



unesp

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



AVALIAÇÃO DO EFEITO CICATRIZANTE DA INFUSÃO DAS FOLHAS DE *Terminalia catappa* L. NA LESÃO GÁSTRICA PROMOVIDA PELO PROCESSO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM RATOS

RIE OHARA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, como requisito para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biomoléculas: estrutura e função.

Prof. Adj. Clélia Akiko Hiruma-Lima

**BOTUCATU – SP
2018**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

AVALIAÇÃO DO EFEITO CICATRIZANTE DA INFUSÃO DAS
FOLHAS DE *Terminalia catappa* L. NA LESÃO GÁSTRICA
PROMOVIDA PELO PROCESSO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO
EM RATOS

RIE OHARA

ORIENTADORA: PROF. ADJ. CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, como requisito para
obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-
Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de
concentração Biomoléculas: Estrutura e Função.

**BOTUCATU – SP
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Ohara, Rie.

Avaliação do efeito cicatrizante da infusão das folhas de *Terminalia catappa* L. na lesão gástrica promovida pelo processo de isquemia e reperfusão em ratos / Rie Ohara. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Clélia Akiko Hiruma Lima

Capes: 21006008

1. *Terminalia*. 2. Plantas medicinais. 3. Isquemia. 4. Reperfusão (Fisiologia). 5. Estômago - Inflamação. 6. Cicatrização de ferimentos.

Palavras-chave: *Terminalia catappa*; cicatrizante; gástrico; isquemia e reperfusão.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço à professora Clélia Akiko Hiruma-Lima pela oportunidade de aprimorar os meus conhecimentos e por toda atenção e ajuda recebidas desde a iniciação científica e durante o mestrado. Um exemplo de profissional e de pessoa que vou levar para a vida.

À equipe do Laboratório de Ensaio Biológicos com Produtos Naturais (Larissa, Vinícius, Gabriela, Bruna, Natália, Marcelo e Thiago) que sempre me ajudou nos experimentos e sem os quais este trabalho não teria sido executado com tanto prazer e bom humor.

À professora Lúcia Regina Machado da Rocha pelas importantes contribuições nas reuniões de discussão de resultados.

À professora Raquel de Cássia dos Santos (USF) por todos os ensinamentos teóricos e principalmente práticos relacionados à isquemia e reperfusão.

À professora Lourdes Campaner dos Santos (UNESP - Araraquara) e à Ana Zanatta (UNESP – São Vicente) que obtiveram e concederam o material vegetal usado neste estudo.

A todos os funcionários e professores do Departamento de Fisiologia que contribuíram de alguma forma com a execução deste trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida

O meu agradecimento pelo conhecimento e formação ao Instituto de Biociências de Botucatu e Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Câmpus de Botucatu.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, sem vocês não teria sido possível. A todos, deixo aqui o meu MUITO OBRIGADA!

Prólogo

O desenvolvimento do projeto de mestrado possibilitou a formação com estudos direcionados para a caracterização de atividade farmacológica de produtos naturais no tratamento da lesão gástrica. Durante a execução do projeto de mestrado, foram realizadas outras atividades, no intuito de enriquecer a formação profissional e científica da aluna.

Trabalhos apresentados na forma de painel em eventos científicos

- PERICO, L. L. ; RODRIGUES, V. P. ; **OHARA, R.** ; SANTOS, R. C. ; VILEGAS, W. ; ROCHA, L. R. M. ; SANTOS, C. ; HIRUMA-LIMA, C. A. . Healing activity from the hydroalcoholic extract (leaves) of *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. (Myrtaceae) in gastric ulcer. 6th International Congress of Aromatic and Medicinal Plants, Coimbra, Portugal, 2016.
- RODRIGUES, V. P. ; PERICO, L. L. ; **OHARA, R.** ; ROCHA, C.Q. ; VILEGAS, W. ; ROCHA, L. R. M. ; HIRUMA-LIMA, C. A. . Anti-edematogenic activity of dichloromethane extract from the roots of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bural. 6th International Congress of Aromatic and Medicinal Plants, Coimbra, Portugal, 2016.
- **OHARA, R.**; PERICO, L. L. ; RODRIGUES, V. P. ; SANTOS, R. C. ; VILEGAS, W. ; ROCHA, L. R. M. ; SANTOS, L. C. ; HIRUMA-LIMA, C. A. . Curative role of *Terminalia catappa* in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion injury. VIII Simpósio Iberoamericano de Plantas Mediciniais Itajaí/SC, 2016.
- **OHARA, R.**; PERICO, L. L. ; RODRIGUES, V. P. ; MAZZOLIN, L. P. ; SEVERI, J. A. ; HIRUMA-LIMA, C. A. Mechanisms involved in the gastroprotective effect of *Guapira noxia* (Netto) Lundell leaves. VIII Simpósio Iberoamericano de Plantas Mediciniais Itajaí/SC, 2016.
- PERICO, L. L. ; RODRIGUES, V. P. ; **OHARA, R.** ; SANTOS, R. C. ; VILEGAS, W. ; ROCHA, L. R. M. ; SANTOS, C. ; HIRUMA-LIMA, C. A. Hydroalcoholic extract from the leaves of *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. improvement injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rat. VIII Simpósio Iberoamericano de Plantas Mediciniais Itajaí/SC, 2016.
- RODRIGUES, V. P. ; PERICO, L. L. ; **OHARA, R.** ; ROCHA, C.Q. ; VILEGAS, W. ; ROCHA, L. R. M. ; HIRUMA-LIMA, C. A. . Anti-edematogenic activity of dichloromethane extract from the roots of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bural. VIII Simpósio Iberoamericano de Plantas Mediciniais Itajaí/SC, 2016.
- NISHIDA, S.M. ; SOARES, A.C.S. ; SOARES, G.A. ; SAKODA, J.N. ; PERICO, L. L. ; CAVARIANI, M.M. ; DELA ROSA, M.E. ; **OHARA, R.** ; RODRIGUES, V. P. ; ROCHA, L. R. M. ; HIRUMA-LIMA, C. A. . Reprodução de A à Z Criando Material Didático: uma Interação Criativa entre Ensino Médio

e Universidade. XV Encontro Anual da RNEC: Novos Talentos da Rede Pública, São Carlos, SP, 2017.

- PÉRICO, L.L. ; RODRIGUES, V.P. ; SANTOS, R. C. ; **OHARA, R.**; VILEGAS, W. ; ROCHA, L. R. M. ; SANTOS, C. ; HIRUMA-LIMA, C. A. . Effects of sex hormones on the toxicity and healing of gastric ulcer in rats treated with *Eugenia punicifolia*, a medicinal plant from amazon region. XXVI Società italo-latinoamericana di etnomedicina. Cartagena de las Índias, Colômbia, 2017.
- PERICO, L. L. ; RODRIGUES, V. P. ; **OHARA, R.** ; SANTOS, B. B. ; SANTOS, R. C. ; VILEGAS, W. ; ROCHA, L. R. M. ; SANTOS, C. ; HIRUMA-LIMA, C. A. . From popular use to preclinical validation: a study of the healing activity of hydroalcoholic extract from the leaves of *Eugenia punicifolia* (myrtaceae) in rodents. 49th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics (SBFTE), Ribeirão Preto/SP, 2017.
- **OHARA, R.**; PERICO, L. L.; RODRIGUES, V. P.; SANTOS, B. B.; SANTOS, R. C.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; ROCHA, L. R. M.; HIRUMA-LIMA, C. A. . Effects of the infusion of *Terminalia catappa* leaves on treatment of duodenal injury induced by ischemia - reperfusion in female rats. 49th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics (SBFTE), Ribeirão Preto/SP, 2017.
- RODRIGUES, V. P.; PERICO, L. L.; **OHARA, R.**; SANTOS, R. C.; VILEGAS, W.; ROCHA, C.Q.; ROCHA, L. R. M.; HIRUMA-LIMA, C. A. Antinociceptive and anti - inflammatory effect of the dichloromethane extract from the roots of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau and its role on ASIC and TRPM8 receptors. 49th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics (SBFTE), Ribeirão Preto/SP, 2017.
- PÉRICO, L.L.; RODRIGUES, V. P.; SANTOS, R. C.; **OHARA, R.**; VILEGAS, W.; ROCHA, L. R. M.; SANTOS, C.; HIRUMA-LIMA, C. A. . Hydroalcoholic extract obtained from *Eugenia punicifolia* leaves and its effect in improving injury induced by gastric ischemia- reperfusion in male and female rats. International Conference in Toxicology and Pharmacology, Toronto, Canadá, 2017.
- PÉRICO, L.L.; RODRIGUES, V.P.; SANTOS, R. C.; **OHARA, R.**; VILEGAS, WAGNER ; ROCHA, L. R. M. ; SANTOS, C. ; HIRUMA-LIMA, C. A. . Effects of sex hormones on the toxicity and healing of gastric ulcer in rats treated with *Eugenia punicifolia*, a medicinal plant from amazon region. World Gastroenterological Conference, Toronto, Canadá, 2017.

Participação em eventos científicos

- VIII Simpósio Iberoamericano de Plantas Mediciniais Itajaí/SC, 2016.
- XV Encontro Anual da RNEC: Novos Talentos da Rede Pública, São Carlos/SP, 2016.

- 49th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics (SBFTE), Ribeirão Preto/SP, 2017.

Atividades de 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/SP, 2016.
- 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/SP, 2017.

Cursos realizados

- Magpix Instrument Training. (Carga horária: 16h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil, 2016.
- Aplicações da Citometria de Fluxo na Pesquisa Farmacológica de Plantas Medi. (Carga horária: 3h). Universidade do Vale do Itajaí, UNIVALI, Brasil, 2016.
- WESTERN BLOT: princípios básicos e vantagens dos produtos Abcam. (Carga horária: 2h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil, 2016.
- Animal models in translational pharmacology. (Carga horária: 3h). Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental, SBFTE, Brasil, 2017.

Artigo completo publicado em periódico

- RODRIGUES, V.P.; ROCHA, C.; PÉRICO, L.L.; SANTOS, RC.; **OHARA, R.**; NISHIJIMA, C.; QUEIROZ, E.F. ; WOLFENDER, J-L. ; ROCHA, L.R.M.; SANTOS, A. ; VILEGAS, W. ; HIRUMA-LIMA, C.A. Involvement of Opioid System, TRPM8, and ASIC Receptors in Antinociceptive Effect of Arrabidaea brachypoda (DC) Bureau. *International Journal Of Molecular Sciences*, v. 18, p. 2304, 2017.

Disciplinas cursadas

- Tópicos em Biologia Geral e Aplicada (2 créditos)
- Avanços em Biologia Celular, Molecular e Funcional (4 créditos)
- Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico de Ciências e Biologia (6 créditos)
- Ética na pesquisa: vamos falar sobre isto? (3 créditos)

Lista de abreviaturas:

AA: Ácido araquidônico
AINE: Anti-inflamatório não esteroideal
CAT: Catalase
Cl⁻: Íon cloreto
COX-1: Cicloxigenase 1
COX-2: Cicloxigenase 2
DNA: Ácido desoxirribonucleico
EGF: Fator de crescimento epitelial
e.p.m.: Erro padrão da média
ERO: Espécie reativa de oxigênio
GPx: Glutathione peroxidase
GSH: Glutathione reduzida
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
HTAB: Brometo de cetrimônio
IFTC: Infusão das folhas de *Terminalia catappa*
I/R: Isquemia e reperfusão
IL-1 β : Interleucina 1 beta
IL-6: Interleucina 6
MDA: Malondialdeído
MPO: Mieloperoxidase
NBT: Azul de nitrotetrazólio
NF κ B: Fator nuclear kappa B
ns: Não significativo
O₂⁻: Íon superóxido
p.o: Via oral
PBS: Tampão fosfato salino
PG: Prostaglandina
PGE₂: Prostaglandina E₂
PLA₂: Fosfolipase A₂
SOD: Superóxido dismutase
TBA: Ácido tiobarbitúrico

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

Lista de figuras:

Fig. 1 – Circulação gastrointestinal.

Fig. 2 – Fatores protetores e agressores da mucosa gástrica.

Fig. 3 – *Terminalia catappa*.

Fig. 4 – Avaliação do efeito gastroprotetor da IFTC em lesões gástricas induzidas por etanol em ratos.

Fig. 5 – Lesões gástricas induzidas por Indometacina e submetidas à diferentes tratamentos.

Fig. 6 – Avaliação do efeito gastroprotetor da IFTC em lesões gástricas induzidas por AINE em ratos.

Fig. 7 – Avaliação do efeito da IFTC sobre a atividade da MPO no estômago de animais submetidos ao modelo de úlcera gástrica induzida por AINE.

Fig. 8 – Avaliação do efeito da IFTC sobre a produção de MDA no estômago de animais submetidos ao modelo de indução de úlcera por AINE.

Fig. 9 – Avaliação do efeito da IFTC sobre a atividade da SOD no estômago de animais submetidos ao modelo de úlcera gástrica induzida por AINE.

Fig. 10 – Avaliação do efeito da IFTC sobre a atividade da CAT no estômago de animais submetidos ao modelo de úlcera gástrica induzida por AINE.

Fig. 11 – Avaliação do efeito da IFTC sobre os níveis de GSH no estômago de animais submetidos ao modelo de úlcera gástrica induzida por AINE.

Fig. 12 – Avaliação do efeito da IFTC sobre a produção de PGE₂ no estômago de animais submetidos ao modelo de úlcera gástrica induzida por AINE.

Fig. 13 – Lesões gástricas induzidas por I/R e submetidas à diferentes tratamentos.

Fig. 14 – Avaliação do efeito gastroprotetor da IFTC em lesões gástricas induzidas por I/R em ratos.

Fig. 15 – Avaliação do efeito da IFTC sobre a atividade da MPO no estômago de animais submetidos ao modelo de lesão gástrica induzida por I/R.

Fig. 16 – Avaliação do efeito da IFTC sobre a produção de MDA no estômago de animais submetidos ao modelo de lesão gástrica induzida por I/R.

Fig. 17 – Avaliação do efeito da IFTC sobre a atividade da SOD no estômago de animais submetidos ao modelo de lesão gástrica induzida por I/R.

Fig. 18 – Avaliação do efeito da IFTC sobre a atividade da CAT no estômago de animais submetidos ao modelo de lesão gástrica induzida por I/R.

Fig. 19 – Avaliação do efeito da IFTC sobre os níveis de GSH no estômago de animais submetidos ao modelo de lesão gástrica induzida por I/R.

Fig. 20 – Lesões gástricas induzidas por I/R após 3 dias de tratamento.

Fig. 21 – Avaliação do efeito curativo da IFTC em lesões gástricas induzidas por I/R em ratos após 3 dias de tratamento.

Fig. 22 – Avaliação do efeito curativo da IFTC em lesões gástricas induzidas por I/R em ratos após 6 dias de tratamento.

Fig. 23 – Avaliação do efeito da IFTC sobre a atividade da MPO no estômago de animais submetidos ao modelo de lesão gástrica induzida por I/R após 3 e 6 dias de tratamento.

Fig. 24 – Avaliação do efeito da IFTC sobre a produção de TNF- α no estômago de animais submetidos ao modelo de gástrica induzida por I/R.

Fig. 25 – Avaliação do efeito da IFTC sobre a produção de IL-1 β no estômago de animais submetidos ao modelo de gástrica induzida por I/R.

Resumo

A espécie *Terminalia catappa* L. (Combretaceae) é uma planta conhecida no Brasil como “amendoeira”, “amendoeira da praia” ou “chapéu-de-Sol” e é utilizada popularmente na Ásia para o tratamento de hepatite, diarreia e disenteria. Essa planta medicinal faz parte da Farmacopeia Caribenha para o tratamento de gastrite e infecção urinária. A partir de sua indicação popular, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antiulcerogênico da infusão das folhas de *Terminalia catappa* (IFTC) no combate aos efeitos lesivos gástricos promovidos pelo uso do etanol, anti-inflamatório não esteroidal (AINE) e isquemia e reperfusão (I/R) em ratos. Para tanto, foram utilizados modelos experimentais agudos em que os animais receberam diferentes doses de IFTC e depois foram submetidos a indução de lesão por agente deletério (etanol, AINE ou I/R). A avaliação do efeito curativo ocorreu a partir da implantação da lesão gástrica nos animais e posteriormente foi realizado o tratamento pela via oral nos diferentes grupos experimentais por períodos que variaram de 3 à 6 dias consecutivos. Foram analisados os parâmetros macroscópicos como a área de lesão e parâmetros bioquímicos relacionados aos sistemas antioxidantes e anti-inflamatórios (superóxido dismutase, glutatona reduzida, catalase, mieloperoxidase, peroxidação lipídica). Foi possível constatar que o tratamento prévio com IFTC não é capaz de prevenir o surgimento das lesões gástricas induzidas por etanol ou I/R mas é capaz de reduzir as lesões por AINE na dose de 300 mg/kg. Entretanto, o tratamento com IFTC durante 3 dias pós-I/R foi capaz de reduzir significativamente a área de lesão bem como diminuir a atividade da mieloperoxidase. Os resultados apresentados indicam que a atuação da IFTC como antiulcerogênico se dá pela ação anti-inflamatória e não pela atuação dos sistemas antioxidantes.

Palavras chave: *Terminalia catappa*; efeito cicatrizante gástrico; isquemia e reperfusão.

Abstract

The species *Terminalia catappa* L. (Combretaceae) is a plant known in Brazil as "amendoeira", "amendoeira da praia" or "chapeu de sol" and is popularly used in Asia for the treatment of hepatitis, diarrhea and dysentery. This medicinal plant is part of the Caribbean Pharmacopoeia for the treatment of gastritis and urinary infection. The objective of this study was to evaluate the antiulcerogenic effect of the infusion of leaves of *Terminalia catappa* (IFTC) against the gastric lesions promoted by the use of ethanol, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and ischemia and reperfusion (I/R) in rats. For this, acute experimental models were used in which the animals received different doses of IFTC and then were subjected to injury induction by ethanol, NSAID or I/R. The healing model occurred after implantation of the gastric lesion in the animals and afterwards the oral treatment was carried out in the different experimental groups for periods ranging from 3 to 6 consecutive days of treatment. Macroscopic parameters such as lesion area and biochemical parameters related to antioxidant and anti-inflammatory systems (superoxide dismutase, reduced glutathione, catalase, myeloperoxidase, lipid peroxidation) were analyzed. It was possible to verify that the previous treatment with IFTC is not able to prevent the appearance of the gastric lesions induced by ethanol or I/R but it is able to reduce the lesions by NSAID in the dose of 300 mg/kg. However, treatment with IFTC for 3 days post I/R was able to significantly reduce the area of injury as well as decrease myeloperoxidase activity. The results indicate that the action of the IFTC as antiulcerogenic is due to the anti-inflammatory action and not the performance of the antioxidant systems.

Key words: *Terminalia catappa*, healing effect, ischemia and reperfusion

SUMÁRIO

1. Introdução	13
2. Objetivo	19
3. Material e Métodos	19
3.1. Material vegetal	19
3.2. Preparo da IFTC	19
3.3. Animais	19
3.4. Modelos experimentais agudos	20
3.4.a. Úlceras gástricas induzidas por etanol absoluto (Robert et al., 1976 com modificações).....	20
3.4.b. Úlceras gástricas induzidas por AINE (Anti-inflamatório não esteroidal) (Guidobono et al., 1997 com modificações).....	20
3.4.c. Indução de lesão gástrica por isquemia e reperfusão (Ueda et al., 1989 com modificações).....	21
3.5. Modelo experimental crônico	21
3.5.a. Indução de lesão gástrica por isquemia e reperfusão (Ueda et al., 1989 com modificações).....	21
3.6. Caracterização de parâmetros inflamatórios e sistema Redox	21
3.6.a. Determinação da atividade da Mieloperoxidase (MPO).....	22
3.6.b. Quantificação de malondialdeído (MDA)	22
3.6.c. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD) (Winterbourn et al., 1975)	22
3.6.d. Quantificação de catalase (CAT) (Aebi, 1984)	23
3.6.e. Determinação de Glutathiona Reduzida (GSH) (Anderson, 1985).....	23
3.6.f. Quantificação de Prostaglandinas E ₂	23
3.6.g. Quantificação de TNF- α	23
3.6.h. Quantificação de IL-1 β	23
3.7. Análise estatística	23
4. Resultados e Discussão	24
4.1. Lesão gástrica induzida por etanol	24
4.2. Lesão gástrica induzida por anti-inflamatório não esteroidal (AINE)	25
4.3. Lesão gástrica induzida por isquemia e reperfusão	30
4.3.a. Lesão induzida por isquemia e reperfusão – modelo agudo	31
4.3.b. Lesão gástrica induzida por isquemia e reperfusão – modelo crônico	35
5. Conclusão	39
6. Referências bibliográficas	40

1. Introdução

A doença ulcerosa péptica abrange tanto as úlceras gástricas quanto as úlceras duodenais (Malfetheriner et al., 2009). As lesões descritas como ulcerosas variam de acordo com a profundidade das erosões causadas que podem ser desde danos epiteliais superficiais até lesões mais profundas que penetram na mucosa e causam perfuração e morte (Turner, 2010; Stewart, 2011). As úlceras são caracterizadas por redução no fluxo sanguíneo local, necrose, infiltração de neutrófilos, secreção de mediadores inflamatórios e indução de estresse oxidativo (de Souza Almeida et al., 2011).

O desenvolvimento das úlceras pépticas é um processo multifatorial, que ocorre em decorrência de um desbalanço entre os fatores agressores e protetores presentes na mucosa (Choi et al., 2009; Shaker et al., 2010). Entre os agentes desencadeantes das úlceras gástricas, destacam-se o aumento da secreção de ácido clorídrico, a atividade da pepsina, redução da secreção de muco e bicarbonato, a presença da bactéria *Helicobacter pylori* e um decréscimo no fluxo sanguíneo local (Farzaei, 2015). Além disso, o aumento na incidência das úlceras (Choi et al., 2009) pode estar associado com os fatores agressores exógenos tais como a exposição da mucosa ao etanol, estresse ambiental, tabagismo, deficiências nutricionais e a ingestão frequente de medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) (Shaker et al., 2010).

Mundialmente, o consumo de etanol causa aproximadamente 3,3 milhões de mortes todo ano (5,9% de todas as mortes). É estimado que o consumo de álcool representa o terceiro maior fator de risco para doenças e é responsável pela causa de aproximadamente 60 doenças, e cofator para o desenvolvimento de pelo menos outras 200 doenças. No trato gastrointestinal, o etanol tem efeitos nocivos como dano direto à mucosa gástrica e esofágica, diminui a pressão do esfíncter, causa deficiência na motilidade e alteração da secreção gástrica (OMS, 2014; Rocco, 2014).

A lesão causada por AINE é mediada pela supressão da via das cicloxigenases (COX), bloqueando a síntese de prostaglandinas (PGs), um fator gastroprotetor que estimula secreção de muco e bicarbonato no estômago e favorece o fluxo sanguíneo na mucosa gástrica (Melcarne, 2016). Além disso, os AINEs retardam o processo de cicatrização das lesões por conta da depleção dos fatores angiogênicos como fator de crescimento epitelial (EGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Farzaei et al., 2015).

A lesão causada por I/R contribui para a mortalidade e morbidade de diversas doenças e tem grande importância em procedimentos clínicos e cirúrgicos, principalmente tratando-se do trato gastrointestinal (Mojzis et al., 2001; Yamamoto et al., 2001). A isquemia seguida de reperfusão é uma condição patológica caracterizada pela restrição inicial da irrigação sanguínea de um órgão, seguida pela restauração do fluxo sanguíneo e da oxigenação. Em sua manifestação clínica clássica, a oclusão arterial é causada por um êmbolo e resulta em um grave desequilíbrio de oferta e demanda metabólica, causando hipóxia tecidual (Eltzschig, 2011).

O trato gastrointestinal recebe aproximadamente 20% do débito cardíaco e essa quantidade aumenta para 35% durante a digestão. Três principais vasos sanguíneos irrigam o trato gastrointestinal: o tronco celíaco, artéria mesentérica superior e inferior (Cangemi e Picco, 2009).

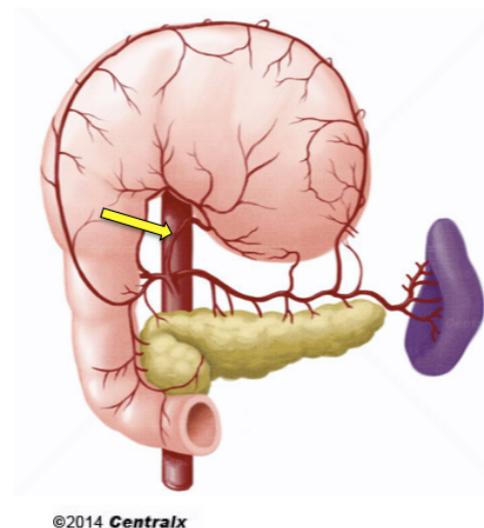


Fig. 1 – Circulação gastrointestinal. Seta indicando artéria celíaca (Centralx, 2014).

A isquemia mesentérica é comum em idosos, de difícil diagnóstico e por isso possui uma alta porcentagem de morbidade. Esse processo ocorre quando o fluxo sanguíneo no intestino é inadequado para suportar suas necessidades metabólicas basais ou elevadas, associadas à digestão (Ozden e Gurses, 2007). Essa alteração se apresenta em várias formas clínicas como: isquemia mesentérica aguda ou crônica, isquemia mesentérica não oclusiva, trombose venosa mesentérica e isquemia colônica (Cangemi e Picco, 2009).

O transplante de intestino tem se tornado uma alternativa cada vez mais viável para o tratamento da falência intestinal irreversível. Porém, neste processo o dano

causado por I/R é inevitável e pode causar prejuízos a curto e a longo prazo (Yandza et al., 2012). A lesão causada pela I/R é um importante campo de estudo quando se trata do transplante de intestino delgado por causa de suas implicações sobre a imunidade intestinal (Alessiani et al., 2014).

Nos transplantes de órgãos, o processo de I/R tem sido visto como responsável por parte da resposta imune contra o enxerto, que ocorre devido à falta de vascularização e oxigenação, o que mostra uma relação entre as respostas imunes adaptativas e a regeneração ou rejeição de órgãos (Yandza et al., 2012).

A obesidade como epidemia levou a um aumento nos procedimentos bariátricos e o processo de I/R pode ocorrer durante a cirurgia e está associado à uma das complicações pós-cirúrgicas por conta da trombose que pode ocorrer na artéria mesentérica superior (Monkhouse, 2009; Kassir et al., 2016).

O processo de I/R também está associado à uma grande taxa de mortalidade no decorrer do choque hemorrágico, hemorragia da úlcera péptica, ruptura vascular e na doença isquêmica gastrointestinal. Clinicamente, existem poucos tratamentos satisfatórios para o tratamento da injúria causada pela isquemia seguida de reperfusão (Li et al., 2009).

A hipóxia causada pelo processo de I/R leva à falha do funcionamento da bomba de cálcio, o que causa aumento do cálcio intracelular e ativação das fosfolipases, liberando ácidos graxos livres das membranas (Vajdovich, 2008). A cascata do ácido araquidônico (AA) é ativada pela fosfolipase A₂ (PLA₂) e o ácido araquidônico é metabolizado pelas cicloxigenases (COX-1 e COX-2), que produzem prostaglandinas (Medzhitov, 2008). As PGE₂ têm um papel fundamental na geração da resposta inflamatória, contribuindo para o surgimento dos sinais cardinais da inflamação: rubor, edema, calor e dor (Ricciotti e FitzGerald, 2011). A cascata do AA é modulada por citocinas como IL-1 β , TNF- α e IL-6 (Medzhitov, 2008).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) liberadas durante o processo de I/R também modulam fatores de transcrição como NF κ B em diferentes células. Essa ativação leva a expressão de várias citocinas pró-inflamatórias, (Vajdovich, 2008) caracterizando uma inflamação (Eltzschig, 2011).

O intestino e outros órgãos do trato gastrointestinal são fontes importantes de enzimas que geram grande quantidade de EROs, tornando-os mais susceptíveis à lesão causada por I/R (Granger et al., 2015).

As EROs reagem diretamente com ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares, o que acarreta numa disfunção da membrana, perda da permeabilidade seletiva, danos ao DNA e degradação de proteínas estruturais e de membrana. O malondialdeído (MDA) é o produto final metaestável da peroxidação lipídica, tendo seus níveis plasmáticos aumentados depois deste processo (Vajdovich, 2008).

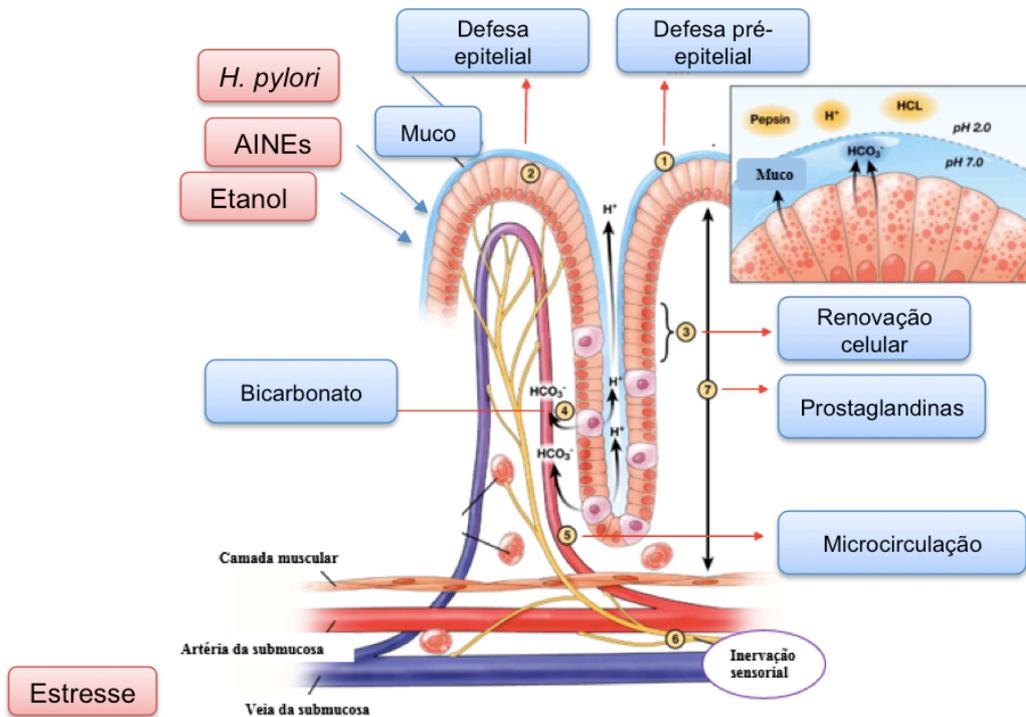


Fig. 2 – Fatores protetores e agressores da mucosa gástrica (Adaptado de Laine et al., 2008).

As células possuem defesas contra o estresse oxidativo que sequestram esses radicais livres. Essas defesas podem ser enzimáticas, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) ou não-enzimáticos como a vitamina C, E, glutatona reduzida (GSH) e carotenoides (Redza-Dutordoir, 2016).

A SOD realiza a dismutação do O_2^- e forma H_2O_2 , que é menos reativo. E a CAT e a GSH-Px convertem o H_2O_2 em água e oxigênio molecular e reduz o dano celular (Vajdovich, 2008).

A glutatona é um tripeptídeo encontrado em todos os tipos de tecido de mamíferos, porém em maior quantidade no fígado. Sua forma predominante é na forma reduzida e possui várias funções tais como detoxificar os eletrófilos, sequestrar radicais livres, manter o grupamento tiol nas proteínas, prover um reservatório de cisteína e modular processos celulares críticos, por exemplo, síntese de DNA e função imune. O

excesso de EROs pode levar à peroxidação lipídica e como consequência o dano celular. A GSH participa dos sistemas antioxidantes que sequestram EROs. Essa atuação é extremamente importante, principalmente na mitocôndria, onde não há a presença de CAT (Lu, 2009). A GSH é também cofator para formação da GPx na degradação de H_2O_2 (Monostori, 2009).

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima inflamatória encontrada em neutrófilos que atua na reação entre o H_2O_2 e o íon cloreto Cl^- . Os produtos dessa enzima modificam biomoléculas durante um processo inflamatório exacerbado, indicando que a ação da MPO pode ser benéfica ou prejudicial. Alguns fitoconstituintes inibem a atividade da MPO, o que explica a redução de algumas doenças cardiovasculares promovida pelo consumo de frutas e vegetais (Kato, 2016).

Os medicamentos usados atualmente no combate às úlceras gástricas produzem muitos efeitos adversos como fratura de ossos, aumento de susceptibilidade a infecções, infarto do miocárdio e câncer gástrico (Cheung et al, 2018). Além de não promoverem uma cicatrização efetiva da lesão, o que leva a uma alta taxa de recidiva da úlcera. Acredita-se que uma das razões da recorrência da lesão deve-se ao fato de que as úlceras cicatrizadas são precariamente vascularizadas e têm de duas a três vezes menos densidade de novos vasos sanguíneos ao redor do que o tecido normal (Szabo e Vincze, 2000).

Plantas do gênero *Terminalia* estão entre as mais usadas mundialmente na medicina popular. Várias espécies são usadas por suas propriedades microbicida, analgésica, antioxidante e anti-inflamatória (Cock, 2015).



Fig. 3 – *Terminalia catappa* (Chua, 2014?).

A *Terminalia catappa* é uma espécie da família Combretaceae e popularmente conhecida no Brasil como “amendoeira”, “amendoeira da praia”, “amendoeira-da-Índia”, “cuca”, “guarda-sol”, “castanheira da Índia”, “castanhola” e “chapéu-de-Sol”. Essa planta é amplamente distribuída em países de clima tropical e subtropical, principalmente em regiões litorâneas devido a sua habilidade de se adaptar facilmente à salinidade e aos ventos (Thomson e Evans, 2006; Anand et al., 2015).

Em Taiwan, as plantas dessa espécie são usadas no tratamento de hepatites. No Suriname essa espécie é usada no combate à disenteria e diarreia (Cock, 2015). Essa planta também está listada na Farmacopeia Caribenha para tratamento de gastrite e infecção urinária (Germosén-Robineau, 2014). Essas propriedades se devem provavelmente aos seus componentes: flavonóides, taninos, saponinas e fitoesteróis (Cock, 2015).

Estudos conduzidos por nosso grupo já mostraram o efeito gastroprotetor da fração aquosa da *Terminalia catappa* frente à lesão causada por I/R (Silva, 2015) e entre os compostos majoritários da infusão das folhas de *Terminalia catappa* (IFTC) estão fenóis (56,71 mg/g) e flavonoides (26,12 mg/g). Ainda na infusão, o teor de punicalagina encontrado foi de 19,85% (Mininel et al., 2015). Esses compostos têm sido reportados como importantes no tratamento de úlceras gástricas por atenuar processos

inflamatórios e por modular o estresse oxidativo por meios enzimáticos ou não-enzimáticos (Farzaei, 2015). Com base nas indicações populares do uso da *Terminalia catappa* e do seu efeito já comprovado em experimentos *in vivo* da fração aquosa, decidimos verificar a eficácia de sua infusão em diferentes modelos experimentais agudos (preventivos) e crônicos (curativos).

2. Objetivo

Avaliar o efeito preventivo e curativo da infusão das folhas de *Terminalia catappa* sobre lesões gástricas em modelos animais.

3. Material e Métodos

3.1. Material vegetal

As folhas de *Terminalia catappa* Linn foram coletadas na orla da praia da cidade de Santos-SP, com autorização da prefeitura, no mês de abril de 2010, e a espécie foi identificada pela equipe de botânicos da Universidade Santa Cecília sendo arquivada e registrada (M Tomaz 01) no Herbarium da Universidade Santa Cecília. Obteve-se autorização do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) sob o nº 33152 para a coleta do material.

3.2. Preparo da IFTC

As folhas de *Terminalia catappa* coletadas (524,6 g) foram submetidas ao processo de secagem em estufa a 50°C por 6 dias consecutivos. Após secagem, as mesmas foram trituradas e moídas em moinho de facas. As folhas secas pulverizadas (1 g) foram misturadas com água em ebulição MilliQ (20 mL) durante 10 min. O recipiente foi mantido fechado e deixado em repouso por 10 minutos. A mistura foi, posteriormente, filtrada em papel de filtro para remover macro-partículas e levada até a temperatura ambiente. O sobrenadante foi filtrado em membrana PTFE (Millex®) de 0,45 µm e liofilizado e armazenado.

3.3. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (200-250g) para os experimentos, provenientes do Biotério ANILAB – Paulínia (São Paulo, Brasil), aclimatados às

condições do biotério setorial por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, sob temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas controladas. Os animais foram alimentados com ração comercial Presence® e água *ad libitum*. Todos os experimentos obedeceram a protocolos experimentais aprovados, previamente, pela Comissão de Ética na Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu sob o número 907.

3.4. Modelos experimentais agudos

3.4.a. Úlceras gástricas induzidas por etanol absoluto (Robert et al., 1976 com modificações)

Ratos machos foram distribuídos em 5 grupos ($n = 7$) e submetidos a 16 horas de jejum antes de receberem uma dose oral por gavagem de veículo (salina 0,9% NaCl, 10 mL/kg), carbenoxolona (100 mg/kg) e IFTC (30, 100 e 300 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 AVsoft Bioview Spectra e as medições da lesão foram expressas como mm^2 . Amostras do tecido foram coletadas e armazenadas a -80°C para caracterizações enzimáticas.

3.4.b. Úlceras gástricas induzidas por AINE (Anti-inflamatório não esteroidal) (Guidobono et al., 1997 com modificações)

Após 16 h de jejum, os ratos dos 5 grupos experimentais ($n=7$) foram tratados com a IFTC em doses variadas (30, 100 e 300 mg/kg), com 30 mg/kg de lansoprazol ou veículo (salina 0,9%, 10 mL/kg). Todos os pré-tratamentos foram administrados via oral por gavagem. Trinta minutos após o tratamento, as lesões foram induzidas por administração oral de 10 mL/kg da Indometacina (AINE), solubilizada em Carbonato de Sódio 0,5% na dose de 50 mg/kg. Os animais foram eutanasiados 6h 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 AVsoft Bioview Spectra e expressas em mm^2 . Amostras do tecido foram coletadas e armazenadas a -80°C para caracterizações enzimáticas.

3.4.c. Indução de lesão gástrica por isquemia e reperfusão (Ueda et al., 1989 com modificações)

Os ratos foram divididos em 5 diferentes grupos (n=7) após um período de 16 horas de jejum. Logo após esse período, foram tratados via oral por gavagem com veículo, Lansoprazol (30 mg/kg) e três diferentes doses da IFTC (30, 100 e 300 mg/kg de peso corporal). Em seguida, todos os animais foram anestesiados com Ketamina (80 mg/kg) e Xilazina (8 mg/kg) (via intramuscular), a artéria celiaca foi isolada e um clamp microvascular foi aplicado nessa artéria que permaneceu ocluindo durante 60 minutos. Após o período de isquemia, o clamp foi removido e após uma hora de reperfusão, os animais foram eutanasiados e seus estômagos removidos para caracterização das áreas de lesões (mm²) e determinação de parâmetros bioquímicos.

3.5. Modelo experimental crônico

3.5.a. Indução de lesão gástrica por isquemia e reperfusão (Ueda et al., 1989 com modificações)

Os ratos foram divididos em diferentes grupos (n=7) após um período de 16 horas de jejum. Logo após, foram anestesiados com Ketamina (80 mg/kg) e Xilazina (8 mg/kg) (via intramuscular) e a artéria celiaca foi isolada. Um clamp microvascular foi colocado nessa artéria onde permaneceu durante 60 minutos. Após o período de isquemia, o clamp foi removido (reperfusão) e os animais foram suturados e devolvidos para seus respectivos ambientes. Transcorridas 24 horas da indução da lesão, os tratamentos orais por gavagem foram iniciados com veículo (salina – 0,9%), Lansoprazol (30 mg/kg) ou IFTC em três diferentes doses. Após 3 ou 6 dias de tratamentos diários, os animais foram eutanasiados e seus estômagos removidos para exame das áreas de lesões e determinação de parâmetros bioquímicos.

3.6. Caracterização de parâmetros inflamatórios e sistema Redox

A determinação dos parâmetros bioquímicos foi realizada nos modelos em que a IFTC apresentou atividade gastroprotetora ou cicatrizante para avaliar os mecanismos envolvidos nessas atividades. Para isso, as amostras de tecido de estômago foram homogenizadas com tampão específico para cada tipo de dosagem. Em todas as dosagens foi incluído um grupo de animais denominado Branco que não sofreu indução de lesão, e para o modelo de I/R que envolve procedimento cirúrgico, foi incluído o

grupo Sham, de animais que foram submetidos à laparotomização sem indução de lesão. Esses grupos foram incluídos para indicar os níveis basais de cada parâmetro.

3.6.a. Determinação da atividade da Mieloperoxidase (MPO)

A determinação da atividade da MPO, um importante marcador da infiltração de neutrófilos, foi realizada pelo método de Krawisz et al. (1984). Amostras de tecido do estômago, mantidas a -80°C , foram solubilizadas com brometo hexadeciltrimetilamônio e a atividade da MPO foi medida por meio de um ensaio com O-dianisidina, substrato da peroxidase. A atividade da MPO é proporcional ao número de neutrófilos infiltrados na mucosa gástrica. O tampão HTAB atua como detergente lisando os grânulos dos neutrófilos que contém a enzima, que então é liberada. A atividade enzimática se determina seguindo a cinética da reação da enzima com água oxigenada do tampão de reação, sendo que 1 Unidade de mieloperoxidase determinada é capaz de degradar 1 mmol/minuto de água oxigenada a 25°C . Os resultados foram expressos como unidade de MPO/g de tecido.

3.6.b. Quantificação de malondialdeído (MDA)

A peroxidação lipídica foi determinada pelo método de Ohkawa et al. (1979), medindo-se a reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com amostras de tecido estômago. 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 TBA 0,8% diluído em ácido acético 20% e 400 μL de amostra para a reação colorimétrica. A concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi medida a 532 nm, e os resultados foram expressos em nmols de MDA/g de tecido.

3.6.c. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD) (Winterbourn et al., 1975)

As amostras de tecido gástrico foram diluídas em tampão fosfato, na proporção 1:20. Em 100 μl do homogenato foram adicionados 150 μl da solução de hipoxantina (0,1mM), xantina oxidase (0,07U) e nitrobluetetrazolium (NBT – 0,6mM). A determinação da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 560 nm. Os resultados foram expressos como unidade de SOD/g de tecido.

3.6.d. Quantificação de catalase (CAT) (Aebi, 1984)

Sobre a amostra do homogenato da mucosa do estômago foi adicionada uma solução de H_2O_2 (0,01 mol em tampão fosfato salino, PBS, 0,05 mol a pH 7). A determinação da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. Os resultados foram expressos em unidade de catalase/minuto x g tecido.

3.6.e. Determinação de Glutathiona Reduzida (GSH) (Anderson, 1985)

O conteúdo de glutathiona reduzida foi determinado utilizando-se 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB). A reação enzimática é constituída de 20 μ l da amostra, 140 μ l de NADPH, 5 μ l de PBS e 20 μ l DTNB. A absorbância foi determinada em 412 nm utilizando-se um espectrofotômetro. Os resultados foram expressos como nmol/g de tecido.

3.6.f. Quantificação de Prostaglandinas E_2

Estômagos foram homogeneizados em tampão fosfato com coquetel inibidor de protease. As concentração de PGE_2 foi determinada pelas técnicas imunoenzimáticas com Kit R&D systems (Minneapolis, EUA). A determinação da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 450 nm. Os resultados foram expressos como pg de PGE_2 /mL de homogenato de tecido.

3.6.g. Quantificação de TNF- α

Estômagos foram homogeneizados em tampão fosfato. A concentração de TNF- α foi determinada pela técnica imunoenzimática com Kit R&D systems (Minneapolis, EUA). A determinação da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 450 nm. Os resultados foram expressos como pg de TNF- α /mL de homogenato de tecido.

3.6.h. Quantificação de IL-1 β

Estômagos foram homogeneizados em tampão fosfato. A concentração de IL-1 β foi determinada pela técnica imunoenzimática com Kit R&D systems (Minneapolis, EUA). A determinação da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 450 nm. Os resultados foram expressos como pg de IL-1 β /mL de homogenato de tecido.

3.7. Análise estatística

Os resultados foram expressos na forma de média \pm erro padrão médio (e.p.m) dos parâmetros obtidos. Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste de Dunnett para comparar o grupo veículo com os demais grupos, com nível de significância mínimo de $p < 0,05$.

4. Resultados e Discussão

4.1. Lesão gástrica induzida por etanol

O consumo agudo e crônico de álcool afeta o trato gastrointestinal tanto diretamente, com o contato do etanol com a mucosa gástrica, quanto indiretamente com o contato de metabólitos como o acetaldeído, que altera a produção e secreção de muco. O etanol causa edema, hemorragia e necrose na mucosa gástrica, prejudicando sua capacidade de defesa contra o ácido gástrico e enzimas digestivas (Rocco, 2014). O etanol causa decréscimo nas concentrações de grupamentos sulfidrílicos no conteúdo da mucosa gástrica (Gardès-Albert et al., 1993), induz morte celular por apoptose (Hoshino et al., 2002), provoca peroxidação lipídica e diminuição dos níveis de GSH (Das et al., 2012).

Neste modelo experimental agudo, testamos o efeito preventivo da IFTC contra a formação de lesões induzidas por etanol. E podemos ver que a Carbenoxolona na dose de 100 mg/kg, usada como controle positivo, apresentou atividade gastroprotetora. A Carbenoxolona aumenta a secreção de muco no estômago, protegendo contra o agente lesivo. Entretanto, o tratamento prévio com diferentes doses de IFTC não foi capaz de reduzir significativamente a área de lesão quando comparamos com o grupo de animais tratado com o veículo, controle negativo (Fig. 3).

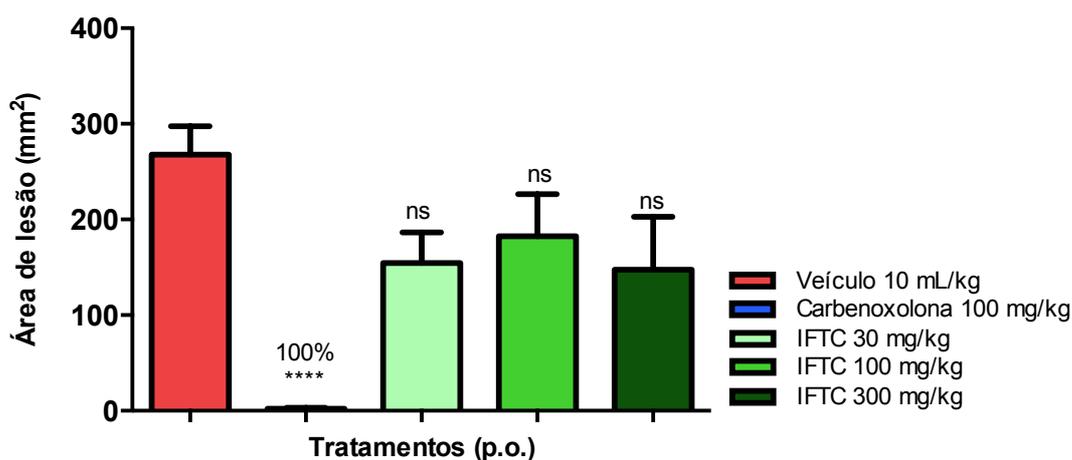


Fig. 4 – Avaliação do efeito gastroprotetor da IFTC em lesões gástricas induzidas por etanol em ratos. Os resultados foram expressos na forma de média \pm e.p.m (n=7-8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett, **** p< 0,0001.

4.2. Lesão gástrica induzida por anti-inflamatório não esteroidal (AINE)

Os AINEs são amplamente usados para tratar inflamações, febres e dores e são divididos em inibidores de COX não seletivos e inibidores seletivos de COX-2. Estudos tem mostrado que pacientes tratados com inibidores não seletivos de COX apresentam um maior risco de ter úlceras no trato gastrointestinal (Cheng, 2017).

A COX-1 regula a síntese de prostaglandinas que estão envolvidas na gastroproteção e são responsáveis por manter a integridade da mucosa gástrica. A inibição da COX também aumenta a produção de leucotrienos, que tem um papel importante no processo inflamatório da lesão gástrica. A inibição da COX-2, por sua vez dificulta a cicatrização efetiva da lesão pois inibe fatores angiogênicos e aumentam o risco de hemorragias (Melcarne, 2016).

Além da inibição de um fator gastroprotetor, a indução de úlcera por AINE promove a geração de EROs, induz aumento de peroxidação lipídica, inibe enzimas de sistemas antioxidantes como GPx, glutathiona redutase, CAT e SOD. Além disso, os AINEs inibem a angiogênese via supressão de VEGF e EGF e desfavorecem a restituição celular da mucosa ao promover degradação da matriz extracelular via supressão de metaloproteinases de matriz (Cheng, 2017).

O Lansoprazol, medicamento usado como controle positivo neste modelo experimental, é usado atualmente no tratamento de lesões gástricas e inibe a secreção gástrica, reduzindo os danos causados pelos agentes lesivos. Porém, o uso crônico dessa

classe de medicamentos tem sido associada ao desenvolvimento de câncer gástrico em estudos recentes (Cheung, 2018).

Nas figuras 5 e 6 podemos observar que o tratamento prévio dos animais com Lansoprazol, medicamento usado como controle positivo, inibiu a formação de lesão em 100%. Entretanto, a dose de 30 mg/kg de IFTC aumentou 2,9 vezes a lesão e a dose de 300 mg/kg diminuiu 72% a área de lesão quando comparamos com o grupo tratado com veículo (controle negativo).

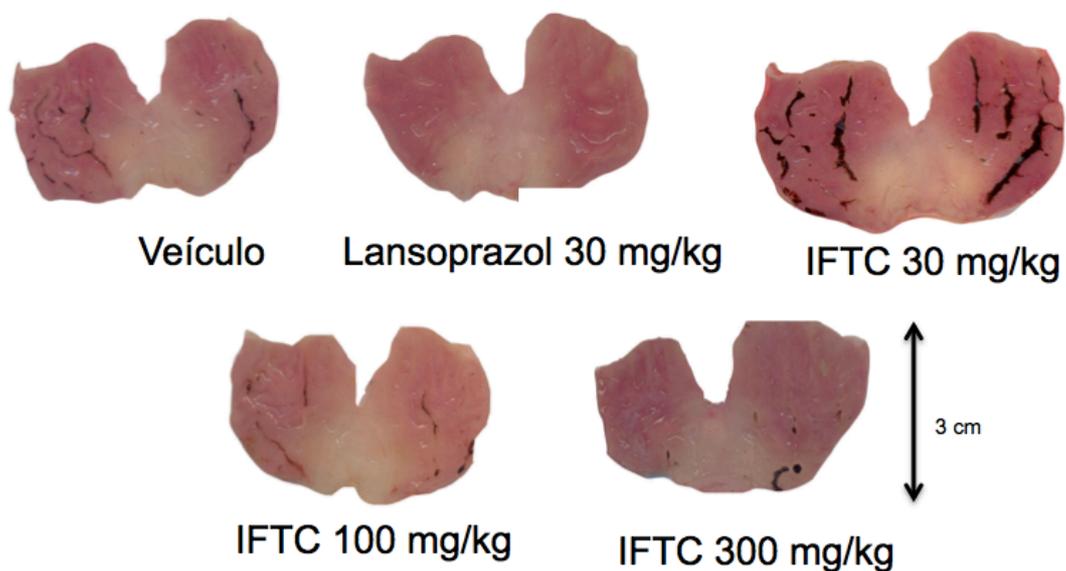


Fig. 5 – Lesões gástricas induzidas por Indometacina e submetidas à diferentes tratamentos.

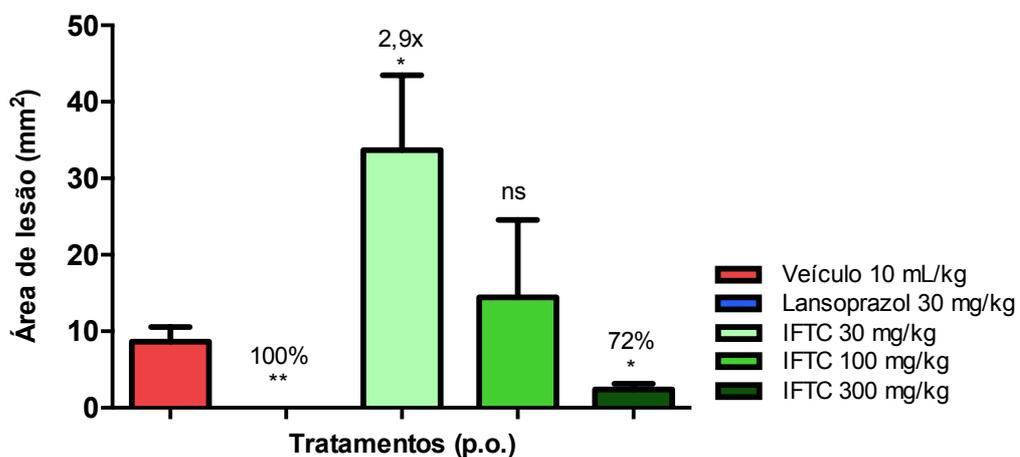


Fig. 6 – Avaliação do efeito gastroprotetor da IFTC em lesões gástricas induzidas por AINE em ratos. Os resultados foram expressos na forma de média \pm e.p.m (n=7-8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Para investigar os mecanismos envolvidos no efeito dual produzido pela administração da IFTC, avaliamos também seu efeito sobre a MPO, enzima usada como marcador de inflamação. Como podemos ver na figura 7, apenas os animais do grupo Branco, que não sofreram indução de lesão, apresentaram níveis reduzidos de MPO, mostrando o envolvimento da infiltração de neutrófilos na geração da lesão. Porém a IFTC não participou na modulação do processo inflamatório gerado pela administração de Indometacina.

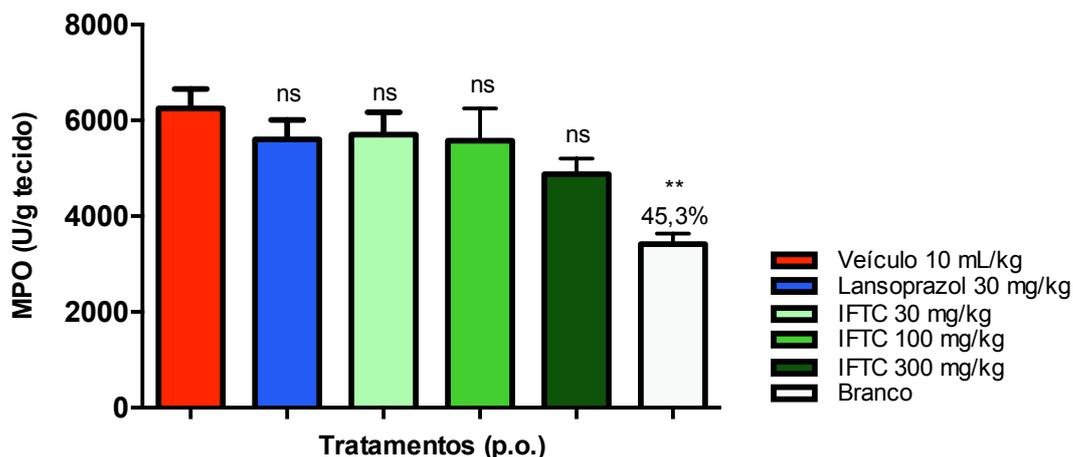


Fig. 7 – Avaliação do efeito da IFTC sobre a atividade da MPO no estômago de animais submetidos ao modelo de úlcera gástrica induzida por AINE. Os resultados foram expressos na forma de média \pm e.p.m (n=7-8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett, ** $p < 0,01$.

Alguns fitoquímicos possuem a capacidade de sequestrar radicais livres, porém essa ação não possui muita relevância *in vivo* comparada aos sistemas enzimáticos já existentes. Alguns sistemas antioxidantes podem sofrer modulação por produtos naturais (Gibellini, 2015) então quantificamos o MDA que é produto de peroxidação lipídica. Avaliamos também a atividade de enzimas antioxidantes como a SOD e a CAT, e quantificamos a GSH, usada como substrato para a GPx, outra enzima antioxidante.

Na figura 8 podemos ver que não há diferença na quantificação do produto final da peroxidação lipídica (MDA) entre os grupos de animais que receberam diferentes

tratamentos. O grupo que sofreu indução de lesão também não apresentou diferença significativa em relação ao grupo branco, o que mostra que apesar das EROs geradas no momento da indução da lesão, este processo está mais relacionado ao processo inflamatório do que ao estresse oxidativo.

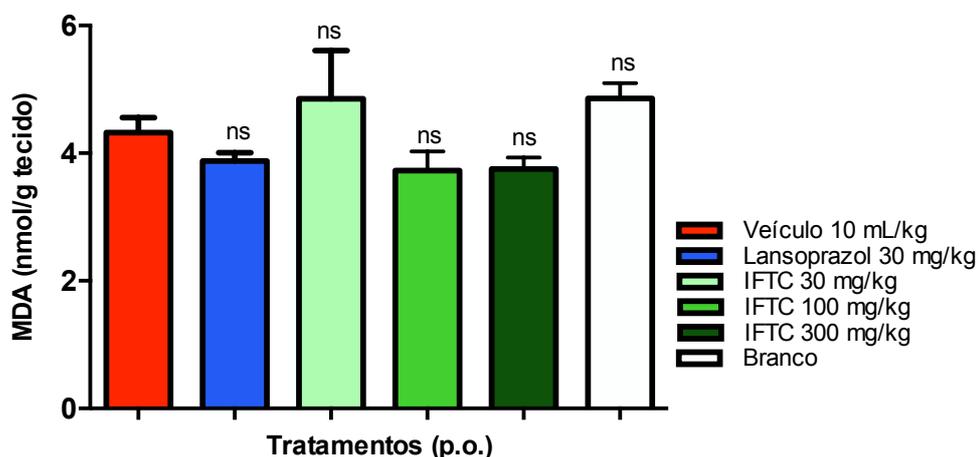


Fig. 8 - Avaliação do efeito da IFTC sobre a produção de MDA no estômago de animais submetidos ao modelo de indução de úlcera por AINE. Os resultados foram expressos na forma de média \pm e.p.m (n=7-8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett.

Como podemos ver nas figuras 9, 10 e 11, não houve alteração em nenhum dos sistemas antioxidantes endógenos diante do pré-tratamento com a IFTC.

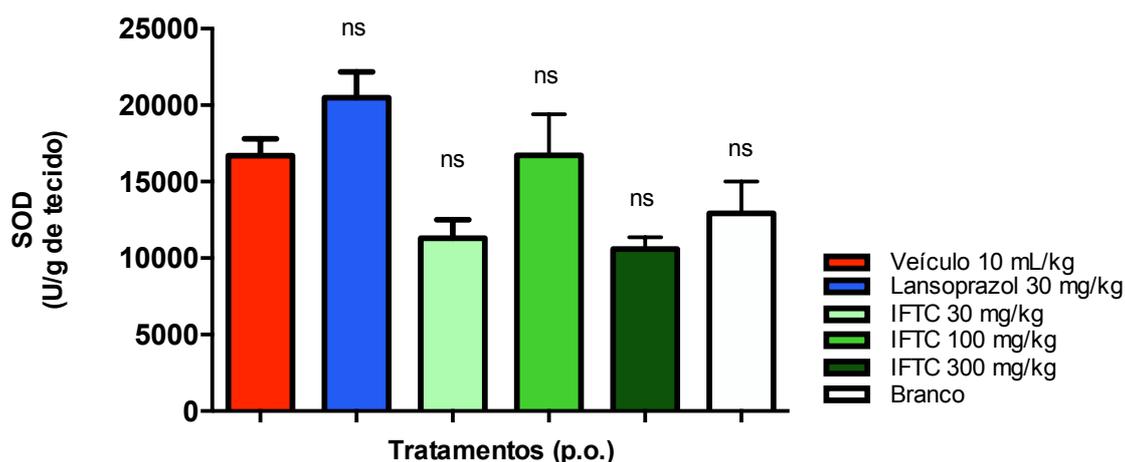


Fig. 9 – Avaliação do efeito da IFTC sobre a atividade da SOD no estômago de animais submetidos ao modelo de úlcera gástrica induzida por AINE. Os resultados foram expressos na forma de média \pm e.p.m (n=7-8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett.

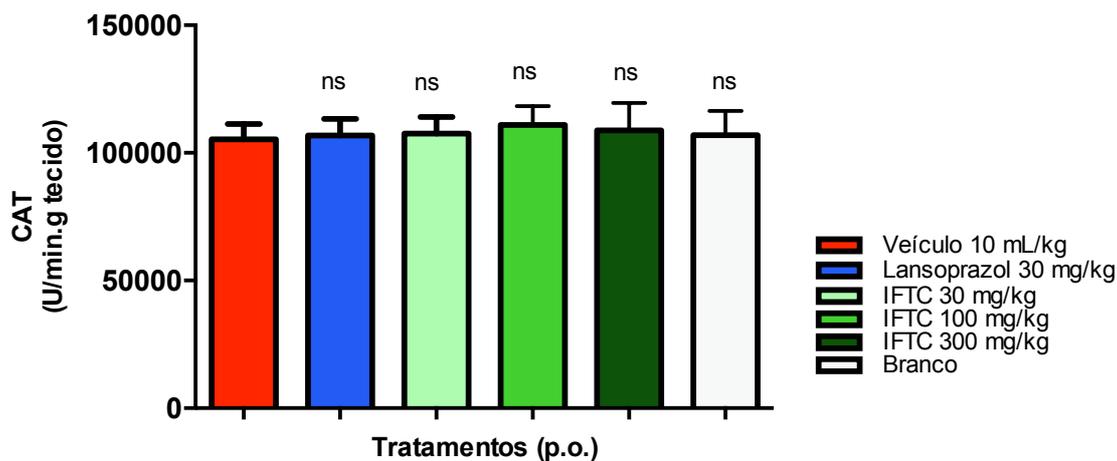


Fig. 10 – Avaliação do efeito da IFTC sobre a atividade da CAT no estômago de animais submetidos ao modelo de úlcera gástrica induzida por AINE. Os resultados foram expressos na forma de média \pm e.p.m (n=7-8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett.

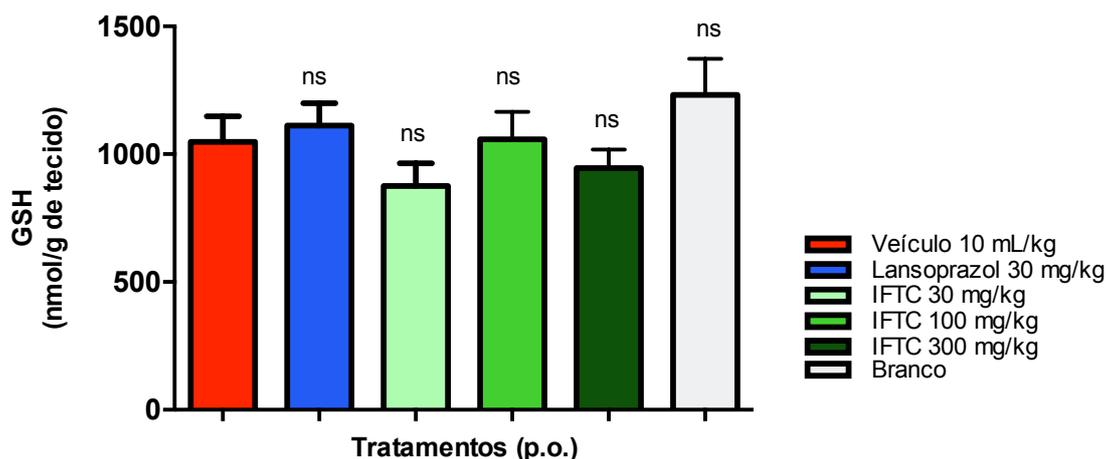


Fig. 11 – Avaliação do efeito da IFTC sobre os níveis de GSH no estômago de animais submetidos ao modelo de úlcera gástrica induzida por AINE. Os resultados foram expressos na forma de média \pm e.p.m (n=7-8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett.

Visto que a IFTC não alterou os níveis de marcadores de inflamação e de lipoperoxidação neste modelo experimental e não exerce nenhuma alteração sobre a atividade de enzimas antioxidantes, quantificamos também os níveis de PGE₂, que tem papel gastroprotetor. A PGE₂ tem sua liberação inibida no momento em que a lesão é induzida pelo AINE, um dos fatores que promovem a lesão. Como podemos ver na figura 12, a via da PGE₂ não está envolvida na gastroproteção promovida pela maior dose, nem no agravamento da lesão causada pela menor dose. Podemos observar

também que o grupo de animais que não sofreram indução de lesão manteve os níveis de PGE₂, o que mostra claramente a inibição do fator protetor neste modelo.

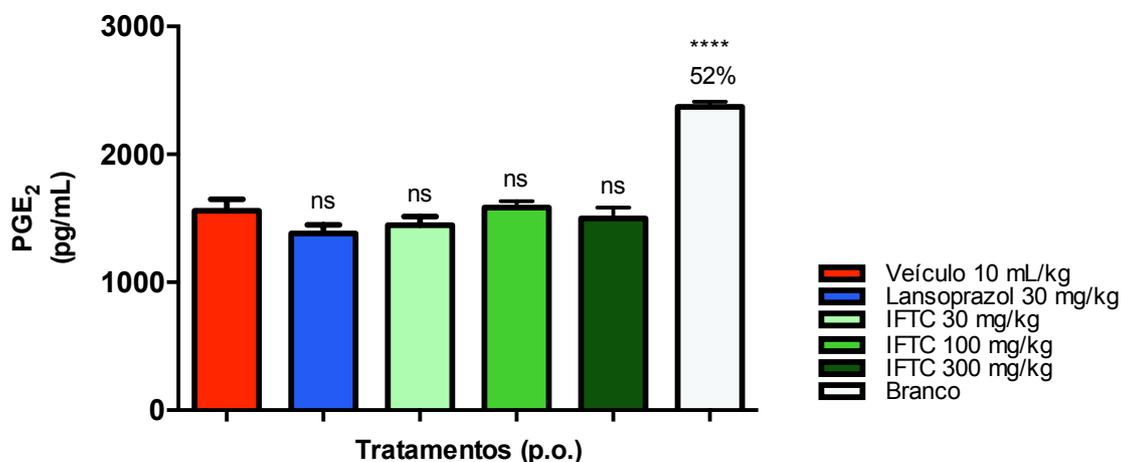


Fig. 12 – Avaliação do efeito da IFTC sobre a produção de PGE₂ no estômago de animais submetidos ao modelo de gástrica induzida por AINE. Os resultados foram expressos na forma de média ± e.p.m (n=7-8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett, *****p*<0,0001.

Polifenóis como taninos e flavonoides, presentes em grande quantidade nesta planta possuem uma grande quantidade de radicais hidroxila (OH), que aumentam seu potencial de sequestrar radicais livres, mas também produz peróxido de hidrogênio, que é prejudicial à célula (Gibellini, 2015). Apesar desse potencial, o tratamento com IFTC não exerceu atividade sobre o estresse oxidativo no tecido. Além disso, as propriedades pró ou antioxidantes dos flavonoides dependem do ambiente em que estão inseridos, o que pode explicar o efeito dual da planta (Baldim, 2017).

4.3. Lesão gástrica induzida por isquemia e reperfusão

Isquemia e reperfusão é uma condição patológica caracterizada por uma restrição do suprimento sanguíneo seguida de um restabelecimento da perfusão, e consequentemente, reoxigenação do tecido. Em sua manifestação clássica, a oclusão da artéria ocorre por um êmbolo e resulta em um desbalanço severo entre a demanda e a oferta metabólica, causando hipóxia. O reestabelecimento do suprimento sanguíneo possui uma resposta paradoxal (Eltzschig, 2011). O processo de isquemia implica na inibição do fluxo de elétrons na cadeia respiratória, impedindo a fosforilação oxidativa, o que diminui os níveis de ATP. Essa diminuição é acentuada pela hidrólise de ATP necessária para manter o potencial de membrana na membrana mitocondrial. O metabolismo anaeróbico leva ao acúmulo de prótons e lactato, abaixando o pH da

célula. A recaptção de Ca^{2+} pelo retículo endoplasmático diminui e leva ao aumento do Ca^{2+} intracelular, o que resulta na fragmentação da mitocôndria e acúmulo de ácidos graxos na célula. Esse acúmulo de ácidos graxos intracelular contribui para o início do processo inflamatório (Gesslbauer, 2017). O aumento do cálcio intracelular também leva ao inchaço e ruptura celular por mecanismos necróticos, apoptóticos e autofágicos. E, embora os níveis de oxigênio sejam restaurados durante a reperfusão, há geração de espécies reativas de oxigênio e os neutrófilos pró-inflamatórios infiltram nos tecidos isquêmicos para exacerbar a lesão (Kalogeris, 2012).

4.3.a. Lesão induzida por isquemia e reperfusão – modelo agudo

No modelo agudo de isquemia e reperfusão houve uma redução nas médias da área de lesão dos animais tratados com lansoprazol e IFTC nas doses de 100 e 300 mg/kg, porém essa redução não foi estatisticamente significativa (Figuras 13 e 14). Para verificar se há algum mecanismo envolvido na redução dessas hiperemias, quantificamos os possíveis parâmetros envolvidos. Apesar do grande desvio padrão identificado na análise das áreas de lesão, a quantificação destes parâmetros poderia ser um indicativo de maior sensibilidade para evidenciar essa redução na área de lesão dos grupos previamente tratados com Lansoprazol e a dose de 300 mg/kg de IFTC. Como podemos evidenciar na figura 15, o tratamento dos animais com a dose de 300 mg/kg de IFTC foram efetivos na redução da atividade da MPO. Portanto, esses resultados demonstram que a IFTC possui ação anti-inflamatória na mucosa gástrica. Entretanto, a infusão não possui uma ação gastroprotetora via redução da peroxidação lipídica (Figura 16) ou ativação dos sistema antioxidante relacionado à atividade da SOD, CAT e GSH como evidenciado nas figuras 17, 18 e 19.

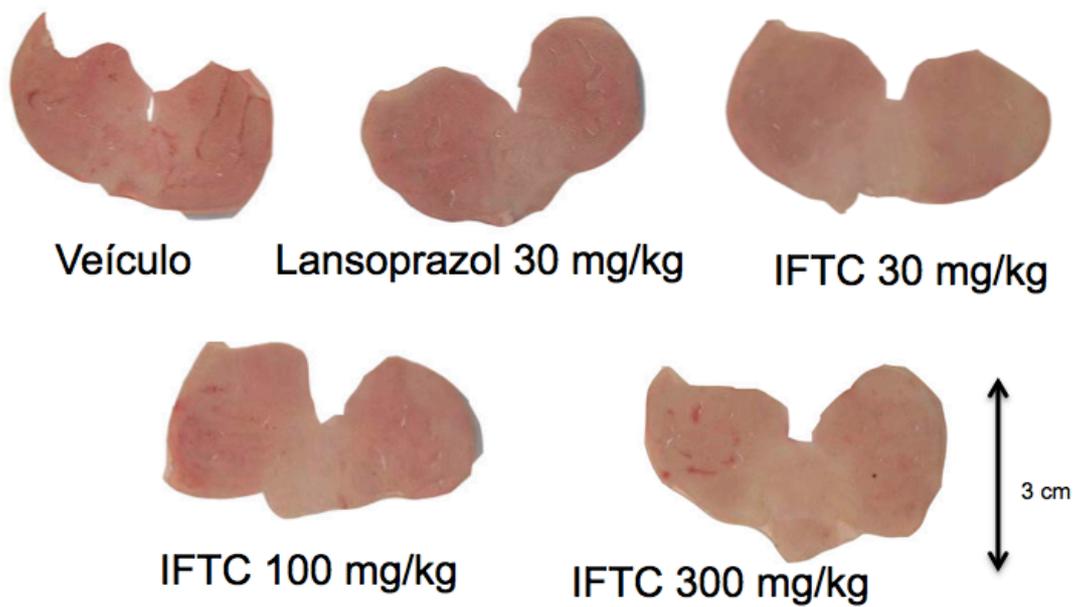


Fig. 13 – Lesões gástricas induzidas por I/R e submetidas à diferentes tratamentos.

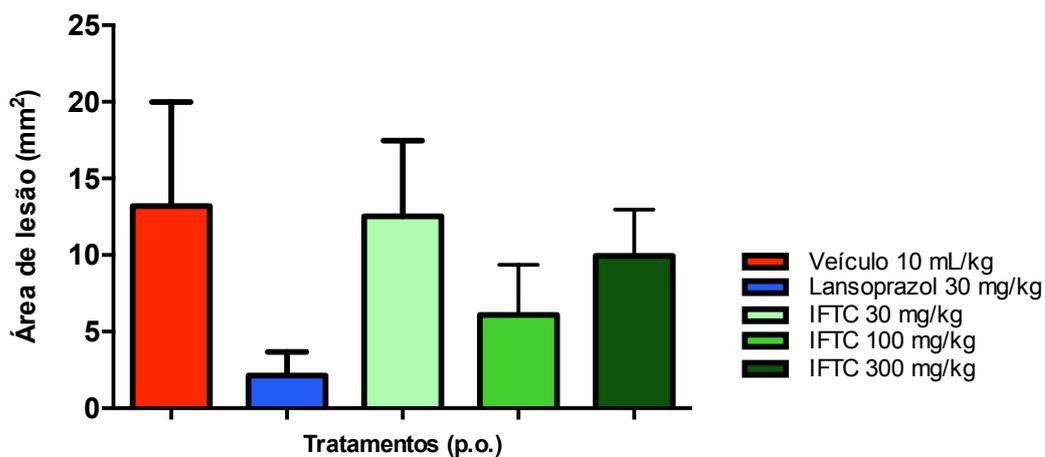


Fig. 14 – Avaliação do efeito gastroprotetor da IFTC em lesões gástricas induzidas por I/R em ratos. Os resultados foram expressos na forma de média \pm e.p.m (n=7-8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett.

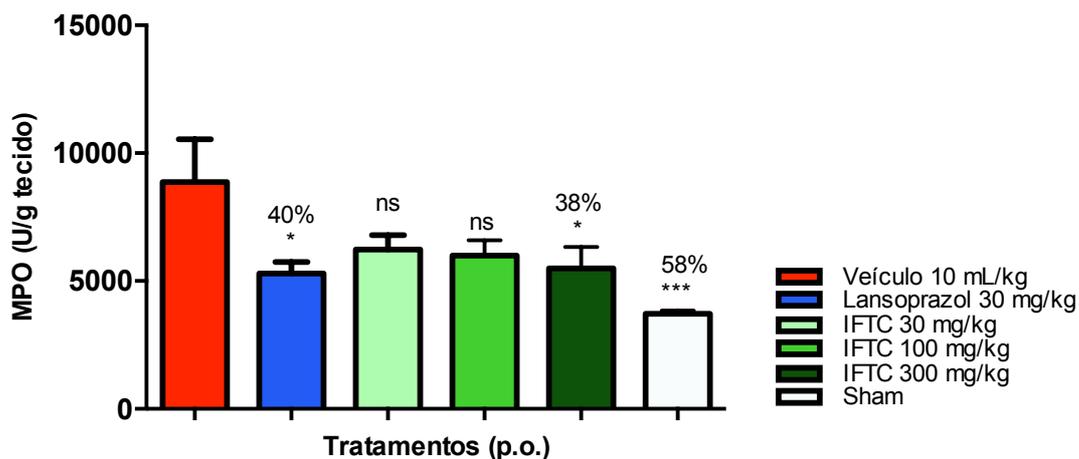


Fig. 15 – Avaliação do efeito da IFTC sobre a atividade da MPO no estômago de animais submetidos ao modelo de lesão gástrica induzida por I/R. Os resultados foram expressos na forma de média \pm e.p.m (n=7-8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett, * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

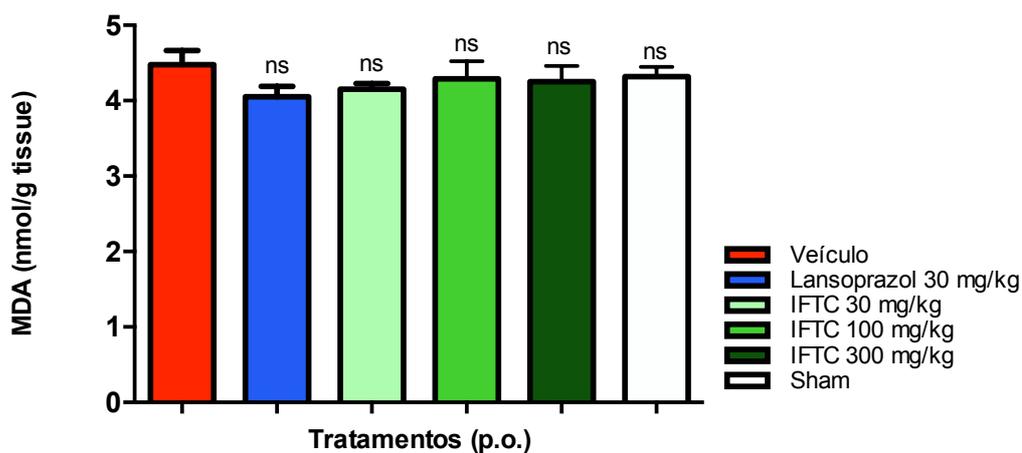


Fig. 16 – Avaliação do efeito da IFTC sobre a produção de MDA no estômago de animais submetidos ao modelo de lesão gástrica induzida por I/R. Os resultados foram expressos na forma de média \pm e.p.m (n=7-8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett.

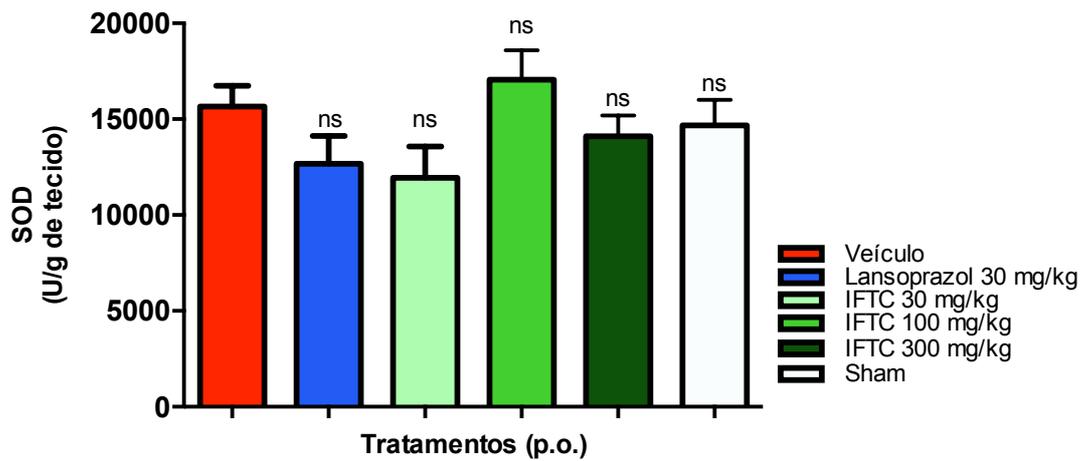


Fig. 17 – Avaliação do efeito da IFTC sobre a atividade da SOD no estômago de animais submetidos ao modelo de lesão gástrica induzida por I/R. Os resultados foram expressos na forma de média \pm e.p.m (n=7-8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett.

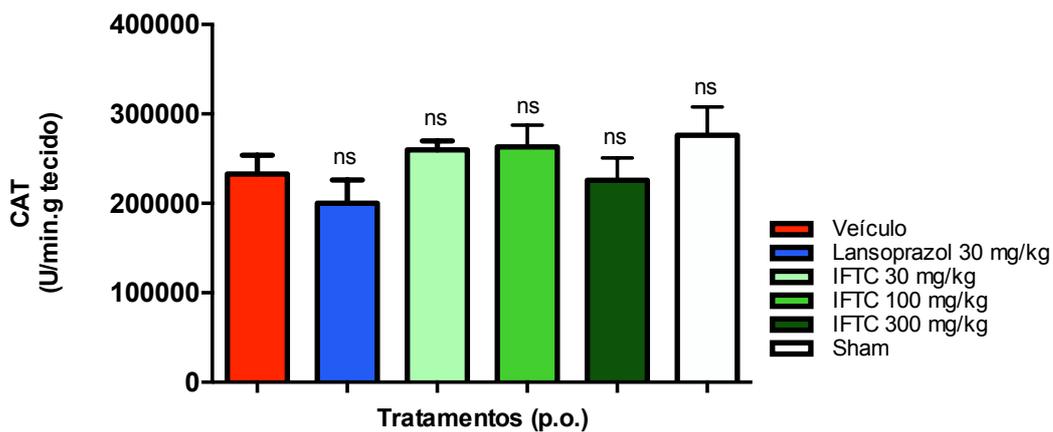


Fig. 18 – Avaliação do efeito da IFTC sobre a atividade da CAT no estômago de animais submetidos ao modelo de lesão gástrica induzida por I/R. Os resultados foram expressos na forma de média \pm e.p.m (n=7-8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett.

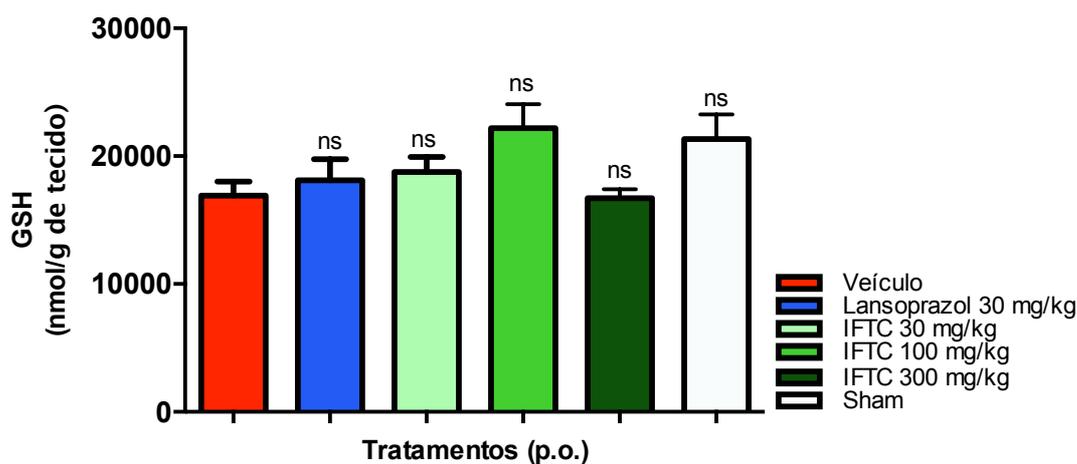


Fig. 19 – Avaliação do efeito da IFTC sobre os níveis de GSH no estômago de animais submetidos ao modelo de lesão gástrica induzida por I/R. Os resultados foram expressos na forma de média \pm e.p.m (n=7-8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett.

4.3.b. Lesão gástrica induzida por isquemia e reperfusão – modelo crônico

Considerando os resultados obtidos pelo tratamento com IFTC de forma aguda, optamos por dar continuidade nos estudos da infusão para caracterizar sua ação curativa, na qual a lesão por I/R é realizada previamente e posteriormente realizamos o tratamento para avaliar a capacidade da planta de reverter o quadro de lesão mucosa. Neste modelo, os animais passaram pela cirurgia para indução da lesão por isquemia e reperfusão e após 24 horas, começaram os tratamentos com veículo, Lansoprazol 30 mg/kg e as três diferentes doses da IFTC durante 3 ou 6 dias.

As figuras 20 e 21 mostram a área de lesão nos estômagos dos animais após 3 dias de tratamento. As doses de 30 e 100 mg/kg reduziram as lesões em 95 e 89% respectivamente. Essa redução é acompanhada pela diminuição da MPO (figura 23), enzima usada como marcador de processo inflamatório. Enquanto o Lansoprazol, medicamento usado atualmente para o tratamento de lesões gástricas e usado como controle positivo neste modelo experimental, não exerceu redução significativa da área de lesão ou dos níveis de MPO.

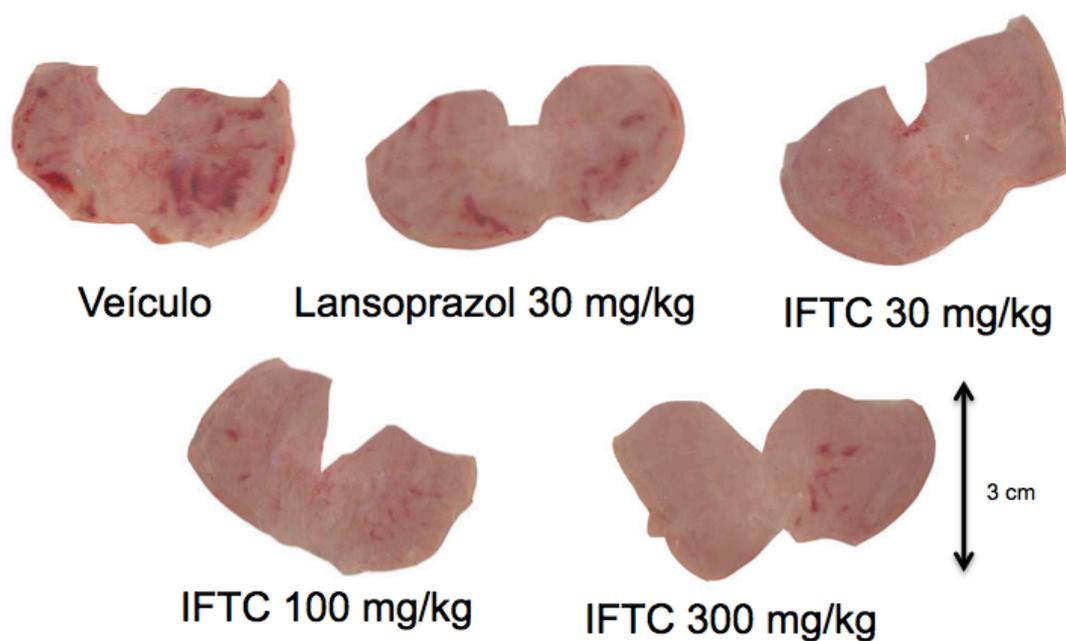


Fig. 20 – Lesões gástricas induzidas por I/R após 3 dias de tratamento.

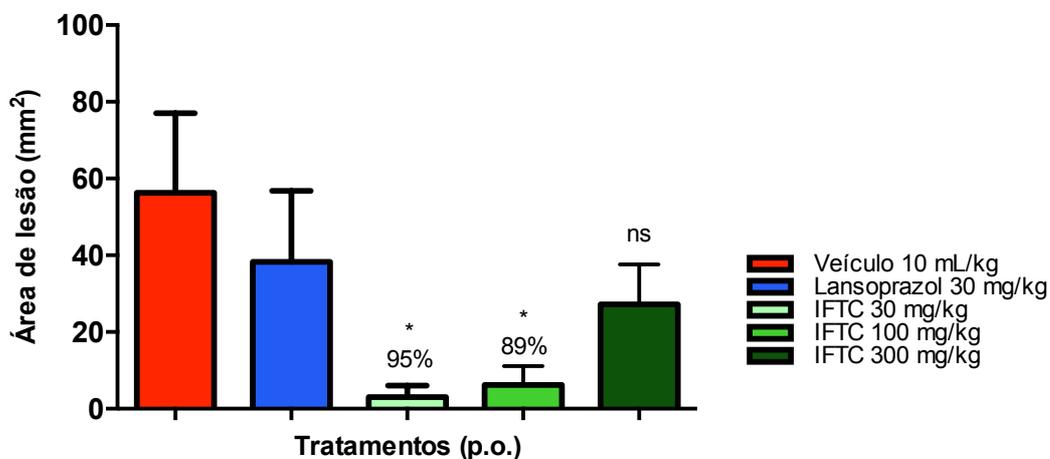


Fig. 21 – Avaliação do efeito curativo da IFTC em lesões gástricas induzidas por I/R em ratos após 3 dias de tratamento. Os resultados foram expressos na forma de média \pm e.p.m (n=7-8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett $*p < 0,05$.

Na figura 22 são apresentadas as áreas de lesão gástrica dos diferentes grupos tratados com Lansoprazol e IFTC em diferentes doses. É possível evidenciar que após 6 dias da indução da lesão por I/R houve uma expressiva redução da área de lesão em todos os grupos, inclusive dos animais tratados somente com o veículo. Esses resultados demonstram que após 6 dias do processo de I/R há uma recuperação própria do epitélio gástrico frente ao efeito deletério do procedimento em relação aos animais tratados por

3 dias. Esse fato também pode ser evidenciado quando quantificamos a atividade da MPO (figura 23) que retornou aos níveis basais no grupo veículo, o que indica que há uma redução do processo inflamatório independente de tratamento após esse período.

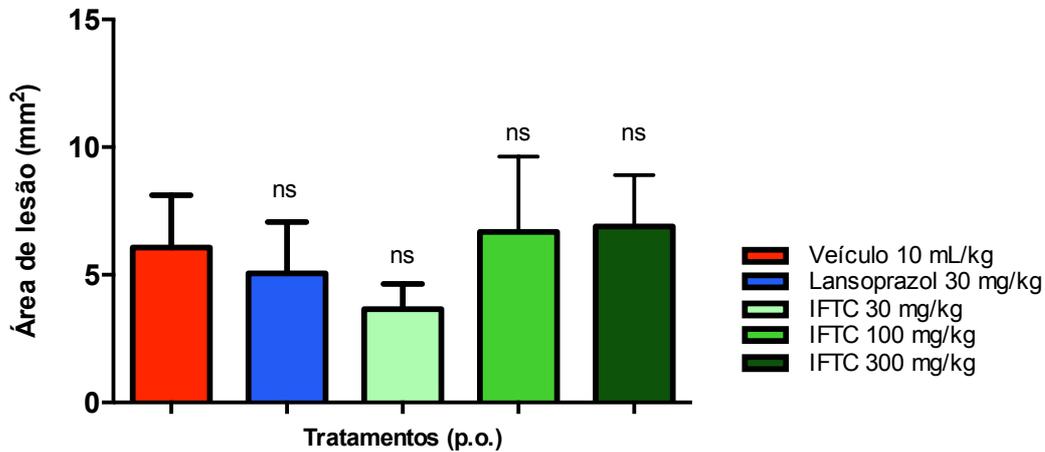


Fig. 22 – Avaliação do efeito curativo da IFTC em lesões gástricas induzidas por I/R em ratos após 6 dias de tratamento. Os resultados foram expressos na forma de média \pm e.p.m (n=7-8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett.

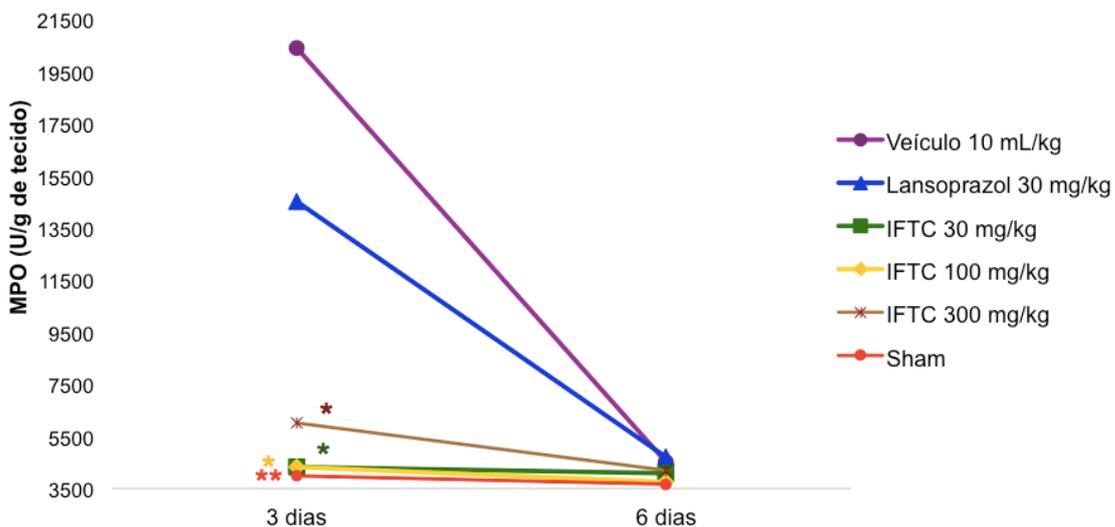


Fig. 23 – Avaliação do efeito da IFTC sobre a atividade da MPO no estômago de animais submetidos ao modelo de lesão gástrica induzida por I/R após 3 e 6 dias de tratamento. Os resultados foram expressos na forma de média (n=7-8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

A geração de espécies reativas de oxigênio é a principal fonte de dano celular no processo de I/R e apesar da proposta inicial do estudo ter sido baseada no potencial antioxidante das moléculas presentes na *Terminalia catappa*, o efeito da infusão dessa planta sobre a lesão causada por I/R não envolve a atuação dos sistemas antioxidantes mas uma atuação relacionada a sua ação anti-inflamatória. Esse tipo de lesão depende intensamente do processo inflamatório durante a isquemia, além disso, no momento da reperfusão, há liberação de várias citocinas por macrófagos e mastócitos, como TNF- α e IL-1 β (Granger, 2015), o que explica o maior dano na mucosa gástrica depois de 3 dias em relação aos animais que passaram por uma hora de reperfusão.

Para investigar os mecanismos envolvidos na atividade cicatrizante da IFTC após 3 dias de tratamento, quantificamos as citocinas envolvidas no processo inflamatório que ocorre durante o período de reperfusão.

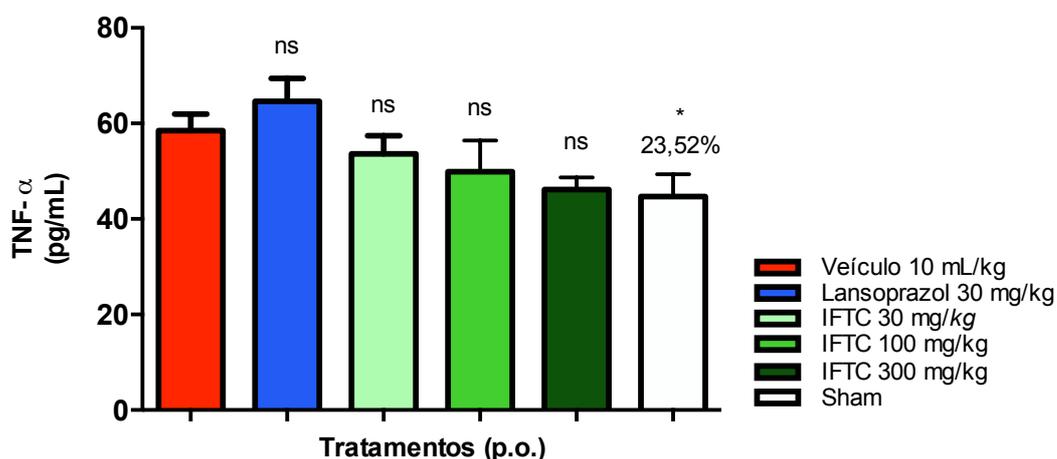


Fig. 24 – Avaliação do efeito da IFTC sobre a produção de TNF- α no estômago de animais submetidos ao modelo de gástrica induzida por I/R. Os resultados foram expressos na forma de média \pm e.p.m (n=7-8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA com teste *t* de Student *a posteriori*, * $p < 0,05$.

Na figura 24, verificamos a diferença de 23% na concentração de TNF- α entre os animais tratados com veículo e os animais do grupo Sham. Os grupos tratados com diferentes doses de IFTC não apresentaram uma redução das médias dos níveis de TNF- α em relação ao grupo tratado com veículo. Este resultado mostra que não há envolvimento da via do TNF- α na ação cicatrizante da IFTC.

Ao avaliarmos o envolvimento da IL-1 β na cicatrização exercida pela IFTC vimos que não há diferença entre os diferentes tratamentos e o grupo tratado com veículo (Figura 24).

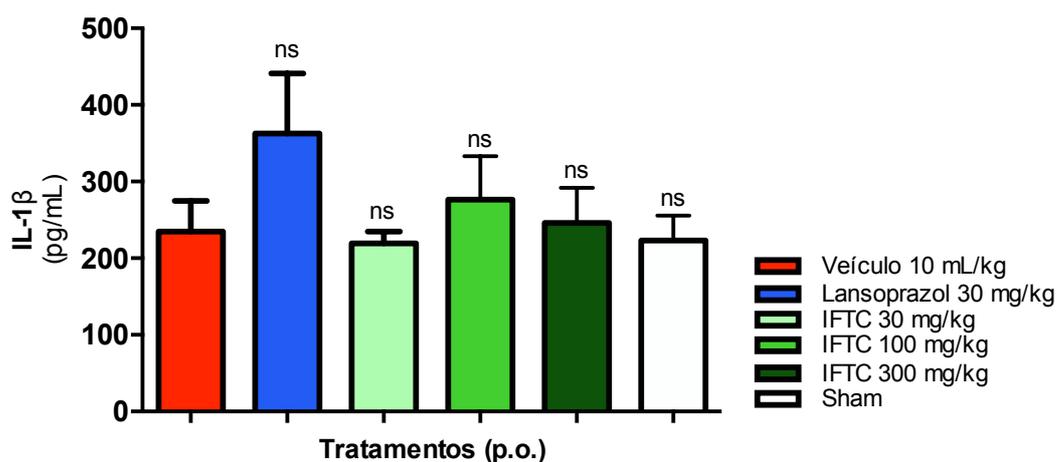


Fig. 25 – Avaliação do efeito da IFTC sobre a produção de IL-1 β no estômago de animais submetidos ao modelo de gástrica induzida por I/R. Os resultados foram expressos na forma de média \pm e.p.m (n=7-8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett.

Gesslbauer e Bochkov mostraram em seu estudo de 2017 que o uso isolado de antioxidantes tem sido insuficientes clinicamente para tratar desequilíbrios causados por estresse oxidativo na lesão causada por I/R, e por isso deve-se buscar terapias com outros alvos como o que foi encontrado neste estudo. Portanto, com base nos resultados obtidos da ação anti-inflamatória da IFTC, os próximos passos deste estudo envolvem a caracterização da ação da IFTC sobre as citocinas anti-inflamatórias e sobre a expressão de NF- κ B, que regula expressão de outros mediadores inflamatórios e tem sido reportado como importante alvo de ação de plantas do gênero *Terminalia*.

5. Conclusão

Nesse trabalho foi possível demonstrar que o tratamento prévio com a infusão de *Terminalia catappa* não é capaz de prevenir as lesões gástricas de agentes lesivos como etanol ou AINE. Entretanto, o tratamento preventivo e curativo com a IFTC é capaz de reduzir a lesão na mucosa gástrica lesionada por I/R, principalmente com 3 dias de tratamento, em que houve redução das áreas de lesões e do marcador inflamatório MPO.

6. Referências bibliográficas

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* v. 105 p. 121-126, 1984.
- ALESSIANI, M. et al. The “Pavia Model” of Experimental Small Bowel Transplantation in Pigs: Technical Variations for Ischemia Reperfusion Injury Studies. *Transplantation Proceedings.* v. 46 p. 2143-2145, 2014.
- ANAND, A. V. et al. An updated review of Terminalia catappa. *Pharmacognosy Reviews.* v. 9 p. 93-98, 2015.
- ANDERSON, M. E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in enzymology.* v. 113 p. 548-555, 1985.
- BALDIM, J.L. et al. The Correlation between Chemical Structures and Antioxidant, Prooxidant, and Antitrypanosomatid Properties of Flavonoids. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* p. 1-12, 2017.
- CANGEMI, J.R.; PICCO, M. F. Intestinal Ischemia in the Elderly. *Gastroenterol Clin N Am.* v. 38 p. 527–540, 2009.
- CENTRALX. Circulação gastrointestinal. Disponível em <<http://www.atlasdocorpopohumano.com/p/imagem/arteria-celiaca>>
- CHENG, Y-T. et al. Phytochemicals enhance antioxidant enzyme expression to protect against NSAID-induced oxidative damage of the gastrointestinal mucosa. *Mol. Nutr. Food Res.* p.1-19, 2017.
- CHEUNG, K. S. et al. Long-term proton pump inhibitors and risk of gastric cancer development after treatment for *Helicobacter pylori*: a population-based study. *Gut.* v. 67, p. 28–35, 2018.
- 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.
- CHUA, E. Sea almond tree *Terminalia catappa* (Linnaeus, 1767). Disponível em <<https://taxo4254.wikispaces.com/Terminalia+catappa>>.
- COCK, I.E. The medicinal properties and phytochemistry of plants of the genus Terminalia (Combretaceae). *Inflammopharmacol.* v. 23 p. 203-229, 2015.
- 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.

- DE SOUZA ALMEIDA, E.S. et al. 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.
- ELTZSCHIG, H.K.; ECKLE, T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nat Med.* v. 17 p. 1-26, 2011.
- FAHMY, N. M. et al. Anti-Inflammatory and Analgesic Activities of *Terminalia Muelleri* Benth. (Combretaceae). *Drug development research.* v. 78, p. 146-154, 2017.
- FARZAEI, M. H. et al. Role of dietary polyphenols in the management of peptic ulcer. *World J Gastroenterol.* v. 21, p. 6499-6517, 2015.
- GARDÈS-AALBERT, M. et al. Oxygen-Centered Free-Radicals and Their Interactions with Egb-761 or Cp-202. Ginkgo Biloba Extract (Egb 761) as a Free-Radical Scavenger., v. 2, p. 1-11, 1993.
- GIBELLINI, L. et al. Natural Compounds Modulating Mitochondrial Functions. *Evid Based Complement Alternat Med.* v. 2015, p. 1-13, 2015.
- GERMOSÉN-ROBINEAU, L. Farmacopea Vegetal Carbeña. CICY editorial, Yucatán, Mexico p. 360, 2014.
- GESSELBAUER, B.; BOCHKOV, V. Biochemical targets of drugs mitigating oxidative stress via redox-independent mechanisms. *Biochemical Society Transactions.* p.1-28, 2017.
- 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.
- GRANGER, D. N. et al. The Gastrointestinal Circulation: Physiology and Pathophysiology. *Compr. Physiol.* v. 5 p. 1541-1583, 2015.
- GRANGER, D. N. e KVIETYS, P. R. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biology.* v. 6, p. 524–551, 2015.
- HOSHINO, T. et al. Effects of prostaglandin E2 on gastric irritant-induced apoptosis. *Dig Dis Sci.*, v. 47(10), p. 2370-2379, 2002.
- JAYESH, K. et al. Ethyl acetate fraction of *Terminalia bellirica* (Gaertn.) Roxb. fruits inhibits proinflammatory mediators via down regulating nuclear factor- κ B in LPS stimulated Raw 264.7 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* v. 95, p. 1654-1660, 2017.
- KALOGERIS, T. et al. Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. *Int Rev Cell Mol Biol.* v. 298, p. 229–317, 2012.

- KASSIR, R. et al. Complications of bariatric surgery: Presentation and emergency management. [Editorial] *International Journal of Surgery*. v. 27, p. 77-81, 2016.
- KATO, Y. Neutrophil myeloperoxidase and its substrates: formation of specific markers and reactive compounds during inflammation. *J. Clin. Biochem. Nutr.* v. 58 p. 99-104, 2016.
- KRAWISZ, J.E. et al. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterol.* v. 87 p. 1344-1350, 1984.
- LAINE, L. et al. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. *Gastroenterology* v. 135, p. 41–60, 2008.
- LI, Y. et al. The protective effect of genistein postconditioning on hypoxia/reoxygenation-induced injury in human gastric epithelial cells. *Acta Pharmacol. Sin.* v. 30 p. 576–581, 2009.
- LU, S.C. Regulation of Glutathione Synthesis. *Mol Aspects Med.* v. 30 p. 42-59, 2009.
- MALFERTHEINER, P.; CHAN, F.K.; MCCOLL, K.E. Peptic ulcer disease. *Lancet* v. 374 p. 1449-1461, 2009.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. v. 454, p. 428-35, 2008.
- MELCARNE, L. et al. Management of NSAID-associated peptic ulcer disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. v. 10(6), p. 723-33, 2016.
- MININEL, J. F. Estudo fitoquímico de extratos polares e infusão das folhas de *Terminalia catappa* L. (Combretaceae) e avaliação de suas atividades antiulcerogênica e mutagênica. 180 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química., 2015. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/126577>>.
- MOJZIS, J. et al. Protective effect of quercetin on ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal injury in rats. *Physiol. Res.* v. 50 p. 501–506, 2001.
- MONKHOUSE et al. Complications of Bariatric Surgery: Presentation and Emergency Management – A review. *Ann R Coll Surg Engl.* v. 91, p. 280-286, 2009.
- MONOSTORI, P. et al. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review. *Journal of Chromatography B*, v. 877, p.3331-3346, 2009.

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

OMS. Alcohol – Fact sheet. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs349/en/>>. Acesso em 10/11/2017.

OZDEN, N.; GURSES, B. Mesenteric Ischemia in the Elderly. *Clin. Geriatr. Med.* v. 23 p. 871–887, 2007.

REDZA-DUTORDOIR, M. e AVERILL-BATES, D. A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta.* v. 12, p. 2977-2992, 2016.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G.A. Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* v. 31 p. 986–1000, 2011.

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.

ROCCO, A. et al. Alcoholic disease: Liver and beyond. *World J Gastroenterol*, v. 20 p. 14652-14659, 2014.

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.

SILVA, L.P. et al. *Terminalia catappa* L.: A medicinal plant from the Caribbean pharmacopeia with anti-*Helicobacter pylori* and antiulcer action in experimental rodent models. *J. Ethnopharmacol.* v. 159 p. 285-295, 2015.

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

SZABO, S. . & VINCZE, Á. Growth factors in ulcer healing: Lessons from recent studies. *J. Physiol.* v. 94, p. 77–81, 2000.

THOMSON, L.A.J.; EVANS, B. *Terminalia catappa* (tropical almond), 2.2. In: Elevitch, C.R. (Ed.). *Species profiles for pacific Island agroforestry: permanent agriculture resources (PAR)*, 2006.

TURNER, J.R. The Gastrointestinal Tract. *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease.* Saunders. Philadelphia, Elsevier: p. 783-784, 2010.

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

VAJDOVICH, P. Free Radicals and Antioxidants in Inflammatory Processes and Ischemia-Reperfusion Injury. *Vet. Clin. Small Anim*. v. 38 p. 31-123, 2008.

WINTERBOURN, C.C. et al. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J. Lab. Clin. Med*. v. 85 p. 337-341, 1975.

YAMADA, T., et al. The protective effect of hyperbaric oxygenation on the small intestine in ischemia-reperfusion injury. *J. Pediatr. Surg*. v. 30 p. 786, 1995.

YAMAMOTO, S. et al. The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in ischemia-reperfusion injury of the rat small intestine. *J. Surg. Res*. v. 99 p. 134-141, 2001.

YANDZA, T. et al. The pig as a pre-clinical model for intestinal ischemia-reperfusion and transplantation studies. *J. Surg. Res*. v. 178 p. 807, 2012.

ZHONG, X. et al. Polyphenol Extracts from *Punica granatum* and *Terminalia chebula* Are Anti-inflammatory and Increase the Survival Rate of Chickens Challenged with *Escherichia coli*. *Biol. Pharm. Bull*. v. 37, p. 1575–1582, 2014.