p. 630-636, 2011.

SOUZA BRITO, A. R. M. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**: ciências médicas. Campinas: Ed. Unicamp, 1994. p. 15-22.

SPITZER, V. Fatty acid composition of some seed-oils of the Sapindaceae. **Phytochemistry**, v. 42, p. 1357-1360, 1996.

SRIKANTA, B. M.; SATHISHA, U. V.; DHARMESH, S. M. Alterations of matrix metalloproteinases, gastric mucin and prostaglandin E<sub>2</sub> levels by pectic polysaccharide of swallow root (*Decalepis hamiltonii*) during ulcer healing. **Biochimie**, v. 92, p. 194-203, 2010.

STERNINI, C.; REEVE, J. R.; BRECHA, N. Distribution and characterization of calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the digestive system of normal and capsaicin-treated rats. **Gastroenterology**, v. 93, p. 852-862, 1987.

STERNINI, C. et al. The opioid system in the gastrointestinal tract. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 16, p. 3-16, 2004.

STICKNEY, J. C.; NORTHUP, D. W. Effect of gastric emptying upon propulsive motility of small intestine of rat. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 101, p. 582-583, 1959.

SUSSER, M.; STEIN, Z. Civilization and peptic ulcer. **Lancet**, v. 279, p. 116-119, 1962.

SUSSMAN, M. *Escherichia coli* and human diseases. In: SUSSMAN, M. (Ed.). **Escherichia coli: mechanisms of virulence**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. p. 3-48.

SZABO, S. Animal model for human disease: duodenal ulcer disease. **Am. J. Pathol.**, v. 93, p. 273-276, 1978.

SZABO, S.; BROWN, A. **Prevention of ethanol-induced vascular injury and gastric mucosal lesions by sucralfate and its components: possible role of endogenous sulfhydryls**. New York: Royal Society of Medicine, 1987. p. 493-497.

SZABO, S.; PIHAN, G.; DUPUY, D. The biochemical pharmacology of sulfhydryls compounds in gastric mucosal injury and protection. In: SZABO, S.; MÓZIK, G. (Ed.). **New pharmacology of ulcer disease**. New York: Elsevier, 1987. p. 424-446.

SZABO, S. Mechanisms of gastric mucosal injury and protection. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 13, suppl. 2, p. S21-S34, 1991.

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

SZABO, S.; NAGY, L. Pathways, mediator and mechanisms of gastroduodenal mucosal injury. **Acta Physiol. Hung.**, v. 80, p. 9-21, 1992.

SZABO, S. et al. Growth factors: New “endogenous drug” for ulcer healing. **Scandinavian J. Gastroenterol.** v. 210, p. 15-18, 1995.

TACHAKITTIRUNGROD, S.; OKONOGLI, S.; CHOWWANAPHOONPOHN, S. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. **Food Chem.**, v. 103, n. 2, p. 381-388, 2007.

TAKEUCHI, K. et al. Role of sulfhydryls in mucosal injury caused by ethanol: relation to microvascular permeability, gastric motility and cytoprotection. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 248, n. 2, p. 836-841, 1989.

TAKEUCHI, K. et al. Role of capsaicin-sensitive sensory nerves in acid-induced bicarbonate secretion in rat stomach. **Dig. Dis. Sci.**, v. 37, p. 737-743, 1992.

TAKEUCHI, K. et al. Role of nitric oxide in pathogenesis of aspirin-induced gastric mucosal damage in rats. **Digestion**, v. 59, p. 298-307, 1998.

TANDON, R. et al. Oxidative stress and antioxidants status in peptic ulcer and gastric carcinoma. **Indian J. Physiol. Pharmacol.**, v. 48, n. 1, p. 115-118, 2004.

TAPAS, A.R. et al. Flavonoids as nutraceuticals: a review. **Tropical J. Pharm. Res.** v. 7, p. 1089–1099, 2008.

TARIQ, M. et al. Bromophenacyl bromide, a phospholipase A2 inhibitor attenuates chemically induced gastroduodenal ulcers in rats. **World J. Gastroenterol.**, v. 12, n. 36, p. 5798-5804, 2006.

TARNAWSKI, A.; HOLLANDER, D. Cytoprotection of gastric and duodenal mucosa. **R. Soc. Med. Curr. Med. Lit. Gastroenterol.**, v. 6, p. 3-11, 1987.

TARNAWSKI, A. Cellular and molecular mechanisms of mucosal defense and repair. In: YOSHIKAWA, T.; ARAKAWA, T. (Ed.). **Bioregulation and its disorders in gastrointestinal tract.** Japan: Blackwell Science, 1998. p. 3-17.

TARNAWSKI, A. S.; JONES, M. K. Inhibition of angiogenesis by NSAIDs: molecular mechanisms and clinical implications. **J. Mol. Med.**, v. 81, p. 627-636, 2003.

TARNAWSKI, A. S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. **Dig. Dis. Sci.**, v. 50, suppl. 1, p. S24-S33, 2005.

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

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

TEMBHURNE, S. V.; SAKARKAR, D. M. Acceleratory effect of murraya koenigii leaves extracts in atropine induced delayed small intestinal transit involved possible cholinergic innervation in mice. **Int. J. Pharm. Tech. Res.**, v. 2, p. 322-326, 2010.

TOMA, W. et al. Preventive activity of pyrrolizidine alkaloids from *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) on gastric and duodenal induced ulcer on mice and rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 95, p. 345-351, 2004.

UEDA, S. et al. Role of free radicals and lipid peroxidation in gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 24, suppl. 162, p. 55-58, 1989.

VANLANGENAKKER, N. et al. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. **Current Molecular Medicine**. v. 8, p. 207-220, 2008.

VASCONCELOS, P. C. et al. Effect of *Mouriri pusa* tannins and flavonoids on prevention and treatment against experimental gastric ulcer. **J. Ethnopharmacol.**, v. 131, p. 146-153, 2010.

VERSTER, J. C.; VOLKERTS, E. R.; VERBATEN, M. N. Effects of alprazolam on driving ability, memory functioning and psychomotor performance: a randomized, placebo-controlled study. **Neuropsychopharmacology**, v. 27, p. 260-269, 2002.

VIANA, A. F. S. C. et al. Gastroprotective activity of *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire leaves on experimental ulcer models. **J. Ethnopharmacol.**, v. 150, p. 316-323, 2013.

VOUTQUENNE, L. et al. Triterpenoid saponins and acylate prosapogenins for *Harpullia austrocaledonica*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 825-832, 2002.

WADA, K. et al. A new gastric ulcer model induced by ischemia-reperfusion in the rat; role of leukocytes on ulceration in rat stomach. **Life Sci.**, v. 59, p. 295-301, 1996.

WALLACE, J. L.; WHITTE, B. J. R. Role of prostanoids in the protective actions of BW755C on gastric mucosa. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 115, p. 45-52, 1985.

WALLACE, J. L.; MCKNIGHT, G. W. The mucoid cap over superficial gastric damage in the rat: a high pH microenvironment which is dissipated by non-steroidal anti-inflammatory drugs and endothelin. **Gastroenterology**, v. 99, p. 295-304, 1990.

WALLACE, J. L. et al. A diclofenac derivative without ulcerogenic properties. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 257, p. 249-255, 1994.

WALLACE, J. L.; GRANGER, D. N. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. **FASEB J.**, v. 10, p. 731-740, 1996.

WALLACE, J. L. et al. Nitric oxide-releasing NSAIDs: GI-safe antithrombotics. **IDrugs**, v. 2, n. 4, p. 321-326, 1999.

WALLACE, J. L.; MILLER, M. J. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. **Gastroenterology**, v. 119, n. 2, p. 512-520, 2000.

WALLACE, J. L. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. **Am. J. Med.**, v. 110, n. 1a, p. 19s-23s, 2001.

WALLACE, J. L. Pathogenesis of NSAID-induced gastroduodenal mucosal injury. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 15, p. 691-703, 2001.

WALLACE, J. L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? **Physiol. Rev.**, v. 88, p. 1547-1565, 2008.

WANG, A. Y.; PEURA, D. A. The prevalence and incidence of *Helicobacter pylori* – associated peptic ulcer disease and upper gastrointestinal bleeding throughout the world. **Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am.**, v. 21, p. 613-635, 2011.

WARREN, J. R.; MARSHALL, B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet**, v. 321, p. 1273-1275, 1983.

WARZECHA, Z. et al. The influence of sensory nerves and CGRP on the pancreatic regeneration after repeated episodes of acute pancreatitis in rats. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 51, p. 449-461, 2000.

WILLIAMS, M. P.; POUNDER, R. E. Review article: the pharmacology of rabeprazole. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 13, suppl. 3, p. 3-10, 1999.

WONG, C-H. et al. Eradication of *Helicobacter pylori* for prevention of ulcer recurrence after simple closure of perforated peptic ulcer: A meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of Surgical Research**. v. 182, p. 219-226, 2013.

WOTKINSON, G. Treating ulcer diseases with carbenoxolone sodium. **Postgrad. Med.**, v. 44, p. 91-98, 1968.

WRAY, C.; WOODWARD, M.J. *Escherichia coli* infections in farm animals. In: SUSSMAN, M. (Ed.). **Escherichia coli**: mechanisms of virulence. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. p. 49-84.

YOSHIKAWA, T. et al. Role of oxygen-derived free radicals in gastric mucosal injury induced by ischemia or ischemia-reperfusion in rats. **Free Radic. Res. Commun.**, v. 7, p. 285-291, 1989.

YOSHIKAWA, T. et al. Vitamin E in gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 53, p. S210-S214, 1991.

YOSHIKAWA, T. et al. Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats. **Gut**, v. 34, n.6, p. 732-737, 1993.

ZHAO, W. et al. Protective effects of DIDS against ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. **Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shagai)**, v. 41, p. 301-308, 2009.

ZELICKSON, M. S. et al. Helicobacter pylori is not the predominant etiology for peptic ulcers requiring operation. **Am. Surg.**, v. 77, p. 1054-1060, 2011.

ZICHE, M. et al. Nitric oxide mediates angiogenesis *in vivo* and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. **J. Clin. Invest.**, v. 94, n. 5, p. 2036-2044, 1994.

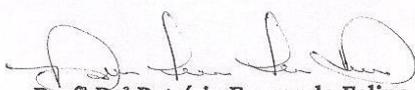
**ANEXOS**

**Anexo 1 – Protocolo do Comitê de Ética em Experimentação Animal (nº 359 - CEUA)**

## Certificado

Certificamos que o Protocolo nº 359-CEUA, sobre “AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA DE SERJANIA MARGINATA FRENTE À DOENÇA ULCEROSA PÉPTICA EXPERIMENTAL”, sob a responsabilidade de **Clélia Akiko Hiruma-Lima**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA), em reunião extraordinária de **12/12/2011**.

Botucatu, 12 de dezembro de 2011.



**Prof.ª Dr.ª Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro**  
Presidente - CEUA

**Anexo 2 – Protocolo do Comitê de Ética em Experimentação Animal (nº 360 - CEUA)**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



## *Certificado*

Certificamos que o Protocolo nº 360-CEUA, sobre "AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA DE SERJANIA MARGINATA FRENTE À DOENÇA ULCEROSA PÉPTICA EXPERIMENTAL", sob a responsabilidade de **Clélia Akiko Hiruma-Lima**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**, em reunião extraordinária de **12/12/2011**.

Botucatu, 12 de dezembro de 2011.

**Prof.ª Dr.ª Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro**  
Presidente - CEUA

Instituto de Biociências - Diretoria Técnica Acadêmica  
Distrito de Júlio de Mesquita Filho s/n. CEP 13618-970 Botucatu SP Brasil  
Tel 44 3844 6043/6044 fax 44 3845 5744 e-mail: iac@iboc.unesp.br

**Anexo 3 - Protocolo experimental das avaliações do teste "Screening" hipocrático**

Os parâmetros a serem observados de acordo com a tabela de Brito (1994) e segundo explicações de alguns padrões comportamentais descritos por Malone e Robichaud (1962), são os seguintes:

<b><i>Frêmito vocal:</i></b>	Emissão de ruídos frequentes
<b><i>Irritabilidade:</i></b>	Reação ao indivíduo ao lado ou ao manuseá-lo
<b><i>Resposta ao toque:</i></b>	Direcionar algo em direção ao animal e esperar ele desviar
<b><i>Aperto de cauda:</i></b>	Apertar a ponta da cauda e puxá-lo
<b><i>Contorção:</i></b>	Animal faz movimento sinuoso
<b><i>Trem posterior:</i></b>	Pata posterior abaixada
<b><i>Endireitamento:</i></b>	5, pode ser posicionado em único lado; 6, pode ser posicionado em qualquer dos lados igualmente bem; 7, pode ser posicionado de costas tão bem como qualquer lado; 8, não pode ser despertado, estando de costas, com um beliscão no dedo da pata traseira.
<b><i>Tônus corporal:</i></b>	Puxar a pele pra ver se ela retorna ao normal
<b><i>Força de agarrar:</i></b>	Fazê-lo segurar na grade e puxá-lo pela cauda
<b><i>Ataxia:</i></b>	1, detecção de perda de coordenação; 2, dificuldade de andar reto mas prosseguir alinhado; 3 não conseguir andar reto, com curso errante; 4, não conseguir qualquer curso
<b><i>Reflexo auricular:</i></b>	Mexer a orelha com a pinça
<b><i>Reflexo corneal:</i></b>	Levar em direção ao olho a pinça para ver se eles tentam fechá-los.
<b><i>Tremores:</i></b>	Verificar se eles tremem, comparando com o normal.
<b><i>Convulsões:</i></b>	São medidas subjetivamente de 1 a 4 de acordo com a severidade e duração
<b><i>Estimulações:</i></b>	Movimentos repentinos
<b><i>Straub:</i></b>	Cauda levantada como uma bandeira

<b><i>Hipnose:</i></b>	Dormir agrupados
<b><i>Anestesia:</i></b>	1- resposta lenta quando uma agulha é pressionada no pé; 2- sem reação à agulha firme pressionada; 3- sem reação com a penetração da agulha
<b><i>Lacrimação:</i></b>	Comparar com a normal
<b><i>Ptose:</i></b>	1- notável fechamento do olho; 2- metade fechado; 3- quase completamente fechado; 4- fechado completamente
<b><i>Micção:</i></b>	Considerar subjetivamente a frequência e quantidade
<b><i>Defecação:</i></b>	Verificar alteração na consistência das fezes
<b><i>Piloereção:</i></b>	A gradação é analisada subjetivamente através da ereção e do aspecto do pelo
<b><i>Hipotermia:</i></b>	Tocar o animal e verificar se a temperatura é baixa em relação ao controle
<b><i>Respiração:</i></b>	Comparar com o normal
<b><i>Cianose:</i></b>	Observar a alteração da cor de orelhas, patas e da mucosa oral.
<b><i>Número de mortos:</i></b>	Anotar a cada verificação dos comportamentos

**Anexo 4 - Teste Hipocrático – Toxicidade de drogas por Análise Comportamental**  
**Parâmetros analisados em camundongos machos e fêmeas tratados oralmente com**  
**dose única de veículo e EHSM 5000 mg/kg**

<b>Sintomas</b>	<b>Normal</b>	<b>Tempo para as análises comportamentais (minutos)</b>				
		<b>30'</b>	<b>60'</b>	<b>120'</b>	<b>240'</b>	<b>360'</b>
Aparência geral	4	4	4	4	4	4
Frêmito vocal	0	0	0	0	0	0
Irritabilidade	0	0	0	0	0	0
Reposta ao toque	4	4	4	4	4	4
Aperto da cauda	4	4	4	4	4	4
Contorção	0	0	0	0	0	0
Trem posterior	0	0	0	0	0	0
Endireitamento	4	4	4	4	4	4
Tônus muscular	4	4	4	4	4	4
Força de agarrar	4	4	4	4	4	4
Ataxia	0	0	0	0	0	0
Reflexo auricular	4	4	4	4	4	4
Reflexo corneal	4	4	4	4	4	4
Tremores	0	0	0	0	0	0
Convulsões	0	0	0	0	0	0
Estimulações	4	4	4	4	4	4
Straub	0	0	0	0	0	0
Hipnose	0	0	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0	0	0
Lacrimação	0	0	0	0	0	0
Ptose	0	0	0	0	0	0

Micção	4	4	4	4	4	4
Piloereção	0	0	0	0	0	0
Defecação	4	4	4	4	4	4
Hipotermia	0	0	0	0	0	0
Respiração	4	4	4	4	4	4
Cianose	0	0	0	0	0	0
Morte		0	0	0	0	0

Códigos: Testes com anotação normal “0”, a intensidade do efeito varia na escala de 1 a 4; testes com anotação normal “4”, a intensidade do efeito poderá variar de 0 a 3 quando ocorrer diminuição, 4 quando igual ao controle e de 5 a 8 quando ocorrer aumento.