

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
*Campus* URUGUAIANA

ROSELEINE EMILIA GUEVEDO SCHNEIDER

AVALIAÇÃO DO EFEITO GASTROPROTETOR DA CUTÍCULA COILINA  
RETIRADA DO VENTRÍCULO DE *Gallus gallus domesticus* EM RATOS

DISSERTAÇÃO

Uruguaiana

2014

ROSELEINE EMILIA GUEVEDOSCHNEIDER

AVALIAÇÃO DO EFEITO GASTROPROTETOR DA CUTÍCULA COILINA  
RETIRADA DO VENTRÍCULO DE *Gallus gallus domesticus* EM RATOS

Dissertação submetida ao programa de Pós-graduação  
*Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da  
Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial  
para obtenção do Título de Mestre em Ciências  
Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleci Menezes Moreira

Uruguaiiana

2014

ROSELEINE EMILIA GUEVEDOSCHNEIDER

AVALIAÇÃO DO EFEITO GASTROPROTETOR DA CUTÍCULA COILINA  
RETIRADA DO VENTRÍCULO DE *Gallus gallus domesticus* EM RATOS

Dissertação do programa de Pós-graduação  
*Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da  
Universidade Federal do Pampa, como requisito  
parcial para obtenção do Título de Mestre em  
Ciências Farmacêuticas.

Linha de pesquisa: Obtenção e avaliação das  
propriedades químicas e biológicas de compostos  
bioativos e insumos farmacêuticos.

Dissertação defendida e aprovada em:

Banca examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleci Menezes Moreira (Orientadora)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Liliane de Freitas Bauermann (UFSM)

---

Prof. Dr. Paulo Cavalheiro Schenkel (UFPEL)

## RESUMO

A úlcera gástrica é considerada um dos principais distúrbios gastrointestinais de evolução geralmente crônica. A terapia convencional é realizada através da utilização concomitante de antibióticos e inibição da secreção ácida por determinados fármacos, com a finalidade de potencializar a rápida cicatrização da mucosa gástrica. O conhecimento empírico é o principal determinante na utilização de materiais biológicos pela população, na região oeste do Rio Grande do Sul/Brasil, existe uma cultura de utilização da cutícula coilina (C) da moela da galinha como substância de origem natural para o tratamento de distúrbios gástricos. Não há relatos científicos comprovando seu efeito gastroprotetor, portanto o objetivo deste trabalho foi determinar a atividade e possíveis mecanismos gastroprotetores da C em modelo de úlcera induzida por ácidos orgânicos, através de tratamento agudo, na perspectiva de uma nova alternativa terapêutica. Para tanto, a C foi doada limpa por produtores rurais, seca e triturada para utilização dos protocolos experimentais. Foram usadas ratas Wistar, 3 meses, n=5/grupo. As lesões gástricas foram provocadas com etanol absoluto (refrigerado; 1mL/200mg) e ácido acetilsalicílico (AAS; 400 mg/200mg), e avaliadas macroscópica e microscopicamente, sendo o tecido estomacal submetido à histologia com coloração hematoxilina-eosina. A investigação dos possíveis mecanismos foi iniciada através da quantificação do muco aderido na mucosa estomacal e da acidez gástrica (titulação ácida) e seu volume. Ao mesmo tempo, foi realizado a determinação da atividade da  $H^+,K^+$ -ATPase na fração microssomal da mucosa gástrica por espectrofotometria. Os resultados expressos em  $M \pm EPM$  e aplicado ANOVA de 1 via, com *post-hoc* de *Tukey's*,  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Os resultados obtidos mostraram que a C foi capaz de proteger a mucosa gástrica das lesões provocadas, na concentração de 5mg/Kg, com ação citoprotetora. Além disso, a C aumentou a produção de muco gástrico nas duas investigações ulcerativas efetuadas; aumentou a medida do pH de forma basal e inibiu a atividade específica da  $H^+,K^+$ -ATPase. Portanto, a coilina empregada pela comunidade rio-grandense mostra resultados muito favoráveis na ação gastroprotetora.

## ABSTRACT

Gastric ulcer is considered one of the major gastrointestinal disorders usually with chronic evolution. Conventional therapy is performed by concomitant use of antibiotics and drugs-inhibition of acid secretion, to enhancing the rapid healing of gastric mucosa. The popular knowledge is the main determinant in the use of biological materials by population, in western of Rio Grande do Sul/Brazil, there is a popular culture of the use of coilin cuticle (C) of chicken gizzard as natural substance for the treatment of gastric disorders. No scientific reports were found proving its gastroprotective effect, so the objective of this study was to determine the activity and possible gastroprotector mechanisms of C in organic acids induced ulcer model by acute treatment with the prospect of a new therapeutic alternative. Therefore, the C was donated clean by farmers, dried and ground for use of experimental protocols. It were used female Wistar rats, 3 months, n = 5/group. The gastric injuries were caused with absolute ethanol (cooled; 1mL/200 mg) and acetylsalicylic acid (AAS; 400mg/200mg), evaluated by macroscopic and microscopic visualization and stomacher tissue were submitted to histology with hematoxylin-eosin. To start, it was investigated the possible mechanisms by quantifying mucus stuck in the stomach mucosa and gastric acidity (acid titration) and its volume. At the same time, it was determinate the H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in the microsomal fraction of the gastric mucosa by spectrophotometry. The results were expressed in M±SEM and 1-way ANOVA with *post-hoc Tukey's* were used, p <0.05 was considered significant. The results obtained showed that C was able to protect the gastric mucosa of the injuries-induced, in the concentration of 5 mg/Kg, with cytoprotective action. Also, the C increased the production of gastric mucus in both ulcerative investigations; increase the pH measurement of basal form and inhibited H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase specific activity. Thought, the coilina, used by Rio Grande Sul community, showed very promisor results in gastroprotective action.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Regiões do estômago e sua estrutura histológica.....	17
Figura 2. Regulação Fisiológica das Secreções Ácidas.....	20
Figura 3. Ação das enzimas antioxidantes.....	25
Figura 4. Esquema representativo dos efeitos do etanol administrado de forma aguda, no estômago. ....	34
Figura 5. Biossíntese de prostaglandinas e tromboxanopela via da ciclooxygenase e mecanismo de ação do AAS.....	35
Figura 6. Imagens demonstrativas do manuseio, trituração da cutícula coilina. ....	40
Figura 7. Fluxograma ilustrativo do procedimento como tratamento curativo com coilina ou omeprazol após o agente ulcerativo etanólico.....	43
Figura 8. Fluxograma ilustrativo para proceder ao procedimento com o tratamento curativo C ou OMZ após o agente ulcerativo AAS.....	44
Figura 9. Fluxograma ilustrativo para procedimento com o tratamento preventivo com agente ulcerativo etanólico. ....	44
Figura 10. Fluxograma ilustrativo para procedimento com o tratamento preventivo com agente ulcerativo AAS.....	44
Figura 11. Efeito da indução das lesões provocadas por Etanol absoluto refrigerado (A). Lesões em menor escala, pois receberam tratamento experimental com a Coilina (B).....	50
Figura 12. Imagens dos estômagos retirados após os protocolos de ulceração e ou tratamento. ....	51
Figura 13. Efeito do tratamento com a coilina ou omeprazol, na injúria provocada pelo etanol, na classificação do Índice de Lesões Ulcerativas. ....	52
Figura 14. Quantificação da produção de muco gástrico. ....	54
Figura 15. Atividade específica da bomba de prótons gástrica em animais lesionados com etanol.....	59
Figura 16. Lesões provocadas por AAS (A) em 400 mg/Kg. Não há nenhum tipo de lesão, pois receberam tratamento experimental da coilina (B).....	61
Figura 17. Imagens dos estômagos retirados após os protocolos de ulceração e ou tratamento. ....	62
Figura 18. Efeito do tratamento com a coilina ou omeprazol, na injúria provocada pelo ácido acetilsalicílico, na classificação do Índice de Lesões Ulcerativas. ....	63
Figura 19. Quantificação de muco gástrico após indução de lesões pela AAS (400mg/Kg). ....	65
Figura 20. Atividade específica da bomba de prótons gástrica em animais lesionados com AAS. ....	68
Figura 21. Microscopia do grupo controle (V).....	70
Figura 22. Ulceração no estômago induzida pelo etanol (E+V).....	70
Figura 23. Tratamento com omeprazol após lesão com etanol (E+O). ....	71
Figura 24. Tratamento com coilina antes da lesão com etanol (C+E).....	72

Figura 25. Ulceração do estômago provocada pelo etanol (V+E).....	72
Figura 26. Tratamento com omeprazol antes da lesão com etanol (O+E). .....	73
Figura 27. Tratamento com coilina antes da lesão com etanol (C+E).....	74
Figura 28. Ulceração no estômago induzida pelo AAS (A+V).....	75
Figura 29. Tratamento com omeprazol após a lesão com AAS (A+O).....	76
Figura 30. Tratamento com a coilina após a lesão com AAS (A+C). .....	76
Figura 32. Tratamento com omeprazol antes da lesão com AAS (O+A).....	78
Figura 33. Tratamento com coilina antes da lesão com AAS (C+A).....	78

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Índice de lesões Ulcerativas.....	45
Tabela 2. Efeito do tratamento da coilina ou omeprazol nos parâmetros do conteúdo gástrico em modelo ulcerativo utilizando etanol.....	56
Tabela 3. Efeito do tratamento da coilina ou omeprazol nos parâmetros do conteúdo gástrico em modelo ulcerativo utilizando AAS.....	66



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB – Alcian Blue

Ach – Acetilcolina

AINES – Antinflamatórios Não-Esteroidais

AMPc – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMP cíclico)

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AAS – Ácido Acetilsalicílico

ATP – Adenosina Trifostato

Ca<sup>2+</sup> – Cálcio

CAT – Catalase

C – Coilina

Cl<sup>-</sup> – Cloro

CMC – Carboximetilcelulose

COX – Ciclooxigenase

COX-1 – Ciclooxigenase - 1

COX-2 – Ciclooxigenase-2

COX-3 – Ciclooxigenase-3

DNES – Sistema neuroendócrino difuso

ERO – Espécies Reativas do Oxigênio

g – Grama

GMP – Guanosina 3,5- monofosfato

GMPc – Guanosina 3,5- monofosfato cíclico (GMP cíclico)

GPX – Glutathione Peroxidase

GR – Glutathione Redutase

GSH – Glutathione

H<sup>+</sup> – Hidrogênio

H<sub>2</sub> – Histamina

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de Hidrogênio

HO<sub>2</sub><sup>-</sup> – Hidroperoxila

IBPs – Inibidores da Bomba de Prótons

L – Litro

K<sup>+</sup> – Potássio

Kg – Quilograma

H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase – Bomba de próton, ou Próton, potássio adenosina trifosfatase

h - Hora

pH – Potencial Hidrogeniônico

p.c. – Peso Corporal

P<sub>i</sub> – Fosfato inorgânico

PG – Prostaglandina

mL – Mililitro

min. – Minuto

mEq – Miliequivalente

Na<sup>+</sup> – Sódio

NO – Óxido Nítrico

NOS – Óxido Nítrico Sintase

$O_2^-$  – Radical Superóxidos

$OH^-$  – Hidroxila

OMZ - Omeprazol

SHs – Sulfidrílicos Não-Proteicos

SOD – Superóxido Dismutase

TGI – Trato gastrointestinal

UG – Úlcera gástrica

$\mu$  – Micro

VGCC – Canais de Cálcio Voltagem Dependentes

WHO (OMS) – Organização Mundial da Saúde

## SUMÁRIO

RESUMO .....	4
ABSTRACT .....	5
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	6
LISTA DE TABELAS .....	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	9
SUMÁRIO.....	13
1 INTRODUÇÃO .....	13
2 OBJETIVO.....	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO .....	16
3.1 FISILOGIA GÁSTRICA.....	16
3.1.1 ANATOMIA E HISTOLOGIA .....	16
3.1.2 MECANISMO DE PRODUÇÃO, SECREÇÃO E LIBERAÇÃO ÁCIDA 19	
3.1.2.1 <i>Secreção Parietal</i> .....	19
3.1.2.2 <i>Pepsina</i> .....	21
3.1.3 MECANISMOS DE DEFESA DO ESTÔMAGO .....	22
3.1.3.1 <i>Muco</i> .....	23
3.1.3.2 <i>Sistema antioxidante</i> .....	23
3.1.3.3 <i>Óxido Nítrico</i> .....	25
3.1.3.4 <i>Fluxo Sanguíneo</i> .....	26
3.1.3.5 <i>Prostaglandina</i> .....	26
3.1.3.6 <i>Canais de Potássio Sensíveis a Adenosina Trifosfato</i> .....	27
3.1.3.7 <i>Ciclooxigenase</i> .....	27
3.1.3.8 <i>Fator de Crescimento Epidérmico</i> .....	28
3.1.4 PATOLOGIAS GÁSTRICAS .....	29
3.1.4.1 <i>Doença Ulcerosa Gástrica</i> .....	29
3.1.4.2 <i>Helicobacter pylori</i> .....	31
3.1.5 TRATAMENTO PARA ÚLCERA GÁSTRICA.....	32
3.2 INDUÇÃO DE ÚLCERA GÁSTRICA POR AGENTES ORGÂNICOS ...	34
3.3 MATERIAL BIOLÓGICO.....	37
3.3.1 CUTÍCULA COILINA.....	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	39

4.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO .....	39
4.1.1	EXTRAÇÃO DA CUTÍCULA COILINA .....	39
4.1.2	MANUSEIO E SECAGEM .....	39
4.2	PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO DA CUTÍCULA COILINA.....	40
4.2.1	VEÍCULO.....	40
4.2.2	SUSPENSÃO DA MEMBRANA COILINA .....	40
4.3	ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	41
4.3.1	RATOS WISTAR .....	41
4.3.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	41
4.3.2.1	<i>Protocolo de Tratamento</i> .....	42
4.3.2.2	<i>Esquema ilustrativo para a realização dos tratamentos</i> .....	43
4.4	PROTOSCOLOS EXPERIMENTAIS .....	45
4.4.1	COLETA DAS AMOSTRAS .....	45
4.4.2	AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DAS LESÕES .....	45
4.4.3	DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ DO SUCO GÁSTRICO.....	46
4.4.4	QUANTIFICAÇÃO DO MUCO ADERIDO À MUCOSA GÁSTRICA. 46	
4.4.5	PREPARAÇÃO DA FRAÇÃO MICROSSOMAL DA MUCOSA ESTOMACAL .....	46
4.4.5.1	<i>Atividade de H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase Microssomal</i> .....	47
4.5	ANÁLISES HISTÓLOGICAS .....	48
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICA .....	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	50
5.1	ÚLCERAS GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ETANOL .....	50
5.1.1	ÍNDICE DE LESÃO ULCEROGÊNICA .....	50
5.1.2	QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DO MUCO .....	54
5.1.3	DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DO CONTEÚDO GÁSTRICO. 56	
5.1.4	ATIVIDADE DA H <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPASE MICROSSOMAL.....	59
5.2	ÚLCERAS GÁSTRICAS INDUZIDAS POR AAS .....	61
5.2.1	ÍNDICE DE LESÃO ULCEROGÊNICA .....	61
5.2.2	QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO.....	64
5.2.3	DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DO CONTEÚDO GÁSTRICO. 66	
5.2.4	ATIVIDADE DA H <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPASE MICROSSOMAL .....	67
5.3	ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	70
5	CONCLUSÃO .....	80
	REFERÊNCIAS .....	81

## 1 INTRODUÇÃO

A úlcera gástrica (UG) trata-se de uma enfermidade grave, geralmente crônica e de prevalência mundial, apresentando-se como uma importante causa de morbimortalidade em seus pacientes acometidos (CHAN & LEUNG, 2002). Por sua gravidade, é uma doença de relevância na saúde pública (COELHO, 2003), constantemente sendo o foco de novas frentes de pesquisa.

Nesse intuito, o conhecimento de novas substâncias com potencial terapêutico na reversão de lesões gástricas, especialmente desprovidas de efeito tóxico, caracteriza-se como matérias-primas inovadoras para possíveis fármacos. Com isso, a busca de recursos farmacológicos mais econômicos, principalmente através da pesquisa de substâncias utilizadas pela sociedade, surge como uma alternativa terapêutica à disposição da comunidade (MACIEL, PINTO, & VEIGA, 2002; JORGE, LEITE, OLIVEIRA, & TAGLIATI, 2004).

Embora nesta última década tenha ocorrido um aumento no crescimento socioeconômico da população brasileira, ainda existem muitas necessidades de atendimento primário à saúde em comunidades isoladas e carentes. Esse interesse por terapias de origem natural não é exclusivamente motivada por achados científicos, mas pela opção da “consciência ecológica” tão em voga na atualidade (SILVEIRA, BANDEIRA, & ARRAIS, 2008; OMS, 2014).

O conhecimento popular é o principal determinante para a utilização de materiais biológicos na terapia. Na maioria das vezes, isso se mostra eficaz, o que desperta o interesse do meio científico pelo assunto, pois estudos nessa área exigem esforços de profissionais, como botânicos, farmacologistas e químicos (MACIEL, PINTO, & VEIGA, 2002; SIMÕES, 2007).

Durante muito tempo, a úlcera gástrica foi controlada através de cirurgia, o que causava um alto índice de mortalidade (YUAN, PADOL, & HUNT, 2006). O recurso estratégico terapêutico utilizado já há algum tempo, reporta-se ao uso concomitante de antibióticos e inibição da secreção ácida por determinados fármacos, com objetivo de potencializar a rápida cicatrização do tecido da mucosa

gástrica (PRADOS & BOIDEXA, 2004; MARTINS, 2005; YUAN, PADOL, & HUNT, 2006).

Diante dos efeitos colaterais provocados pela utilização crônica de fármacos padrões na terapia medicamentosa da úlcera gástrica, se faz necessário investigar alternativas que agreguem efeitos farmacológicos capazes de promover a prevenção e a rápida cicatrização de úlceras, com ausência ou redução de efeitos colaterais (COELHO, 2003).

Para tanto, surge em nosso meio acadêmico uma questão a ser investigada, oriunda de um conhecimento popular riograndense quase esquecido. Baseia-se no emprego da membrana interna (cutícula coilina) da moela da galinha para tratamento de desconforto gástrico forte e, até mesmo, em situações de ocorrência de lesões estomacais. Assim sendo, não foram encontrados relatos científicos comprovando seu efeito gastroprotetor. Em suma, esta pesquisa justifica um estudo científico empregando modelos experimentais *in vivo* para verificar o possível efeito gastroprotetor na indução de lesão gástrica utilizando ácidos orgânicos como agentes ulcerogênicos (MERCER, CROSS, SMITH, & MILLER, 1997; SULEYMAN, DEMIREZER, & KURUUZUM-UZ, 2004; ANOOP & JEGADEESAN, 2009; LAKSHMI, SINGH, & SHRIVASTVA, 2010; TAHA, SALGA, & ALI, 2012; DAMASCENO, RODRIGUES, & SILVA, 2013).

## 2 OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar de forma aguda os efeitos gastroprotetores promovidos pela suspensão da cutícula coilina em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto e ácido acetilsalicílico, na perspectiva de uma nova alternativa terapêutica.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Induzir lesão gástrica aguda através da ingestão por gavagem, de etanol absoluto refrigerado e de ácido acetilsalicílico;
- Verificar o efeito gastroprotetor da suspensão coilina através da visualização macro e microscópica das lesões;
- Quantificar a acidez gástrica e o muco aderido à mucosa gástrica;
- Determinar atividade específica da  $H^+,K^+$ -ATPase.



### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 FISIOLOGIA GÁSTRICA

##### 3.1.1 ANATOMIA E HISTOLOGIA

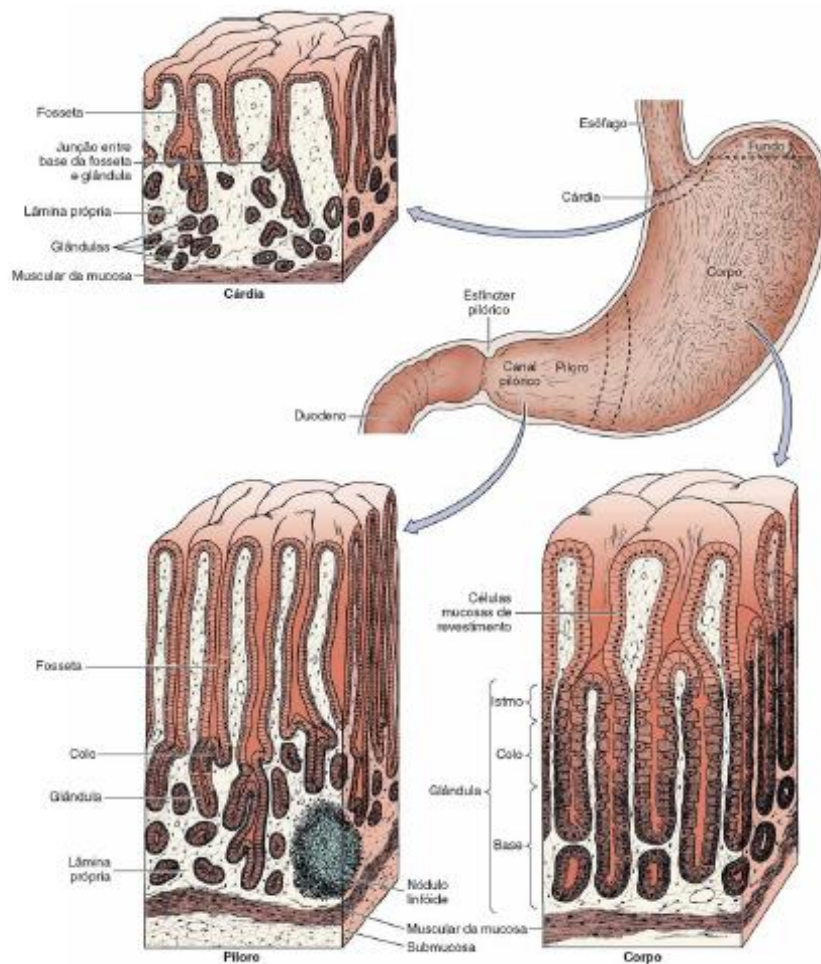
Integrante do trato gastrointestinal (TGI) humano, o estômago é a região mais dilatada do canal alimentar, é uma estrutura sacular, que comporta um volume aproximado de 1.500 mL de comida e fluído estomacal, podendo secretar de 2 a 3 litros (L) de suco gástrico ao dia (AIRES, 2008). Basicamente, sua principal função é transformar o bolo alimentar em uma massa viscosa (fluido ácido e espesso) denominado quimo, por atividades químicas e mecânicas, promovendo uma digestão parcial dos alimentos através da produção de ácido gástrico e de secreção das enzimas pepsina, renina e lipase gástrica, assim como produzindo hormônios parácrinos. O estômago lança de modo intermitente, pequenas alíquotas de seu conteúdo no duodeno (GARTNER & HIATT, 2003; SILVERTHORN, 2010)

Anatomicamente, o estômago estende-se ao longo da linha média esquerda ligada ao esôfago, chamada de curvatura maior (convexa); e a direita, onde se une ao duodeno, em curvatura menor (côncava). A observação macroscópica mostra divisão de quatro regiões: a cárdia, que é uma região estreita, situada na junção gastroesofágica; o fundo, que possui uma região em formato de cúpula à esquerda do esôfago, comumente cheia de gás; o corpo, que é a maior região, pois é responsável pela formação do quimo, e o antro ou também chamado de piloro, que é uma porção estreita, afunilada, dotada do espesso esfíncter pilórico, que controla a liberação intermitente do quimo para o duodeno (GARTNER & HIATT, 2003).

A parede gástrica divide-se em quatro camadas histológicas: a mucosa, a submucosa, a camada muscular e a serosa (ou adventícia) (FIGURA 1). Histologicamente, as características estruturais das regiões do fundo e do corpo são análogas, a superfície interna do estômago exibe pregas (rugos), dobras longitudinais da mucosa e submucosa, que desaparecem quando o estômago está

distendido. Além disso, o revestimento epitelial do estômago se divide em dois compartimentos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

**Figura 1. Regiões do estômago e sua estrutura histológica.**



Adaptado de JUNQUEIRA & CARNEIRO, (2008).

O compartimento foveolar apresenta células epiteliais que delimitam toda a superfície da mucosa (células de revestimento superficial), e as fossetas gástricas. Estas são células colunares altas, secretoras do muco visível e lisozima, que possuem núcleos basais e exibem numerosos grânulos de secreção contendo uma substância homogênea, precursora do muco, a mucina. Nesta região é comum a ocorrência de mitose pelas células regeneradoras, promovendo nova formação do

epitélio, que é continuamente substituído (KUMMAR, ABBAS, FAUSTO, & ASTER, 2010).

O compartimento glandular estende-se da camada da muscular da mucosa até a base da fosseta gástrica e está dividida em três regiões: istmo, colo e base. Diferenciando-se em distintos tipos celulares, as células mucosas do colo secretam muco solúvel; as células parietais (oxínticas) contêm vesículas que secretam  $H^+$  através da enzima  $H^+,K^+$ -ATPase e o fator gástrico intrínseco; as células principais, também conhecidas por zimogênicas, são responsáveis pela secreção de enzimas proteolíticas (pepsinogênio e renina) e lipase gástrica; células DNES, são produtoras de hormônios endócrinos, parácrinos e neurócrinos, como exemplo, as células G (produtoras da histamina), células D (sintetizadora de somatostatina) e células X (produtoras de endotelina) (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

### 3.1.2 MECANISMO DE PRODUÇÃO, SECREÇÃO E LIBERAÇÃO ÁCIDA

A secreção gástrica apresenta dois componentes, a secreção parietal e secreção não-parietal. A composição química do suco gástrico varia com a velocidade da sua liberação. Igualmente, a acidez aumenta com a velocidade da secreção, levando a queda do potencial de hidrogênio (pH) do suco gástrico; outros íons, como sódio diminuem sua concentração, enquanto o potássio ( $K^+$ ) e o cloro ( $Cl^-$ ) mantêm-se constantes. Provavelmente por dois motivos: (1) o suco gástrico primário é formado por cloreto de sódio e se modifica durante a passagem pela luz glandular devido à ação das células oxínticas que trocam sódio ( $Na^+$ ) por hidrogênio ( $H^+$ ); (2) aumentando a velocidade da secreção, onde se eleva a secreção de  $H^+$  e  $Cl^-$  e, por conseguinte, aumenta-se o volume da secreção total (Figura 2).

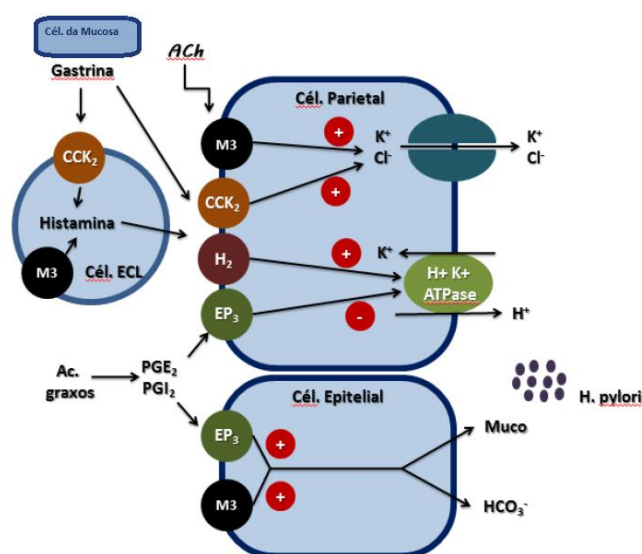
#### 3.1.2.1 Secreção Parietal

Há uma relação direta entre o número de células parietais e a produção de ácido gástrico no estômago. A secreção de prótons é um processo contínuo e complexo controlado por múltiplos estímulos provenientes do Sistema Nervoso Central (SNC) e do Sistema Nervoso Periférico (SNP). Subdivididos em fase cefálica, gástrica e intestinal, os quais convergem na regulação das células gástricas parietais, com o objetivo de ativar a enzima  $H^+,K^+$ -ATPase, bomba de próton, que possui a capacidade de secretar uma solução eletrolítica fortemente ácida (AIRES, 2008).

A enzima  $H^+,K^+$ -ATPase é composta por uma grande subunidade  $\alpha$  e uma subunidade  $\beta$  (menor), e é responsável pelo gradiente iônico, com pH intracelular de cerca de 7,3 e um pH intracanalicular em torno de 0,8. A sinalização da secreção ácida é mediada por duas vias: a via dependente do cAMP, que resulta na fosforilação das proteínas efetoras da célula parietal para liberação da histamina, e a via dependente do aumento citosólico do  $Ca^{2+}$  para ocorrer liberação da gastrina e acetilcolina (Ach) (BRUNTON, LAZO, & PARKER, 2010). A gastrina é liberada pelas células da mucosa do antro gástrico e torna-se ativa nos receptores  $CCK_2$ ,

estimulando também, a liberação de histamina pelas células G. A histamina atua nos receptores  $H_2$  nas células parietais, estimulando a secreção do muco e bicarbonato através da ativação dos receptores  $EP_3$ . Os receptores muscarínicos  $M_3$  são os responsáveis por desencadear as respostas fisiológicas geradas pela ACh. (Figura 2).

**Figura 2. Regulação Fisiológica das Secreções Ácidas.**



Adaptado Hoogerwerf & Pasricha (2012).

A fase encefálica consiste na resposta aos estímulos visuais, olfatórios, gustativos e à antecipação do alimento, liberando a ACh pelas fibras vagais pós-ganglionares estimulando diretamente à secreção de ácido gástrico por meio do receptor colinérgico muscarínico específico do subtipo  $M_3$ . A fase gástrica envolve a estimulação mecânica dos receptores pela distensão gástrica e é mediada por impulsos vagais por meio dos receptores histamínicos do subtipo  $H_2$ , no qual se liga a histamina. A gastrina é regulada na fase intestinal e por componentes químicos de uma maneira indireta, e também se observa um efeito direto menos importante da gastrina nas células parietais influenciando a ação no receptor específico  $CCK_2$  (BRUNTON, LAZO, & PARKER, 2010).

As escolhas terapêuticas disponíveis para regulação da secreção ácida buscam transformar a influência neural por intermédio de cirurgias, por induzir os mecanismos que envolvem os segundos mensageiros na célula parietal, através da utilização de antagonistas muscarínicos ou histamínicos, assim como pela alteração do último evento da cascata de reações envolvidas na secreção, utilizando inibidores da bomba protônica (HOOPERWERF & PASRICHA, 2010; HIRSCHOWITZ, KEELING, & LEWIN, 1995).

### **3.1.2.2 Pepsina**

O aumento da concentração ácida dispara um reflexo colinérgico local que estimula a secreção de pepsinogênio pelas células principais. Esse reflexo sensível a ácido aumenta a sensibilidade das células principais e, o ácido promove a liberação de secretina, hormônio produzido pelas células duodenais, que também estimula a secreção de pepsinogênio. A pepsina é a principal enzima proteolítica do organismo e a única do suco gástrico, sua atividade ocorre quando o pepsinogênio inativo entra em contato com o meio ácido. Com o aumento da concentração, autocataliticamente, se produz novas moléculas de pepsina (AIRES, 2008).

### 3.1.3 MECANISMOS DE DEFESA DO ESTÔMAGO

A perda da integridade da mucosa estomacal pela ação dos agentes agressores tem início a partir de um distúrbio secretório, como o aumento da acidez do suco gástrico ( $H^+$ ), do ácido biliar, e da pepsina. Também fatores externos podem ser considerados agressores, como a utilização exagerada de anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES), o fumo, excesso de café e a colonização da *Helicobacter pylori*. Os agentes defensores incidem em fatores neurais, funcionais e humorais. Neste sentido, a secreção do muco alcalino (principal agente), age através da microcirculação da mucosa e da motilidade estomacal, defendendo a mucosa dos agentes que prejudicam a integridade da mucosa. Assim sendo, a prostaglandina (PG) age como fator funcional, o óxido nítrico (NO) age como fator humoral, e os neurônios, sensoriais sensíveis à capsaicina, agem como fatores neurais (PRADOS & BOIDEXA, 2004).

Quando a secreção gástrica atinge o máximo, a concentração intraluminal de íon  $H^+$  é  $3 \times 10^6$  vezes maiores do que a do sangue e dos tecidos. Os principais componentes com função de proteção presentes na mucosa gástrica são: o muco, o bicarbonato e o fluxo sanguíneo. A inibição da secreção é feita pela somatostatina, por fatores de crescimento epidérmico e por PG da série E (AIRES, 2008).

As células gástricas estão ligadas à membrana basal da célula epitelial, local sensível aos danos provocados principalmente por ácidos. O processo de restauração epitelial da mucosa abrange a migração rápida de células cicatrizantes aos locais desprotegidos na membrana lesionada (PAIMELA et al. 1995). Ao ocorrer lesão na mucosa, forma-se uma “cobertura mucoide” sobre o local danificado, que consiste de fragmentos celulares, muco e plasma (fibrina e albumina). Essa capa mucoide promove um microambiente com pH em torno de 5, que auxilia na reconstituição celular. A manutenção desse pH relativamente alto, para padrões estomacais, é dependente de um suprimento contínuo de sangue na região. Portanto, ao ocorrer alterações que promovam aumento da acidez, lesões hemorrágicas graves aparecem no tecido gástrico (WALLACE & MILLER, 2001).

### 3.1.3.1 Muco

O muco se apresenta de forma transparente, viscosa e elástica contendo 95% de água e 5% de glicoproteína, recobrando toda a superfície da mucosa gastrointestinal. O bicarbonato é secretado para a zona limítrofe inundada de muco, o que cria um microambiente com pH essencialmente neutro. Os fluidos contendo ácidos e pepsinas saem das glândulas gástricas em grande quantidade, passando através da camada superficial de muco, mas não entrando em contato com as células epiteliais superficiais (Figura 2). A estimulação da secreção de muco, bem como a de bicarbonato, ocorre por diversos fatores e formam uma “barreira de mucoproteção” (SANIOTO, 1991), com ação antioxidante e redução de danos à mucosa promovidos por radicais livres (SENO, et al., 1995).

### 3.1.3.2 Sistema antioxidante

#### 3.1.3.2.1 *Espécies reativas do oxigênio*

Em todos os sistemas biológicos são encontradas Espécies Reativas do Oxigênio (ERO). No metabolismo celular aeróbio, em condições fisiológicas, o oxigênio ( $O_2$ ) sofre redução tetravalente, com estabilização de quatro elétrons, formando água. Nesse processo são formados intermediários reativos, tais como, hidroxila ( $OH^\cdot$ ), hidroperoxila ( $HO_2^\cdot$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais superóxidos ( $O_2^\cdot$ ). Esta redução ocorre na mitocôndria e a reatividade é normalmente neutralizada, porém todos os componentes celulares são atingidos pela ação das ERO, sendo a membrana lipídica um dos componentes mais suscetíveis em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na permeabilidade e na estrutura das membranas celulares (MELLO FILHO, HOFFMAN, & MENECHINI, 1983; TARIQ, 2006).

A ocorrência do dano provocado, culminando na alteração dessa seletividade da troca iônica e extravasamento do conteúdo de organelas, como as



enzimas hidrolíticas dos lisossomas e a gênese de produtos citotóxicos, como o malonaldeído, ocasionando a morte celular (HERSHKO, 1989).

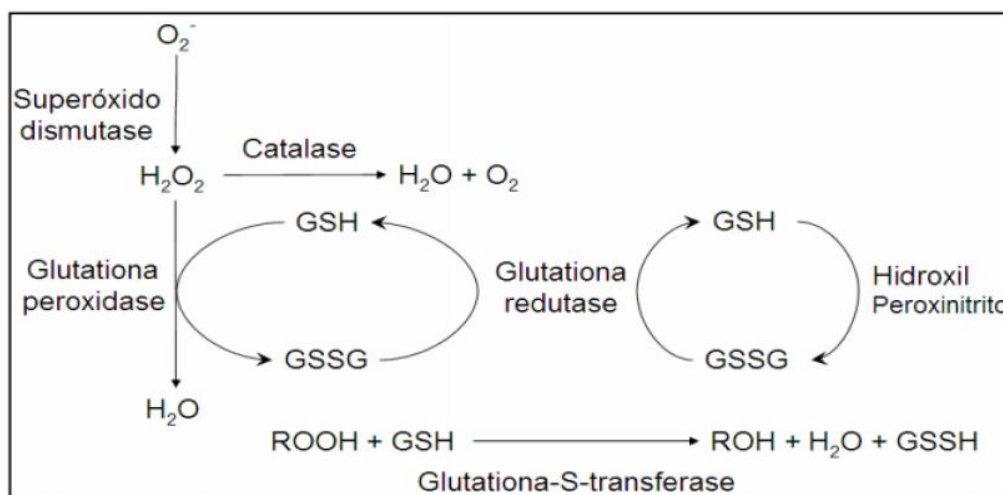
As concentrações das ERO, em condições fisiológicas normais, dentro das células são mantidas mínimas, pois há um sistema de enzimas, com funções antioxidantes, inibindo a formação desses radicais. Sendo assim, eliminados do organismo por um conjunto de enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), e pela glutathione reductase (GR) (MCCORD & FRIDOVICH, 1969). Os grupamentos sulfidrilas ligam-se aos radicais livres formados durante este processo ou produzidos após exposição a agentes nocivos, protegendo assim a mucosa gástrica (AVILA, 1996).

#### 3.1.3.2.2 Grupo Sulfidrílicos Não-Protéicos

A glutathione (GSH) é um antioxidante hidrossolúvel, mais pesquisado agente endógeno, dos grupos sulfidrílicos não-proteicos (SHs) do organismo e atua protegendo as células contra ERO (Figura 3) (STRUZYNSKA, CHALIMONIUK, & SULKOWSKI, 2005). A GSH é um tripeptídeo formado por cisteína, glutamato e glicina. Sua molécula possui uma ligação peptídica não muito comum entre o grupo amina da cisteína e o grupo carboxila do glutamato (PARK, 2000). Estes agentes são também importantes na produção (SALIM, 1992) e manutenção do muco gástrico, uma vez que suas subunidades glicoproteicas são unidas entre si por pontes de dissulfeto que, uma vez reduzidas, tornam o muco hidrossolúvel (AVILA, 1996).

A função gastroprotetora dos grupos SH endógenos presentes em diversas enzimas do sistema antioxidante e no muco gástrico, já foi demonstrado em diversos modelos de indução de úlcera (EtOH, AINES), pois sucede uma depleção destes compostos (HAWKEY, 2000, HERNANDEZ-MUNOZ & VAZQUEZ-MARTINEZ, 2000 e, BAYIR, 2006).

**Figura 3. Ação das enzimas antioxidantes.**



Adaptado de Struzynska (2005).

### 3.1.3.3 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso participante da cascata de sinalização de inúmeros processos fisiológicos, tais como, o relaxamento no músculo liso, agregação plaquetária, controle da pressão arterial e fluxo sanguíneo, neurotransmissão e regulação de mecanismos pró e antiapoptóticos (RADOMSKI & MONCADA, 1993). Em um processo catalisado pela enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS), o terminal guanidino nitrogenado da L-arginina juntamente com a presença do oxigênio molecular produz NO e L-citrulina (KUO & SCHROEDER, 1995).

O estresse oxidativo é aumentado com o bloqueio da produção do NO ativando assim, o mastócito. Estes por serem encontrados em grandes quantidades no TGI, são os principais responsáveis pela liberação dos mediadores histamina e fator ativador de plaquetas, provocando aumento da permeabilidade epitelial, sendo revertido pela rápida liberação exógena de NO (KANWAR, 1994).

O NO é importante no reparo da mucosa no processo da cicatrização, provavelmente pela sua habilidade de provocar ou aumentar o depósito de colágeno pelos fibroblastos além de estimular a angiogênese (WALLACE & MILLER,

2000). Também, desempenha uma papel importante na modulação da defesa da mucosa gástrica como: regulador na secreção de muco (BROWN, 1993), inibidor da migração de neutrófilo (BANICK, 1997); vasodilatador produzindo aumento de fluxo sanguíneo regional (WALLACE & MILLER, 2000).

#### **3.1.3.4 Fluxo Sanguíneo**

Um dos papéis do fluxo sanguíneo mucoso é suprir de oxigênio, nutrientes e hormônios a mucosa gástrica, além de participar da regulação da remoção do ácido por difusão retrógrada da produção de muco e da secreção de bicarbonato. De fato, o aumento do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica diminui sensivelmente o dano causado por diversos agentes nocivos (BRZOZOWSLI, 2003).

#### **3.1.3.5 Prostaglandina**

As prostaglandinas (PG) possuem papel fundamental na proteção da mucosa gástrica. A ação protetora das PG favorece a produção de muco, secreção de bicarbonato e, além disso, devido à sua ação vasodilatadora, as PG E e I aumentam o fluxo sanguíneo mucoso. A diminuição do fluxo sanguíneo na área ulcerada e a falha da atividade de enzimas antioxidantes na mucosa podem contribuir para retardar a cicatrização da úlcera gástrica e para o agravamento de danos gástricos induzidos por estresse. Os fármacos que bloqueiam a síntese de PG reduzem a proteção celular e, portanto, provocam lesão e ulceração da mucosa gástrica (HAWKEY, 2000).

Esses mediadores são biossintetizados a partir do ácido araquidônico pelas enzimas ciclooxigenases (COX), através da ativação da fosfolipase A<sub>2</sub>, podendo ser provocada por lesões teciduais ou por estímulos fisiológicos (bradicinina, noradrenalina e angiotensina). Sua atuação pode percorrer duas vias: via da lipoxigenase, com formação de leucotrienos ou pela via da ciclooxigenase (COX), com formação também de tromboxano (RANG, 2007).

Como já referido acima, as principais PG envolvidas na gastroproteção são as PG E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), as quais podem ativar os receptores EP<sub>3</sub> das células epiteliais, causando a diminuição da secreção de ácido e aumento da secreção de muco, respectivamente. Também aumentam o fluxo sanguíneo e a secreção de bicarbonato através da ativação dos receptores EP<sub>1</sub> (WALLACE & MILLER, 2001).

A gastroproteção mediada pelas PG, do mesmo modo, abrange a ativação dos canais de K<sub>ATP</sub> os quais estão envolvidos em diversos outros processos fisiológicos do sistema gastrointestinal, tais como a regulação do fluxo sanguíneo, secreção de ácido e contratilidade do estômago.

#### **3.1.3.6 Canais de Potássio Sensíveis a Adenosina Trifosfato**

Os canais de potássio (K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>) tomam parte de múltiplos processos fisiológicos como liberação de neurotransmissores, controle da secreção de insulina e glucagon, citoproteção na isquemia cardíaca e cerebral, manutenção dos tônus do músculo liso e reatividade vascular (BRUNTON, LAZO, & PARKER, 2010).

Embora seu mecanismo de ação não esteja completamente elucidado no estômago, os K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> podem estar envolvidos com a contratilidade do estômago, a regulação do fluxo sanguíneo e com a secreção de ácido gástrico. Estudos realizados na última década demonstraram que os fármacos inibidores (glibenclamida) e ou ativadores (diazóxido) desses canais tem participação na assistência contra diferentes agressores, corroborando com a redução da lesão gástrica e a infiltração neutrofílica induzida por AINES (MEDEIROS, 2008).

#### **3.1.3.7 Ciclooxigenase**

Existem três isoformas de COX (também conhecida como prostaglandina-endoperoxidase), a COX-1, COX-2 e COX-3.

A enzima COX-1 é responsável pela catálise de PG e tromboxano (participam na agregação plaquetária). Participa da função fisiológica constitutiva e promove uma série de ações de manutenção dos processos do organismo e, principalmente, atuando na proteção da integridade da mucosa gástrica, juntamente pelo fluxo sanguíneo, aumentando a concentração de bicarbonato e atenuando a acidez no local (WALLACE & M. A., 2001). Halter (2001) sugere que a maior parte das PG no TGI seja biossintetizada pela ação da COX-1, enquanto que a COX-2 é responsável pelos fenômenos da inflamação e das prostaglandinas que produzem contração uterina (SCHELLACK, 2006). A isoforma COX-3, sugerida por Daniel L Simmons (1999), é implicada nos efeitos adversos do paracetamol no SNC (provável inibidor mais seletivo desta forma).

Portanto, a cicatrização da úlcera é um processo complexo e bem regulado de preenchimento da mucosa lesada com propagação e migração de células dos tecidos epitelial e conjuntivo (VANE & BOTTING, 1998). Este processo inclui reestabelecimento da superfície contínua de camada epitelial, estruturas glandulares, microvasos e tecido conjuntivo no interior da cicatriz (BRZOZOWSLI, 2003).

### **3.1.3.8 Fator de Crescimento Epidérmico**

O fator de crescimento epidérmico aparece como marcador clínico de doenças inflamatórias e neoplásicas, no processo de cicatrização via estimulação da produção de muco e inibição da secreção ácida. As células epiteliais da mucosa na margem da úlcera proliferam e migram para o tecido de granulação no sentido de reconstruir o sítio lesionado. As citocinas produzidas localmente pelas células regenerativas controlam a cicatrização e a reconstrução das estruturas glandulares (TARNAWKI, 2005).

### 3.1.4 PATOLOGIAS GÁSTRICAS

Gastrite é uma inflamação da mucosa gástrica. A doença pode ser aguda, de natureza transitória, com infiltrado neutrofílico e acompanhada de hemorragia na mucosa superficial, significando uma inflamação ativa. A crônica exibe vários graus de lesão da mucosa e é manifestada com agregados linfóides e alguns centros germinativos são observados no interior da mucosa. A evolução dessas alterações leva à metaplasia intestinal e atrofia da mucosa. Uma das principais razões de ocorrer à gastrite crônica é a infecção pelo bacilo *Helicobacter pylori* (MARTINS, 2005).

#### 3.1.4.1 Doença Ulcerosa Gástrica

Conceitualmente, a úlcera gástrica (UG) em humanos é uma lesão definida, circular ou oval, inferior a 4 cm de diâmetro, podendo ocorrer em qualquer porção do trato gastrointestinal (TGI), na maioria das vezes localizada no revestimento do estômago ou do duodeno. Caracterizam-se histologicamente como uma descontinuidade (rompimento) das células da mucosa do TGI podendo chegar à camada da submucosa (AIRES, 2008).

A diferenciação das úlceras ocorre pela identificação da localização anatômica ou pelas circunstâncias em que se desenvolveram, tais como, a úlcera gástrica (situam-se na parte alta da curvatura (antro) do estômago); a úlcera duodenal (surgem na primeira porção do duodeno); a úlcera marginal (surge após procedimentos cirúrgicos); a úlcera gastroesofágica (junção inferior do esôfago com o estômago); e, há também, a úlcera de estresse, lesões que surgem por queimaduras ou traumatismo (THOMOPOULOS, 2004).

A doença é considerada um dos principais distúrbios gastrointestinais de evolução geralmente crônica, podendo ocorrer devido a um desequilíbrio entre fatores de defesa, como PG e bicarbonato, e a fatores ofensivos, tais como ácido clorídrico, pepsina, uso abusivo de medicamentos AINES (VANE & BOTTING, 1998) ou infecção pela bactéria *H. pylori* (COELHO, 2003; BRZOZOWSLI, 2003).

Paralelamente, outros fatores são abrangidos na patogênese da úlcera gástrica, incluindo predisposição genética, alteração na secreção ácida, rápido esvaziamento gástrico, falha dos mecanismos de defesa da mucosa, estresse físico e psicológico, além do tabagismo e a ingestão de bebidas contendo álcool ou cafeína (RICHARDSON, 1993; QUAN & TALLEY, 2002).

A mortalidade causada pela doença é baixa, mas promove complicações mais severas em pacientes debilitados por outras enfermidades ou por tratamento cirúrgico (MARTINS, 2005). Por outro lado, a morbidade é relevante e costuma caracterizar-se por dor epigástrica, sangramento, quadros obstrutivos e peritonite quando ocorrem perfurações. Uma vez instalado um quadro como este, há geração de altos custos para os serviços de saúde, pois incidem elevadas taxas de recidivas e a doença é onerosa tanto diretamente (limitações impostas ao doente, consultas médicas, hospitalizações, medicações), quanto associada à redução da produtividade com as ausências nos locais de trabalho (PRADOS & BOIDEXA, 2004).

A prevalência da úlcera gástrica é difícil de ser estimada, devido a subjetividade dos sinais e a semelhança de múltiplos sintomas de vários tipos de dispepsia. A maioria dos estudos epidemiológicos baseia-se em estatísticas obtidas a partir de atendimentos médicos, hospitalizações, cirurgias e óbitos. Dados estes, sujeitos à críticas, por não representar verdadeiramente as ocorrências da doença. Mesmo sendo uma enfermidade extremamente frequente, não se conhece de modo preciso sua real incidência na população, estima-se que cerca de 5 a 10 % da população brasileira em algum momento de sua vida desenvolverá UG (LIMA, 2004).

A incidência de UG no Brasil varia de 1 a 20 %, o que reflete tão somente diferenças na coleta dos dados, nos critérios de diagnóstico e nas variações das populações estudadas (YUAN, PADOL, & HUNT, 2006; VERAS, 2014). Atualmente, estudos mostram que as UG afetam cerca de 10% da população mundial (OMS, 2014).

### 3.1.4.2 *Helicobacter pylori*

A *Helicobacter pylori* (GOODWIN, et al. 1989) é uma bactéria gram negativa, descoberta por Warren e Marshall em 1983 (Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 2005). Habita quase exclusivamente o estômago e duodeno humano, sendo o único organismo conhecido capaz de colonizar esse ambiente muito ácido. Em parte pela sua capacidade de secretar urease, que transforma a ureia presente no ácido gástrico em amônia, elevando o pH ao redor da bactéria possibilitando sua colonização. Por possuir o formato de hélice (espiralada) permite invadir com maior facilidade a camada mucoprotetora que protege o epitélio estomacal alojando-se (MARHALL, et al., 1984).

Existem evidências de que *H. pylori* é importante na gênese da úlcera péptica, quer em razão da inflamação da mucosa resultante de sua presença, quer por alterar os mecanismos que regulam a produção de ácido. MOMTAZ, et al., (2012) relatam que cerca de 90% das pessoas portadoras de UG se encontram infectados pela bactéria, apesar de a maioria dos humanos infectados nunca chegar a manifestar qualquer tipo de sintomatologia e ou complicação relacionada com a bactéria. A elevada prevalência da infecção pela bactéria no mundo provoca uma dificuldade terapêutica e deve-se sempre considerar esta infecção como um problema de saúde pública.

No reconhecimento do papel da *H. pylori* na determinação do processo inflamatório gástrico, sugeriu-se a associação da infecção da bactéria com um aumento do risco ao desenvolvimento do câncer gástrico, pois a evolução da UG para gastrite, que caminha através de uma progressão lenta e gradual, para uma gastrite crônica (com graus variáveis de atrofia e metaplasia), são consideradas fatores de risco para o câncer gástrico. Em relação à UG, uma vez erradicada a bactéria, pode-se sugerir que o paciente ficará saudável (GOODMAN & COCKBURN, 2001).



### 3.1.5 TRATAMENTO PARA ÚLCERA GÁSTRICA

Para restabelecer o equilíbrio da mucosa gástrica rompida, são necessárias intervenções medicamentosas com a finalidade de aumentar os fatores defensivos locais (secreção de muco, bicarbonato e prostaglandinas) ou diminuir os agentes agressores como ácido gástrico, pepsina, bile, medicamentos ulcerogênicos (AINES) e, *H. pylori* (COELHO, 2003).

Durante muito tempo, os fármacos tendiam sempre a neutralizar o conteúdo gástrico, empregando antiácidos, dieta alimentar ou cirurgia para o tratamento de UG. A partir dos anos 70 foram introduzidos na terapêutica novos princípios ativos, ocasionando um grande impacto mundial, pela definição dos receptores de Histamina H<sub>2</sub> e antagonista seletivos, como a cimetidina e a ranitidina (BLACK, 1972), com isto a diminuição drástica da necessidade de cirurgia.

Diversos fármacos gastroprotetores foram também introduzidos, como os inibidores da bomba de prótons (IBPs), sua ação provoca redução nas secreções de ácido gástrico basal. Tratam-se de pró-fármacos (omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol e esomeprazol) que são ativados pelos canalículos secretores de ácido da célula parietal. Sua ação altera a secreção ácida pela inativação irreversível da bomba através de formação de ligações de dissulfeto entre a estrutura dos fármacos e da estrutura protéica da referida bomba. A sua forma ativa, sulfenamida cíclica, liga-se covalentemente a H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, inativando-a, por modificar sua conformação estrutural (SACHS, et al., 2010; HOOGERWERF & PASRICHA, 2012).

Os canais de K<sub>ATP</sub> recebem este nome por serem responsivos às concentrações de ATP intracelular e são alvos farmacológicos de inúmeros fármacos, dentre eles as sulfonilureias, como a glibenclamida e glimepirida, que bloqueiam esses canais (MEDEIROS, 2008).

Há fármacos como cromakalim e pinacidil que também provocam abertura desses canais. Essa abertura ocorre nas células endoteliais e provoca uma vasodilatação que ajuda na proteção da mucosa gástrica contra agentes ulcerogênicos. A abertura desses canais aumenta a entrada de potássio para o interior celular, modificando o potencial elétrico de ação da membrana da célula, provocando redução da entrada de cálcio pelos Canais de Cálcio Voltagem

Dependentes (VGCC), levando à vasodilatação (NILIUS & DROOGMANS, 2001). Diversos estudos sugerem que os canais podem ser ativados pela proteína quinase dependente de GMPc, demonstrando a possível atividade vasodilatadora de mediadores endógenos (como o NO e ATP). Assim, o bloqueio desses canais por mediadores como adrenalina, vasopressina, endotelina e angiotensina II provoca uma vasoconstrição promovendo o aumento da concentração de cálcio intracelular e da ativação da proteína quinase C (MEDEIROS, 2008).

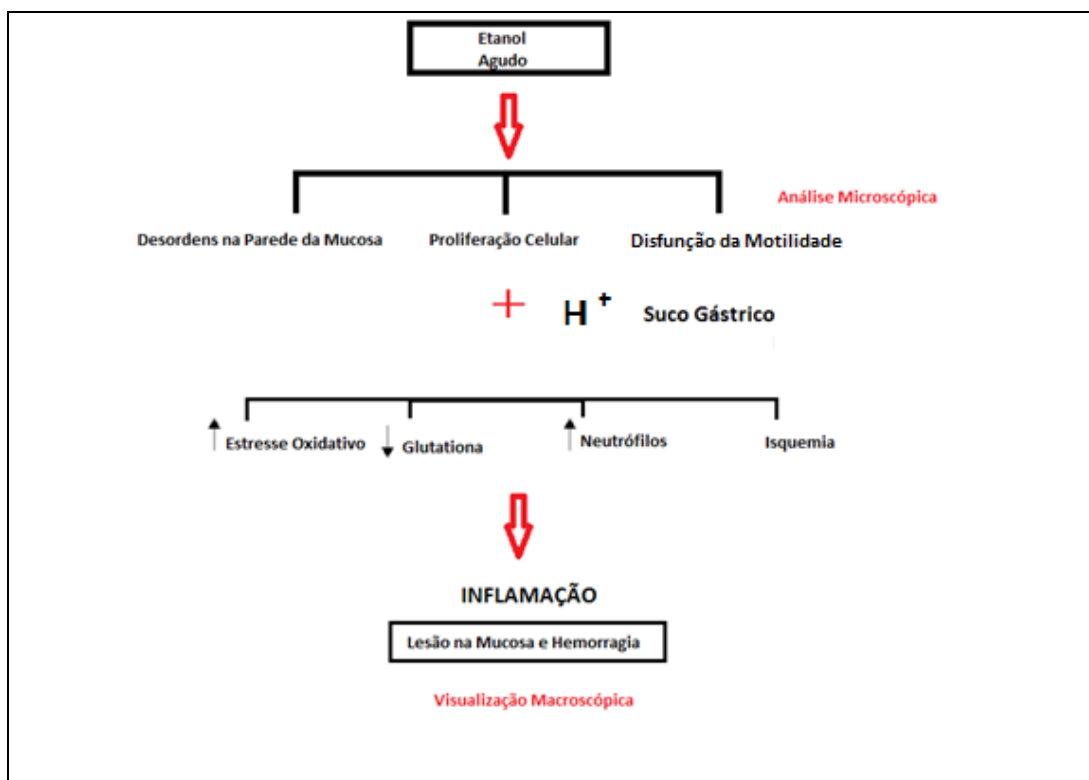
Com o passar do tempo, mais fármacos foram apresentados, tais como, o misoprostol (Citotec<sup>®</sup>), análogo da PGE<sub>2</sub>. Seu mecanismo de ação atua na estimulação da PG no estômago, aumentando a secreção do muco e do bicarbonato (HAWKEY, 2000). Foi proibida a comercialização no Brasil, pela ANVISA em 1999, pois um de seus efeitos, promove no útero aumento das contrações do miométrio, podendo causar aborto (ANVISA, 2014).

Não obstante, da grande variedade de tratamentos, a doença tem mostrado uma elevada tendência para à reincidência. Vários medicamentos empregados na terapêutica desta doença não são inteiramente efetivos e muitos efeitos adversos acompanham estes medicamentos, além do alto custo do tratamento (MARTINS, 2005). Assim, múltiplos produtos provenientes de materiais biológicos apresentam-se como uma origem atrativa de novas fontes de princípios ativos para tratamento desta doença.

### 3.2 INDUÇÃO DE ÚLCERA GÁSTRICA POR AGENTES ORGÂNICOS

Alguns ácidos orgânicos são utilizados como agentes que provocam úlcera gástrica. O etanol é um desses agentes ulcerogênicos, ele induz uma potente constrição venosa seguido de uma vigorosa e rápida dilatação arterial, no local administrado. Os radicais livres gerados durante esses episódios de isquemia e reperfusão provocam severas mudanças celulares e, em alguns casos, evoluem até a necrose celular (SZABO & GOLDBERG, 1990). Essa agressão também altera a peroxidação lipídica da membrana plasmática, levando à formação de compostos tóxicos, como aldeídos e novos radicais livres (Figura 4). O subsequente aumento na permeabilidade da membrana, juntamente com a queda de produtos vasoativos, gera a infiltração de mastócitos, macrófagos e outras células polimorfonucleares do sangue, causando danos vasculares, necrose e formação de úlcera (BILICI et al., 2002).

**Figura 4. Esquema representativo dos efeitos do etanol administrado de forma aguda no estômago.**

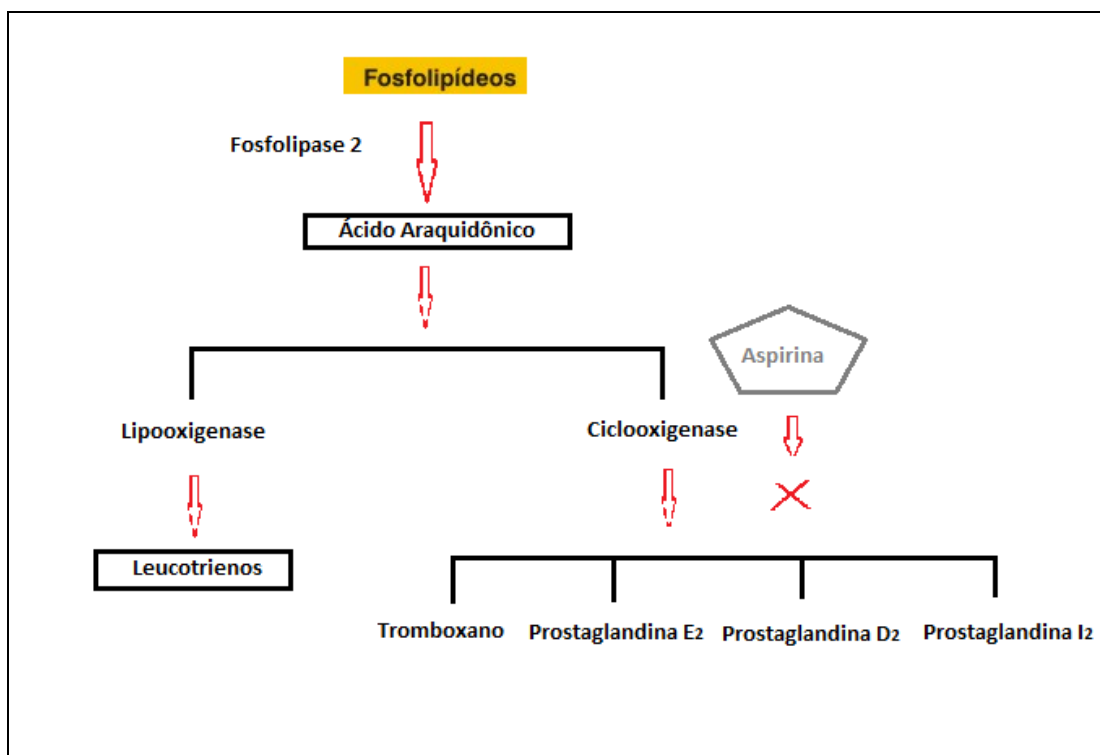


Adaptação de Szabo & Goldberg (1990).

Os AINES são um dos principais agentes que contribuem para a patogênese da úlcera gastrintestinal e representam um importante fator etiológico, por serem corriqueiros na prática clínica (WALLACE & MILLER, 2001).

Fármacos dessa classe terapêutica, como ácido acetilsalicílico (AAS), não são seletivos para as isoformas de COX e as inibem (Figura 5), resultando em distúrbios na microcirculação sanguínea. Igualmente, os efeitos adversos dos medicamentos à base de AINES alteram a motilidade estomacal e também atuam na diminuição da secreção do muco alcalino (HOOPERWERF & PASRICHA, 2012; KONTUREK, et al., 1981), uma vez que diminuindo a atividade das PG pela inibição da COX, gera danos à mucosa e aumenta a concentração de radicais livres no local, já que o muco, além de barreira física, atua também como antioxidante (REPETTO & LLESUY, 2002).

**Figura 5. Biossíntese de prostaglandinas e tromboxano pela via da ciclooxigenase e mecanismo de ação do AAS.**



Adaptação de Hoogerwerf e Pasricha (2012).

Existem métodos experimentais que representam uma ferramenta importante de indução de lesão gástrica para investigação de possíveis protetores gástricos, sendo a indução de lesões estomacais via administração por gavagem de ácidos orgânicos um dos métodos preferenciais (MERCER et al, 1997; SULEYMAN, DEMIREZER, & KURUUZUM-UZ, 2004; ANOOP & JEGADEESAN, 2009; LAKSHMI, SINGH, & SHRIVASTVA, 2010).

Dependendo da quantidade de ácido orgânico administrado (etanol e AAS) na porção glandular do estômago de ratos, esta se torna coberta de erosões hemorrágicas e úlceras quando examinados após o tempo do protocolo ulcerativo determinado. Este tempo é de uma hora para o etanol e três horas para o AAS após respectivas administrações (TAHA, SALGA, & ALI, 2012; DAMASCENO, RODRIGUES, & SILVA, 2013; YOSHIDA, et al., 2002).

### 3.3 MATERIAL BIOLÓGICO

#### 3.3.1 Cutícula Coilina

A diversidade cultural brasileira é proveniente da variedade e miscigenação do seu povo, do meio que o cerca, da ação da natureza e a influência sociocultural, em particular das sociedades tradicionais, não industriais, que, interagindo com o meio detêm um conhecimento sobre a utilização de drogas naturais. Essas populações exercem um papel fundamental na manutenção desse conhecimento aprimorando e selecionando métodos de terapia para preservação e perpetuação dessa cultura biodiversa (SIMÕES, 2007).

O conhecimento empírico dos efeitos de produtos de procedência natural na medicina popular constitui-se muitas vezes um meio alternativo para a obtenção de melhora e incluem terapias alternativas no cuidado primário à saúde, servindo também como base para estudos etnofarmacológicos usados como ferramenta na busca de informações e também como estratégia na investigação de novas matérias primas para possíveis fármacos (MACIEL, PINTO, & VEIGA, 2002; JORGE, LEITE, OLIVEIRA, & TAGLIATI, 2004; SIMÕES, 2007; OMS, 2014).

A *Gallus gallus* (galinha) possui um órgão triturador altamente muscular, conhecido como ventrículo (moela), sendo revestido por um epitélio cuboide que se invagina no interior da lâmina própria, formando cavidades alongadas, portando glândulas gástricas tubulares terminais. As células destas últimas glândulas secretam um material córneo espesso que se solidifica na superfície e forma uma dura membrana, chamada de cutícula coilina (C), um complexo glicoproteico. Embora seja estruturalmente semelhante à queratina, essa substância não é quimicamente equivalente (SILVIA, FREITAS, & MOMO, 2013). Este revestimento interno do ventrículo é áspero e pregueado, com cerca de 1 mm de espessura repostado pelas glândulas abaixo dele à medida que se desgasta na superfície (BACHA & BACHA, 2003; DYCE, et al., 2004).

Na região da fronteira oeste do Rio Grande do Sul, entre Argentina e o Uruguai, permanece um conhecimento etnofarmacológico sobre a utilização da

coilina desidratada como substância de origem biológica no tratamento de distúrbios gastrointestinais. No entanto, não existe nenhum dado sobre esse fato na literatura científica confirmando esse efeito gastroprotetor. Portanto, busca-se a investigação científica desta terapia empírica neste estudo, através de modelo experimental de indução de úlcera gástrica em ratos para nortear um possível protótipo fármaco.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

#### 4.1.1 EXTRAÇÃO DA CUTÍCULA COILINA

Vinte *Gallus gallus domesticus* (galinhas) foram tratadas com milho triturado e Ração Vita® (Cotrijuí). Os referidos animais foram utilizados para o consumo alimentar da propriedade rural. Soltas no pátio durante o dia e à noite recolhidas ao galinheiro. Foram sacrificadas através da degola (processo tradicional) e visceramento manual, foi realizada a dissecação da membrana coilina do ventrículo. A cutícula coilina (C) foi gentilmente doada por criadores do município de Ijuí (RS).

#### 4.1.2 MANUSEIO E SECAGEM

A membrana interna do ventrículo de *Gallus gallus* (cutícula coilina) foi obtida durante o mês de agosto de 2013. Seca em estufa ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) durante cinco dias. Foi triturada manualmente (gral e pistilo) a fino pó. Após, foi armazenada na temperatura ambiente, em vidro âmbar, no dessecador para posterior utilização.



## 4.2 PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO DA CUTÍCULA COILINA

### 4.2.1 VEÍCULO

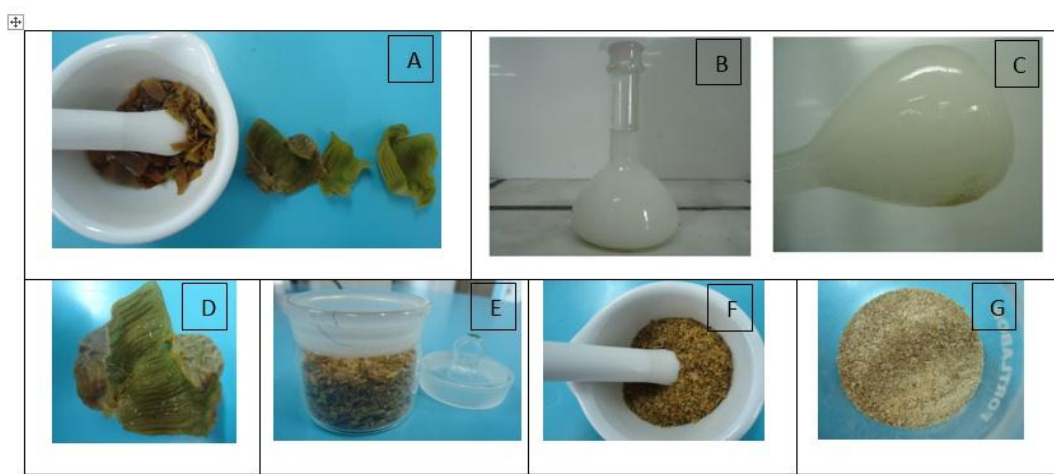
O veículo foi preparado com 1% de carboximetilcelulose (CMC) em água destilada.

### 4.2.2 SUSPENSÃO DA MEMBRANA COILINA

Para a realização da suspensão da membrana coilina, esta foi adicionada no veículo, na concentração de 1mg/mL. Essa suspensão foi preparada diariamente para a administração aos animais (LAKSHMI, SINGH, & SHRIVASTVA, 2010).

A suspensão da coilina (Figura 6C) foi realizada diariamente (uso imediato) para evitar influência por possível degradação dos componentes do veículo e da substância estudada, imitando o uso etnofarmacológico (SIMÕES, 2007). As Figuras 6B e 6C ilustram a suspensão de 1% de CMC com 10 mg da coilina (Figura 6G), em um balão volumétrico (10 mL). A Figura 6A e 6D mostram a membrana coilina limpa e seca *in natura*, pronta para ser triturada no gral e pistilo (E; F e G).

**Figura 6. Imagens demonstrativas do manuseio, trituração da cutícula coilina.**



Fonte: Fotografias do arquivo pessoal.

### 4.3 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

#### 4.3.1 RATOS WISTAR

Foram utilizados ratos Wistar (fêmeas), 3 meses, pesando entre 200 e 250 g provenientes do Biotério da Universidade Federal de Santa Maria, RS.

Os animais foram mantidos em ambiente climatizado ( $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) com ciclo claro escuro de 12 horas, com água e alimentação *ad libitum* (exceto quando mencionado), na sala 4 de experimentação do Biotério da Universidade Federal do Pampa, *Campus* Uruguaiana (RS).

Todos os procedimentos realizados nesta pesquisa estavam em concordância com os Princípios Internacionais para a Pesquisa envolvendo Animais (Genebra), e com a legislação brasileira disposta na Lei nº 11.794/2008 (Procedimentos para uso científico de animais) e no Decreto 24.645/34 (Dos Direitos dos Animais). Este projeto foi registrado no SIPPEE e aprovando pelo CEUA sob protocolo nº 08/2013.

#### 4.3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Todos os animais foram privados de alimentos 24 horas (TAHA, SALGA, & ALI, 2012) antes da exposição dos ulcerogênicos e divididos em 13 grupos (n = 5 cada grupo).

- Grupo Veículo (Controle): V
- Grupo V + Etanol (E)
- Grupo E+V
- Grupo V + AAS (A)
- Grupo A+ V
- Grupo Omeprazol (O) + E
- Grupo O + A
- Grupo E + O
- Grupo A + O

- Grupo Coilina (C) + E
- Grupo C + A
- Grupo E + C
- Grupo A + C

#### **4.3.2.1 Protocolo de Tratamento**

##### *4.3.2.1.1 Tratamento com o Veículo:*

Neste procedimento, os animais receberam a administração por gavagem da suspensão de CMC a 1% em água destilada no volume de 1 mL/200g do peso corporal dos animais. Após 1 hora de espera, foram realizadas as eutanásias (*overdose* de tiopental (20 mg/mL) via *i.p.*) e as coletas dos estômagos para a realização dos protocolos (LAKSHMI, SINGH, & SHRIVASTVA, 2010).

##### *4.3.2.1.2 Tratamento com o Etanol:*

A indução de úlcera gástrica através da ingestão etílica foi realizada administrando por gavagem o etanol absoluto (EtOH) refrigerado (4°C) na dose de 1 mL/200g *dop.c.* (SULEYMAN, DEMIREZER, & KURUUZUM-UZ, 2004, LAKSHMI, SINGH, & SHRIVASTVA, 2010).

##### *4.3.2.1.3 Tratamento com o Ácido Acetilsalicílico*

Para o modelo da indução de úlcera gástrica através da ingestão de AAS foi dissolvido no veículo 400 mg de AAS e administrado por gavagem no volume de 1 mL/200g do p.c., como realizado em Taha et al.,(2012) e Yoshida et al., (2002).

##### *4.3.2.1.4 Tratamento com Omeprazol:*

O tratamento foi realizado com o fármaco padrão (ONASANWO, et al., 2011) omeprazol (OMZ) em 10 mg do pó, suspenso no veículo e administrado por gavagem 1 mL/200g do p.c. (LAKSHMI, SINGH, & SHRIVASTVA, 2010).

#### 4.3.2.1.5 Tratamento com Cutícula Coilina:

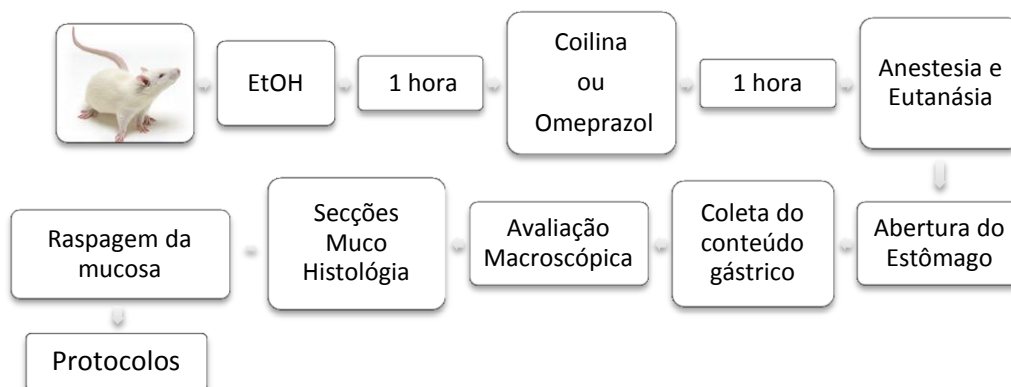
A análise do efeito protetor da cutícula coilina foi realizado com a administração da suspensão da coilina na concentração de 5mg/Kg no volume de 1mL/200g do p.c. através de gavagem. O procedimento da indução da lesão gástrica por EtOH ou AAS foi realizado após 1 hora.

Para a verificação do efeito cicatrizante foi realizado primeiramente a indução da lesão gástrica e somente com 1 hora de intervalo foi realizado a administração da suspensão contendo a C (5 mg/Kg). Prosseguindo, foram aguardados 60 minutos e o animal foi anestesiado para a eutanásia e coleta das amostras.

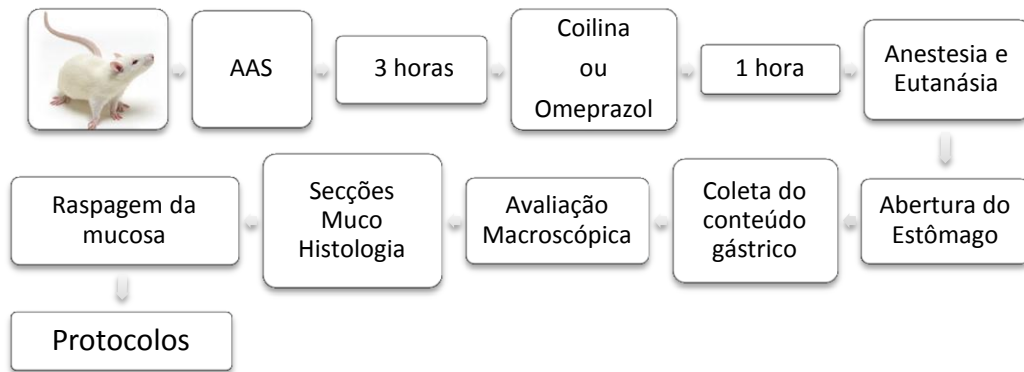
#### 4.3.2.2 Esquema ilustrativo para a realização dos tratamentos

Para analisar o efeito curativo, foi realizado o seguinte procedimento:

**Figura 7. Fluxograma ilustrativo do procedimento como tratamento curativo com coilina ou omeprazol após o agente ulcerativo etanólico.**

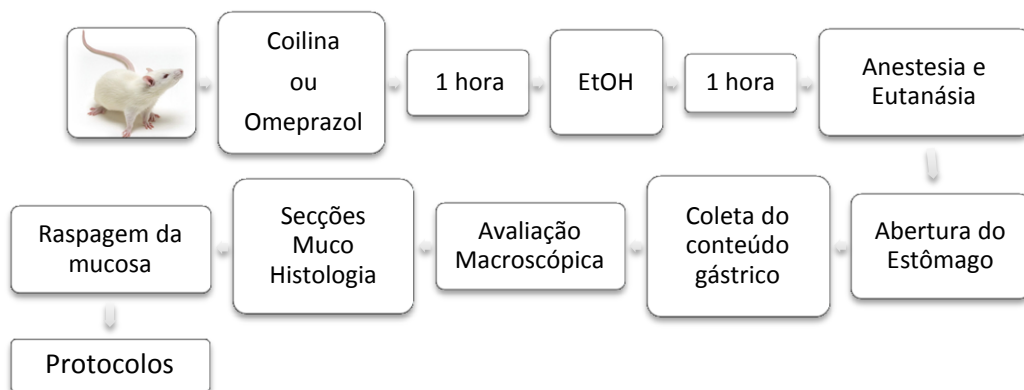


**Figura 8. Fluxograma ilustrativo para proceder ao procedimento com o tratamento curativo C ou OMZ após o agente ulcerativo AAS.**

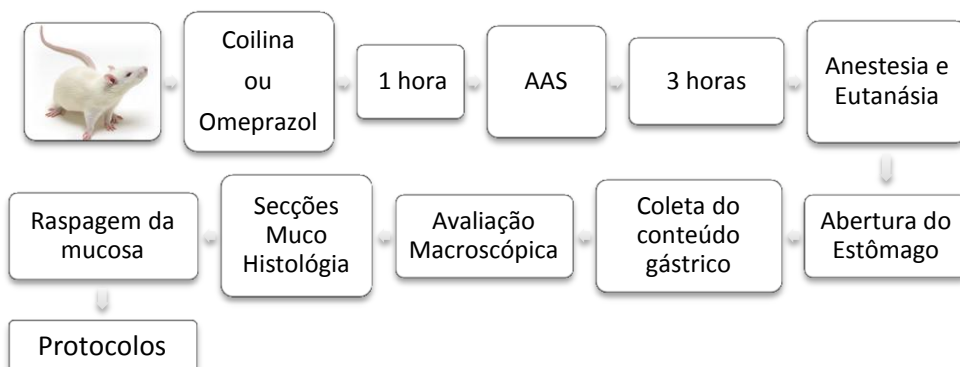


Para a realização dos protocolos com o objetivo de averiguar o efeito preventivo foram realizados os seguintes protocolos:

**Figura 9. Fluxograma ilustrativo para procedimento com o tratamento preventivo com agente ulcerativo etanólico.**



**Figura 10. Fluxograma ilustrativo para procedimento com o tratamento preventivo com agente ulcerativo AAS.**



## 4.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

### 4.4.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Após a eutanásia o estômago dos animais foram retirado, aberto ao longo da curvatura maior para observar as lesões gástricas que apareceram como bandas hemorrágicas ao longo das cristas da mucosa estomacal, sendo pontuadas através da severidade e a intensidade das lesões (GAMBERINI et al., 1991). Além disso, foi coletado o fluido gástrico para quantificação ácida; secções do estômago para análise histológica e raspagem da mucosa para análise bioquímica.

### 4.4.2 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DAS LESÕES

A avaliação foi realizada por dois observadores (cegos ao estudo) e seguiu a classificação pelo Índice de Lesões Ulcerativas (Tabela 1). Foram calculados por meio de somatória dos parâmetros de acordo com a metodologia adaptada por Gamberini et al., (1991).

**Tabela 1. Índice de lesões Ulcerativas**

<b>Lesão</b>	<b>Pontuação</b>
De 0 a 10 petéquias	2
Acima de 10 petéquias	3
Úlceras de até 1 mm	*n x 2
Úlceras maiores que 1 mm	*n x 3
Úlceras perfuradas	*n x 4
Hemorragia	1
Edema	1
Perda de pregas	1
Perda da coloração	1

(\*n=número de lesões encontradas)

#### 4.4.3 DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ DO SUCO GÁSTRICO

O conteúdo gástrico foi coletado para a quantificação do volume e para determinação do pH. Para tanto, todo o estômago foi lavado com 3mL de água MilliQ (pH 7,12) e recolhendo todo o conteúdo gástrico, isto foi centrifugado a 1500 rpm durante 20 minutos. Três mililitros do sobrenadante foi titulado com NaOH 0,1N, utilizando fenolfaleína 2% como indicador ácido-base (DOMER & SPRINGFIEL, 1971).

A concentração de íons de hidrogênio foi calculada pela seguinte fórmula:

$$pH = -\log[H^+]$$

#### 4.4.4 QUANTIFICAÇÃO DO MUCO ADERIDO À MUCOSA GÁSTRICA

Após a avaliação e quantificação das lesões, o antro do estômago foi retirado pesado e incubado em 10 mL de solução corante de Alcian Blue (AB) 0,1%, onde permaneceu corando por 2 horas.

O excesso de AB foi removido com sacarose 0,25 M (foram realizadas duas lavagens sucessivas, sendo a primeira por 15 minutos e a segunda durante 45 minutos). O corante complexado com o muco na parede glandular foi extraído com 5 mL de cloreto de magnésio (0,5 M), agitando-se intermitentemente, por 1 minuto a cada 30 minutos durante 2 horas. Após, foi separado 4 mL desta solução azul adicionado 4 mL de éter etílico e agitado vigorosamente até formar uma emulsão, centrifugado a 3600 rpm x 10 minutos para separar a fase aquosa, descartando o resíduo. A concentração de AB nas amostras foi determinada por leitura espectrofotométrica a 580 nm e quantificada pela complexação que ocorreu com o muco, esta foi determinada por interpolação na curva padrão do corante e expressa em µg de AB/mL/g de tecido (SHAY et al., 1945).

#### 4.4.5 PREPARAÇÃO DA FRAÇÃO MICROSSOMAL DA MUCOSA ESTOMACAL

A preparação da fração microsomal gástrica foi realizada segundo Onasanwo et al., (2011). A mucosa do estômago foi removida através de raspagem e homogeneizada em um tampão contendo: Manitol 125 mM, Sacarose 40 mM, EDTA 1 mM, Piperazina-1,4-bis (ácido 2-etanosulfônico) (PIPES) 50 mM 6,7. O homogeneizado foi centrifugado por 7 minutos a 800xg, o sobrenadante centrifugado a 14.500xg por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi centrifugado a 100.000xg por 30 minutos. O *pellet* resultante foi armazenado em tampão PIPES 60 mM, a -20C° para a realização da atividade da bomba de próton.

#### 4.4.5.1 Atividade de H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase Microsomal

O ensaio da atividade foi realizado de acordo com o método descrito por Hervatin et al. (1987), citado em Zhi-Min (2005). O tampão de ensaio, em volume de 200 mL, consistiu de: Tris-1,4-piperazina-bis (ácido etanosulfônico) 60 mM, pH 7.4; ouabaína 0,1 mM; sacarose 90 mM; KCl 15 mM ou sacarose 30 mM. O volume de amostra foi de 20 µL da fração microsomal, tendo como substrato ATP 2 mM, incubado por 10 min. a 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético (10%). O produto da reação, o fosfato (P<sub>i</sub>), liberado foi determinado pelo método de Chan (1986). Atividade sem K foi considerada a atividade basal. A diferença entre atividade com e sem K foi definida como a atividade H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. A atividade foi expressa como µmol P<sub>i</sub>/h/mg de proteína. A proteína foi quantificada pelo método de Bradford (1976).



## 4.5 ANÁLISES HISTÓLOGICAS

Os tecidos foram fixados com formol tamponado a 10% por no mínimo 48 horas e no máximo 7 dias, as peças foram desidratadas (gradação crescente de etanol) e incluídas em parafina histológica.

Posteriormente, as peças foram cortadas (5 mm de espessura) em micrótomo, de maneira seriada. As amostras foram submetidas à coloração por hematoxilina-eosina (HE) para observação geral das estruturas e celularidade (BEHMER, TOLOSA, & FREITAS NETO, 1976).

O procedimento de corte, coloração e análise histopatológica foram realizadas em parceria no Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da UNIPAMPA, *campus* Uruguaiana, pela mestranda Caroline da Silva Silveira e orientada pelo Prof. Dr. Bruno Leite dos Anjos.

#### 4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $M \pm$  EPM). Os valores foram analisados usando ANOVA de uma via, com *post-hoc* de *Tukey's*. Foram considerados como estatisticamente significativas, as diferenças de médias com valor de  $p < 0.05$ .

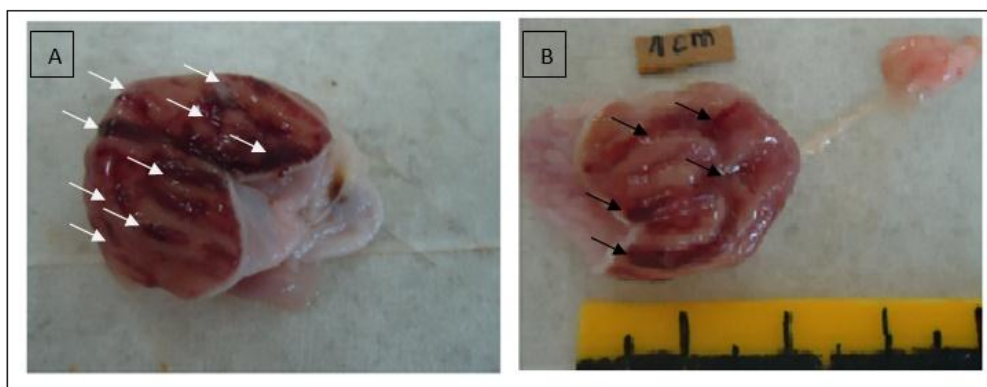
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ÚLCERAS GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ETANOL

#### 5.1.1 ÍNDICE DE LESÃO ULCEROGÊNICA

A Figura 11 representa fotografias do resultado do procedimento indutor da lesão gástrica provocada pelo etanol, servindo para a observação visual e somatório da pontuação citadas na tabela Índice de Lesões Ulcerativas (Gamberini et al., 1991) (Tabela 1.).

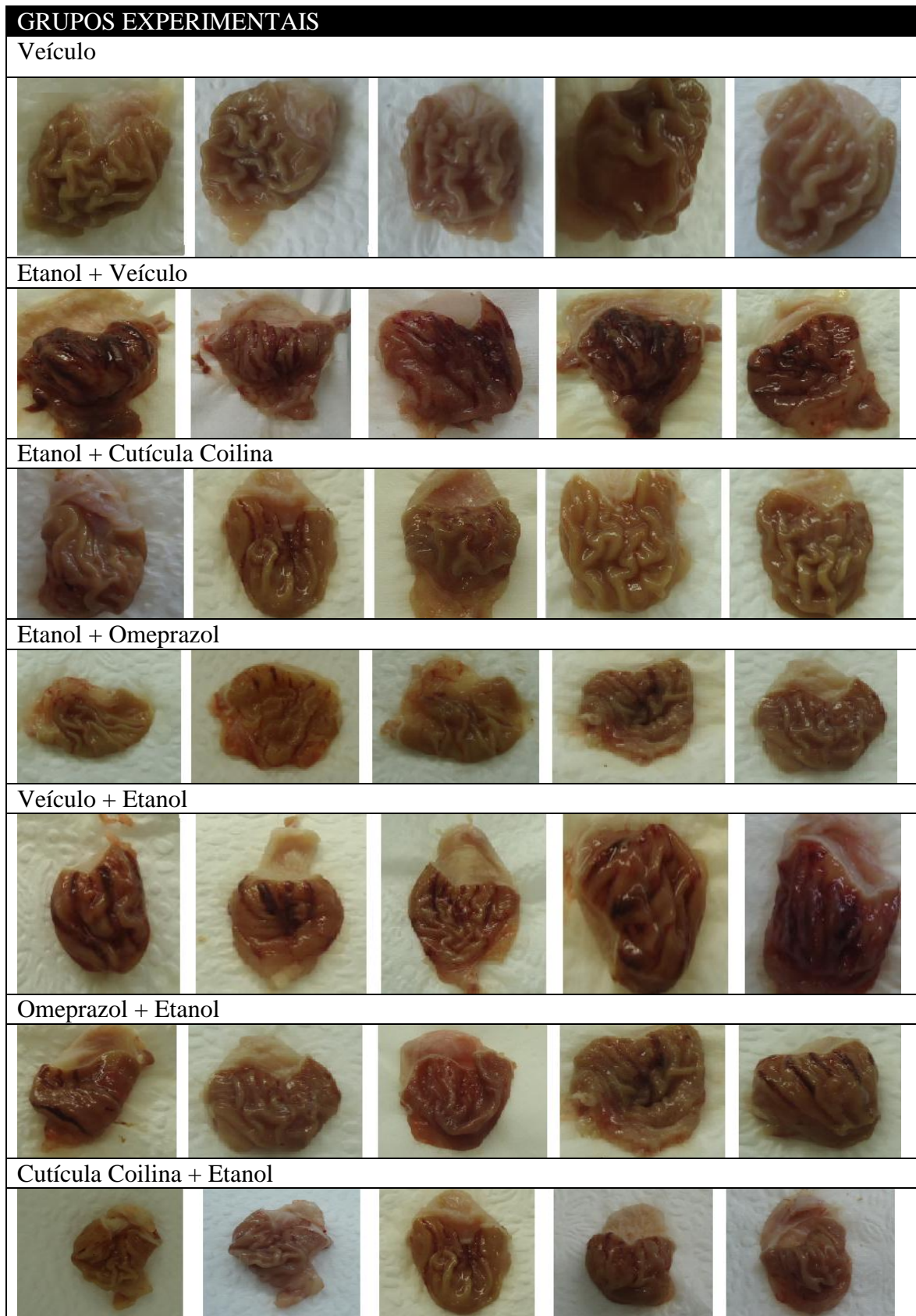
**Figura 11. Efeito da indução das lesões provocadas por Etanol absoluto refrigerado (A). Lesões em menor escala, pois receberam tratamento experimental com a Coilina (B).**



A Figura 11A evidencia a ulceração provocada pela administração de etanol. As setas brancas indicam as lesões e serviram para classificar e pontuar as diferenças nas agressões ocorridas na mucosa. Na Figura 11B, as setas pretas apontam as lesões provocadas pela administração do etanol absoluto, em número menor, pois esse estômago recebeu tratamento com a cutícula coilina.

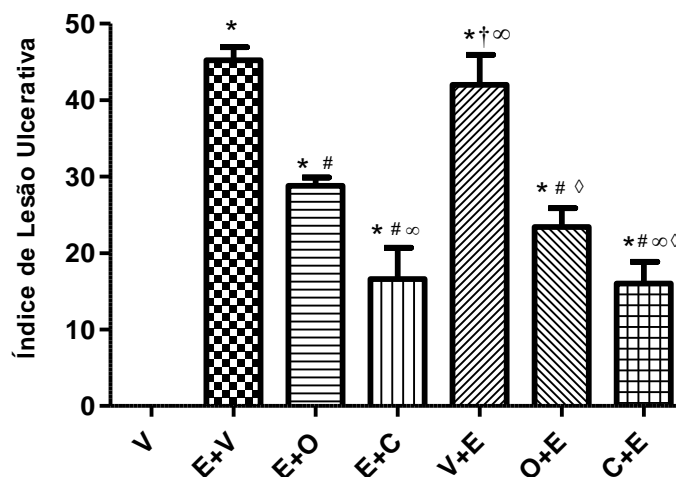
A figura 12 mostra as fotografias dos estômagos retirados dos diferentes grupos experimentais, onde foram avaliadas e quantificadas as lesões provocadas pelos diferentes tratamentos.

**Figura 12. Imagens dos estômagos retirados após os protocolos de ulceração e ou tratamento.**



A Figura 13 mostra os resultados obtidos com o somatório da pontuação realizada através do Índice de Lesão Ulcerativa com o tratamento da cutícula colina ou omeprazol antes ou após a lesão provocada pelo etanol.

**Figura 13. Efeito do tratamento com a colina ou omeprazol, na injúria provocada pelo etanol, na classificação do Índice de Lesões Ulcerativas.**



\*  $p < 0,05$  vs V; #  $p < 0,05$  vs E+V; †  $p < 0,05$  vs E+C; ∞  $p < 0,05$  vs E+O; ∅  $p < 0,05$  vs V+E

O grupo V que recebeu somente a CMC não apresentou lesões macroscópicas (Figura 13), exibindo valores nulos demonstrando que o veículo utilizado não promoveu alterações visíveis na mucosa do estômago dos animais experimentais. Lakshmi, Singh e Shirivastva (2010) também demonstram que esse excipiente é inerte nessa concentração (1%).

Os animais que receberam a lesão ulcerativa demonstraram um somatório elevado ( $E+V= 45,2 \pm 1,74$  e  $V+E= 42,0 \pm 3,92$ ) de pontos (Figura 13). Vários estudos correlacionam o consumo excessivo de álcool como tendo um importante papel na etiologia da úlcera gástrica em humanos (CHARI, TEYSSEN, & SINGER, 1993; STERMER, 2002).

As principais características da indução da úlcera gástrica pelo etanol são a perda epitelial, edema da mucosa e a hemorragia sub-epitelial. O etanol penetra rapidamente na mucosa gástrica, a lesão é caracterizada por danos de membrana,

hemorrágica erosiva, lesões com necrose das células, de coagulação difusa, esfoliação de células, múltiplas erosões, congestão vascular e formação distinta de úlcera (SIKIRIC et al., 1997 e FARIA et al., 2012). Embora estas lesões causadas pelo agente necrosante em roedores não simulem integralmente as características da úlcera que se desenvolve em humanos, pois essas lesões nos roedores são temporalmente agudas e, conseqüentemente superficiais, esse modelo ulcerogênico possui respaldo para a pesquisa de novos protótipos de drogas potencialmente efetivas para o caráter clínico (SZABO & GOLDBERG, 1990).

Os grupos que receberam o fármaco omeprazol demonstraram uma gastroproteção (E+O= 28,8 ±1,1 e O+E= 23,4 ±2,85 pontos), uma vez que a atuação desse medicamento é promover a diminuição da secreção de H<sup>+</sup> pela inibição da bomba de próton, conseqüentemente aumentando o pH do suco gástrico e assim, promovendo uma melhora no estado patogênico (LORENTZON, et al. 1985).

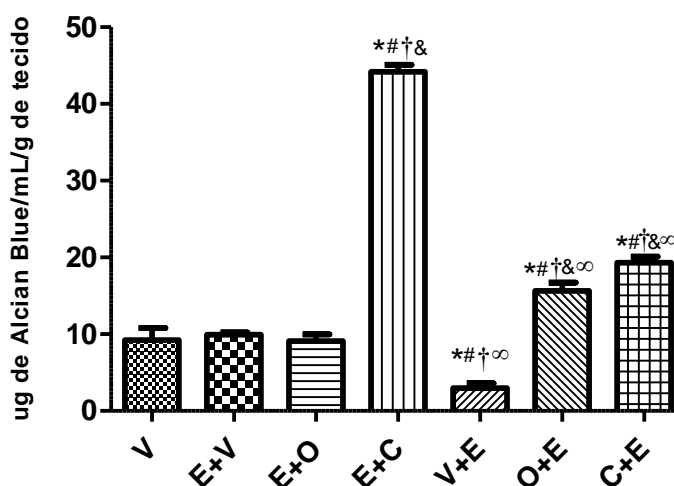
Os animais que receberam o tratamento experimental na dose de 5 mg/Kg da coilina (E+C= 16,6 ±4,1 e C+E=16,0 ±2,84 pontos) apresentaram uma diminuição na pontuação das lesões estomacais. Esses dados demonstraram que ocorreu uma gastroproteção contra os danos provocados pelo ulcerogênico e essa pontuação também foi menor quando comparados aos resultados obtidos com a utilização de omeprazol (Figura 13). A coilina exerceu uma melhora na prevenção contra essas lesões, pois atuou como um agente protetor na mucosa mais eficaz que o omeprazol. Também, os extratos de raiz de *Hemidesmus indicus* R. Br. obtiveram através de uma resposta dependente de dose (150, 300 e 450 mg), uma redução na formação de lesões gástricas em ratos, induzido por vários procedimentos ulcerativos comparando-os com omeprazol (ANOOP & JEGADEESAN, 2003).

Mendonça et al., (2013), obtiveram gastroproteção das lesões provocados por esse mesmo ulcerogênico através da administração do extrato da *Baccharis trimera* (Less) em diferentes doses, utilizando o mesmo somatório do índice de lesões.

### 5.1.2 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DO MUÇO

A Figura 14 apresenta os dados da quantificação do Alcian Blue (AB) aderido na mucosa dos estômagos das ratas experimentais que receberam o tratamento com a cutícula colina ou omeprazol antes ou após a lesão provocada pelo etanol.

**Figura 14. Quantificação da produção de muco gástrico.**



\*p < 0,05 vs V; #p < 0,05 vs E+V; †p < 0,05 vs E+O; ∞p < 0,05 vs E+C; &p < 0,05 vs V+E.

Ao analisarmos o resultado do efeito do omeprazol (Figura 14) administrado posteriormente à lesão etanólica, percebemos que houve aumento na produção de muco (O+E= 15,63 ±1,09 µg de AB/mL/ g de tecido), em comparação ao grupo que recebeu o omeprazol depois da lesão (E+O= 9,12 ±0,85 µg de AB/mL/g de tecido). O mecanismo da ação do omeprazol é aumentar o pH do suco gástrico através da inibição da bomba de próton. O emprego preventivo do omeprazol (5 mg/Kg) aumentou a produção total do muco, conseguindo evitar a ação necrosante do ulcerogênico (CHARI, TEYSSEN, & SINGER, 1993).

O álcool aumenta a motilidade do estômago (STERMER, 2002), portanto quando as ratas receberam o pós-tratamento com o omeprazol conseguiram manter a produção basal do muco estomacal protegendo-o da lesão. No trabalho de Lakshmi, Singh e Shrivastva (2010), utilizando o omeprazol (10 mg/Kg) em ações contra dano provocado pelo etanol também mantiveram a produção do muco.

A dose de 5 mg/Kg da suspensão da coilina aumentou a concentração de Alcian Blue (E+C= 44,197  $\pm$ 0,921 e C+E= 19,31  $\pm$ 0,80  $\mu$ g de AB/mL/g de tecido), como mostrado na Figura 14, em comparação aos grupos que receberam o veículo e a lesão (V= 9,23  $\pm$ 1,56; E+V= 9,93  $\pm$ 0,31; V+E=2,99  $\pm$ 0,62  $\mu$ g de AB/mL/g de tecido). A barreira mucoide gástrica desempenha um papel importante no mecanismo de defesa contra úlcera gástrica, pois forma um muco contínuo semelhante a um gel, essa superfície mucoide mantém um pH em torno de 6-7, protegendo a mucosa do meio ácido (pH 1-2) (ZAKARIA et al., 2014). A qualidade e quantidade da secreção do muco gástrico são os critérios mais importantes para a determinação do estado dessa barreira mucolítica na defesa das injúrias promovidas por ácido e ação da pepsina (RACHCHH & JAIN, 2008). Essa influência no aumento da produção de muco pode ocorrer por duas possíveis vias, a COX e as PG, onde seus produtos são precursores de muco (SMITH, GARAVITO, & DEWITT, 1996) e de alguma forma estas vias podem estar sendo ativadas, com a utilização da coilina.

A capacidade das PG para estimular a secreção de muco, pode também contribuir significativamente para a promoção da cicatrização da úlcera. As PG endógenas são obtidas principalmente a partir de COX-2, os efeitos benéficos da PGE2 sobre a cicatrização da úlcera gástrica em roedores parecem ser mediados através de receptor específico (EP4). Enquanto a COX-1 é a isoforma predominante expressa na mucosa gástrica normalmente. A expressão da COX-2 pode ser regulada muito rapidamente. Esta regulação positiva parece ser uma resposta defensiva e anti-inflamatória destinada a reforçar as defesas das mucosas (WALLACE, 2008).

Anoop e Jegadeesan (2003), obtiveram um aumento acentuado na produção de muco e uma diminuição no grau de ulceração, através da administração de extratos da *Hemidesmus indicus*, sugerindo que o muco também protegeu a mucosa e a



submucosa da reação inflamatória provocada pelo ulcerogênico etanol. Também, Mojzisz, Hegedüsová, e Mirossay (2000) demonstraram que a reperfusão aumentada estimulada por *Malotilate* em comparação com o fármaco sucralfato aumentou o muco aderido na mucosa epitelial gástrica e diminuiu a isquemia no local lesionado, possivelmente a ação da coilina na produção do muco possa estar de alguma forma relacionada com este efeito.

Zakaria et al., (2014) estudou o envolvimento de *Muntingia calabura* na atividade gastroprotetora e obteve uma resposta semelhante ao nosso trabalho na diminuição da lesão e no aumento do muco. O extrato foi administrado em doses crescentes (100, 250 e 500 mg/Kg) e obteve uma maior produção do muco com a maior dose, semelhante ao fármaco utilizado no estudo (100 mg/Kg de ranitidina).

### 5.1.3 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DO CONTEÚDO GÁSTRICO

A Tabela 2 relaciona os dados obtidos da determinação de parâmetros fisiológicos do conteúdo estomacal das ratas experimentais que receberam o tratamento da cutícula colina ou omeprazol antes ou após a lesão provocada pelo etanol.

**Tabela 2. Efeito do tratamento da coilina ou omeprazol nos parâmetros do conteúdo gástrico em modelo ulcerativo utilizando etanol.**

Tratamento	Volume de suco gástrico (mL)	pH
V	0,71 ±0,27	0,91 ±0,04
E+V	6,42 ±1,33*	1,11 ±0,09&
E+O	2,38 ±0,15#¥	1,04 ±0,06&
E+C	4,02 ±0,91¥	1,27 ±0,01* &
V+E	3,87 ±0,27¥	0,78 ±0,08
O+E	15,62 ±1,09*#	0,86 ±0,02 <sup>∞</sup>
C+E	3,75 ±0,39¥	0,99 ±0,04 <sup>∞</sup>

Dados expressos em média±EPM. \*p < 0,05 vs V; #p < 0,05 vs E+V; †p < 0,05 vs E+O; ∞p < 0,05 vs E+C; &p < 0,05 vs V+E; ¥p < 0,05 vs O+E; ◊p < 0,05 vs C+E.

Segundo Chari, Teyssen e Singer (1993), dependendo da concentração alcoólica utilizada ocorrem processos fisiológicos diferentes quando o álcool entra em contato com o suco gástrico. Este agente ulcerogênico em baixas concentrações (5 a 20%) aumenta a motilidade e promove um rápido esvaziamento gástrico. Entretanto, quando o etanol é utilizado em graduação alta (acima de 50%) atrasa o esvaziamento gástrico (PFEIFFER, HOLGL, & KAESS, 1992) e promove danos cáusticos possibilitando lesões profundas, ocasionando estase e ruptura da parede dos vasos sanguíneos (STERMER, 2002). Lakshmi, Singh & Shrivastva (2010), demonstraram que o etanol (90%) aumentou a secreção gástrica (pepsina e mucina), e com isso, alterou o volume do suco gástrico retendo-o. Portanto, o álcool etílico interfere no processo da motilidade estomacal retardando o esvaziamento gástrico, por meio da excitação dos nervos sensoriais da mucosa gástrica e da estimulação da liberação de gastrina e histamina e provoca uma redução acentuada da diferença de potencial transmucoso, condição que lesa a barreira mucosa, e aos íons  $H^+$  são associados às lesões agudas da mucosa gástrica resultando em hemorragias da mucosa (STERMER, 2002). Assim sendo, os volumes do suco gástrico coletado dos grupos com lesão etanólica (E+V e V+E) são maiores que no grupo veículo.

Para abrandar os efeitos do agente ulcerogênico, o omeprazol desencadeia um processo de inativação da secreção do  $H^+$  e mantendo por mais tempo o conteúdo gástrico (E+O e O+E) dentro do lúmen estomacal. Ichikawa et al., (1994), mostraram que os fármacos que inibem a secreção ácida no estômago interagem e permeiam a ligação glicoproteína do muco, retardando o coeficiente de difusão, sugerindo que o omeprazol não só inibem a secreção de ácido, mas também promove ações de proteção da mucosa gástrica, através do aumento da biossíntese da mucina. Os grupos que receberam o tratamento experimental com a coilina não alteram a quantidade do volume gástrico (E+C e C+E) em comparação os animais que receberam a lesão provocada pelo etanol.

Os dados da quantidade de ácido no conteúdo gástrico do grupo V e do grupo E+V não apresentaram diferença estatística entre si (Tabela 2). Quando o agente agressor foi administrado por primeiro (pH do etanol em torno de 6,5), seguiu-se uma série de danos na mucosa estomacal provocando edema, perda de função e destruição celular. A hemorragia acometida, pode mascarar a dosagem do

pH do conteúdo gástrico, pois as hemácias possuem poder de tamponamento (pH em torno de 7,5). Conseqüentemente, não havendo integridade estrutural das células parietais, as enzimas secretoras de  $H^+$  ( $H^+,K^+$ -ATPase) ficaram prejudicadas e, possivelmente por isso, o omeprazol não foi eficaz e o pH desse grupo (E+O) se manteve igual ao basal.

Os grupos de animais que receberam os tratamentos preventivos (C+E e O+E), conseguiram manter o pH fisiológico do estômago, provavelmente, em consequência da redução dos danos provocados pelo ulcerogênico, mantendo suas estruturas celulares intactas quando comparado com o grupo controle positivo (V+E).

Os animais que receberam a coilina posteriormente à lesão (E+C) apresentaram o maior aumento de pH quantificado no conteúdo estomacal coletado, demonstrando uma diferença significativas entre o V e os grupos que receberam primeiramente o tratamento, portanto o efeito gastroprotetor da coilina foi mais eficaz quando administrada posteriormente à indução de injúria gástrica.

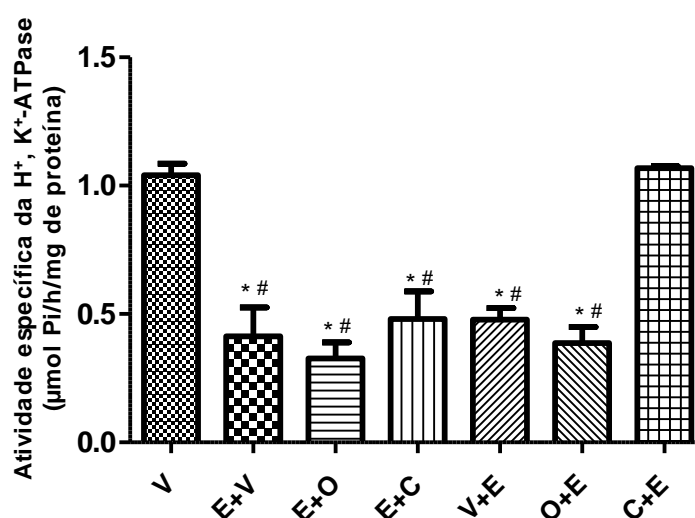
Farias, et al., (2012), correlacionaram o aumento do pH e do muco com o aumento de níveis da PGE2 na administração do extrato de *Rhizophora mangle*, a estimulação da PGE2 aumenta também a secreção do bicarbonato, contribuindo significativamente para a promoção da cicatrização da úlcera. Portanto, se faz necessário uma investigação para desvendar uma possível participação da coilina na estimulação da PGE2.

Semelhante ao nosso resultado, Silva et al., (2011) avaliando as lesões, através de um escore de lesão, o valor de pH e volume gástrico, sob ação de um produto de origem marinha (PLS=polissacarídeo sulfatado), o qual resultou em prevenção aos danos gástricos induzidos por etanol (50%), levantando a possibilidade do polissacarídeo estudado depositar-se na mucosa gástrica e com isso, melhorar a resistência à lesão ulcerogênica. Como a coilina contém glicoproteínas, este mecanismo sugerido por Silva e colaboradores, pode também estar ocorrendo nestas lesões e produzindo a gastroproteção.

#### 5.1.4 ATIVIDADE DA $H^+,K^+$ -ATPase MICROSSOMAL

Na figura 15 são apresentados os resultados obtidos da atividade específica da bomba de prótons pela quantificação da liberação do fosfato inorgânico liberado na hidrólise de ATP.

**Figura 15. Atividade específica da bomba de prótons gástrica em animais lesionados com etanol.**



\*  $p < 0,05$  vs V; #  $p < 0,05$  vs C+E.

Os grupos de animais que apresentaram inibição na atividade específica da  $H^+,K^+$ -ATPase gástrica foram os do controle positivo ( $E+V = 0,414 \pm 0,112$ ;  $V+E = 0,478 \pm 0,044 \mu\text{mol Pi/h/mg}$ ), e os grupos controle negativo ( $E+O = 0,327 \pm 0,062$   $O+E = 0,387 \pm 0,062 \mu\text{mol Pi/h/mg}$ ), uma vez que o omeprazol é um medicamento clássico usado como inibidor da bomba de prótons na clínica, pois dependendo da dose, inibe o desenvolvimento de várias úlceras experimentais e acelera a cicatrização de úlceras gástricas crônicas em animais, sendo considerado como uma atividade citoprotetora (OKAKE, 1986).

Lakshmi, Singh e Shivastva (2010), obtiveram através de microssomas gástricos isolados da mucosa do estômago de ratos, resultados mostrando que a

fração clorofórmica estuda da planta (*Xilocarpus granatun*) inibiu a atividade da  $H^+,K^+$ -ATPase quando comparando com a atividade do omeprazol. Esta fração tem ação antiulcerogênica por possuir uma atividade antissecretória de prótons.

Atividade da  $H^+,K^+$ -ATPase nas células parietais secreta ácido pelos canalículos, gerando um pH <1,0 no lúmen desta estrutura. A acidez deste espaço permite a acumulação de bases fracas neste pKa. O omeprazol é uma base fraca (pKa 4), quando ocorre o acúmulo das suas moléculas nas células estomacais, ele se torna rapidamente ativo (pela acidez elevada do conteúdo estomacal) e inibe a secreção ácida através da ligação covalente à cisteínas acessíveis na enzima  $H^+,K^+$ -ATPase das células parietais (SHIN & KIM, 2013).

A coilina utilizada como forma de tratamento posterior à lesão sinalizou uma inibição à secreção pelas células parietais e diminuição ( $E+C= 0,480 \pm 0,112$   $\mu\text{mol Pi/h/mg}$ ) na atividade da bomba de prótons. E, além disso, o tratamento experimental com a coilina antes da lesão etanólica foi capaz de prevenir a ação ulcerativa e não alterar a atividade enzimática ( $C+E= 1,068 \pm 0,0069$   $\mu\text{molPi/h/mg}$ ), mantendo-se igual ao controle ( $V= 1,041 \pm 0,045$   $\mu\text{molPi/h/mg}$ ). Até o momento, estes resultados sugerem que no modelo de lesão gástrica aguda induzida por etanol o efeito gastroprotetor da coilina parece envolver a diminuição da atividade  $H^+,K^+$ -ATPase, o aumento da quantidade de muco e pH impedindo a ação lesiva do ulcerogênico, bem como prevenindo a formação de lesão gástrica.

Farias et al., (2012), mostraram com a administração do extrato concentrado de taninos da planta *Rhizophora mangle* L., o efeito inibitório da atividade da  $H^+,K^+$ -ATPase, sugerindo uma ligação entre os taninos e as proteínas, precipitando-as. Relacionando essa ação, com o efeito citoprotetor obtido, pois também encontraram uma diminuição no escore de lesões, um aumento no muco e nos níveis PGE2 e no valor de pH.

## 5.2 ÚLCERAS GÁSTRICAS INDUZIDAS POR AAS

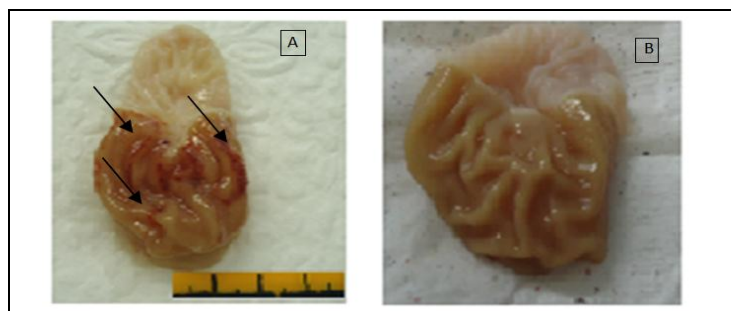
### 5.2.1 ÍNDICE DE LESÃO ULCEROGÊNICA

Com a finalidade de promover os ensaios de ulceração gástrica aguda induzida pelo ulcerogênico ácido acetilsalicílico (AAS), seguindo o esquema dos protocolos delineado nas Figuras 8 e 10 para efetuar as análises.

A Figura 16 demonstra através das fotografias, o procedimento indutor da lesão gástrica com a utilização do AAS, servindo para a observação visual e somatório da pontuação, citadas na tabela de Índice de Lesões Ulcerativas (Gamberini et al., 1991).

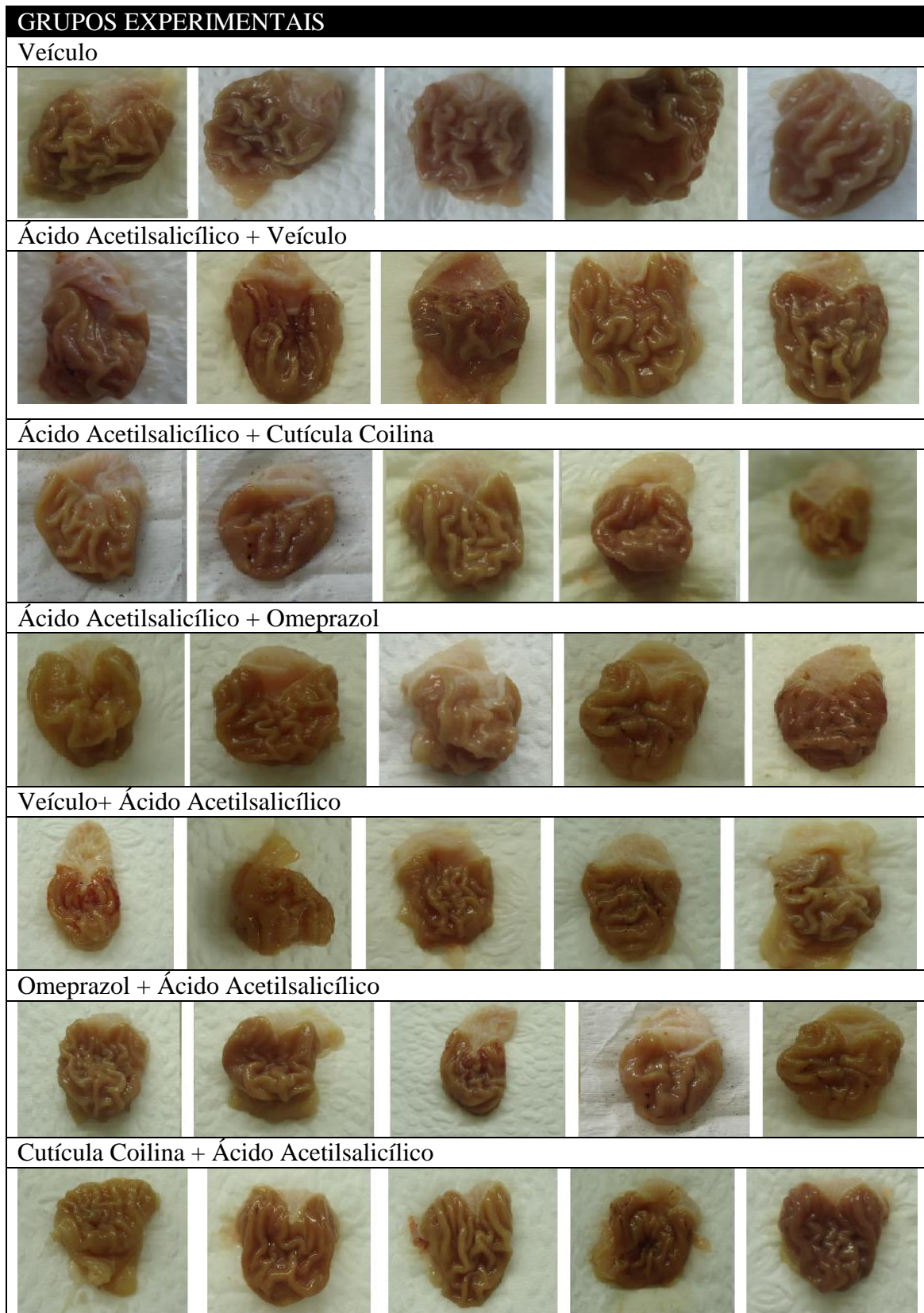
Na Figura 16A é mostrada a ulceração provocada pela administração de AAS em um grupo sem tratamento. As setas pretas indicam as lesões hemorrágicas e serviram para classificar e pontuar as diferentes agressões ocorridas na mucosa. Na Figura 16B é demonstrada a mucosa estomacal intacta, sem nenhum tipo de lesão sofrida pela administração da AAS, pois este estômago foi tratado previamente com a cutícula coilina.

**Figura 16. Lesões provocadas por AAS (A) em 400 mg/Kg. Não há nenhum tipo de lesão, pois receberam tratamento experimental da coilina (B).**



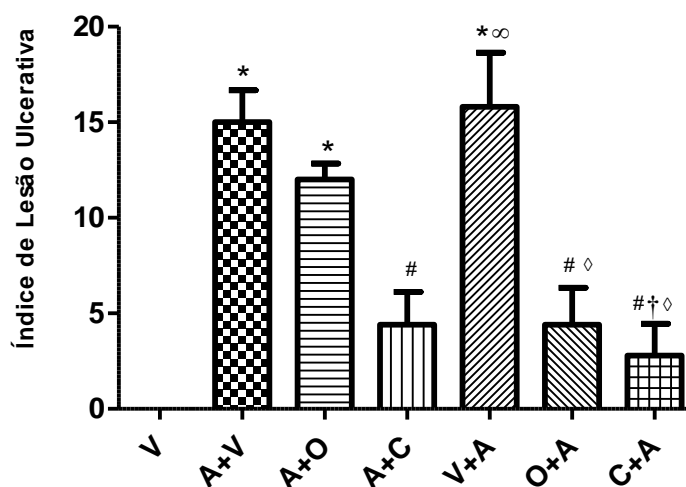
A figura 17 mostra as fotografias dos estômagos retirados dos diferentes grupos experimentais, onde foram avaliadas e quantificadas as lesões provocadas pelos diferentes tratamentos.

**Figura 17. Imagens dos estômagos retirados após os protocolos de ulceração e ou tratamento.**



A Figura 18 mostra os resultados obtidos com o somatório da pontuação realizada através do Índice de Lesão Ulcerativa com o tratamento da cutícula colina ou omeprazol antes ou após a lesão provocada pela utilização de ácido acetilsalicílico.

**Figura 18. Efeito do tratamento com a colina ou omeprazol, na injúria provocada pelo ácido acetilsalicílico, na classificação do Índice de Lesões Ulcerativas.**



\*p < 0,05 vs V; #p < 0,05 vs A+V; †p < 0,05 vs A+O; ∞p < 0,05 vs A+C; ◇p < 0,05 vs V+A.

A Figura 18 mostra que no grupo Veículo não ocorreu nenhuma alteração na mucosa estomacal, uma vez que receberam somente a suspensão de 1% CMC, apresentando pontuação nula. Esses dados demonstram que o veículo, não causa lesão macroscópica aparente (LAKSHMI, SINGH, & SHRIVASTVA, 2010).

Em decorrências das avaliações macroscópicas realizadas nas mucosas estomacais das ratas lesionadas com o agressor AAS, obtivemos valores semelhantes entre si, A+V= 15,0 ± 1,67 e V+A= 15,8 ± 2,83 pontos. Nestes grupos, percebe-se que o veículo não provocou nenhum tipo de prevenção, corroborado com as fotografias (Figuras 17) tiradas durante os procedimentos de ulcerações. Administração oralde AAS em ratos normais causaram danos hemorrágicos no estômago, que aumentaram em gravidade de uma maneiradose-dependente (50 e 100 mg/Kg) (SOUZA et al., 2003). Yoshida et al., (2002) também mostraram



resultados semelhantes, quando utilizaram em excesso o AAS (400 mg/Kg) para provocar erosões hemorrágicas nas mucosas de forma aguda.

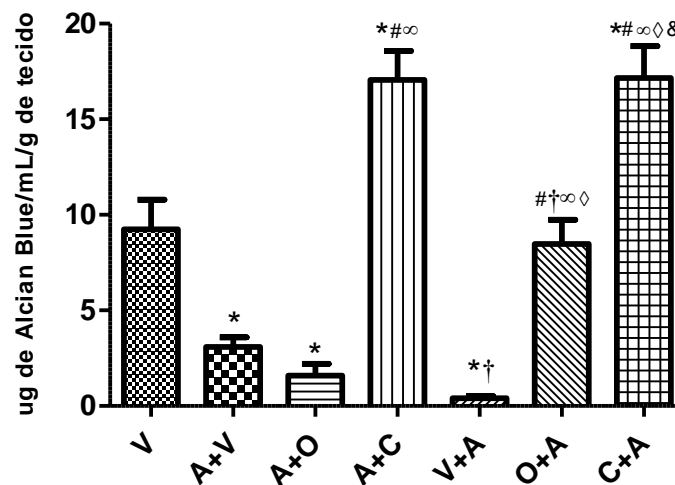
O grupo que recebeu omeprazol apresentou o escore de lesões menores que o grupo AAS, porém ainda apresenta lesões (A+O= 12,0 ±0,83 pontos). Estudos mostraram que o omeprazol pós-tratamento não é a forma mais adequada de obter resultados de melhora no quadro ulcerativo agudo e sim na forma sequencial (durante 30 dias), sem quaisquer efeitos adversos (OKAKE, 1986). Entretanto, o grupo que recebeu primeiro o tratamento do omeprazol apresentou uma proteção melhor contra o agente ulcerogênico (O+A= 4,4 ±1,94 pontos), o que já era esperado (ANOOP & JEGADEESAN, 2003 e SACHS et al., (2010). O fármaco omeprazol exerce uma inibição irreversível na bomba de próton, com isso, aumenta o pH do suco gástrico e consegue manter a barreira mucoide no estômago, promovendo uma ação mecânica de proteção (LORENTZON, et al. 1985).

Os animais que receberam o tratamento experimental A+C obtiveram as seguintes pontuações 4,4 ±1,93 e, para o grupo C+A=2,8 ± 1,65 pontos. Esse escore reduzido mostrou ação gastroprotetora (aumento dos agentes defensivos da mucosa estomacal) da coilina contra o ulcerogênico, sendo mais eficaz que o omeprazol utilizado neste experimento. A administração oral de extratos de látex de *Calotropis procera* de maneira dose-dependente obteve um escore diminuído na extensão das lesões da mucosa gástrica, induzida de forma aguda por AAS (500 mg/kg) (BHARTI, WAHANE, & KUMAR, 2010).

### 5.2.2 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO

A Figura 19 mostra os dados da quantificação do Alcian Blue (AB) aderido na mucosa dos estômagos das ratas experimentais que receberam o tratamento da cutícula colina ou omeprazol antes ou após a lesão provocada pelo ácido acetilsalicílico.

**Figura 19. Quantificação de muco gástrico após indução de lesões pela AAS (400mg/Kg).**



\*p < 0,05 vs V; #p < 0,05 vs A+V; ∞p < 0,05 vs A+O; †p < 0,05 vs A+C; †p < 0,05 vs V+A; &p < 0,05 vs O+A.

A administração de AAS foi capaz de diminuir a produção de muco e na presença da coilina houve uma elevada produção do muco na mucosa gástrica. A aderência do AB apresentou os seguintes valores nos grupos A+C=17,06 ±1,51 µg de AB/mL/g de tecido; e no pré-tratamento C+A= 17,16 ±1,66 µg de AB/mL/g de tecido, como mostrado na Figura 19, em comparação aos que receberam o veículo (V=9,23 ±1,56 µg de AB/mL/g de tecido) e os que receberam a lesão (A+V=3,08 ±0,50; V+A = 0,42 ±0,12 µg de AB/mL/g de tecido). Wallace (2008) mostra que as ações ulcerativas do AAS são mediadas por meio da inibição da ciclooxigenase com isso, ocorre uma queda na produção de muco.

Esses valores foram obtidos através da utilização de 5mg/Kg da coilina, de modo preventivo e pós-lesão ulcerativa e, nos dois casos, mostraram um melhor resultado na formação e manutenção da barreira mucoide quando confrontado com os que receberam o tratamento medicamentoso.

Os animais que receberam o tratamento com omeprazol após a lesão mostraram a seguinte dosagem de AB (A+O= 1,59 ±0,61µg de AB/mL/g de tecido) e, os que receberam de forma preventiva (O+A=8,481 ±1,254 µg de AB/mL/g de tecido) demonstraram a manutenção basal do muco. Lakshmi, Singh e Shrivastva

(2010), descreveram que através dos compostos ativos de *Xylocarpus granatum* (gedunina e fotogedunina) ocorreu um aumento na produção da mucina no meio estomacal em comparação com os que receberam tratamento comparativo com o omeprazol (10 mg/Kg), na lesão formada por AAS (150mg/Kg) e em consequência disso, diminuição das lesões ulcerativas.

### 5.2.3 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DO CONTEÚDO GÁSTRICO

A Tabela 3 relaciona os dados obtidos na determinação de alguns parâmetros fisiológicos do conteúdo estomacal das ratas experimentais que receberam o tratamento da cutícula colina ou omeprazol antes ou após a lesão provocada pelo ácido acetilsalicílico.

**Tabela 3. Efeito do tratamento da coilina ou omeprazol nos parâmetros do conteúdo gástrico em modelo ulcerativo utilizando AAS.**

Tratamento	Volume de suco gástrico (mL)	pH
V	0,712 ± 0,276	0,9136 ± 0,038
A+V	1,680 ± 0,333 <sup>&amp;¥</sup>	0,5874 ± 0,107 <sup>*</sup>
A+O	1,294 ± 0,158	1,0288 ± 0,032 <sup>#</sup>
A+C	1,832 ± 0,158 <sup>*&amp;¥◇</sup>	1,1494 ± 0,059 <sup>#&amp;¥</sup>
V+A	0,490 ± 0,102 <sup>#</sup>	0,4806 ± 0,035 <sup>*†</sup>
O+A	0,548 ± 0,078 <sup>#</sup>	0,6934 ± 0,066 <sup>†</sup>
C+A	0,640 ± 0,108 <sup>#</sup>	0,4516 ± 0,026 <sup>*†∞</sup>

Dados expressos em média±EPM. <sup>\*</sup>p < 0,05 vs V; <sup>#</sup>p < 0,05 vs A+V; <sup>†</sup>p < 0,05 vs A+O; <sup>∞</sup>p < 0,05 vs A+C; <sup>&</sup>p < 0,05 vs V+A; <sup>¥</sup>p < 0,05 vs O+A; <sup>◇</sup>p < 0,05 vs C+A.

A ulceração provocada pelo ácido acetilsalicílico aumentou a quantidade do volume gástrico. Os animais que receberam o omeprazol (A+O) e o tratamento experimental (A+C) após a lesão, não são diferentes na quantidade de suco gástrico produzido.

Entretanto, nos animais que receberam de forma preventiva o omeprazol ocorreu uma redução no volume do suco gástrico (O+A), devido ao mecanismo de ação desse medicamento que é diminuir a secreção de ácido na forma livre. Do mesmo modo, obtivemos dados semelhantes nos animais do grupo ulcerativo (V+A) e no tratamento preventivo experimental (C+A). Possivelmente o AAS (irritou a região pilórica, por agir de forma direta nesta região, permitindo a difusão retrógrada de íons  $H^+$  e assim, provocou a saída do conteúdo estomacal (DAVENPORT, 1966). Condizendo com os dados dos animais que receberam a lesão com ácido acetilsalicílico (A+V e V+A), mostraram uma queda no pH, por não terem recebido nenhum tipo de tratamento.

Os animais que receberam o ácido acetilsalicílico tiveram uma diminuição no pH, no entanto, quando foi adicionado o omeprazol (A+O) ou a coilina (A+C) foram capazes de aumentaram o valor de pH. O omeprazol como esperado inibe a enzima secretora de  $H^+$ , diminuindo a acidez estomacal provocada pela AAS. Por outro lado, os animais que receberam os tratamentos (O+A e C+A) antes da lesão não foram capazes proteger da queda do pH provocada pela AAS.

Lakshmi, Singh e Shrivastva (2010), descreve que através dos compostos ativos de *Xylocarpus granatum* (gedunina e fotogedunina) ocorreu uma diminuição no valor da acidez do meio estomacal, semelhante à ação do omeprazol (10mg/Kg) administrado 45 minutos antes da injúria provocada por AAS (150mg/Kg).

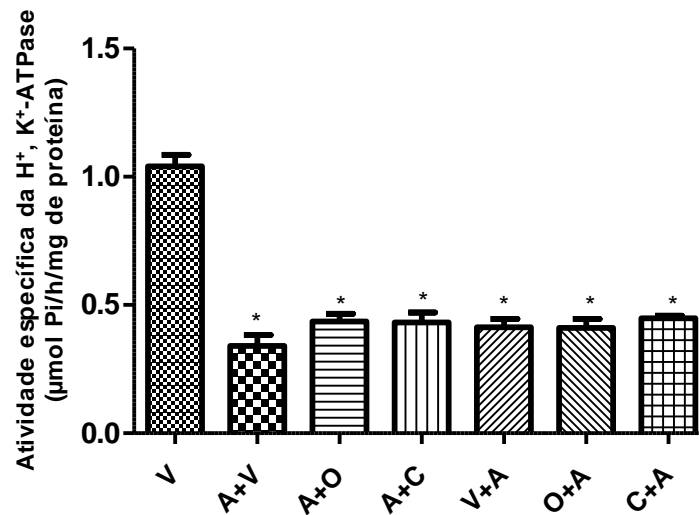
Lallo et. al., (2014), utilizando o extrato da *Potentilla mooniana* (400 mg/Kg) obteve ação gastroprotetora em indução ulcerogênica com AAS, mas não foi observado efeito sobre o volume gástrico, entretanto, mostrou um aumento significativo no pH gástrico em 41,6% e aumento na produção do muco (58,6%), semelhante aos nossos resultados obtidos com a coilina.

#### 5.2.4 ATIVIDADE DA $H^+,K^+$ -ATPase MICROSSOMAL

Na figura 20 são mostrados os resultados obtidos da atividade específica da bomba de prótons pela quantificação da liberação do fosfato inorgânico na hidrólise

do ATP como substrato da enzima, na mucosa estomacal dos animais lesionados com ácido acetilsalicílico.

**Figura 20. Atividade específica da bomba de prótons gástrica em animais lesionados com AAS.**



\* p<0,05 vs V.

Ocorreu uma diminuição na atividade da enzima dos grupos de animais que receberam a lesão ulcerativa (A+V= 0,341 ±0,05 e V+A= 0,414 ±0,03 μmol Pi/h/mg), sinalizando uma inativação da secreção das células. Robert, et al. (1989) investigaram o mecanismo pelo qual a exposição ao frio sensibiliza os ratos para a formação de lesões gástricas após uma dose baixa de aspirina (50 mg /Kg), eles explicaram que este sinergismo (aspirina mais frio) aumentou a formação da lesão, hipersecreção de ácido gástrico, diminuição do fluxo de sangue na mucosa gástrica, e diminuição da síntese de prostanoídes no estômago, deixando vulnerável a mucosa ao efeito ulcerogênico.

A coilina utilizada como forma de tratamento experimental mostrou uma diminuição na atividade específica da enzima (A+C= 0,432 ±0,04 e C+A=0,448 ±0,01 μmol Pi/h/mg), semelhante ao fármaco omeprazol (A+O = 0,435 ±0,04 e O+A= 0,411 ±0,03 μmol Pi/h/mg) em comparação com o grupo controle (V= 1,041 ±0,04 μmol Pi/h/mg).

Larsson et al., (1988), mostrou que o omeprazol inibiu irreversivelmente a função da secreção das células parietais independente da dose (40 e 400  $\mu\text{mol/Kg}$ ), causando uma diminuição na atividade específica da  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase (30-50% e 60-80% respectivamente), por até 24 horas após a administração.

Lakshmi, Singh e Shrivastva (2010), também obteve redução enzimática com seus compostos ativos da *X. granatum* (100 mg/mL) semelhante à inibição provocada pelo omeprazol (10mg/Kg). Lallo et. al., (2014), obteve redução na pontuação ulcerogênica no modelo de indução com AAS mostrando um aumento no pH gástrico, aumento do muco e diminuição na atividade de  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase (47,73%), justificando esses achados com os efeitos protetores obtidos em seu extrato.

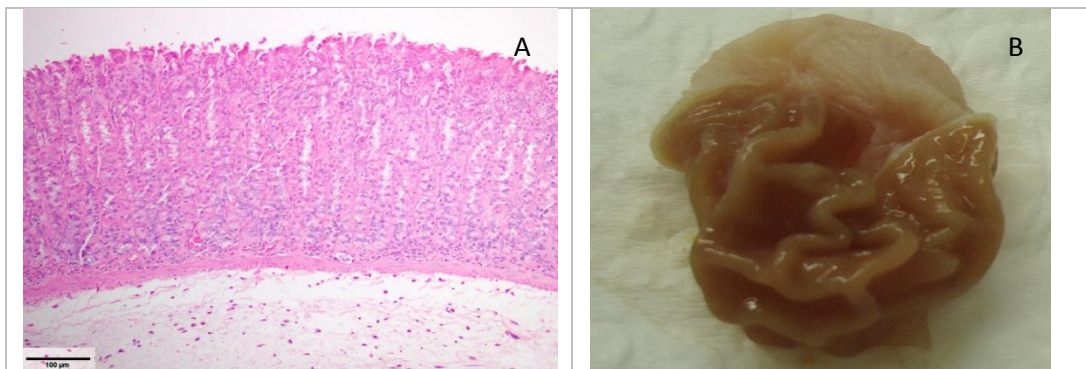
Farias, et al. (2012), mostraram com a administração do extrato concentrado de taninos da planta *Rhizophora mangle* L., um efeito inibitório da atividade da  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase, sugerindo uma ligação entre os taninos e as proteínas, precipitando-as. Relacionando essa ação, com o efeito citoprotetor obtido, pois também encontraram uma diminuição no escore de lesões, um aumento no muco, nos níveis PGE2 e no valor de pH.

Em suma, estes resultados sugerem que no modelo de lesão gástrica aguda induzida por AAS, o efeito gastroprotetor da coilina parece envolver a diminuição da atividade  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase, o aumento da quantidade de muco e do pH impedindo a ação lesiva do ulcerogênico, bem como prevenindo a formação de lesão gástrica.

### 5.3 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

A Figura 21 mostra os resultados obtidos na análise histológica (A) do tecido estomacal (B) de um animal que recebeu o veículo. Não foram visualizadas alterações na mucosa gástrica.

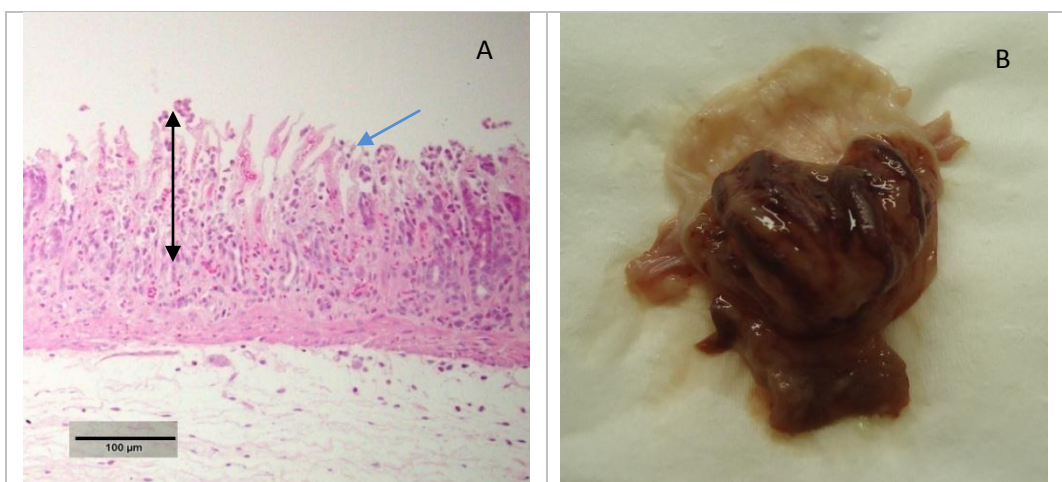
**Figura 21. Microscopia do grupo controle (V).**



(A) Microscopia óptica (20X). Hematoxilina e eosina. (B) Fotografia (4X)

A Figura 22 mostra os resultados obtidos na análise histológica (A) do tecido estomacal (B) de um animal que foi induzido lesão gástrica etanólica (E+V).

**Figura 22. Ulceração no estômago induzida pelo etanol (E+V).**



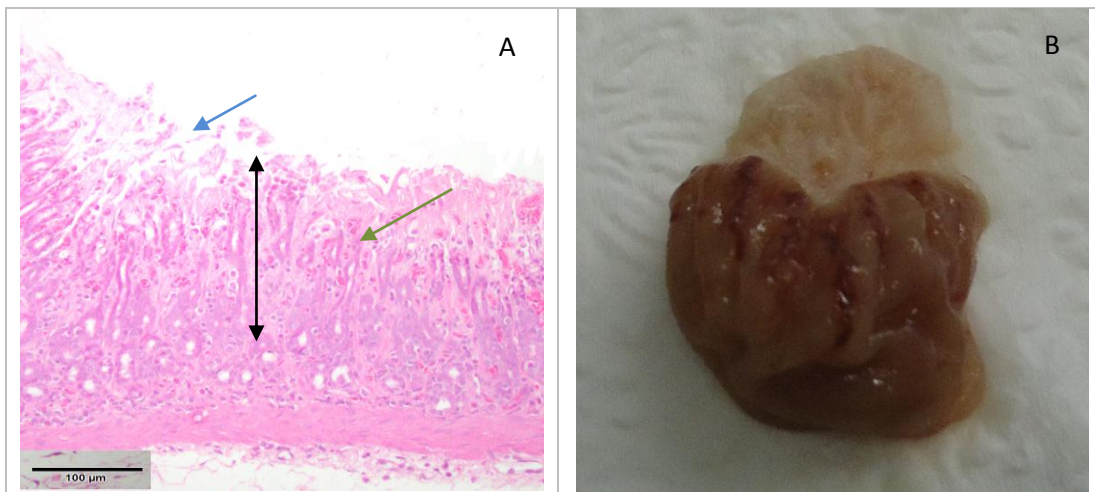
(A) Microscopia óptica (20X). Hematoxilina e eosina. (B) Fotografia (4X)

A área focal é da região pilórica com erosão acentuada (necrose). Essa caracterização foi baseada por achatamento das glândulas pilóricas. Também se observa acentuada diminuição das células de revestimento, desde a superfície até as áreas mais profundas das glândulas pilóricas (seta preta). Nota-se ainda hiperemia de capilares da camada mucosa (seta azul).

A Figura 23 mostra o resultado obtido na análise histológica (A) do tecido estomacal (B) de um animal que foi lesionado com agente ulcerativo etanol e tratamento com o omeprazol (E+O).

A região pilórica foi caracterizada na área focal de erosão. Diferenciada por achatamento necrótico nas glândulas pilóricas (seta azul). Observa-se moderada diminuição das células de revestimento, desde a superfície até o terço médio da mucosa gástrica (seta preta). Observa-se ainda hiperemia de capilares da camada mucosa (seta verde)

**Figura 23. Tratamento com omeprazol após lesão com etanol (E+O).**



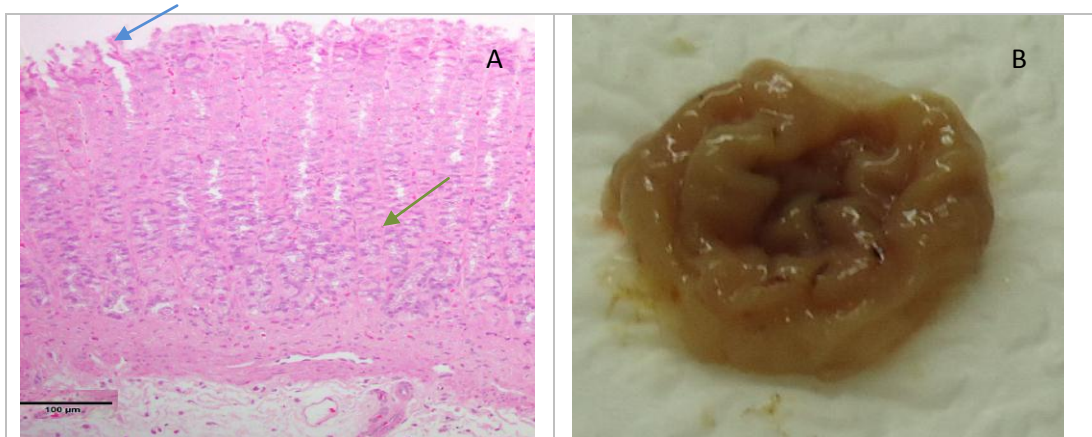
(A) Microscopia óptica (20X). Hematoxilina e eosina. (B) Fotografia (4X)

A Figura 24 mostra os resultados obtidos na análise histológica (A) do tecido estomacal (B) de um animal que recebeu tratado experimental com a colina e após lesionado com o agente ulcerativo etanol (C+E).



A área focal é da região fúndica do estômago. Há uma leve lesão celular que pode ser observada nas células de revestimento da superfície da mucosa gástrica (seta azul). Observam-se células parietais e principais normais (seta verde).

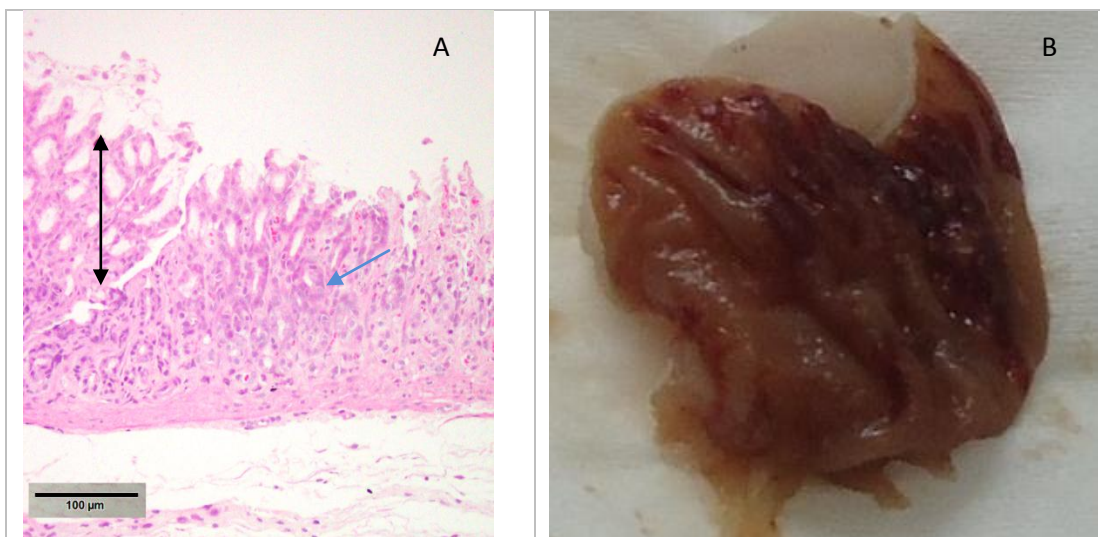
**Figura 24. Tratamento com coilina antes da lesão com etanol (C+E).**



(A) Microscopia óptica (20X). Hematoxilina e eosina. (B) Fotografia (4X)

A Figura 25 mostra os resultados obtidos na análise histológica (A) do tecido estomacal (B) de um animal que foi lesionado com o ulcerogêncio etanol (V+E).

**Figura 25. Ulceração do estômago provocada pelo etanol (V+E).**



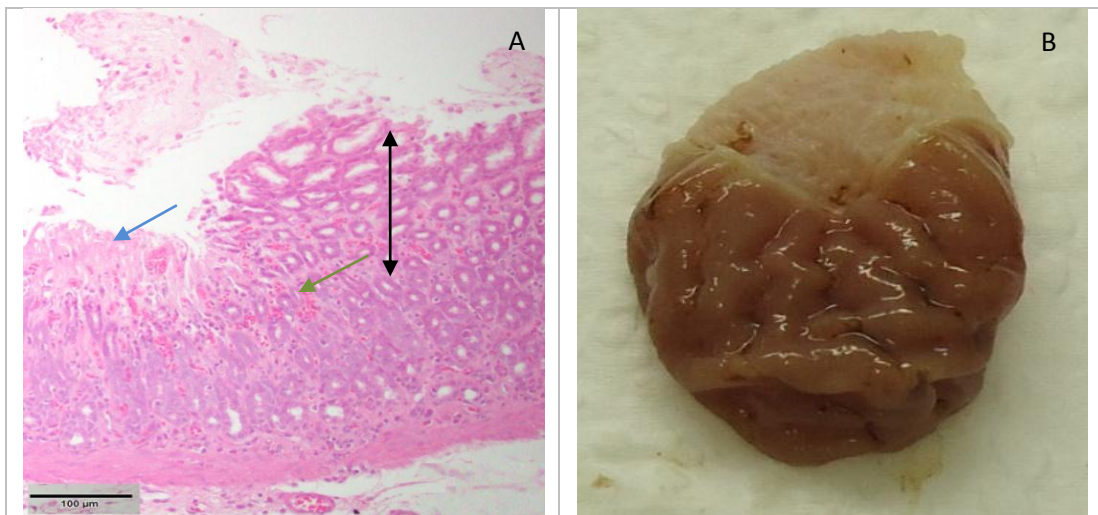
(A) Microscopia óptica (20X). Hematoxilina e eosina. (B) Fotografia (4X)

A área focal mostra necrose (erosões acentuadas) na região pilórica. Essa diferenciação ocorre por visualizações do achatamento das glândulas pilóricas. Observa-se também, diminuição acentuada das células de revestimento, desde a superfície até as áreas mais profundas das glândulas pilóricas (seta preta). Nota-se ainda hiperemia de capilares da camada mucosa (seta azul).

A Figura 26 mostra os resultados obtidos na análise histológica (A) do tecido estomacal (B) de um animal que foi lesionado com agente ulcerativo etanólico e pré-tratado com omeprazol (O+E).

A área focal foi a região pilórica e apresentou erosão moderada, observa-se achatamento nas glândulas pilóricas (seta azul). Essa caracterização moderada foi caracterizada pela diminuição das células de revestimento, desde a superfície até o terço médio da mucosa gástrica (seta preta). Também nota-se ainda, uma hiperemia de capilares da camada mucosa estomacal (seta verde).

**Figura 26. Tratamento com omeprazol antes da lesão com etanol (O+E).**

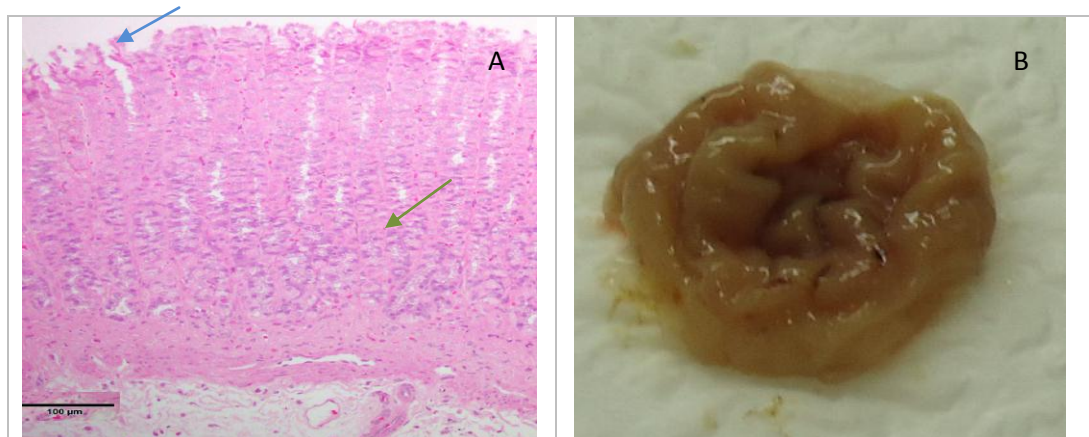


(A) Microscopia óptica (20X). Hematoxilina e eosina. (B) Fotografia (4X)

A Figura 27 mostra os resultados obtidos na análise histológica (A) do tecido estomacal (B) de um animal que recebeu tratamento experimental com a colina e após lesionado com o agente ulcerativo etanol (C+E).

A área focal é da região fúndica do estômago. Há uma leve lesão celular que pode ser observada nas células de revestimento da superfície da mucosa gástrica (seta azul). Observam-se células parietais e principais normais (seta verde).

**Figura 27. Tratamento com coilina antes da lesão com etanol (C+E).**



(A) Microscopia óptica (20X). Hematoxilina e eosina. (B) Fotografia (4X)

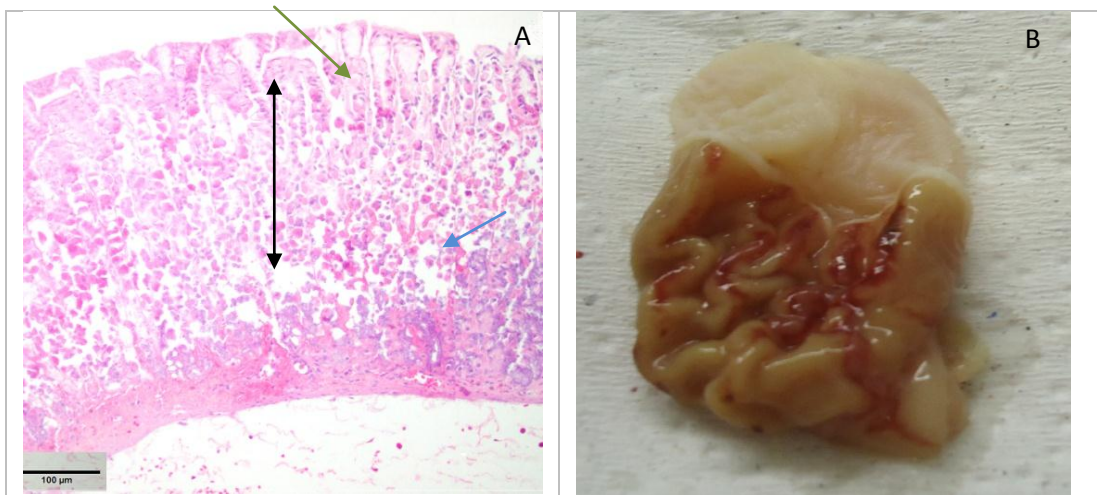
O etanol tem sido amplamente utilizado para análises histopatológicas de estudos de atividade anti-ulcerogênica, é um método rápido, eficaz e conveniente para protocolos de avaliações agudas *in vivo* (MAHMOOD, AL-BAYATY, & SALMAH, 2011).

O resultado histopatológico da avaliação gástrica induzida por etanol apresentou semelhanças com estudos anteriores que também utilizaram esse lesionante, pois ele é altamente corrosivo para a mucosa gástrica. Sua ação abrange erosão superficial, liberação de histamina e leucotrienos, ocorrendo assim geração de edema. Possui um efeito solvente, dissolvendo lipídeos da membrana e, também reduz o nível de proteínas dos tecidos, que por sua vez, levam a diminuir o fluxo sanguíneo gástrico, resultando em necrose celular (SZABO, et al. 1985 e 1990; BHARTI, WAHANE, & KUMAR, 2010; MAHMOOD, AL-BAYATY, & SALMAH, 2011; AL-QARAGHULI, ABDEL, AL-ANI, & FAISAL, 2013). Administração da coilina reduziu essa ação erosiva. Estes efeitos histológicos foram melhores que o tratamento com o omeprazol.

A Figura 28 mostra os resultados obtidos na análise histológica (A) do tecido estomacal (B) de um animal que foi lesionado com agente ulcerativo ácido acetilsalicílico (A+V).

Área focal mostra uma erosão acentuada, caracterizada por achatamento de glândulas fúndicas (seta preta). Observam-se células parietais e principais necróticas desprendidas, as quais apresentam citoplasma mais eosinofílico e núcleo picnótico (seta verde). A lesão se estende desde a superfície até as áreas mais profundas das glândulas fúndicas. Nota-se ainda hiperemia de capilares da camada mucosa (seta azul).

**Figura 28. Ulceração no estômago induzida pelo AAS (A+V).**

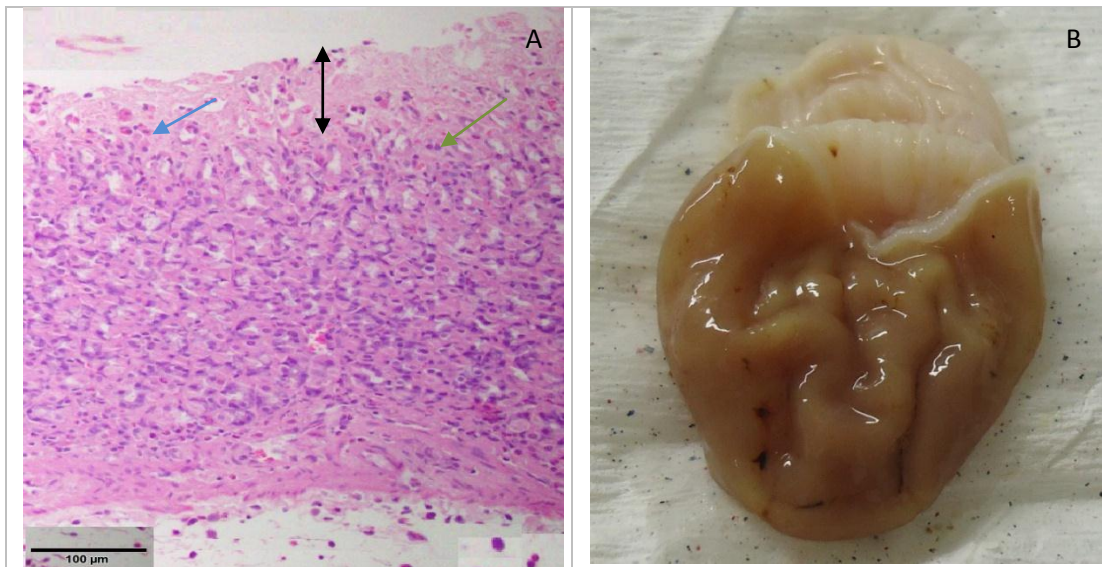


(A) Microscopia óptica (20X). Hematoxilina e eosina. (B) Fotografia (4X)

A Figura 29 mostra os resultados obtidos na análise histológica (A) do tecido estomacal (B) de um animal que foi lesionado com o agente ulcerativo ácido acetilsalicílico e depois de tratado com omeprazol (O+A).

A área focada é a região fúndica, caracterizada por necrose leve das células glandulares. A lesão celular pode ser observada em células de revestimento da superfície da mucosa gástrica (seta preta). Notam-se células parietais e principais necróticas desprendidas, as quais apresentam citoplasma mais eosinofílico e núcleo picnótico (seta azul) e leve hiperemia (seta verde).

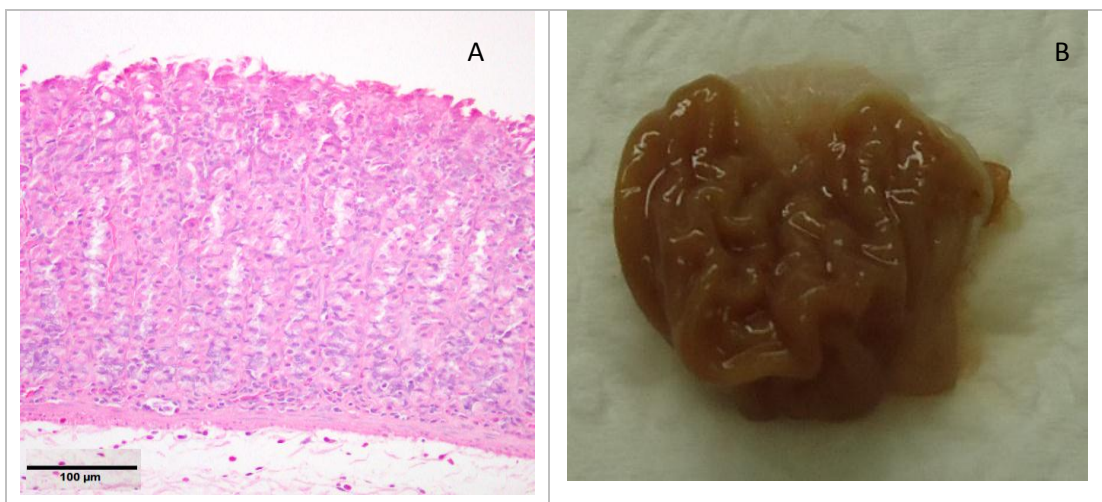
**Figura 29. Tratamento com omeprazol após a lesão com AAS (A+O).**



(A) Microscopia óptica (20X). Hematoxilina e eosina. (B) Fotografia (4X)

A Figura 30 mostra os resultados obtidos na análise histológica (A) do tecido estomacal (B) de um animal que foi lesionado com AAS e depois recebeu o tratado experimental com a colina (A+C). A área focal é da região fúndica do estômago. Não foram visualizadas alterações na mucosa gástrica.

**Figura 30. Tratamento com a colina após a lesão com AAS (A+C).**

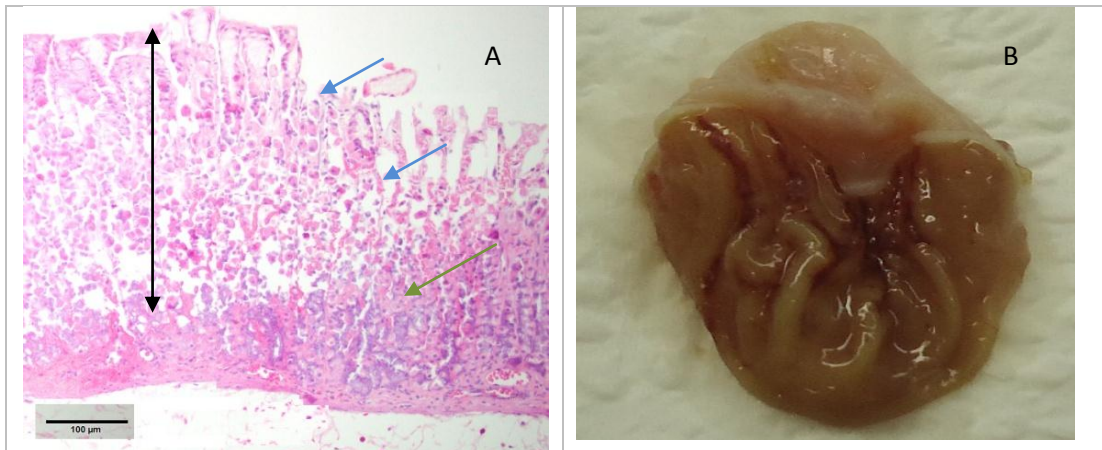


(A) Microscopia óptica (20X). Hematoxilina e eosina. (B) Fotografia (4X)

A Figura 31 mostra os resultados obtidos na análise histológica (A) do tecido estomacal (B) de um animal que foi lesionado com agente ulcerativo ácido acetilsalicílico (V+A).

A área focal desta microscopia foi região fúndica apresenta necrose com achatamento das glândulas dessa região. A lesão se estende desde a superfície até as áreas mais profundas das glândulas fúndicas (seta preta). Ocorreram erosão e desprendimento das células parietais e principais (setas azuis), caracterizadas pela presença do citoplasma mais eosinofílico e núcleo picnótico. Nota-se ainda hiperemia de capilares da camada mucosa (seta verde).

**Figura 31. Ulceração no estômago induzida pelo AAS (A+V).**



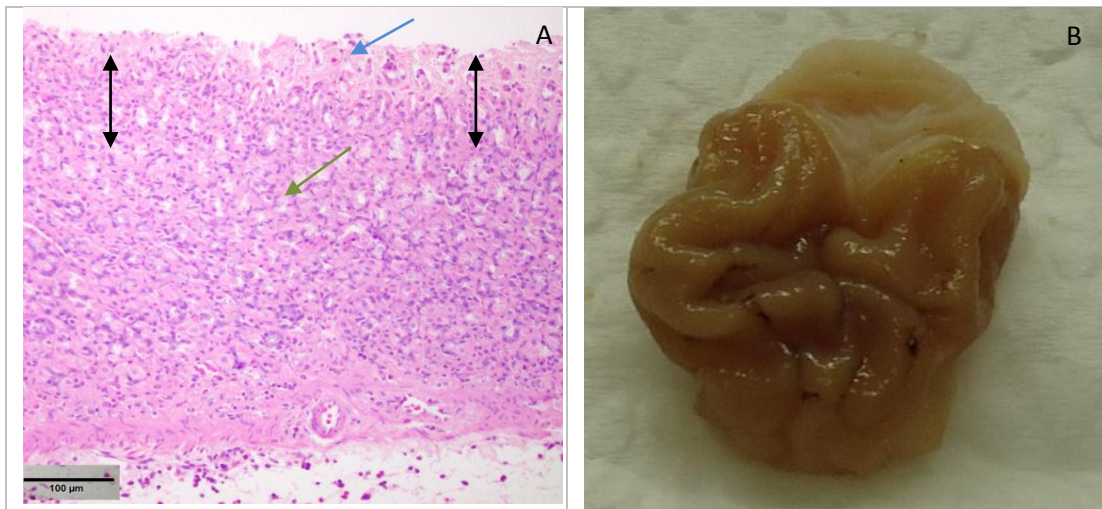
(A) Microscopia óptica (20X). Hematoxilina e eosina. (B) Fotografia (4X)

A Figura 32 mostra os resultados obtidos na análise histológica (A) do tecido estomacal (B) de um animal que foi tratado com omeprazol e após lesionado com o agente ulcerativo ácido acetilsalicílico (O+A).

O focal da microscopia foi na região fúndica, diferenciada por erosão leve das células glandulares.

A lesão celular pode ser observada em células de revestimento superfície da mucosa gástrica (seta preta). Observam-se células parietais e principais necróticas desprendidas, as quais apresentam citoplasma mais eosinofílico e núcleo picnótico e leve hiperemia.

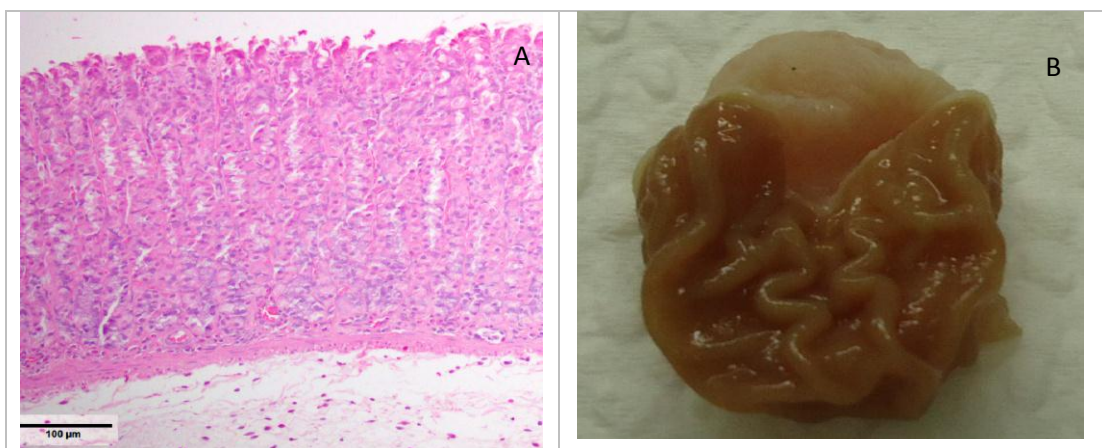
**Figura 31. Tratamento com omeprazol antes da lesão com AAS (O+A).**



(A) Microscopia óptica (20X). Hematoxilina e eosina. (B) Fotografia (4X)

A Figura 33 mostra os resultados obtidos na análise histológica (A) do tecido estomacal (B) de um animal que foi tratado experimental com a colina e após lesionado com o agente ulcerativo ácido acetilsalicílico (C+A). A região focal foi a fúndica e não apresentou alterações na região da mucosa gástrica.

**Figura 32. Tratamento com colina antes da lesão com AAS (C+A).**



(A) Microscopia óptica (20X). Hematoxilina e eosina. (B) Fotografia (4X)

A utilização de AAS reduz níveis de COX-1 e PGE2 na mucosa estomacal. Essa redução induz à erosão necrótica superficial da mucosa, evoluindo até a úlcera gástrica. A inflamação e infiltração de neutrófilos também são importantes na patogênese da lesão gástrica induzida por AINES. É acompanhada por um aumento

da geração de superóxidos derivados do acúmulo dessas células migratórias (WALLACE, KEENAN, & GRANGER, 1990; BRORZOZOWSKI, KONTUREK, BRORZOZOWKI, & PAWLIK, 2005; ZHONGZHI, et al., 2011).

Neste estudo as células necróticas e migratórias foram aumentadas pela administração do AAS e a co-administração da coilina reduziu essa ação. Estes efeitos histológicos foram semelhantes ao tratamento com o omeprazol



## 5 CONCLUSÃO

O efeito gastroprotetor da coilinana dose de 5mg/Kg foi avaliado tanto visual (índice de lesão) quanto fisiológico, nas lesões ulcerogênicas provocadas quimicamente em ratas. Esse efeito foi testado nos parâmetros, pH e volume gástrico, produção de muco, atividade de  $H^+,K^+$ -ATPase e estudo histopatológico.

- A cutícula coilina foi capaz de proteger a mucosa gástrica das lesões provocadas tanto pelo etanol quanto pelo ácido acetilsalicílico de forma aguda visualizadas de forma macroscópica;
- A coilina obteve ação citoprotetora nas avaliações histopatológicas frente às lesões provocadas pelos ácidos orgânicos;
- A coilina aumentou a produção de muco gástrico nas duas investigações ulcerativas efetuadas;
- Manteve a medida do pH de forma basal, ou levemente aumentada nos dois modelos ulcerativos;
- Inibiu a atividade específica da  $H^+,K^+$ -ATPase frente às lesões provocadas.

Os resultados obtidos através do modelo *in vivo* agudo de úlcera induzida forneceram as primeiras evidências científicas da suspensão coilina na concentração de 5mg /Kg. Portanto, podemos confirmar que coilina empregada pela comunidade rio-grandense por meio de uma terapia empírica mostra realmente resultados muito favoráveis na ação gastroprotera.

**REFERÊNCIAS**

- ABDULLA, M. A., AHMED, K. A., AL-BAYATY, F. H., & MASSOOD, Y. (2010 (4)). Gastroprotective effect of Phyllanthus niruri leaf extract against ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* , 226-230.
- AIRES, M. (2008). Sistema Digestivo. In: D. L. Sanioto, *Fisiologia* (pp. 652-680). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 4º ed.
- AL-QARAGHULI, A. M., ABDEL, W. E., AL-ANI, I. M., & FAISAL, G. G. (2013). Effects of Xiang Sha Yang Wei Wan on Ethanol-Induced Gastric Ulcer in Sprague Dawley Rats: a Histological Study. *THE INTERNATIONAL MEDICAL JOURNAL* 12 (2) , 3-10.
- ANOOP, A., & JEGADEESAN, M. (2003). Biochemical studies on the anti-ulcerogenic potential of Hemidesmus indicus R.Br.var.indicus. *Journal Ethnopharmacol* 84 , 149– 156.
- ANOOP, A., & JEGADEESAN, M. (2003). Biochemical studies on the anti-ulcerogenic potential of Hemidesmus indicus R.Br.var.indicus. *Journal Ethnopharmacol* 84 , 149– 156.
- ANVISA. (10 de Maio de 2014). *Brasil: Portal ANVISA*. Fonte: Portal Agência Nacional de Vigilância Sanitária, disponível: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/index.htm>
- AVILA, J. R. (1996). Role of endogenous sulphydrils and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. *Inflammation Research* 45 (2) , 83-88.
- BACHA, W., & BACHA, L. (2003). Gallus gallus. In: P. M. Oliveira, *Atlas colorido de histologia veterinária* (p. 198). São Paulo: Roca. 2ª Ed.
- BANICK, P. D. (1997). Nitric oxide inhibits neutrophil beta 2 integrin function by inhibiting membrane-associated cyclic GMP synthesis. *Journal of Cellular Physiology* , 12-24.
- BAYIR, Y. (2006). The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil infiltration in rats by constituent diffractaic acid. *Thyotomeditine* 13 (8) , 584-590.
- BEHMER, O. A., TOLOSA, E. M., & FREITAS NETO, A. (1976). *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. São Paulo: Edart, 256p.

- BHARTI, S., WAHANE, V. D., & KUMAR, V. L. (2010). Protective effect of *Calotropis procera* latex extracts on experimentally induced gastric ulcers in rat. *Journal of Ethnopharmacology* 127 , 440–444.
- BLACK, J. W. (1972). Definition and antagonism of histamine H<sub>2</sub>- receptors. *Nature* 236 (5347) , 385-390.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 , 218-254.
- BRORZOZOWSKI, T. K., KONTUREK, S. J., BRORZOZOWKI, I., & PAWLIK, T. (2005 ). Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. *Journal of Physiology and Pharmacology* 56 (5) , 33-55.
- BROWN, J. F. (1993). Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells. *American Journal of Physiology* , 418-422.
- BRUNTON, L., LAZO, J. S., & PARKER, K. L. (2010). As bases farmacológicas da terapêutica. In: G. & GILMAN, *Farmacoterapia da acidez gástrica, úlceras pépticas e doença do refluxo gastroesofágico*. (pp. 869-881). Rio de Janeiro: McGaraw-Hill. 11<sup>a</sup> Ed.
- BRZOZOWSLI, T. (2003). Experimental production of peptic ulcer, gastric damage and cancer models and their use in pathophysiological studies and pharmacological treatment - Polish achievements. *Journal Physiology and Pharmacology* 54 (3) , 99-126.
- CAMERON, A. J. (1975). Aspirin and gastric ulcer. *Mayo Clinic Proceedings* 50 (10) , 565-570.
- CASTILLO-JUÁREZ, I., GONZÁLEZ, V., & JAIME-AGUILAR, H. (2009). Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology* 122 , 402-405.
- CHAN, F. K. (1986). A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup> stimulated ATPase activity. *Analytical Biochemistry* 157 , 375-380.
- CHAN, F., & LEUNG, W. (2002). Peptic-ulcer disease. *The Lancet* 360 , 933-941.
- CHARI, S., TEYSSEN, S., & SINGER, M. V. (1993). Alcohol and gastric acid secretion in. *Gut* (34) , 843-847.
- CHO, C. H., CHEN, B. W., HUI, W. M., LUK, C. T., & LAM, S. K. (1990). Endogenous prostaglandins: its role in gastric mucosal blood flow and ethanol ulceration in rats. *Prostaglandins* 40 , 397-403.

- COELHO, L. (2003). Projetos Diretrizes: Úlcera Péptica. *Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. Federação Brasileira de Gastroenterologia* , 50-62.
- DAMASCENO, S. R., RODRIGUES, J. C., & SILVA, R. O. (2013). Role of the NO/KATP pathway in the protective effect of a sulfated-polysaccharide fraction from the algae *Hypnea musciformis* against ethanol-induced gastric damage in *mico*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 23 (2) , 320-328.
- DAVENPORT, H. (1966). Fluid produced by the gastric mucosa during damage by acetic and salicylic acids. *Gastroenterology* 50 , 487–499.
- DOMER, F. R., & SPRINGFIELD, C. C. (1971). Animal Experiments in Pharmacological Analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 60 (8) , 1279.
- DYCE, K., SACK, W. O., & G., W. C. (2004). *Tratado de anatomia veterinária*. Rio de Janeiro: Elsevier.
- FARIAS, F. M., ALMEIDA, A. C., FERREIRA, A. L., DUNDER, R. J., TAKAYAMA, C., SILVA, M. S., et al. (2012). Mechanisms of action underlying the gastric antiulcer activity of the *Rhizophora mangle* L. *Journal of Ethnopharmacology* 139 , 234– 243.
- FEITOSA, M. L. (2011). *Dissertação: Investigação dos Mecanismos de Ação da Atividade Gastroprotetora de 1,4-cineol em Modelos de Úlcera Gastrica em Camundongos*. Fortaleza: Departameto de Fisiologia e Farmacologia - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.
- GAMBERINI, M. T., SKORUPA, L. A., SOUCCAR, C., & LAPA, A. J. (1991). Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera*. *Mart. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 86 , 137-139.
- GARTNER, L. P., & HIATT, J. L. (2003). Tratado de Histologia em Cores. In: L. P. Gartner, & J. L. Hiatt, *Sistema Digestivo* (pp. 314-325). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2ª Ed.
- GOODMAN, K., & COCKBURN, M. (2001). The role of epidemiology in understanding the health effects of *Helicobacter pylori*. *Epidemioly* 12 (2) , 266-271.
- GOODWIN, C. S., ARMSTRONG, J. A., CHILVERS, T., PETERS, M., COLLINS, M. D., SLY, L., et al. (1989). Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., Respe. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* 39 (4) , 397-405.

GRETZER, B., EHRLICH, K., & MARICIC, N. (1998). Selective cyclooxygenase-2 inhibitors and their influence on the protective effect of a mild irritant in the rat stomach. *British Journal of Pharmacology* 123 , 927-937.

HALTER, F. (2001). Cyclooxygenase-2-implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issue and perspectives. *Gut* 49 , 443-453.

HAWKEY, C. J. (2000). Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Gastroenterology* , 521-535.

HERNANDEZ-MUNOZ, R. M.-R., & VAZQUEZ-MARTINEZ, O. (2000). Gastric mucosal cell proliferation in ethanol-induced chronic mucosal injury is related to oxidative stress and lipid peroxidation in rats. *Laboratory Investigation* 80 (8) , 1161-1169.

HERSHKO, C. (1989). Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. *Seminars in Hematology* 26 , 277-285.

HIRSCHOWITZ, B. I., KEELING, D., & LEWIN, M. (1995). Pharmacological aspects of acid secretion. *Digestive Disease and Sciences* 40 , 3-23.

ICHIKAWA, T., ISHIHARA, K., SAIGENJI, K., & HOTTA, K. (1994). Effects of acid-inhibitory antiulcer drugs on mucin biosynthesis in the rat stomach. *European Journal of Pharmacology*, 251 (1) , 107-111.

JORGE, R., LEITE, J., OLIVEIRA, A., & TAGLIATI, C. (2004). Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities. *Journal of Ethnopharmacol* 94 , 93-100.

JUNQUEIRA, L. C., & CARNEIRO, J. (2008). Histologia Básica. In: L. C. Junqueira, & J. Carneiro, *O Trato Digestivo* (pp. 291-300). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 11ª Ed.

KANWAR, S. (1994). Nitric oxide synthesis inhibition increases epithelial permeability via mast cells. *American Journal of Physiology* , 222-229.

KONTUREK, S. J., PIASTUCKI, I., BRORZOWSKI, T., RADECKI, T., DEMBINASKA-KIEC, A., ZMUDA, A., et al. (1981). Role of prostaglandins in the formation of aspirin-induced gastric ulcers. *Gastroenterology* 80 (1) , 4-9.

KUMMAR, V., ABBAS, A. K., FAUSTO, N., & ASTER, J. C. (2010). Bases Patológicas das Doenças. In: R. & Cotran., *Sistema Digestivo* (pp. 1005-1020). Rio de Janeiro: Elsevier.

KUO, P. C., & SCHROEDER, R. A. (1995). The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Annals of Surgery* , 220-235.

- LAKSHMI, V., SINGH, N., & SHRIVASTVA, S. (2010). Gedunin and Photogedunin of *Xylocarpus granatum* show significant anti-secretory effects and protect the gastric mucosa of peptic ulcer in rats. *Phytomedicine* 17 , 569–574.
- LALOO, D., PRASAD, S., SAIRAM, K., & HEMALATHA, S. (2014). Gastroprotective activity of polyphenolic-rich extract of *Potentilla mooniana*. *Pharmaceutical Biology* , 1-11.
- LARSSON, H., CARLSSON, E., RYBERG, B., FRYKLUND, J., & WALLMARK, B. (1988). Rat parietal cell function after prolonged inhibition of gastric acid secretion. *American Physiological Society* , 33-39.
- LORENTZON, P., EKLUNDH, B., BRÄINDSTRM, A., & WALLMARK, B. (1985). The mechanism for inhibition of gastric (H ++ K +)-ATPase by omeprazole. *Biochimica et Biophysica Acta* 817 , 25-32.
- MACIEL, M., PINTO, A., & VEIGA, J. (2002). Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova* 25 , 429-438.
- MAHMOOD, A. A., AL-BAYATY, F. H., & SALMAH, I. (2011). Mahmood AA, Enhancement of gastric ulcer by *Areca catechu* nut in ethanol-induced gastric mucosal injuries in rats. *Journal of Medicinal Plants Research* (5) , 2562-2569.
- MARHALL, B., ROYCE, H., ANNEAR, D. I., GOODWIN, C. S., PEARMAN, J., WARREN, J. R., et al. (1984). Marshall B, Royce H, Annear DI, Goodwin CS, Pearma Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. . *Microbios Letters* 25 , 83-88.
- MARTINS, A. P. (2005). Regimes terapêuticos para a úlcera péptica. *Laboratory Investigation* 21 , 431-444.
- MCCORD, J. M., & FRIDOVICH, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Chemical Biology* 244 (22) , 6049-6055.
- MEDEIROS. (2008). Role of the NO/cGMP/K(ATP) pathway in the protective effects of sildenafil against ethanol-induced gastric damage in rats. *British Journal of Clinical Pharmacology* 153 , 721-727.
- MELLO FILHO, A. C., HOFFMAN, M. E., & MENEGHINI, R. (1983). Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by iron. *Biochemical Journal* 218 , 273-275.
- MENDONÇA, N. M., SILVEIRA, C., OLIVEIRA, J. M., SARTOR, C. F., FELIPE, D. F., AMARAL, V., et al. (2013). AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA DA *Baccharis trimera* (LESS) DC. EM RATOS. *Revista Saúde e Pesquisa* (6) 1 , 21-26.

- MERCER, D., CROSS, J., SMITH, G., & MILLER, T. (1997). Protective action of gastrin-17 against alcohol-induced gastric injury in the rat: role in mucosal defense. *American Physiological Society Gastrointestinal and Liver Physiology* 273: , 365-373.
- MOJZIS, J., HEGEDŰSOVÁ, R., & MIROSSAY, L. (2000). Role of Mucus in Ischemia/Reperfusion-Induced Gastric Mucosal Injury in Rats. *Physiological Research* (49) , 48-54.
- MOMTAZ, H., SOUOD, N., DABIRI, H., & SARSHAR, M. (2012). Study of Helicobacter pylori genotype status in saliva, dental plaques, stool and gastric biopsy samples. *World Journal Gastroenterology* 18 (17) , 2105-2111.
- NILIUS, B., & DROOGMANS, G. (2001). Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiological Reviews* 81 , 1415-1459.
- OKAKE, S. (1986). Effects of gastric proton pump inhibitors on gastric secretion and peptic ulcers. *Nihon Yakurigaku Zasshi* (87) , 351-360.
- OMS, O. M. (10 de maio de 2014). *Portal do Ministério da Saúde*. Fonte: World Health Organization, disponível: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/v4n9\\_erradicacao\\_hpylori.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/v4n9_erradicacao_hpylori.pdf)
- ONASANWO, S. A., SINGH, A. B., SABA, A. A., & OYAGBEMI, O. A. (2011). Oridupa and G. Palit, Antiulcerogenic and in vitro antioxidant activities of Lagenaria breviflora (LB) whole fruit ethanolic extract in laboratory animals. *Pharmacognosy Research* 3 , 2-8.
- PAIMELA, H., GODDARD, P. J., & SILEN, W. (1995 ). Present views on restitution of gastrointestinal epithelium. *Digestive and Liver Disease* 40 (11) , 2495-2496.
- PARK, J. S. (2000). Capsaicin protects against ethanol-induced oxidative injury in the gastric mucosa of rats. *Life Sciences* 67 , 3087-3093.
- PFEIFFER, A., HOLGL, B., & KAESS, H. (1992). Effect of ethanol and commonly ingested alcoholic beverages on gastric emptying and gastro-intestinal transit. *Journal of Clinical Investigation* (70) , 487-491.
- PRADOS, C. M., & BOIDEXA, M. (2004). Úlcera péptica. *Revista Española de Enfermedades Digestivas (Madrid)* 96 (1) , 81-82.
- PUURUNEN, J., HILTUNEN, D., & KARPPANEN, H. (1977). Ethanol induced changes in gastric mucosal content of cyclic AMP and ATP in the rat. *European Journal of Pharmacology* 42 , 85-89.

QUAN, C., & TALLEY, N. J. (2002). Management of peptic ulcer disease not related to Helicobacter pylori or NSAIDS. *American Journal of Gastroenterology* 97 (12) , 2950-2961.

RACHCHH, M., & JAIN, S. M. (2008). Gastroprotective effect of Benincasa hispida fruit extract. *Indian Journal of Pharmacology* 40 , 271-275.

RADOMSKI, M. W., & MONCADA, S. (1993). Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide. *Thromb Haemost* 70 , 36-41.

RANG, H. P. (2007). *Pharmacology*. United Kingdom: Elsevier. 6<sup>a</sup> Ed.

REPETTO, M. G., & LLESUY, S. F. (2002). Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *REPETTO, MG.; LLESUY, SF. Antioxidant properties of natural compounds Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35 (5) , 523-534.

RICHARDSON, C. T. (1993). *Úlcera péptica. In: Tratado de Medicina Interna*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

ROBERT, A., LEUNG, F. W., KAISER, D. G., & GUTH, P. H. (1989). Potentiation of aspirin-induced gastric lesions by exposure to cold in rats. Role of acid secretion, mucosal blood flow, and gastric mucosal prostanoid content. *Gastroenterology* 97(5) , 1147-1158.

SACHS, G., SHIN, J. M., VAGIN, O., LAMBRECHT, N., YAKUBOV, I., & MUNSON, K. (2010). The Gastric H,K ATPase as a Drug Target: Past, Present, and Future. *Journal of Clinical Gastroenterology* , 226-242.

SANIOTO, D. L. (1991). Fisiologia. In: A. Mello, *Sistema digestivo: secreção e digestão*. (pp. 456-463). Rio de Janeiro: Guanabara Koogab.

SCHELLACK, G. (2006). *Farmacologia na prática clínica da área de saúde*. São Paulo: Fundamento Educacional.

SENO, K., JOH, T., YOKOYAMA, Y., & ITOH, M. (1995). Role of mucus in gastric mucosal injury induced by local ischemia/reperfusion. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 126 (3) , 287-293.

SHAY, H. K., FELS, S. E., MERAZE, D., & GRUENSTEIN, M. S. (1945). A simple method for the uniform production of gastric ulceration in rat. *Gastroenterology* 5 , 43-61.

SHIN, J. M., & KIM, N. (2013). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Proton Pump Inhibitors. *Journal of Neurogastroenterology and Motility* (19) 1 , 25-35.

SIKIRIC, P., SEIWERTH, S., GRABAREVIC, Z., RUCMAN, R., PETEK, M., JAGIC, V., et al. (1997). The influence of a novel pentadecapeptide, BPC 157, on



NG-nitro-arginine methylester and Larginine effects on stomach mucosa integrity and blood pressure. *European Journal of Pharmacology* , 23-33.

SILVA, R. O., SANTOS, G. M., NICOLAU, L. A., LUCETTI, L. T., SANTNA, A. M., CHAVES, L. S., et al. (2011). Sulfated-Polysaccharide Fraction from Red Algae *Gracilaria caudata* Protects Mice Gut Against Ethanol-Induced Damage. *Marine Drugs* (9) , 2188-2200.

SILVEIRA, P., BANDEIRA, M., & ARRAIS, P. (2008). Farmacovigilância e reações adversas as plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. *British Journal of Pharmacology* 18(4) , 618-626.

SILVERTHORN, D. U. (2010). *Fisiologia Humana*. Porto Alegre: Artemed.

SILVIA, V. B., FREITAS, F. L., & MOMO, C. (2013). ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO PROVENTRÍCULO E VENTRÍCULO GÁSTRICO DE *Crypturellus parvirostris* (WAGLER,1827). *Ciência Animal Brasileira* (14) , 106-112.

SIMMONS, D. L., BOTTING, R. M., ROBERTSON, P. M., MADSEN, M. L., & VANE, J. R. (1999). Induction of an acetaminophen-sensitive cyclooxygenase with reduced sensitivity to nonsteroid antiinflammatory drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (6) , 3275–3280.

SIMÕES, M. O. (2007). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora UFRGS. 7ª Ed. .

SMITH, W. L., GARAVITO, R. M., & DEWITT, D. L. (1996). Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *Biological Chemistry* 271 , 33157-33160.

SOUZA, M. H., LIMA, O. M., ZAMUNER, S. R., FIORUCCI, S., & WALLACE, J. (2003). Gastritis increases resistance to aspirin-induced mucosal injury via COX-2-mediated lipoxin synthesis. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 285 , 54–61.

STERMER, E. A. (2002). Alcohol consumption and the gastrointestinal tract. . *The Israel Medical Association Journal* 4 (30) , 200-202.

STRUZYNSKA, L., CHALIMONIUK, M., & SULKOWSKI, G. (2005). The role of astroglia in Pb-exposed adult rat brain with respect to glutamate toxicity. *Toxicology* 212 , 185-194.

SULEYMAN, H., DEMIREZER, L. O., & KURUUZUM-UZ, A. (2004). Effects of *Rumex patientia* root extract on indomethacine and ethanol induced gastric damage in rats. *Pharmazie* 59 , 147–149.

SZABO, S., & GOLDBERG, I. (1990). Experimental pathogenesis: drugs and chemical in the gastric mucosa. *Scandinavian Journal of Gastroenterol* 174 , 1-8.

SZABO, S., TRIER, J. S., BROWN, A., & SCHNOOR, J. (1985). Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. *Gastroenterology* 88 , 228-236.

TAHA, M., SALGA, M., & ALI, H. (2012). Gastroprotective activities of *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. revisited: Role of arbutin. *Journal of Ethnopharmacology* 141 , 273– 281.

TARIQ, M. (2006). Bromophenacyl bromide, a phospholipase A2 inhibitor attenuates chemically induced gastroduodenal ulcers in rats. *World Journal Gastroenterology* , 5798-5804.

TARNAWKI, A. (2005). Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. *Digestive Diseases and Science* 50(1) , 24-33.

THOMOPOULOS, K. C. (2004). Changes in aetiology and clinical outcome of acute upper gastrointestinal bleeding during the last 15 years. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* , 177-182.

VANE, J. R., & BOTTING, R. M. (1998). Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *American Journal of Medicine* 104 , 2s-8s.

VERAS, V. (10 de maio de 2014). *Úlcera Péptica*. Fonte: Clínica Médica, disponível:

[http://www.medstudents.com.br/content/resumo\\_medstudents\\_20050922\\_.doc](http://www.medstudents.com.br/content/resumo_medstudents_20050922_.doc)

WALLACE, J. L. (2008). Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? *Physiology Reviews* 88 , 1547–1565.

WALLACE, J. L., & M. A., L. (2001). Inflammatory mediators in gastrointestinal defense e injury. *Experimental Biology and Medicine* 226 , 1003-1115.

WALLACE, J. L., & MILLER, M. J. (2001). Inflammatory mediators in gastrointestinal defense e injury. *Experimental Biology and Medicine* 226 , 1003-1115.

WALLACE, J. L., & MILLER, M. J. (2000). Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. *Gastroenterology* 119 , 512-520.

WALLACE, J. L., KEENAN, C., & GRANGER, D. N. (1990). Gastric ulceration induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is a neutrophil dependent process. *Am J Physiol. American Journal of Physiology* 259 , 462–467.

WOOD, J. G., & DARNELL, M. P. (1993). Adenosine is a mediator of ethanol-induced gastric vasodilation in dogs. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 27 , 664-670.

YOSHIDA, N., SUGIMOTO, N., NAKAMURA, Y., ICHIKAWA, H., NAITO, Y., & YOSHIKAWA, T. (2002). Helicobacter pylori infection potentiates aspirin induced gastric mucosal injury in Mongolian gerbils. *Gut* 50 , 594-598.

YUAN, Y., PADOL, I., & HUNT, R. H. (2006). Peptic ulcer disease today. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology* , 80-86.

ZAKARIA, Z. A., BALAN, T., SUPPAIAH, V., AHMAD, S., & JAMALUDIN, F. (2014). Mechanism(s) of action involved in the gastroprotective activity. *Journal of Ethnopharmacology* 151 , 1184–1193.

ZHI-MIN, S. (2005). Cysteamine increases expression and activity of H<sup>+</sup>-ATPase of gastric mucosal cells in weaning piglets. *World Journal of Gastroenterology* 11(42) , 6707-6712.

ZHONGZHI, W., JUNICHI, H., XINHUI, W., AKIKO, M., TAKAHIRO, T., NORIMASA, M., et al. (2011). Protective Effects of Ginger against Aspirin-Induced Gastric Ulcers in Rats. . *Yonago Acta medica* 54 , 11-19.