



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS DE SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MARCOS EBER FERREIRA ROGÉRIO

**EFICÁCIA DE *Tephrosia egregia* Sandwith NA GASTROPATIA INDUZIDA POR
ETANOL EM CAMUNDONGOS: ANÁLISE DO ENVOLVIMENTO DE ÓXIDO
NÍTRICO, PROSTAGLANDINA E2, E RECEPTORES OPIOIDES.**

SOBRAL

2017

MARCOS EBER FERREIRA ROGÉRIO

EFICÁCIA DE *Tephrosia egregia* Sandwith NA GASTROPATIA INDUZIDA POR
ETANOL EM CAMUNDONGOS: ANÁLISE DO ENVOLVIMENTO DE ÓXIDO
NÍTRICO, PROSTAGLANDINA E2, E RECEPTORES OPIOIDES.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará - *Campus* de Sobral, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mirna Marques Bezerra Brayner

Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Alfredo Rodrigues e Silva

SOBRAL

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- R63e Rogerio, Marcos Eber Ferreira.
EFICÁCIA DE *Tephrosia egregia* Sandwith NA GASTROPATIA INDUZIDA POR ETANOL EM CAMUNDONGOS: ANÁLISE DO ENVOLVIMENTO DE ÓXIDO NÍTRICO, PROSTAGLANDINA E2, E RECEPTORES OPIOIDES. / Marcos Eber Ferreira Rogerio. – 2017.
86 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2017.
Orientação: Profa. Dra. Mirna Marques Bezerra Brayner.
Coorientação: Profa. Dra. Antonio Alfredo Rodrigues e Silva.
1. Lesão gástrica. 2. Gastroproteção. 3. *Tephrosia egregia* Sandwith. I. Título.

CDD 660.6

MARCOS EBER FERREIRA ROGÉRIO

EFICÁCIA DE *Tephrosia egregia* Sandwith NA GASTROPATIA INDUZIDA POR ETANOL EM CAMUNDONGOS: ANÁLISE DO ENVOLVIMENTO DE ÓXIDO NÍTRICO, PROSTAGLANDINA E2, E RECEPTORES OPIOIDES.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará - *Campus* de Sobral, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: ___ / ___ / _____

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Mirna Marques Bezerra Brayner
Universidade Federal do Ceará (UFC) – *Campus* Sobral

Prof^º. Dr. Antônio Alfredo Rodrigues e Silva
Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA

Prof^ª. Dr^ª. Angela Martha Campos Arriaga
Programa de Pós-Graduação em Química – UFC

Prof^ª. Dr^ª. Raquel Carvalho Montenegro
Universidade Federal do Ceará (UFC) – NPDM

Dedicada à minha esposa Daiane Rocha e à
minha mãe Maria Cleide.

AGRADECIMENTO

Ao meu Senhor e eterno Deus toda a minha gratidão por suas bênçãos e proteção, por guiar os meus passos estando comigo neste momento tão importante. Por Ele e para Ele dedico tudo aquilo que a vida me propõe a executar.

Minha amada esposa Daiane Rocha, a você eu dedico não só este momento, mas todos os meus dias. Obrigado por ser uma benção na minha vida, por sua dedicação ao nosso amor, nosso lar. Obrigado por sua ajuda e encorajamento nos momentos difíceis. Você é o motivo da minha felicidade. Amo-te!

Minha querida mãe Maria Cleide, sua luta e dedicação por mim me motivaram a seguir em frente. Seus ensinamentos me tornaram um homem íntegro e de bom caráter. Todas as minhas conquistas também serão suas. Obrigado por tudo.

Agradeço aos meus familiares e amigos por todo apoio, orações e pensamentos positivos. Que Deus abençoe vocês.

Um trabalho se torna grandioso em função do empenho, participação e compromisso de uma equipe. Este estudo só tornou-se possível pela colaboração de algumas pessoas e órgãos a quem gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos:

A minha orientadora professora Dra. Mirna Brayner, pelo seu exemplo, dedicação e carisma. Agradeço a Deus por sua vida, e a você pelo apoio, paciência, profissionalismo e ensinamentos que foram essenciais à elaboração deste trabalho. Fui agraciado com a oportunidade de conhecê-la. Minha eterna gratidão. Oro por você.

Ao professor Dr. Antonio Alfredo, meu agradecimento por sua disposição em ajudar. Senti-me honrado pela sua valiosa orientação contribuindo para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a professora Dra. Ângela Arriaga, junto a sua equipe do Programa de Pós-Graduação em Química da UFC, que gentilmente cedeu o extrato de *Tephrosia egregia*. À professora Dra. Hellíada Chaves por sua disponibilidade em acompanhar o desenvolvimento desta pesquisa. À professora Dra. Karusa pela sua contribuição nas análises

histopatológicas. Ao professor Dr. Vicente Pinto por sua valiosa ajuda, estando sempre prestativo e disposto a contribuir com a ciência. Meu eterno orientador.

Agradeço às doutorandas do laboratório de farmacologia, Jordânia e Danielle Val, por toda contribuição desde os ensinamentos até experimentação em bancada. Em especial à Isabela Ribeiro, minha gratidão pela ajuda indispensável e de fundamental importância. O que seria de mim sem essa ajuda? Costumo dizer que ela foi meu braço direito. Obrigado pela parceria. Sucesso!

Meu agradecimento aos meus ICs, os estudantes de iniciação científica Gabriel Girão, Amanda Kathleen, e em especial a Dina Andressa pela eficiência nas práticas laboratoriais. Vocês foram muito importantes. Desejo sucesso e um futuro promissor.

Aos técnicos dos laboratórios da faculdade, Nayara e Anderson, meu muito obrigado pela atenção concedida e apoio nos experimentos desenvolvidos. À veterinária Alana, agradeço pela atenciosa ajuda na concessão dos animais do biotério.

Agradeço aos coordenadores do programa de pós-graduação em biotecnologia durante os anos que estive no mestrado, Dra. Lissiana e Dr. Igor Iuco, juntamente com todos os professores internos e colaboradores, muito obrigado por todo o conhecimento adquirido.

Aos grandes colegas e amigos do mestrado, grande satisfação em conhecê-los e poder conviver durante este tempo, dividindo e compartilhando os conhecimentos. Obrigado Laís Feitosa por colaborar nos experimentos desta pesquisa. Aos meus “doidos” amigos Rondinely, Nayara e Rayane, obrigado por tornarem este momento menos estressante e mais divertido. Felicidades.

Agradeço pelo apoio financeiro concedido pela CAPES durante os meses de trabalho desenvolvido com dedicação exclusiva.

Obrigado a todos os funcionários e colegas da faculdade de medicina da UFC - Campus Sobral, Edilda, Seu Almino, Seu Araújo, Neto e os demais seguranças e vigias que de maneira indireta ajudaram para que tudo pudesse ser realizado.

Abraços

“Como é feliz o homem que acha a sabedoria e que obtém o entendimento, pois a sabedoria é muito mais proveitosa do que a prata e rende mais do que o ouro”. (Provérbios: 3.13-14)

RESUMO

Espécies do gênero *Tephrosia* possuem amplo emprego popular com uso terapêutico em distúrbios inflamatórios, apresentando capacidade biogênica para produzir substâncias com atividades antioxidantes. Este trabalho teve por objetivos avaliar a atividade gastroprotetora do extrato salino de raízes de *Tephrosia egregia* Sandwith (TERE); investigar o possível envolvimento do óxido nítrico, prostaglandina E2, e receptores opioides no efeito protetor de TERE no modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos. O efeito de TERE na proteção gástrica foi avaliado pela análise da área lesionada do estômago após agressão química com etanol. Nos procedimentos metodológicos de gastropatia induzida por etanol, foram analisados os grupos controle (Salina 0,3ml/30g), TERE (doses- 2, 20, e 200 mg/Kg), e ranitidina (80 mg/Kg). A concentração de hemoglobina tecidual foi quantificada utilizando um kit padrão com reagente de Drabkin. Atividade antioxidante foi determinada através de dosagens da catalase - CAT, superóxido dismutase - SOD e glutathiona reduzida - GSH. Adicionalmente, neste modelo, foram utilizadas diferentes ferramentas farmacológicas (morfina, naloxona, misoprostol, indometacina, L-arginina, ou L-NAME), para buscar esclarecer os possíveis mecanismos de ação da TERE no possível efeito gastroprotetor. A análise estatística empregou o teste de análise de variância, seguido por teste de comparações múltiplas de Bonferroni, sendo significativo quando $p < 0,05$. O efeito gastroprotetor macro e microscópico do extrato salino de raízes de *Tephrosia egregia* Sandwith foi significativo se comparado ao efeito da ranitidina no modelo etanol-induzido; houve uma redução na concentração de hemoglobina tecidual do grupo tratados com TERE. A atividade enzimática da CAT, SOD e GSH aumentou no grupo tratado com TERE, determinando o efeito antioxidante do extrato. A análise de ferramentas farmacológicas revelou que o efeito protetor da *Tephrosia egregia* envolve a participação das vias do Óxido Nítrico, e a ativação dos receptores opioides, mas não depende de Prostaglandinas. Em conclusão, ficou evidenciada a atividade gastroprotetora do extrato salino de raízes de *Tephrosia egregia* Sandwith, demonstrando sua eficiência através das atividades biológicas demonstradas servindo como requisitos para qualificar esse extrato como produto biotecnológico.

Palavras-chave: Gastroproteção, Lesão gástrica, *Tephrosia egregia* Sandwith.

ABSTRACT

Species of the genus *Tephrosia* have wide popular use with therapeutic use in inflammatory disorders, presenting biogenetic capacity to produce substances with antioxidant activities. The objective of this study was to evaluate the gastroprotective activity of the extract of roots of *Tephrosia egregia* Sandwith (TERE); Investigate the possible involvement of nitric oxide, prostaglandin E₂, and opioid receptors in the protective effect of TERE in the model of ethanol-induced gastric injury in mice. The effect of TERE on gastric protection was evaluated by the analysis of the injured area of the stomach after chemical aggression with ethanol. In the methodological procedures of ethanol induced gastropathy, the control groups (Saline 0.3ml / 30g), TERE (doses-2, 20, and 200mg / kg) and ranitidine (80mg / kg) were analyzed. Tissue hemoglobin concentration was quantified using a standard kit with Drabkin reagent. Antioxidant activity was determined through catalase - CAT, superoxide dismutase - SOD and reduced glutathione - GSH dosages. In addition, in this model, different pharmacological tools (morphine, naloxone, misoprostol, indomethacin, L-arginine, or L-NAME) were used to clarify possible mechanisms of action of TERE in the possible gastroprotective effect. Statistical analysis employed the analysis of variance test, followed by Bonferroni multiple comparison test, being significant when $p < 0.05$. The macro and microscopic gastroprotective effect of the salt extract of *Tephrosia egregia* Sandwith roots was significant when compared to the effect of ranitidine in the ethanol-induced model; There was a reduction in tissue hemoglobin concentration in the group treated with TERE. The enzymatic activity of CAT, SOD and GSH increased in the group treated with TERE, determining the antioxidant effect of the extract. Analysis of pharmacological tools revealed that the protective effect of *Tephrosia egregia* involves the participation of Nitric Oxide pathways and the activation of opioid receptors, but does not depend on Prostaglandins. In conclusion, it was evidenced the gastroprotective activity of the salt extract of *Tephrosia egregia* Sandwith roots, demonstrating its efficiency through the demonstrated biological activities serving as requirements to qualify this extract as a biotechnological product.

Keywords: Gastroprotection, Gastric Injury, *Tephrosia egregia* Sandwith.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Regiões anatômicas do estômago humano.....	21
Figura 2 –	Anatomia funcional da mucosa gástrica humana.....	22
Figura 3 –	Camadas teciduais do estômago humano.....	23
Figura 4 –	Vias de sinalização dos principais mediadores da secreção ácida gástrica em humanos.....	26
Figura 5 –	Fatores que influenciam o equilíbrio gástrico.....	32
Figura 6 –	Terapêutica da úlcera gástrica em estômago humano.....	34
Figura 7 -	<i>Tephrosia egregia</i> Sandwith.....	45
Fluxograma 1 –	Ação das enzimas gástricas antioxidantes (Enzimas: superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. GSH glutathione reduzida. GSSG glutathione oxidada. O ₂ ⁻ oxigênio, H ₂ O ₂ peróxido de hidrogênio, H ₂ O água).....	31
Fluxograma 2 –	Esquema representativo dos efeitos do consumo agudo e crônico de etanol no estômago humano.....	33

LISTA DE GRÁFICOS E TABELA

Gráfico 1 –	Efeito da solução salina do extrato etanólico de raízes de <i>Tephrosia egregia</i> na gastropatia induzida por etanol em camundongos.....	54
Gráfico 2 –	Avaliação da atividade enzimática da catalase, em modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em camundongos.....	56
Gráfico 3 –	Avaliação da Concentração da Glutathiona Reduzida (GSH), em modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em camundongos.....	57
Gráfico 4 –	Dosagem de Superóxido Dismutase (SOD), em modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em camundongos.....	58
Gráfico 5 –	Avaliação do envolvimento de prostaglandinas na gastroproteção induzida pela solução salina do extrato etanólico de raízes de <i>Tephrosia egregia</i> em modelo de gastropatia induzida por etanol.....	59
Gráfico 6 –	Avaliação do envolvimento do Óxido Nítrico na gastroproteção induzida pela solução salina do extrato etanólico de raízes de <i>Tephrosia egregia</i> em modelo de gastropatia induzida por etanol.....	60
Gráfico 7 –	Avaliação do envolvimento de receptores opioides na gastroproteção induzida pela solução salina do extrato etanólico de raízes de <i>Tephrosia egregia</i> em modelo de gastropatia induzida por etanol.....	61
Tabela 1 –	Efeito da solução salina do extrato etanólico de raízes de <i>Tephrosia egregia</i> (TERE) na concentração de hemoglobina (Hb) tecidual em camundongos.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA	Ácido araquidônico
ACh	Acetilcolina
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de Variância
CAT	Catalase
CCK ₂	Receptor de colecistocinina tipo 2
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CoA	Coenzima A
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
COX-3	Variante da COX-1
CSH	Cisteína
DTNB	Ácido 5',5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico), conhecido por reagente de Elmann
EC	Células enterocromafins
ECL	Enterocromafin símile
EPM	Erro Padrão da Média

EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ETOH	Extrato etanólico
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EP ₁ , EP ₂ , EP ₃ e EP ₄	Receptores de prostaglandinas
FGF	Fator do Crescimento do Fibroblasto
GC	Guanilato ciclase
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GPR	Peptídeo Liberador de Gastrina
GSH	Glutationa Reduzida
GSSH	Glutationa Oxidada
GTP	Guanosina trifosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H ₂ / H ₃	Receptores Histamínicos
H&E	Hematoxilina e eosina
H ⁺ /K ⁺ -ATPase	Bomba de hidrogênio/potássio
HCl	Ácido clorídrico
HGF	Fator de crescimento do hepatócito
IL-1β	Interleucina 1 beta
IP ₃	Trifosfato de inositol
L-Arg	L-arginina
L-NAME	N _o -Nitro-L-arginina metil éster (inibidor da NOS)

L-NMMA	N ^G -monometil-L-arginina (inibidor da NOS)
M ₂ , M ₃ e M ₄	Receptores muscarínicos tipos 2, 3 e 4 respectivamente
HCl	Cloreto de sódio
NANC	Neurônios não adrenérgicos não colinérgicos
NBT	Azul de Nitro-Tetrazólio
NO/ON	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOSn	Óxido nítrico sintase neuronal
NOSe	Óxido nítrico sintase endotelial
NOSi	Óxido nítrico sintase induzível
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORs	Receptores Opioides
PACAP	Neuropeptídeo
PCA1 / VAPAC2	Receptores das células ECL
PDE5	Inibidores da fosfodiesterase 5
PGE ₂	Prostaglandina E2
PGs	Prostaglandinas
pH	Potencial Hidrogeniônico
PKC	Proteína-quinase C
PLA ₂	Fosfolipase A2
PNA / ANP	Peptídeo natriurético atrial

SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório
SH	Sulfidrilas Endógenas
SST2	Receptores de Somatostatina
SNC	Sistema nervoso central
SNE	Sistema Nervoso Entérico
SOD	Superóxido Dismutase
TERE	Extrato salino de raízes de <i>Tephrosia egregia</i> Sandwith
TLR3/TLR4	Receptores semelhantes a Toll
TGF- α	Fator de crescimento transformante alfa
TGI	Trato gastrintestinal
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	19
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	O estômago e a mucosa gástrica.....	21
2.2	Fisiologia da secreção gástrica.....	24
2.3	Mecanismos de defesa da mucosa gástrica.....	27
2.4	Úlcera gástrica.....	31
2.4.1	Lesão da mucosa gástrica induzida por etanol.....	32
2.4.2	Terapêutica das úlceras gástricas.....	34
2.4.3	Cicatrização das úlceras gástricas.....	35
2.5	Vias de regulação endógena na mucosa gástrica.....	36
2.5.1	Receptores opióides.....	36
2.5.2	Prostaglandinas.....	37
2.5.3	Óxido Nítrico (NO).....	39
2.6	Recursos naturais.....	41
2.6.1	Uso de plantas medicinais.....	41
2.6.2	Atividade gastroprotetora de produtos naturais.....	42
2.7	Considerações botânicas.....	43
2.7.1	Considerações sobre a família <i>Fabaceae</i>.....	43

2.7.2	Considerações sobre o gênero <i>Tephrosia</i>	44
2.7.3	Considerações sobre a espécie <i>Tephrosia egregia</i> Sandwith.....	45
3.	PERGUNTAS DE PARTIDA.....	46
4.	OBJETIVOS.....	47
4.1	Geral.....	47
4.2	Específicos.....	47
5.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
5.1	Animais.....	48
5.2	Material vegetal e preparação do extrato.....	48
5.3	Drogas e reagentes.....	49
5.4	Protocolo experimental.....	49
5.4.1	Lesões gástricas induzida por etanol em camundongos.....	49
5.4.2	Determinação dos níveis de Hemoglobina (Hb) em tecido gástrico de camundongos.....	50
5.4.3	Determinação da atividade antioxidante de <i>Tephrosia egregia</i> Sandwith.....	50
5.4.3.1	Avaliação da atividade enzimática da Catalase (CAT) em tecido gástrico de camundongos.....	50
5.4.3.2	Avaliação da concentração da Glutathiona Reduzida (GSH) em tecido gástrico de camundongos.....	51
5.4.3.3	Dosagem de Superóxido Dismutase (SOD) em tecido gástrico de camundongos.....	51

5.4.4	Investigações dos possíveis mecanismos de ação de <i>Tephrosia egregia</i> Sandwith.....	52
5.4.4.1	Envolvimento do Óxido Nítrico (ON) na gastroproteção de TERE em tecido gástrico de camundongos.....	52
5.4.4.2	Envolvimento das prostaglandinas na gastroproteção de TERE em tecido gástrico de camundongos.....	52
5.4.4.3	Envolvimento de receptores opioides na gastroproteção de TERE em tecido gástrico em camundongos.....	52
5.4.5	Análises estatísticas.....	53
6.	RESULTADOS.....	54
6.1	Efeito protetor da solução salina do extrato etanólico de raízes de <i>Tephrosia egregia</i> Sandwith na lesão gástrica induzida por etanol.....	54
6.2	Efeito da solução salina do extrato etanólico de raízes de <i>Tephrosia egregia</i> Sandwith sobre a hemoglobina tecidual.....	55
6.3	Avaliação da atividade enzimática da catalase na citoproteção gástrica em camundongos.....	55
6.4	Envolvimento da glutathiona reduzida na citoproteção gástrica em camundongos.....	56
6.5	Dosagem de Superóxido Dismutase na citoproteção gástrica em camundongos.....	57
6.6	Avaliação do envolvimento das prostaglandinas na gastroproteção induzida pela solução salina do extrato etanólico de raízes de <i>Tephrosia egrégia</i>	58
6.7	Avaliação do envolvimento do óxido nítrico na gastroproteção induzida pela solução salina do extrato etanólico de raízes de <i>Tephrosia egrégia</i>	59

6.8	Avaliação do envolvimento dos receptores opioides na gastroproteção induzida pela solução salina do extrato etanólico de raízes de <i>Tephrosia egregia</i>	60
7.	DISCUSSÃO.....	62
8.	CONCLUSÕES.....	69
	REFERÊNCIAS.....	70

1. INTRODUÇÃO

As gastropatia são lesões profundas na mucosa que continuam sendo uma causa comum de hospitalizações e cirurgias, de acordo com o progresso no diagnóstico e tratamento (SOSTRES *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2010).

Pesquisas laboratoriais utilizando modelos de gastropatias induzidas por etanol em camundongos têm contribuído para elucidar eventos celulares e moleculares que formam a base da patogenia da doença.

Os medicamentos utilizado no tratamento de úlceras possui custo financeiro elevado para a maioria da população (WANG *et al.*, 2010). Assim, o uso de fármacos oriundos de recursos naturais contribui para uma maior adesão ao esquema terapêutico, visto que a Organização Mundial da Saúde - OMS recomenda a prática do uso de plantas medicinais nos programas de atenção primária à saúde como forma de diminuir os custos e ampliar o número de beneficiados, principalmente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (BIESKI, 2004).

Vários medicamentos sintéticos utilizados na terapêutica moderna, que atuam especificamente sobre receptores, enzimas e canais iônicos foram desenvolvidos a partir de plantas superiores, toxinas animais e de microrganismos. Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram extraídos de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais (CALIXTO, 2001).

A utilização de uma flora variada tem sido validada, ainda que em ensaios pré-clínicos, no tratamento de doenças do trato gastrintestinal (BACCHI, 1986; REPETTO; LLESUY, 2002; ABDULLA *et al.*, 2010; AL-ATTAR, 2011).

O conhecimento sobre plantas medicinais é um recurso popular usado como alternativa terapêutica. Atualmente, existe uma preocupação com a segurança e eficácia dos produtos naturais, visto que na maioria das vezes o uso como tratamento é baseado somente em suposições tradicionais.

A junção do conhecimento popular do uso de plantas como medicamento e procedimentos experimentais modernos incrementa resultados, reforça certezas farmacológicas ou as contestam, propondo novas abordagens, com resultados muitas vezes inéditos e inovadores.

Espécies do gênero *Tephrosia* possuem amplo emprego popular, sendo usada em desordens inflamatórias (SANTRAM et. al, 2006; SHENOY et. al, 2010) e doenças que afetam os rins, fígado, baço, coração e sangue (DESPANDE et. al, 2003). Apresentam capacidade biogenética para produzir substâncias com grande diversidade estrutural, tais como esteróides, aminoácidos e flavonóides, incluindo os isoflavonóides rotenóides (ANDEL, 2000). Estes últimos são conhecidos por apresentarem atividades antioxidantes, por sua capacidade de capturar os radicais hidroxila ou peróxido, por exemplo (DAS et. al, 1990; ABDELWAHED et. al, 2007).

A espécie *Tephrosia egregia* apresenta excelente capacidade antioxidante, relatada através da investigação de extrato metanólico, sugerindo possuir um bom potencial de ação contra os radicais livres (ARRIAGA et. al, 2009).

Diante disto, estudamos a atividade gastroprotetora de *Tephrosia egregia* Sandwith, buscando contribuir para o desenvolvimento de uma abordagem terapêutica complementar no tratamento dos processos ulcerosos da mucosa gástrica, aumentando as chances de êxito do tratamento, e caracterização dos possíveis mecanismos de ação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O estômago e a mucosa gástrica

A alimentação é fonte crucial de nutrientes para os animais, incluindo o homem, sendo o estômago um dos principais órgãos envolvidos na digestão. Apresenta-se como um órgão sacular com capacidade de 1200 a 1500 mL, podendo sofrer distensão e acomodar um volume de até 3000 mL. O estômago é dividido em cinco regiões anatômicas: cárdia, fundo, corpo, antro e o esfíncter pilórico (figura 1), sendo seu revestimento interno idêntico ao do restante do trato gastrointestinal, apresentando mucosa, submucosa, camada muscular e serosa (ABBAS, VINAY KUMAR e FAUSTO, 2005).

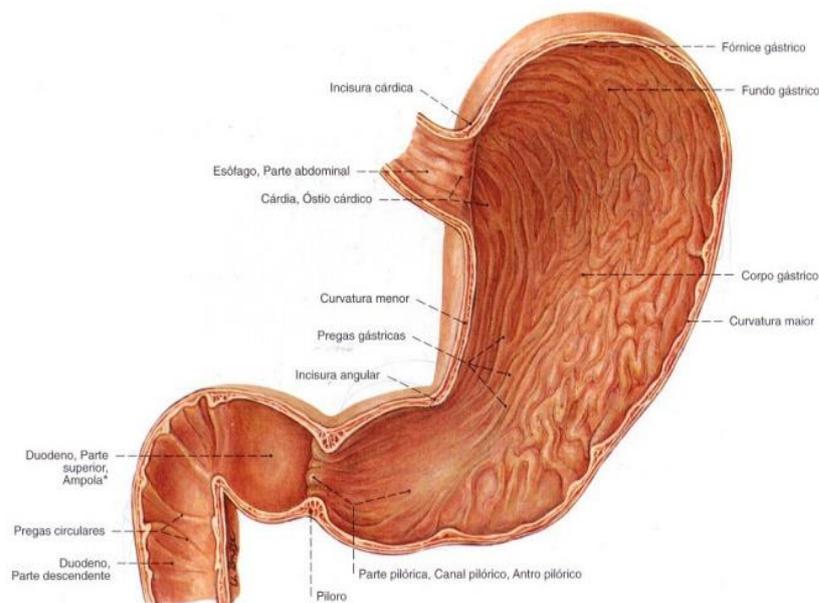


Figura 1 - Regiões anatômicas do estômago humano

Fonte: SOBOTTA (2000).

A superfície da mucosa gástrica é recoberta por células especiais conhecidas por “células mucosas superficiais” que são responsáveis pela produção e liberação de um muco viscoso, denso e alcalino que serve de barreira protetora contra a ação da secreção ácida, sintetizada pelas glândulas oxínticas ou gástricas, as quais estão presentes no corpo e fundo do estômago (MILLS e SHIVDASANI, 2011).

A área glandular oxíntica é composta por células parietais (ou oxínticas) e localiza-se nas regiões de fundo e corpo do estômago (80% do órgão). A área glandular pilórica, localizada na região antral, ocupa os outros 20% do órgão sendo composta principalmente por células G, produtoras de gastrina. Essas áreas glandulares são compostas de unidades tubulares verticais, que consistem em uma fenda na região apical, as foveólas, um istmo (zona progenitora) e uma base. Em se tratando de composição celular, as glândulas gástricas apresentam ainda células neuroendócrinas, contendo agentes sinalizadores hormonais e parácrinos que participam do controle da secreção, dentre as principais estão: as células enterocromafins (EC), secretoras do peptídeo natriurético atrial (PNA), serotonina e adrenomedulina; células enterocromafins-símiles – ECL (*enterochromaffin-like*) que contêm histamina; células D que produzem somatostatina e amilina; e células G que contêm grelina e obestatina. Na base de cada unidade glandular predominam as células principais, secretoras de pepsinogênio em ratos e humanos (**Figura 2**) (SAMUELSON; HINKLE, 2003; SCHUBERT; PEURA 2008).

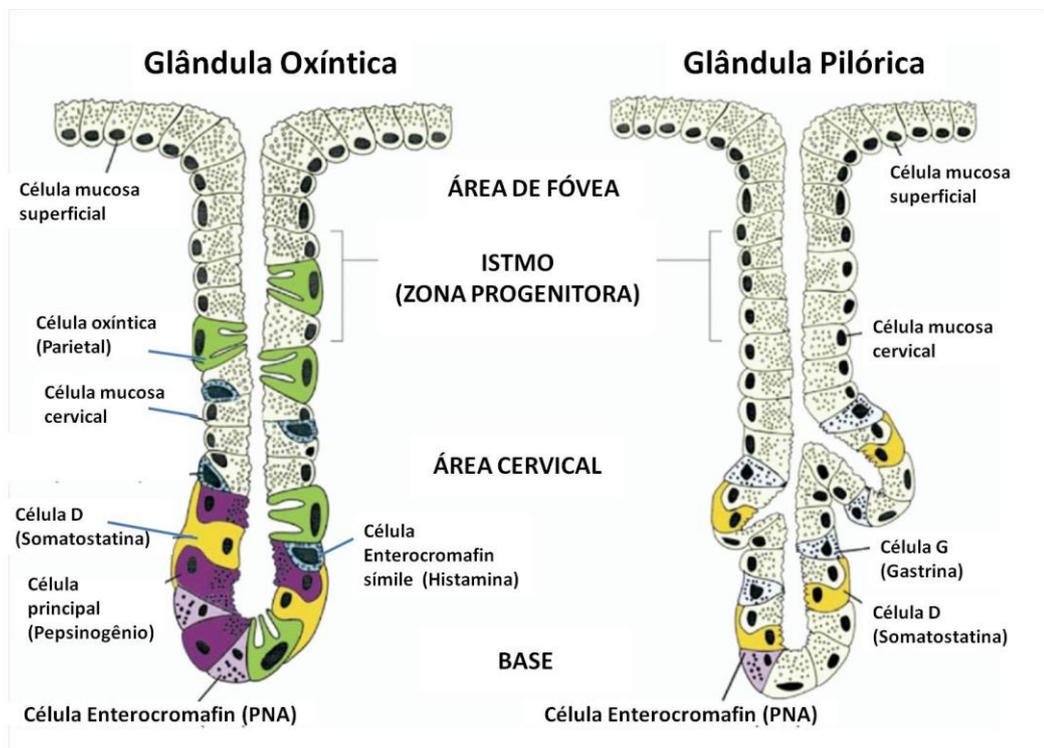


Figura 2 - Anatomia funcional da mucosa gástrica humana.

Fonte: SCHUBERT; PEURA (2008).

Histologicamente, o estômago é composto pelas camadas teciduais: mucosa, submucosa, muscular externa (circular e longitudinal) e serosa (**Figura 3**). A superfície interna do estômago (mucosa) é revestida por células epiteliais prismáticas, as quais formam as fossetas gástricas, originando pequenas glândulas na porção terminal. A camada submucosa é constituída de tecido conjuntivo frouxo com colágeno, fibrilas de elastina, vasos sanguíneos e linfáticos. A camada mais externa, serosa ou adventícia, é constituída principalmente de tecido conjuntivo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; KUTCHAI, 2004; SILVERTHON, 2003; LIU; CRAWFORD, 2005).

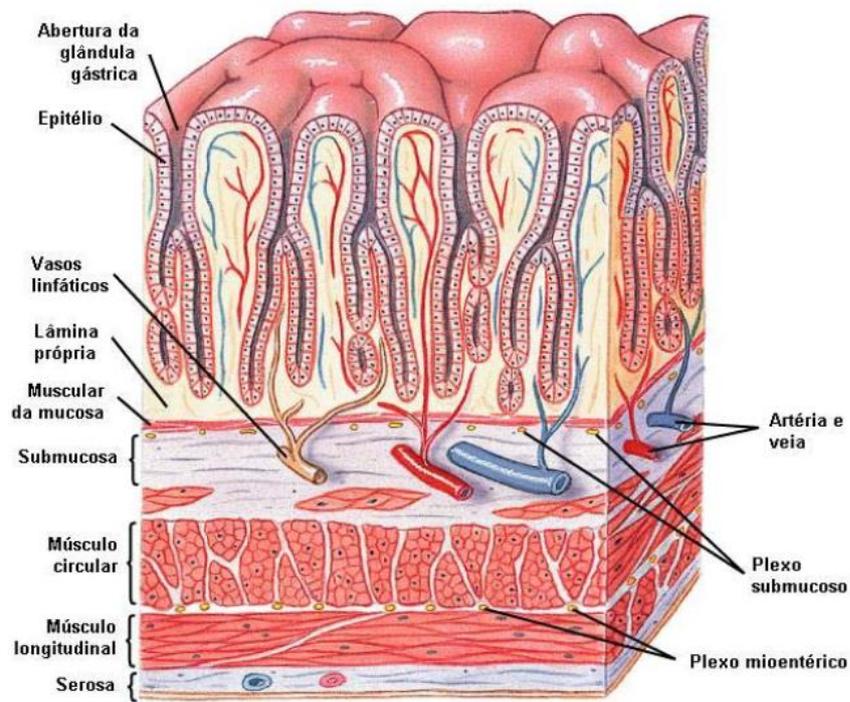


Figura 3 - Camadas teciduais do estômago humano.

Fonte: SILVERTHON (2003).

A mucosa gástrica possui dois compartimentos distintos: o foveolar superficial e glandular mais profundo, demonstrando a variação na sua composição de acordo com a região anatômica do estômago. As glândulas superficiais do estômago sofrem estimulação direta pela presença do alimento, aumentando a sua secreção, sendo que também são ativadas pelo Sistema Nervoso Entérico (SNE). Da mesma forma, o SNE ativa glândulas mais profundas, podendo essa ativação ocorrer pela estimulação tátil, irritação química e/ou distensão da

parede gástrica proporcionando um aumento nas secreções tanto de glândulas superficiais quanto profundas. A estimulação parassimpática, com liberação de acetilcolina, excita a atividade gastrointestinal incluindo uma maior liberação das secreções glandulares; já a estimulação simpática, com liberação de norepinefrina e pequenas quantidades epinefrina, inibe a atividade do trato gastrointestinal opondo-se a estimulação parassimpática, efeito esse atribuído principalmente à inibição dos neurônios do sistema nervoso entérico pela norepinefrina (FURNESS, 2012). A regulação hormonal tem papel crucial no controle da secreção das glândulas gástricas, regulando tanto o volume como as características das secreções (SCHUBERT; PEURA, 2008).

2.2 Fisiologia da Secreção Gástrica

A secreção de ácido gástrico é um processo contínuo em que múltiplos fatores centrais e periféricos contribuem para uma meta comum: a secreção de H^+ pelas células parietais. É regulada por uma complexa interação de sinais neurais, endócrinos e parácrinos do cérebro e do trato gastrointestinal (KONTUREK, *et al.*, 2004; PETRONILHO, *et al.*, 2009). Neurônios aferentes e eferentes providenciam uma comunicação bidirecional entre SNC e o estômago além de uma grande variedade de neuropeptídeos, que agem centralmente e periféricamente para regular a secreção ácida gástrica (SCHUBERT, 2005) (Figura 4).

Os principais estimulantes da secreção do ácido são a acetilcolina (ACh), liberada de neurônios pós-ganglionares entéricos; a gastrina, liberada de células G do antro gástrico; e a histamina, liberada das ECL (Figura 2). O principal inibidor da secreção do ácido gástrico é a somatostatina liberada das células D da mucosa oxíntica e pilórica (HOOPER; PASRICHA, 2006).

Na via neuronal, o Sistema Nervoso Central (SNC) modula a atividade do SNE através da ACh, estimulando a secreção de ácido gástrico em resposta à antecipação ao alimento (odor, visão, salivação), o que caracteriza a “fase cefálica” da secreção ácida gástrica. As fibras eferentes que se originam nos núcleos motores dorsais descem até o estômago pelo nervo vago e fazem sinapse com células ganglionares do SNE (SCHUBERT, 2005).

A ACh é liberada pelos neurônios pós-ganglionares do nervo vago e interage com receptores muscarínicos M3 da membrana basolateral da célula parietal, ativando-os. A

ativação do receptor colinérgico resulta na liberação de cálcio dos estoques mediada pela formação do inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) pela fosfolipase C, bem como da entrada de cálcio extracelular que é modulada por várias substâncias ativadas pela fosfolipase A2. O cálcio se une a proteínas fixadoras de cálcio, como a calmodulina, formando o complexo cálcio-calmodulina que fosforila proteínas em cascata e ativa as proteínas quinases cálcio dependentes (PKC). A ativação da PKC permite a fosforilação de proteínas que irão ativar a H⁺/K⁺-ATPase (bomba de próton), estimulando diretamente a secreção do ácido (ATHMANN, *et al.*, 2000; AIHARA, *et al.*, 2007).

A ACh também age indiretamente através da interação com receptores muscarínicos M2 e M4 das células D e por inibição do Peptídeo Natriurético Atrial - ANP (CHEN, *et al.*, 2006; SCHUBERT e PEURA, 2008). Estes processos impedem a secreção de somatostatina, removendo a regulação deste peptídeo sobre as células G, ECL e parietais (SCHUBERT, 2005).

A gastrina é produzida pela célula G do antro gástrico, mas também pode ser produzida em pequena quantidade no intestino delgado, no cólon e no pâncreas. Este hormônio é o principal mediador da secreção ácida estimulada pela alimentação e age principalmente liberando histamina das células ECL no corpo e fundo do estômago. Quando liberada da célula G, liga-se em receptores de gastrina/colecistocinina do tipo 2 (CCK₂) localizados na célula parietal, promovendo aumento dos níveis de cálcio intracelular, o qual estimulará a bomba de prótons (H⁺/K⁺-ATPase), desencadeando a formação de ácido. Esses receptores também estão presentes nas células ECL, aos quais a gastrina pode ligar-se promovendo a liberação de histamina (ALY, *et al.*, 2004; BEALES, 2004).

A histamina é estocada principalmente em células ECL que comumente se localizam em estreita proximidade com as células parietais. Quando a histamina é liberada, ela estimula diretamente a secreção do ácido gástrico pela ligação em receptores H2 na célula parietal, desencadeando uma cascata de eventos intracelulares, resultando, com isso, no aumento dos níveis de AMPc e ativação da PKA. A ativação da via dependente de AMPc estimula a bomba de prótons na célula parietal, resultando na secreção de ácido (JAIN, *et al.*, 2007). Além disso, a histamina modula a secreção do ácido de maneira indireta, por atuar em receptores H3 na célula D do antro gástrico, inibindo a secreção de somatostatina (substância que tem função de inibir a secreção do ácido por suprimir a liberação de gastrina, mediante

retroalimentação negativa); e atuar nas células G estimulando a liberação de gastrina (KONTUREK, *et al*, 2004; ROULEAU, *et al.*, 2004).

Outros mediadores estão envolvidos na secreção gástrica, como o peptídeo liberador de gastrina (GPR) que é liberado das fibras pós-ganglionares do nervo vago e estimula diretamente à liberação de gastrina, e conseqüentemente, a secreção ácida e os neuropeptídios PACAP e VIP que após liberados dos nervos não colinérgicos, ativam os receptores PCA1 e VAPAC2 presentes nas células ECL, resultando na liberação de histamina (ATHMANN, *et al.*, 2000; AIHARA, *et al.*, 2007; CHEN, *et al.*, 2006; SCHUBERT; PEURA, 2008). Entretanto o PACAP e o VIP podem inibir a secreção ácida ao estimular direta ou indiretamente a secreção de somatostatina (LI, *et al.*, 2000).

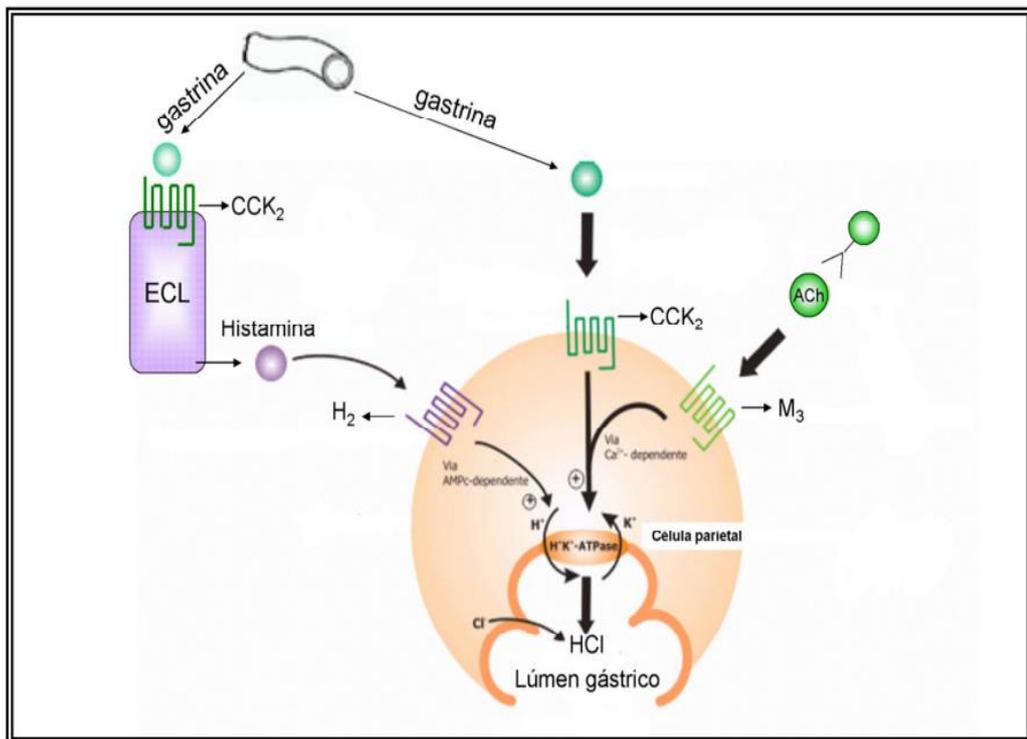


Figura 4 - Vias de sinalização dos principais mediadores da secreção ácida gástrica em humanos

Fonte: Adaptado de OLBE, *et al.* (2003).

A somatostatina é um peptídeo inibitório liberado pelas células D localizadas nas áreas do antro e do fundo do estômago. Dois mecanismos do efeito antissecretor da somatostatina tem sido registrados: a interação direta sobre as células parietais e a liberação de gastrina e histamina das células G e ECL. Ambos ocorrem através da ativação de receptores de SST₂ de somatostatina localizados nas células ECL e parietal (LI, *et al.*, 2001).

O receptor SST₂ está acoplado à proteína G inibitória (Gi) e também pode inibir a secreção ácida provocada pelos agonistas de Ca₂⁺ e a liberação de histamina pelas células ECL (ATHMANN, *et al.*, 2000; KOMASAKA, *et al.*, 2002). Segundo Komasaka, *et al.* (2002), a inibição da liberação de histamina pelas células ECL tem papel mais importante na inibição da secreção ácida gástrica do que o efeito inibitório direto da somatostatina sobre as células parietais.

As prostaglandinas (PGEs) também atuam na regulação da secreção ácida via receptores EP₃ que acoplados à proteína Gi inibem a via da ACh, causando supressão da acidez gástrica nas células parietais (KATO, *et al.*, 2005)

O peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) pertence a uma família de genes que incluem a calcitonina, a adrenomedulina e a amilina. Seus receptores já foram identificados nas células D antral e oxíntica. Em resposta a alta acidez, o CGRP ligado aos neurônios sensoriais estimula a somatostatina causando a inibição da secreção de gastrina e histamina e conseqüentemente, da secreção ácida (SCHUBERT; PEURA, 2008).

2.3 Mecanismos de defesa da mucosa gástrica.

A mucosa gástrica é continuamente exposta a substâncias com uma grande diversidade de temperaturas, pH, osmolaridade, substâncias endógenas (ácido clorídrico, pepsina e bile) ou por irritantes ingeridos, por exemplo o álcool e anti-inflamatórios não esteroides (AINES), além de produtos bacterianos que são capazes de provocar reações inflamatórias locais ou sistêmicas. Para evitar possíveis danos causados por tais substâncias existe um mecanismo próprio de defesa que depende de processos fisiológicos, modulados por uma gama de mediadores, entre hormônios, neurotransmissores e citocinas. Existem os mecanismos locais e os neuro-hormonais, ambos atuam de forma dinâmica, controlando o fluxo sanguíneo da mucosa, como o aporte de leucócitos, a taxa de descamação do epitélio, a secreção de muco, HCl e, bicarbonato de sódio e o sistema imunológico. Em condições que possam comprometer a ação destes mecanismos, a mucosa gástrica passa a ficar mais susceptível aos danos induzidos por fatores irritantes luminiais e/ou sistêmicos. O tecido gástrico possui eficiência na defesa da mucosa, desde o lúmen até regiões mais profundas do tecido, dependendo da extensão e da causa do dano (TULASSAY; HERSZÉNYI, 2010).

A primeira defesa contra os agentes agressores (H^+ e pepsina) é uma barreira física formada por muco, bicarbonato e fosfolípídeos surfactantes que recobrem a camada superficial. O muco é composto basicamente por água e mucina, e como o bicarbonato, é secretado pelas células superficiais formando assim a barreira protetora. Prostaglandinas, agentes colinérgicos, gastrina e secretina estimulam a secreção de muco. Já a secreção de bicarbonato pode ser estimulada por prostaglandinas, L-glutamato, L-aspartato, L-leucina, inibidores da fosfodiesterase 5 (PDE5) e ativação de receptores semelhantes a Toll tipo 3 e 4 (TLR3 e TLR4) (DEFONESKA e KAUNITZ, 2010).

O bicarbonato de sódio ajuda a manter uma zona de pH neutro na mucosa oferecendo uma barreira protetora contra a difusão do ácido. Sabe-se que a PGE2 estimula a secreção de bicarbonato de sódio no estômago, via ativação dos receptores EP1; e no duodeno de ratos, via ativação de receptores EP3 e EP4. Além disso, o fator liberador de corticotrofina, melatonina, uroguanilina, e orexina A também estimulam a secreção de bicarbonato (AOI, *et al.*, 2004; NAKASHIMA, *et al.*, 2004).

O muco tem aspecto geleiforme devido sua composição: glicoproteínas de alto peso molecular, mucina e água. A camada de muco que cobre a superfície interna do TGI é constantemente renovada e sua espessura da secreção de mucina, do grau de degradação proteolítica e da erosão. O muco gástrico pode ser separado em duas diferentes camadas: a camada mais externa, onde o muco está aderido mais frouxamente; e a mais interna, firmemente aderida. Sendo esta última mais importante na manutenção do pH neutro na superfície da mucosa, que a protege do ácido corrosivo. A camada frouxa de muco funciona como ligante de agentes luminis nocivos, sequestro de nitritos deglutidos e de NO (PHILLIPSON *et al.*, 2008). O muco secretado sobre a superfície estomacal tem as funções de lubrificar a mucosa, reduzindo o dano físico ao epitélio e diminuir a capacidade bacteriana de invadir o epitélio subjacente Além de prevenir a abrasão mecânica, o muco provê um microambiente adequado à cicatrização em sítios onde a superfície foi previamente danificada, acelerando o reparo. Em combinação com o bicarbonato de sódio secretado pelas células mucosas superficiais, o muco possui um papel-chave na proteção gástrica, cuja efetividade está regulada pela síntese de PGs (FIORUCCI *et al.*, 2001).

O fluxo sanguíneo é fundamental na defesa citoprotetora da mucosa gástrica por disponibilizar mais bicarbonato de sódio e proteger a mucosa da retrodifusão dos íons H^+ . O óxido nítrico (NO), que produzido pela ação da enzima óxido nítrico sintetase (NOS), atua

como vasodilatador local com aumento do fluxo sanguíneo. A NOS possui três isoformas que produzem NO a partir da L-arginina, convertendo-a em L-citrulina; duas isoformas são constitutivas, a endotelial (eNOS) e a neural (nNOS), e uma forma induzível (iNOS). O NO atravessa facilmente membranas plasmáticas difundindo-se rapidamente para células vizinhas à célula que o produziu, tendo a capacidade de ligar-se ao grupo heme da guanilil ciclase solúvel (GCs), que catalisa a conversão de GTP para GMPc, aumentando, por conseguinte, a concentração de GMPc intracelular. Assim, esse segundo mensageiro liga-se aos domínios específicos de moléculas efetoras, incluindo canais iônicos, proteínas quinases, e fosfodiesterases, promovendo respostas celulares. Os neurônios do sistema nervoso entérico e células endoteliais vasculares expressam de forma basal as suas respectivas isoformas constitutivas da NOS, e a forma induzível também pode ser expressa por estes tipos celulares como também por macrófagos e neutrófilos. Uma relevante diferença entre as isoformas constitutivas e induzíveis, é que esta última é uma enzima cálcio independente, propiciando a esta à capacidade de produzir grande quantidade de NO, que faz com que este passe a ter efeito pró-ulcerogênico (NISHIO et al., 2006).

Prostaglandinas endógenas, também denominadas prostanoídes tem um importante papel mediando muitos aspectos da defesa da mucosa gastrointestinal (MAITY *et al.*, 2003). Podem ser produzidas a partir do ácido araquidônico (AA) pela ação das cicloxigenases (COX), que apresentam três isoformas: COX1 constitutiva, COX2 induzível e COX3 uma variante da COX1 (DEY, LEJEUNE e CHADEE, 2009). Prostanoídes possuem oito receptores, entre tipos e subtipos. Prostaglandias E2 (PGE2), existem os subtipos EP1, EP2, EP3 e EP4 (NARUMIYA, 2009). A PGE2 produzida pelas células mucosas atua na proteção gástrica em vários locais e ligando-se a diferentes subtipos de receptores: no estômago ocorre inibição da contração através do envolvimento de receptores EP1; a estimulação da secreção duodenal de bicarbonato ocorre através de receptores EP3 e EP4; a inibição da contração do intestino delgado por EP4; estimulação da secreção de muco no estômago (EP3 e EP4); e sub-regulação da secreção de citocinas no cólon (EP4) e aumentando também o fluxo sanguíneo (TAKAHASHI, TAKEUCHI e OKABE, 1999).

Radicais livres são espécies químicas com elétrons desemparelhados que lhes conferem alta reatividade. As Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) são radicais livres que contêm oxigênio ou espécies químicas contendo oxigênio e formam facilmente radicais livres, como peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Tais espécies são resultados do metabolismo

celular natural sendo capazes de induzir dano e provavelmente morte celular (STOHS, 2011). Antioxidantes são moléculas capazes de evitar ou diminuir o dano oxidativo causado por radicais livres. Os flavonóides e outros polifenóis, presentes em alguns produtos naturais, são substâncias que podem propiciar vários benefícios à saúde e possuem comprovadamente, in vitro, ação antioxidante ou pró-antioxidante, ação essa comprovada in vivo em alguns locais como estômago, intestino delgado e grosso (HALLIWELL, 2011).

As células do trato gastrointestinal possuem um sistema de defesa antioxidante capaz de evitar a citotoxicidade das espécies reativas de oxigênio (EROs) através de mecanismos que envolvem a ação de enzimas antioxidante como a superóxido dismutase (SOD), glutathiona (GSH) e catalase (CAT) (Figura 5).

Alterações no estado redox (oxidação-redução) e depleção de antioxidantes pela exposição a agentes oxidantes levam ao estresse oxidativo e dano oxidativo (BAYIR, 2006).

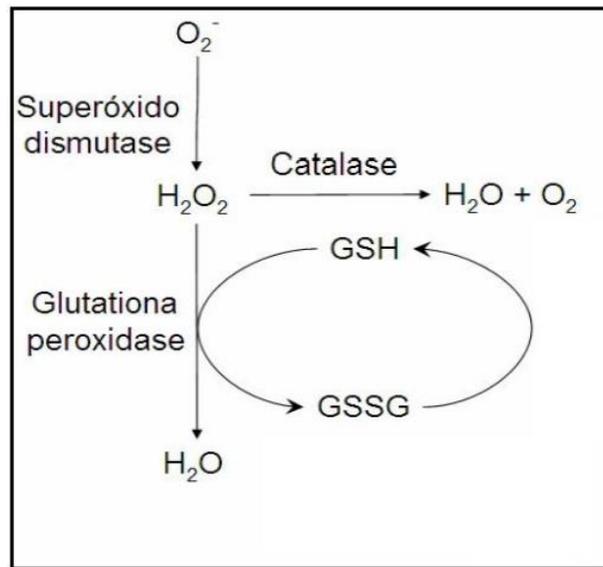
A SOD existe sob a forma de três isoenzimas nas células humanas: a) SOD citosólica, contendo íons cobre e zinco, b) SOD extracelular, contendo íons cobre e zinco e c) SOD mitocondrial, contendo íons manganês. Esta enzima remove, por reação de dismutação, o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que é um radical livre muito reativo, formado pela redução do oxigênio molecular (MATÉS; SÁNCHEZ-JIMENEZ, 1999; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

A catalase localiza-se principalmente nos peroxissomos, onde catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. Tem também a função de detoxificação de diferentes substratos, como fenóis e álcoois pela redução do peróxido de hidrogênio. A catalase liga-se com NADPH, o qual protege a enzima da inativação e aumenta assim sua eficiência (KIRKMAN *et al.*, 1999).

A Glutathiona (GSH) é um tripeptídeo, age como um antioxidante importante para a manutenção da integridade da mucosa do estômago. Os tióis endógenos tais como GSH são capazes de ligar-se a radicais livres e prevenir a formação das lesões produzidas por vários agentes ulcerogênicos. Assim a GSH tem importante participação na manutenção da integridade da mucosa gástrica e seu esgotamento pode resultar na acumulação de radicais livres que favorecem o surgimento de danos à membrana por peroxidação lipídica (MAITY, *et al.*, 2003; DEMIR, *et al.*, 2003; OLIVEIRA, *et al.*, 2004).

A concentração relativamente elevada de grupos sulfidrílicos não proteicos (NP-SH), que é principalmente glutathiona reduzida (GSH, glicina γ -glutamil-cisteína), além de

cisteína (CSH), coenzima A e outros tióis na mucosa gástrica, também indica suas possíveis implicações para a gastroproteção. NAGY et al. (2007) indicaram que sulfidrilas endógenas (SH) desempenham um papel importante na manutenção da integridade gastroduodenal e na proteção contra lesões quimicamente induzidas em células, tecidos e órgãos.



Fluxograma 1 – Ação das enzimas antioxidantes no trato gastrointestinal.

Fonte: Adaptado de MOURA ROCHA (2009).

2.4 Úlcera gástrica

A úlcera é uma lesão profunda da mucosa produzida pela ação da secreção ácida, que se estendem até camada muscular, podendo atingir a submucosa ou camadas mais profundas, onde tanto os componentes dos tecidos epitelial e conectivo, incluindo miofibroblastos subepiteliais, células do músculo liso, vasos e nervos, podem ser destruídos (MALFERTHEINER, CHAN e MCCOLL, 2009. MILANI; CALABRÒ, 2001).

Na maioria dos casos a etiologia da úlcera é multifatorial, sendo geralmente aceito que é resultante de um desequilíbrio gerado pelo aumento dos agentes agressores endógenos (ácido clorídrico e pepsina) ou exógenos (etanol, infecção por *H. pylori*, anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), fumo, estresse) e pela diminuição dos agentes protetores (muco, bicarbonato, prostaglandinas, óxido nítrico e fluxo sanguíneo), responsáveis pela integridade da mucosa (BELAICHE, *et al.*, 2002; RAMAKRISHNAN, *et al.*, 2007; ABBAS, *et al.*, 2005). (figura 6).

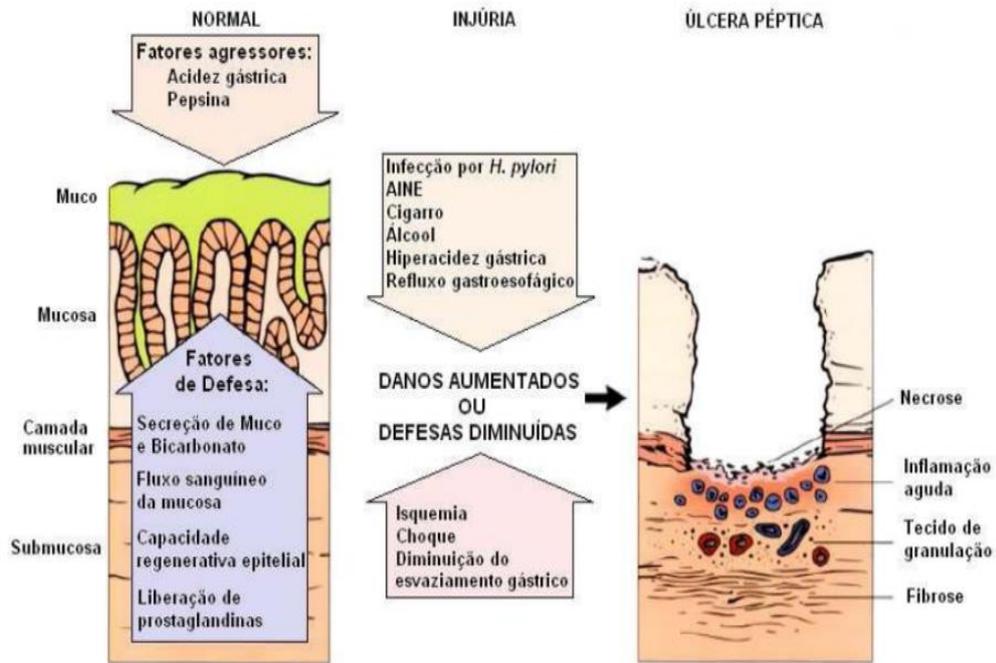


Figura 5 - Fatores que influenciam o equilíbrio gástrico.

Fonte: adaptado de ABBAS, VINAY KUMAR, FAUSTO (2005).

2.4.1 Lesão da mucosa gástrica induzida por etanol

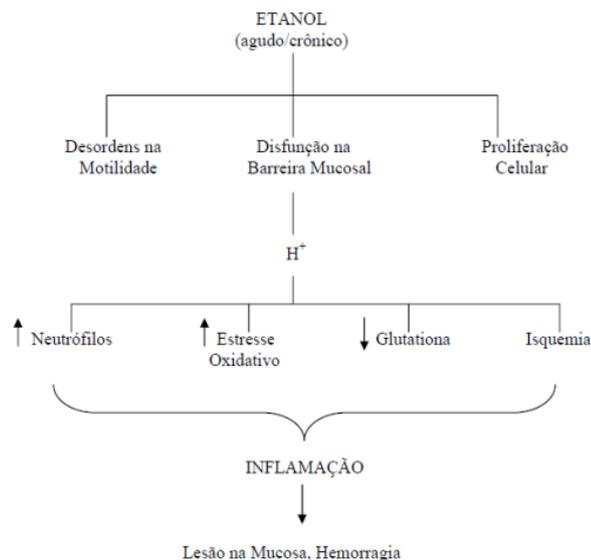
As lesões induzidas experimentalmente em camundongos possuem o mesmo mecanismo para o desenvolvimento das lesões em seres humanos, ou seja, provocando um desequilíbrio entre os agentes agressores e os agentes responsáveis pela proteção da mucosa (MAITY et al., 2003).

O etanol é capaz de induzir lesões experimentais para estudo por possuir ação necrotizante direta e causar alteração na microcirculação da mucosa, por isquemia e produção de radicais livres, além de liberar endotelina, promover a desgranulação de mastócitos, inibir a produção de prostaglandinas e diminuir a produção de muco (RUJJANAWATE et al., 2005). A inibição da síntese das prostaglandinas pelo etanol, pode ser explicada pela ativação da via das lipoxigenases, que irão aumentar os níveis de leucotrieno C4 e B4, diminuindo assim os produtos formados pela ciclooxigenases (MAITY et al., 2003; GOEL, TAVARES e BENNETT, 2012; PESKAR et al., 2012).

A ingestão de etanol em baixas concentrações (10%) causa um processo inflamatório agudo que estimula a aderência leucocitária (neutrófilos), havendo comprometimento do epitélio, e em altas concentrações (90 a 100%) induz lesões independentes de neutrófilos, sendo mais relacionadas ao dano vascular precoce, com redução do fluxo sanguíneo da mucosa, isquemia e morte celular. O processo inflamatório produzido pelo etanol caracteriza-se pela liberação de mediadores, que ativam os granulócitos e consequente produção de proteases e formação de radicais livres (TEYSSEN; SINGER, 2003; SIEGMUND *et al.*, 2003).

Um importante efeito deletério do etanol no estômago é a depleção dos grupos sulfidrílicos não-protéicos, que são necessários para a estabilização das membranas celulares, bem como para a eliminação de radicais livres. O etanol também influencia a atividade da musculatura, provoca estase gástrica, congestão capilar e aumento da permeabilidade vascular, aumentando o risco de hemorragia e ulceração, associados a lesões macroscópicas e microscópicas na mucosa (MACMATH, 1990; SANTOS; RAO, 2001).

Siegmund, Teyssen e Singer (2002), propuseram um esquema para representar os efeitos agudos e crônicos do etanol na mucosa gástrica (Figura 7).



Fluxograma 2 - Esquema representativo dos efeitos do consumo agudo e crônico de etanol no estômago humano

Fonte: Adaptado de SIEGMUND, TEYSSEN E SINGER (2002).

2.4.2 Terapêutica das gastropatias

Quando se considera as opções terapêuticas existentes para o tratamento das úlceras, temos medicamentos que promovem: ação antibacteriana, a neutralização do ácido gástrico, redução da secreção ácida estomacal e citoproteção. Geralmente, são utilizados inibidores de bomba protônica (ex. omeprazol) e de antagonistas de receptor de histamina H₂ (cimetidina) (Figura 8) (SCHROETER et al., 2008).

No entanto, esses fármacos disponíveis atuam predominantemente minimizando os fatores lesivos da mucosa, e essa terapia está associada ao surgimento dos efeitos adversos e em muitos casos, ocorre recidiva da lesão gástrica (TUNDIS et al., 2008). Isso se deve ao fato de que ainda não foi encontrado um fármaco capaz de proporcionar uma cicatrização qualitativa das lesões gástricas, ou seja, a reconstrução da inteira estrutura da mucosa gástrica, havendo deste modo o retorno da doença assim que o paciente faz a interrupção da terapia medicamentosa (TOMA et al., 2005).

Apesar de terapias mais eficientes, como o uso de inibidores da bomba de prótons e o combate à infecção por *H. pylori*, a úlcera péptica gástrica ou doença péptica gástrica ainda apresenta-se como um agravo de saúde com forte impacto econômico para os sistemas de saúde e da diminuição da qualidade de vida dos indivíduos afetados (SUNG, KUIPERS e EL-SERAG, 2009; LAU et al., 2011).

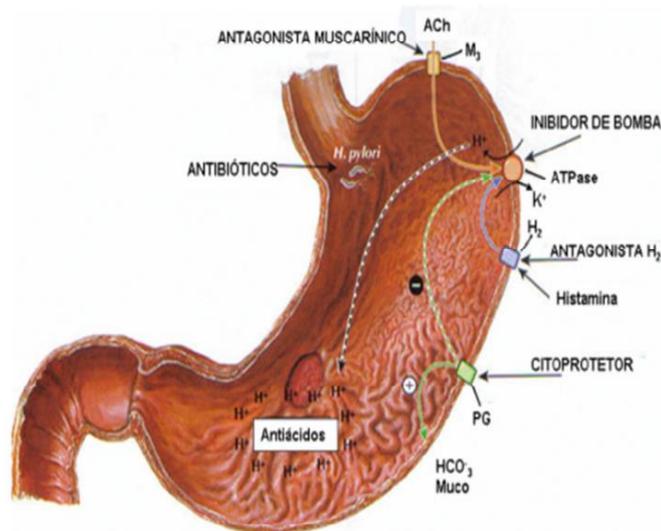


Figura 6 – Terapêutica das lesões gástricas em estômago humano

FONTE: adaptado de RAFFA; RAWLS; BEYZAROV (2006).

Portanto, torna-se necessário mais estudo para a compreensão desta doença, assim como a busca por métodos e drogas capazes de promover a sua remissão. Assim as plantas

medicinais surgem como alternativa para uma nova abordagem terapêutica que tenha menos efeitos colaterais e menor índice de recidiva que os outros compostos já existentes no mercado.

2.4.3 Cicatrização das úlceras gástricas

A cicatrização das úlceras gástricas é um mecanismo de reparo geneticamente programado que inclui inflamação, proliferação celular, re-epitelização, formação de tecido de granulação, angiogênese, interações entre várias células e a matriz extracelular, e remodelação do tecido, finalizando com a formação de uma cicatriz. Citocinas, fatores de crescimento e fatores de transcrição ativados durante o dano tecidual promovem a cicatrização das úlceras (MARTIN; WALLACE, 2006).

As plaquetas também participam do mecanismo de cicatrização, pois liberam numerosos fatores de crescimento que podem promover angiogênese e proliferação epitelial. Células progenitoras circulantes também são importantes para o processo de reparo (WALLACE *et al.*, 2006). A supressão da resposta inflamatória pode levar à lesão gástrica e ao impedimento dos mecanismos de reparo, porém em alguns casos esta resposta pode ser desregulada e contribuir para aumentar os danos.

Algumas citocinas produzidas durante a inflamação podem diminuir a severidade dos danos gastroduodenais. A administração de IL-1 β , por exemplo, demonstra capacidade de inibir a secreção ácida, provavelmente porque estimula a liberação de prostaglandinas e NO aumentando resistência da mucosa contra agentes nocivos (RAD *et al.*, 2004; KOSSOULAS *et al.*, 2009), e o TNF- α estimula a proliferação das células epiteliais, auxiliando a cicatrização (KOSONE *et al.*, 2006).

2.5 Vias de regulação endógena na mucosa gástrica.

2.5.1 Receptores opióides

O conceito de opióides atualmente engloba todas as substâncias naturais, semissintéticas ou sintéticas que agem como agonistas ou mesmo como antagonistas dos receptores opióides. Para promover desambiguação, o termo opiáceos pode ser usado para os alcalóides de ocorrência natural, como morfina e codeína (DUARTE, 2005, TRESCOT *et al.*, 2008).

Os opióides atuam sobre receptores específicos acoplados a proteínas G, que podem ser ativados por mediadores endógenos (peptídeos opióides) ou por drogas opióides exógenas como a morfina, classicamente utilizada como analgésico. Quatro tipos de receptores diferentes já foram descritos, μ (mu para morfina), κ (kapa para receptor de *ketociclazocine*), δ (delta para deferente, pois foi primeiramente identificado no canal deferente de camundongos) e N (de receptor para o peptídeo nociceptina). Os ligantes endógenos dos receptores opióides são principalmente peptídeos derivados de quatro precursores diferentes, pro-opiomelanocortina, pro-encefalina, pro-dinorfina e pro-nociceptina (WALDHOER, *et al.*, 2004).

A ativação de receptores μ -opióides pré-juncionais inibem a liberação de ACh mediando a atividade contrátil da musculatura lisa do TGI (GELMAN *et al.*, 2010). Os receptores opióides atuam em nível central e periférico. Agonistas seletivos de receptores δ e μ -opióides centrais exercem efeito protetor no modelo de úlceras induzidas por etanol. A administração de baixas doses de opióides diretamente no SNC promove gastroproteção, o mesmo não acontece quando administrado em doses subcutâneas. O mecanismo de ação envolve receptores δ -1 e δ -2 e não está relacionada à diminuição da secreção ácida gástrica. A ativação periférica de receptores opióides (μ e δ) está relacionada à maior produção de NO e PGs, no modelo de lesões induzidas pelo etanol, o mesmo não ocorre no modelo produzido pela administração de AINES. O efeito gastroprotetor dos opióides é alcançado em doses inferiores às utilizadas para promover analgesia (GYIRES *et al.*, 1997; GYIRES & RÓNAI, 2001; GYIRES *et al.*, 2001).

Na metade do século XX os antagonistas opióides começaram a ser utilizados no tratamento da superdosagem de drogas agonistas, a fim de reverter a depressão respiratória causada por essas drogas. A naloxona e a naltrexona, alil derivados da oximorfona, são considerados antagonistas puros e interagem com os três tipos de receptores opióides

(DUARTE, 2005). O primeiro antagonista a ser sintetizado foi a naloxona, que apresenta grande afinidade por receptores μ , sendo bastante eficaz na reversão dos efeitos de agonistas opioides, inclusive os efeitos gastroprotetores (MARTIN, 1967; FERRAZ, 1999; GYIRES *et al.*, 2000).

2.5.2 Prostaglandinas

As prostaglandinas são sintetizadas a partir do ácido araquidônico (AA) por ação da enzima cicloxigenase (COX). O AA é produzido a partir de fosfolipídios da membrana celular, sob a ação da enzima fosfolipase A2 (PLA2) sendo liberado por estímulos químicos ou mecânicos. Com a descoberta que o pré-tratamento com PGs prevenia os danos causados por agentes necrotizantes na mucosa gástrica, esta molécula tornou-se importante para a compreensão dos mecanismos de proteção da mucosa e de cicatrização de úlceras (BRZOZOWSKI *et al.*, 2005).

No início da década de 1990 foi demonstrada a existência de duas isoformas da COX: COX-1 e COX-2. A isoforma anteriormente considerada constitutiva, COX-1, induz a produção de PGs envolvidas na regulação de funções fisiológicas como homeostasia renal, função plaquetária e citoproteção da mucosa gástrica. A segunda isoforma, COX-2, seria expressa em resposta a estímulos inflamatórios e mitogênicos. Durante muito tempo acreditava-se que a inibição da COX-2 seria responsável pelos efeitos terapêuticos dos AINES, enquanto que a inibição da COX-1 seria responsável pela toxicidade desses agentes (GRANJEIRO *et al.*, 2008).

As PGs atuam em quatro tipos de receptores diferentes, EP₁ a EP₄. De maneira geral, os efeitos ocorrem pela ação em receptores acoplados a proteínas G (SAMUELSSON *et al.*, 1978). Estes receptores são expressos em muitos tecidos e tipos celulares. Os subtipos EP₃ e EP₄ estão presentes em praticamente todos os tecidos, enquanto que a distribuição dos receptores EP₁ e EP₂ está restrita a rins, útero, SNC e estômago (USHIKUBI *et al.*, 2000).

No estômago, as PGs exercem atividades gastroprotetoras atuando de maneira diversa, podendo aumentar o fluxo sanguíneo gástrico, a secreção do muco que recobre a superfície da mucosa e a secreção do bicarbonato que atua como agente neutralizador; além de diminuir a secreção de ácido clorídrico (SULEYMAN *et al.*, 2010). Os AINES podem aumentar a susceptibilidade da mucosa a lesões, por reduzirem a produção de PGs

(FIORUCCI *et al.*, 2001). A inibição da síntese gastrointestinal de prostaglandinas pode causar de diminuição da secreção de muco, bicarbonato e do fluxo sanguíneo da mucosa, bem como aumento do número de leucócitos aderentes ao endotélio vascular da microcirculação gastrointestinal. Consequentemente haverá dificuldade no reparo de danos epiteliais. Sabe-se que a prevenção da adesão leucocitária induzida por AINES resulta em quase completa proteção contra o dano gástrico associado a essas drogas em modelos animais. No TGI as PGs exercem algumas funções em comum com o óxido nítrico (NO), de forma que a supressão de um desses mediadores pode ser compensada pelo estímulo da produção do outro. Entre estas funções estão: estimulação da secreção de muco, promoção de cicatrização e manutenção do fluxo sanguíneo (WALLACE, 2008). PGs também exercem efeito protetor de forma indireta pela inibição da secreção de histamina a partir das células enterocromafins símile (ECL), diminuindo potencialmente a estimulação da secreção ácida (SCHUBERT; PEURA, 2008).

O sistema COX-PG atua em conjunto com a expressão de diversos fatores de crescimento locais no entorno da lesão (fator de crescimento epidermal – EGF, fator de crescimento transformante alfa – TGF α , fator de crescimento do hepatócito – HGF e fator básico de crescimento do fibroblasto - bFGF). Estes fatores aceleram o processo de cicatrização da úlcera e coincide com a inibição da secreção ácida gástrica e com o aumento do fluxo sanguíneo da mucosa na margem da úlcera. Inibidores não seletivos da COX (indometacina) dificultam a cicatrização da úlcera e aumentam a taxa de transcrição da COX-2 nas circunvizinhanças das lesões, este fato sugere que as PGs derivadas de COX-2 expressas localmente são responsáveis pela aceleração da cura da úlcera através da ativação dos fatores de crescimento (KONTUREK *et al.*, 2005).

A ativação da COX-2 em virtude do processo inflamatório aumenta a produção de PGE₂, que estimula tanto a angiogênese como a expressão do fator de crescimento derivado do endotélio – VEGF (*vascular endothelium growth factor*) acelerando a proliferação celular. Esta ação da PGE₂ ocorre via ativação de receptores tipo EP₄ (HATAZAWA *et al.*, 2007).

Para que ocorra lesão gástrica induzida por AINES em ratos e camundongos, faz-se necessária a supressão de ambas as COX-1 e 2, uma vez que a inibição da COX-1 diminui o fluxo sanguíneo gástrico e a inibição da COX-2 aumenta a adesão leucocitária ao endotélio vascular. Como a indometacina não apresenta seletividade (em determinadas doses) torna-se eficaz na produção de úlceras provocadas por AINES em modelos experimentais (WALLACE *et al.*, 2000).

O papel da COX na proteção da mucosa gástrica depende do grau de exposição a agentes potencialmente nocivos. Quando a mucosa se apresenta normal, a inibição de ambas as COX-1 e 2 é necessária para induzir a formação de dano, porém na presença de um agente potencialmente nocivo a inibição específica da COX-1 torna-se suficiente para causar lesão. No entanto, a formação da lesão é motivo suficiente para induzir a expressão da COX-2, que irá concorrer com a COX-1 para restaurar a integridade da mucosa (PESKAR, 2001).

2.5.3 Óxido Nítrico (NO)

O NO é um mediador gasoso endógeno, moderadamente solúvel em água e sua meia-vida varia de 3 a 60 segundos. É produzido a partir da atividade de enzimas intracelulares específicas que exerce papel regulatório importante, principalmente no sistema cardiovascular e na inflamação (SZABO, 2010). Pode ser citotóxico, vasodilatador e modular reações inflamatórias ou anti-inflamatórias, dependendo do tipo celular e do estímulo. O NO é produzido a partir do aminoácido arginina, na presença de oxigênio molecular. A oxidação da L-arginina à L-citrulina e NO é catalisada por uma família de três isoformas de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS) (LANAS, 2008).

NO exerce atividade citostática (mediada por macrófagos) contra diferentes micro-organismos patogênicos, além de provocar vasodilatação dependente do endotélio, inibição da ativação, da adesão e agregação plaquetária, regulação da pressão sanguínea basal, entre outras atividades. A atividade da molécula foi registrada em endotélio, cerebelo, nervos não adrenérgicos não colinérgicos (NANC), macrófagos, neutrófilos, rins, células epiteliais pulmonares, miocárdio e mucosa gastrintestinal. Nos vasos sanguíneos, o NO exerce função na modulação do diâmetro vascular pela sua habilidade em relaxar o músculo liso, além de inibir as interações dos elementos sanguíneos circulatórios com a parede do vaso (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002).

Fisiologicamente os receptores das células endoteliais podem ser ativados na presença de ACh, bradicinina, adenosina difosfato, substância P, serotonina, entre outros; ou pelo aumento do atrito provocado por células sanguíneas sobre a camada endotelial do vaso (*shear-stress*). Tais estímulos, agindo em conjunto ou isoladamente, ativam a enzima Óxido Nítrico Sintase endotelial (NOSe) e conseqüentemente a produção de NO. Na célula endotelial o NO se difunde rapidamente para a célula muscular e para o lúmen vascular. Na

célula muscular o NO interage com o ferro do grupo heme da enzima Guanilato Ciclase (GC), causando alteração na conformação da enzima, tornando-a ativa. Sua forma ativa catalisa a saída de dois grupamentos fosfato da molécula de Guanosina Trifosfato (GTP), formando Guanosina Monofosfato Cíclico (GMPc). O aumento do GMPc na célula muscular resulta no seu relaxamento. O mecanismo de relaxamento envolve a diminuição da entrada de Ca^{++} para a célula, a inibição da liberação de Ca^{++} do retículo endoplasmático e o aumento do sequestro de Ca^{++} para esta organela. Ainda não se conhece o mecanismo pelo qual o NO é removido da GC após ocorrer à vasodilatação necessária. Sabe-se que a produção de GMPc é interrompida segundos após a remoção do NO da enzima GC (DUSSE *et al.*, 2003).

No trato digestório são expressas as duas isoformas constitutivas, NOSe no endotélio vascular e a NOSn, no sistema nervoso entérico. A isoforma NOSi também é expressa mas principalmente em macrófagos e neutrófilos, embora também o sejam no endotélio vascular e em neurônios (LANAS, 2008). Durante o processo inflamatório no tecido gástrico ocorre um aumento na expressão da isoforma induzível, sugerindo a atividade de neutrófilos e macrófagos na gastrite (GUO *et al.*, 2003).

O NO apresenta importantes funções no TGI, incluindo o controle do fluxo sanguíneo da mucosa, manutenção da sua integridade e do tônus vascular. O NO também medeia o relaxamento não adrenérgico não colinérgico da musculatura longitudinal e circular do esfíncter esofágico, estômago, duodeno, intestino delgado e esfíncter anal interno. Apesar do mecanismo de ação descrito anteriormente ocorrer via produção de GMPc, também existem ações independentes de GMPc, como a oxidação de proteínas e lipídios no tecido gástrico. Dessa forma, o NO atua tanto contribuindo para a manutenção da homeostase do TGI, como também, em caso de lesões na parede do TGI (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002; LANAS, 2008).

O NO também protege o trato gastrintestinal através da inibição da secreção ácida gástrica pelas células parietais e aumento da liberação de somatostatina pelas células D; além de atuar também de forma indireta sobre as células ECL, causando inibição da liberação de histamina (BERG *et al.*, 2005).

Compostos sintéticos inibidores da produção de NO (L-NMMA - *N^G-Methyl-L-arginine*, aminoguanidina, L-NAME - *N_ω-Nitro-L-arginine methyl ester*) apresentam diferentes atividade e potência farmacológica, influenciando de maneira distinta a produção nas três isoformas de NOS. O L-NAME é 0,09 vezes mais potente sobre a NOSi do que sobre

a NOSn, e 0,11 vezes do que a NOSe. Em virtude de sua atividade inibitória da produção de NO, os análogos da L-arginina, L-NMMA ou o L-NAME aumentam a adesão de leucócitos polimorfonucleares. Tais agentes também revertem os demais efeitos do NO (KUBES *et al.*, 1991; ALDERTON *et al.*, 2001; GRANIK & GRIGOR'EV, 2002). Existem também as drogas liberadoras de NO, como os nitratos cardíacos (nitroglicerina, dinitrato de isossorbida, nitroprussiato de sódio), os quais ajudam a manter o fluxo sanguíneo gástrico adequado e inibem as interações entre leucócitos de endotélio (LANAS, 2008).

Tendo em vista que o aumento do $[Ca^{++}]$ citosólico é um componente central na secreção ácida gástrica, a diminuição da $[Ca^{++}]$ pelo NO causa diminuição da secreção ácida. O Ca^{++} facilita a reciclagem de membranas pela regulação do transporte e acoplamento das vesículas tubulares com a membrana apical, sendo um elemento vital na secreção, pois sua diminuição impede a translocação das H^+/K^+ ATPases para a membrana apical. Outro possível efeito seria pelo aumento da velocidade de degradação do AMPc pela fosfodiesterase celular em virtude da ativação alostérica que o GMPc exerce sobre esta enzima, que catalisa a degradação do AMPc (BERG *et al.*, 2005). O NO também inibe a secreção ácida gástrica estimulada por histamina, sendo produzido a partir de e agindo sobre células ECL. Estas atividades sugerem um papel de inibidor parácrino fisiológico da secreção ácida para o NO (BERG *et al.*, 2004).

2.6 Recursos Naturais

2.6.1 Uso de plantas medicinais

O uso de produtos naturais, com finalidades curativas, é exercido desde os tempos mais remotos por populações de todo mundo e contra as mais diversas enfermidades, sendo as principais indicações fitoterápicas, de conhecimento popular e fácil acesso (DOS SANTOS *et al.*, 2009)

A comprovação científica dos efeitos benéficos das plantas tem despertado interesse dos pesquisadores, pois um grande número de plantas medicinais permanece desconhecido, tanto do ponto de vista químico quanto farmacológico.

A floresta tropical brasileira detem quase 1/3 da flora mundial, sendo esta uma grande fonte de biodiversidade, entretanto são os países desenvolvidos, como EUA, Japão e os europeus os que mais manufacturam e comercializam produtos naturais.

A química de produtos naturais e a química medicinal são ferramentas indispensáveis para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. Muitos medicamentos disponíveis no mercado farmacêutico, derivam de produtos naturais, seja por isolamento, semi-síntese ou por síntese total de algum produto natural (BARREIRO e DA SILVA BOLZANI, 2009).

Vegetais são fontes inesgotáveis de substâncias que podem agir sozinhas ou sinergicamente em seus extratos, onde a presença de compostos pertencentes à classes diferentes ou com estruturas distintas contribuem para a mesma atividade (TOUQUEER; SAEED; AJAIB, 2013; MACIEL; PINTO; VEIGA *et al.*, 2002).

É importante que órgãos institucionais (universidades, centros de pesquisa e empresas) busquem o desenvolvimento de novos produtos a partir de espécies nativas, a fim de produzir fitoterápicos com comprovada eficácia e segurança, por meio de estudos pré-clínicos e clínicos.

2.6.2 Atividade gastroprotetora de produtos naturais

Considerando-se os processos inflamatórios, a despeito do progresso no diagnóstico e tratamento, as úlceras pépticas continuam sendo uma causa comum de hospitalizações e cirurgias (SOSTRES *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2010). O tratamento medicamentoso utilizado possui custo financeiro elevado para a maioria da população (WANG *et al.*, 2010).

A imensa quantidade de fármacos que compõem a terapêutica moderna, incluindo aqueles com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não teria alcançado o estágio atual de desenvolvimento não fossem o auxílio dos produtos naturais, notadamente aqueles derivados das plantas superiores (YOKOYAMA *et al.*, 2011).

Os efeitos gastroprotetores de diversas plantas estão relacionados a distintos mecanismos de ação, que atuam geralmente em conjunto, como a inibição da secreção ácida gástrica, aumento da produção de muco e bicarbonato de sódio, efeito antioxidante, anti-inflamatório e na motilidade do estômago: o extrato da inflorescência de *Senecio brasiliensis*,

utilizado em modelos experimentais de úlcera gástrica e duodenal em roedores, mostrou efeito protetor pelo aumento do pH do suco gástrico e diminuição da secreção ácida via indução de síntese de PGs e somatostatina, resultando no incremento do muco e diminuição da atividade das células parietais (TOMA *et al.*, 2004); o extrato hidroalcoólico de *Achyrocline satureoides* tem atividade antiulcerogênica, tanto no modelo induzido por etanol quanto por AINES, também promovendo o incremento da secreção de muco (SANTIN *et al.*, 2010); o extrato aquoso de *Maytenus rigida* Mart, mostrou atividade gastroprotetora nos modelos de lesão gástrica induzida por etanol atividade de receptores opioides, adrenoceptores- α -2 e com o aumento da produção de óxido nítrico (VIEIRA, A. M., 2013); o extrato metanólico de *Maytenus truncata* mostrou efeito gastroprotetor, através do aumento do pH (SILVA *et al.*, 2005). Bighetti e colaboradores (2005) demonstraram o efeito antissecretório do extrato hidroalcoólico de *Mikania laevigata* e de uma cumarina isolada do mesmo em modelos experimentais de ulceração gástrica, evidenciando que o mecanismo de ação de ambos relacionava-se ao controle do parassimpático sobre a secreção ácida gástrica.

2.7 Considerações Botânicas

2.7.1 Considerações sobre a família *Fabaceae*

A família Fabaceae Lindl. ou Leguminosae Adans. é considerada a terceira maior família de Angiospermae, ficando atrás de Asteraceae e Orchidaceae. Compreende aproximadamente 727 gêneros e reúne 19.325 espécies difundidas nos diversos ecossistemas, estando concentrada nas regiões tropicais e subtropicais (BROUGHTON *et al.*, 2003; LEWIS *et al.*, 2005). Possuindo 3.200 espécies e 176 gêneros, dos quais 31 são endêmicos, e está representada em todos os biomas brasileiros, com um conjunto de espécies e gêneros endêmicos (GIULIETTI *et al.*, 2005).

Cerca de 490 espécies apresentam fins terapêuticos, colocando-a como a segunda família que mais possui plantas medicinais. Suas espécies possuem importantes propriedades biológicas e são amplamente utilizadas como componentes farmacêuticos e na medicina popular para o tratamento de várias doenças (GAO, *et al.*, 2010). Outras espécies são utilizadas para recuperação de solos, como plantas do gênero, *Glicine* e *Dolichos* por sua capacidade de fixar nitrogênio na presença de bactérias nitricantes em simbiose.

A família Fabaceae é dividida segundo alguns autores (BENTHAM, 1859, JOLY, 1998; ZIPCODEZOO, 2016) em três subfamílias: Mimosoideae, Caesalpinioideae e Papilionoideae.

2.7.2 Considerações sobre o gênero *Tephrosia*

O gênero *Tephrosia* engloba cerca de 400 espécies e ocorre principalmente no continente africano, mas há relatos na Américas e Oceania. Apresentam-se como arbustos ou subarbustos, com folhas imparipinadas ou pseudorecemas terminais ou auxiliar e são lateralmente comprimidas, suas vargens são longas contendo muitas sementes. Sua ocorrência se dá em regiões tropicais ou subtropicais (QUEIROZ; TOZZI; LEWIS, 2013; TARUS, *et al.*, 2002).

2.7.3 Considerações sobre a espécie *Tephrosia egregia* Sandwith

O gênero *Tephrosia* é rico em compostos bioativos principalmente flavonoides dentre os quais se destacam os rotenoides. *Tephrosia egregia* Sandwith (Figura 9) é conhecida popularmente no Nordeste do Brasil como “anil bravo”, esta planta é um arbusto com folhas imparipinadas e folíolos de dez a vinte jugos. Apresenta flores lilás e dispostas em racemos auxiliares ou terminais (BOLLAND, 1947).

Estudos anteriores relataram em *T. egregia* a presença de rotenoides, esteroides, pterocarpanos, chalconas, flavonas dentre outros. Seus extratos apresentaram atividades antioxidante, antimicrobiana, nematocida, alelopática e larvicida frente ao *Aedes aegypti*, atividades estas que podem estar associadas à ampla diversidade estrutural existente nos extratos dessa planta (AL-HAZIMI, *et al.*, 2006; LIMA, 2010).



Figura 7 – *Tephrosia egregia* Sandwith.

(Registro feito por Marcos Eber)

3. PERGUNTAS DE PARTIDA

- Qual a eficácia e os mecanismos de ação de *Tephrosia egregia* em lesão gástrica induzida por etanol?
- O extrato de *Tephrosia egregia* possui atividade antioxidante? Quais as enzimas envolvidas na proteção citotóxica?
- O óxido nítrico e as prostaglandinas possuem participação no efeito gastroprotetor de *Tephrosia egregia* em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol?
- Os receptores opioides estão envolvidos no efeito gastroprotetor de *Tephrosia egregia* em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol?

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Investigar o possível efeito da solução salina do extrato etanólico de raízes de *Tephrosia egregia* Sandwith (*TE*) em modelo de lesão gástrica induzida por etanol, e os possíveis mecanismos de ação envolvidos.

4.2 Específicos:

Investigar a atividade antioxidante de *Tephrosia egregia* Sandwith em modelo de lesão gástrica induzida por etanol;

Investigar o envolvimento dos receptores opioides e receptores α 2-adrenérgicos no efeito gastroprotetor de *Tephrosia egregia* em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol;

Investigar a participação do óxido nítrico e de prostaglandinas da série E (PGE₂) no possível efeito gastroprotetor de *Tephrosia egregia* em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Camundongos *Swiss* fêmeas (*Mus musculus*) com peso entre 25–30g provenientes do Bióterio Central da Universidade Federal do Ceará (UFC) foram cuidadosamente ambientados a 22 ± 2 °C sob um ciclo de claro/escuro de 12/12 h, com água e comida *ad libitum*. Os animais foram mantidos em jejum de 18–24 h antes do início dos experimentos. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento e a quantidade de animais utilizados. Um mesmo grupo não tratado (*Naive*) fora utilizado como grupo comparador geral para todas as configurações experimentais.

Todos os tratamentos e procedimentos cirúrgicos foram realizados de acordo com o “Manual Prático Sobre Usos e Cuidados Éticos de Animais de Laboratório” da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). Todos os experimentos estiveram de acordo com as Diretrizes para Cuidados e Usos de Animais de Laboratório e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA), da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral. (Processo nº 01/2016).

5.2 Material vegetal e preparação do extrato

O extrato salino das raízes de *Tephrosia egregia* Sandwith - TERE utilizado nos experimentos, foi obtido junto ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC, com a Professora Dra. Ângela Martha Campos Arriaga. O espécime foi coletado em estágio de florescimento, na praia do Icaraí no município de Caucaia, Ceará, Brasil, em 22 de julho de 2014.

A identificação botânica foi realizada pelo Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. Sua exsicata encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, sob o número de registro 55945.

As raízes de TERE foram extraídas através de maceração contínua com etanol (3x3,0 L) à temperatura ambiente. A solução resultante foi filtrada e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotatório, resultando em 1,13 g de extrato das raízes.

Uma diluição fresca do extrato macerado em solução salina 0,9 % (60 mg:3 ml) foi preparada em dia do experimento e administrada via oral, em diferentes doses.

5.3 Drogas e reagentes

Os reagentes utilizados durante o desenvolvimento deste trabalho foram:

Ranitidina foi adquirida da Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A. (Guarulhos, SP, Brasil);

Morfina e Naloxona foram obtidas da Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA (Itapira, SP, Brasil);

Indometacina, hidrocloreto de N ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) e o hidrocloreto de L-arginina metil éster (L-Arg) foram obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA);

Etanol e formaldeído foram obtidos da Vetec Química Fina Ltda. (Duque de Caxias, RJ, Brasil);

O misoprostol foi comprado da Biolab Searle (Independência, SP, Brasil).

Todas as drogas, foram solubilizadas em solução 0,9% de NaCl estéril (salina). Todos os reagentes químicos utilizados apresentaram propriedades analíticas adequadas.

5.4 Protocolo Experimental

- Lesão gástrica induzida por etanol em camundongos;
- Determinação dos níveis de Hemoglobina (Hb) em tecido gástrico de camundongos;
- Determinação da Atividade Antioxidante de *Tephrosia egregia* Sandwith;
- Investigações dos possíveis mecanismos de ação de *Tephrosia egregia*;
- Análise estatística.

5.4.1 Lesão gástrica induzida por etanol em camundongos

Foram utilizados grupos (n=7) de camundongos *Swiss* fêmeas (25-30 g). Os animais foram pré-tratados com veículo (salina, 0,3 ml/30g v.o.), TERE (2; 20 ou 200 mg/Kg; v.o.) ou ranitidina (80 mg/kg, v.o.) utilizada como grupo de tratamento padrão da patologia. Etanol

99,9% (0,2 ml/animal, v.o.) foi administrado 60 min (v.o.) após os tratamentos. Decorridos 30 minutos, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados, abertos pela curvatura, lavados em solução salina, fixados entre placas de Petri e fotografados (Motorola Razr HD, KDA20.117) em resolução de 1280 x 720 pixels. Lesões hemorrágicas ou ulcerativas foram medidas e comparadas ao percentual de área gástrica determinada com auxílio de um programa de planimetria computadorizada (Image J 1.42q® do Wayne Rasb and National Institutes of Health, 9000 Rock ville Pike, Bethesda, Maryland,USA).

5.4.2 Determinação dos níveis de Hemoglobina (Hb) em tecido gástrico de camundongos

Foi usado um teste colorimétrico para cianometahemoglobina para determinação da concentração de hemoglobina na mucosa gástrica. O método baseia-se na oxidação de ferro (ferro II) da molécula de hemoglobina pelo ferricianeto de potássio em pH fracamente alcalino, formando a metahemoglobina que é convertida em cianometahemoglobina após a reação com o cianeto de potássio, proporcionando uma coloração avermelhada, que é proporcional à concentração de hemoglobina presente na amostra.

Os estômagos previamente utilizados no teste gastoprotetor foram pesados e guardados em freezer à -20°C. Para medir os níveis de hemoglobina utilizou-se um kit padrão para hemoglobina (Bioclin), contendo reagente de Drabkin's (ferrocianeto de potássio em pH fracamente alcalino).

As amostras de tecido do estômago foram homogeneizadas em solução de Drabkin (100 mg de tecido/1 mL de solução). Logo após, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi retirado, filtrado e novamente centrifugado nas mesmas condições.

A concentração de hemoglobina/100 mg foi determinada a partir da curva padrão de hemoglobina sendo a leitura feita em ELISA com absorvância de 540 nm. Os resultados foram expressos em µg de Hb/100 mg de tecido.

5.4.3 Determinação da Atividade Antioxidante de *Tephrosia egregia* Sandwith

5.4.3.1 Avaliação da Atividade enzimática da Catalase (CAT) em tecido gástrico de camundongos

A atividade da catalase tem como princípio a medida da velocidade de produção de O_2 e H_2O à proporção em que a H_2O_2 é hidrolisado.

O homogenato do estômago a 10% foi diluído em meio de reação (H_2O_2 diluído, tampão Tris-HCl, EDTA 5 mM, pH 8, H_2O miliQ), em seguida, a atividade da enzima foi medida em 230 nm, através de um espectrofotômetro, em uma leitura da absorbância por minuto, durante 6 minutos e os resultados expressos em $\mu M/\text{min}/\mu g$ de proteína.

5.4.3.2 Avaliação da Concentração da Glutathiona Reduzida (GSH) em tecido gástrico de camundongos

A determinação da concentração da GSH baseou-se na reação do reagente de Ellman, o 5'5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) com o tiol livre originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico.

Foram utilizados 400 μL do homogenato 10% + EDTA 0,02 M juntamente com 320 μL H_2O destilada e 80 μL Ác. Tricloroacético para serem centrifugados a 3000 rpm x 15 min. Em seguida, retirados 400 μL do sobrenadante e adicionados 800 μL de tampão Tris-HCL + 20 μL DTNB 0,01 M.

A medida do produto de reação formado foi feita por leitura da absorbância a 412 nm em espectrofotômetro, conforme descrito anteriormente por Sedlak e Lindsay (1968).

5.4.3.3 Dosagem de Superóxido Dismutase (SOD) em tecido gástrico de camundongos

A quantidade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi medida de acordo com a sua capacidade de inibir a redução fotoquímica do azul de nitro-tetrazolio (NBT).

Em um tubo foram adicionados amostras do homogenato 50 μL juntamente com o meio de reação (tampão fosfato 50 mM, metionina 19 mM, EDTA 0,1 mM) mantidos com refrigeração. Em seguida, adicionado 300 μL de Riboflavina, seguido por 150 μL de NBT. O material foi exposto a iluminação por 15 minutos, e imediatamente feita a leitura da absorbância a 560 nm em espectrofotômetro.

Nesse método descrito por Beauchamp C. (1971), a riboflavina reduzida fotoquimicamente gera O_2^- o qual reduz o NBT produzindo Formazam que absorve no

comprimento de onda de 560 nm. Na presença de SOD a redução do NBT é inibida. Os resultados foram expressos em unidades da enzima, que é a quantidade de SOD necessária para inibir a taxa de redução do NBT em 50%.

5.4.4 Investigações dos possíveis mecanismos de ação de *Tephrosia egregia* Sandwith

5.4.4.1 Envolvimento do Óxido Nítrico (ON) na gastroproteção de TERE em tecido gástrico de camundongos

6 grupos com 7 camundongos Swiss, fêmeas (25-30 g) foram tratados com veículo (salina, 0,3 ml/30g v.o.), TERE (200 mg/kg, v.o.), L-arginina (600 mg/kg, i.p.). O L-NAME (20 mg/kg, i.p.), um inibidor não-específico da óxido nítrico sintase (NOS), foi administrado 15 minutos antes dos tratamentos acima descritos. Os tratamentos foram realizados 60 min (v.o.) ou 30 min (i.v.) antes da administração de etanol absoluto (0,2 ml/animal, v.o.). Decorridos 30 minutos da administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados e avaliados conforme o modelo descrito anteriormente.

5.4.4.2 Envolvimento das prostaglandinas na gastroproteção de TERE em tecido gástrico de camundongos

Camundongos Swiss, fêmeas (7/grupo) foram tratados com TERE (200 mg/kg, p.o.), misoprostol (50 mg/kg, p.o.), ou salina (5 ml/kg, p.o.) Misoprostol administrada 1 h antes da indução do dano etanólico. Indometacina (10 mg/kg, p.o.) foi administrada 2 h antes de TERE, misoprostol, ou salina. Após 30 min, os animais foram eutanasiados e tiveram seus estômagos avaliados como previamente descrito.

5.4.4.3 Envolvimento de receptores opioides na gastroproteção de TERE em tecido gástrico de camundongos

Camundongos Swiss, fêmeas (7/grupo) foram tratados com morfina (5 mg/kg, s.c.), TERE (200 mg/kg, v.o.) ou salina (0,3 ml/30g, v.o.). O dano etanólico foi induzido 1 h após o tratamento com o extrato ou salina, e 30 min após administração de morfina. A

participação de receptores opioides foi avaliada pela administração de naloxona (4 mg/kg, i.p.) 15 min antes dos tratamentos acima descritos. Os estômagos foram analisados como previamente descrito no modelo.

5.4.5 Análises estatísticas

Os valores foram expressos como média \pm Erro Padrão da Média (EPM). Foi utilizada à análise de variância (ANOVA) para comparação dos dados quantitativos da área ulcerativa, e de testes farmacológicos. As diferenças entre o grupo controle e os grupos em tratamento, foram determinadas pelo teste de Bonferroni, na qual foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Efeito protetor da solução salina do extrato etanólico de raízes de *Tephrosia egregia* Sandwith na lesão gástrica induzida por etanol

Os estômagos dos animais do grupo que recebeu apenas salina apresentaram a maior porcentagem de área lesionada por ação etanólica (0,2 ml/camundongo), produzindo estriações hemorrágicas agudas na mucosa gástrica, com média percentual de $30,46 \pm 2,742$. O grupo que recebeu Ranitidina (80mg/Kg), apresentou média de $9,833 \pm 1,014$ de área lesionada %, com significância $p < 0,05$ em relação ao grupo salina. A *T. egregia* (200 mg/kg) reduziu significativamente ($p < 0,05$) a área percentual de lesões gástricas em comparação ao grupo salina ($9,130 \pm 1,634$ versus $30,46 \pm 2,742$ área lesionada %) (**Gráfico 1**).

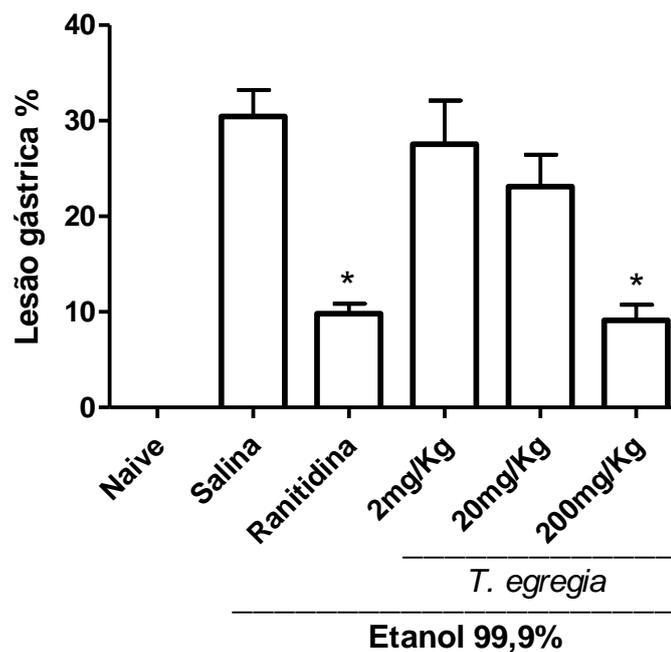


Gráfico 1 – Efeito da solução salina do extrato etanólico de raízes de *Tephrosia egregia* na gastropatia induzida por etanol em camundongos. Os camundongos foram tratados via oral com Salina, Ranitidina 80 mg ou *T. egregia*. Após 60 min, etanol absoluto (0,2 ml por animal) foi administrado por gavagem. O grupo controle foi tratado com Salina. Um grupo não tratado (*Naive*) foi adicionado como comparador geral. O dano gástrico foi quantificado após 30 min. Os resultados são expressos como média ± EPM para cada grupo de sete camundongos. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Etanol + Salina. ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni para múltiplas comparações.

6.2 Efeito da solução salina do extrato etanólico de raízes de *Tephrosia egregia* Sandwith sobre a hemoglobina tecidual

O tratamento com TERE (200 mg/kg) promoveu uma redução significativa ($p < 0,05$) nos níveis de hemoglobina da mucosa gástrica, quando comparados ao grupo Salina.

Tabela 1 – Efeito da solução salina do extrato etanólico de raízes de *Tephrosia egregia* (TERE) na concentração de hemoglobina (Hb) tecidual em camundongos

Grupo experimental (n = 7)	Hb tecidual ($\mu\text{g}/100\text{mg}$ de tecido)
Naíve	9,4 \pm 0,7
Salina	16,9 \pm 0,10
TE (2 mg/kg)	10,7 \pm 0,9
TE (20 mg/kg)	10,8 \pm 1,5
TE (200 mg/kg)	8,4 \pm 0,6*

A tabela apresenta os resultados como média para cada grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo EtOH + Salina. ANOVA seguida do teste de Bonferroni para múltiplas comparações.

6.3 Avaliação da atividade enzimática da catalase na citoproteção gástrica em camundongos

A avaliação da catalase diante do efeito gastroprotetor de *Tephrosia egregia* - TERE sobre o dano gástrico por etanol, mostrou um aumento significativo ($p < 0,05$) dos níveis de atividade da enzima em estudo (TERE 203,9 \pm 39,44 *versus* Salina 40,75 \pm 7,296), evidenciando um grande envolvimento (80,02%) no estresse oxidativo, comparado ao grupo etanol + salina (**Gráfico 2**).

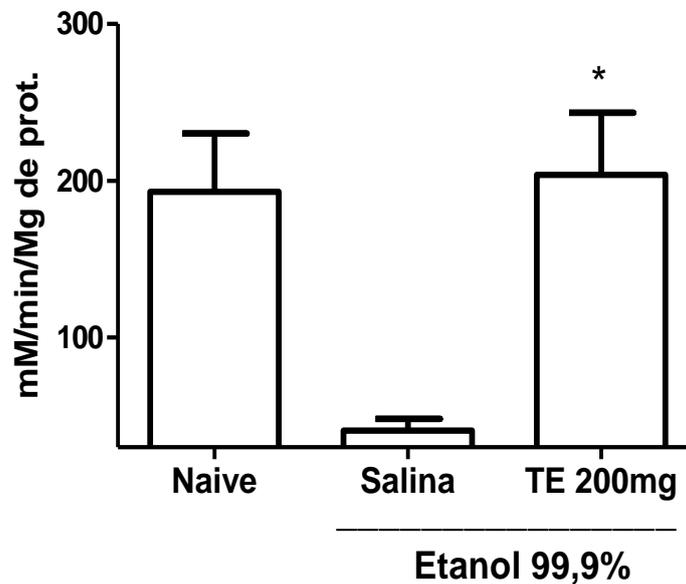


Gráfico 2 – Avaliação da atividade enzimática da catalase, em modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos. A atividade da enzima foi medida através de um espectrofotômetro na absorvância de 230 nm. Os resultados foram expressos como média \pm EPM para cada grupo de 7 camundongos. * $p < 0,05$ em relação ao grupo etanol + Salina. NOVA seguida pelo teste de Bonferroni para múltiplas comparações.

6.4 Envolvimento da glutathiona reduzida na citoproteção gástrica em camundongos

A depleção de GSH, geralmente, é observada na úlcera gástrica induzida por etanol absoluto como indício de estresse oxidativo. Os níveis de GSH encontrados na mucosa gástrica de camundongos expostos a este modelo experimental encontram-se no **gráfico 3**. O pré-tratamento com TERE (200 mg/Kg) apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de GSH em relação ao grupo tratado com salina ($1596 \pm 153,5$ versus $802,8 \pm 75,69$), resultando em um aumento de 49,7%.

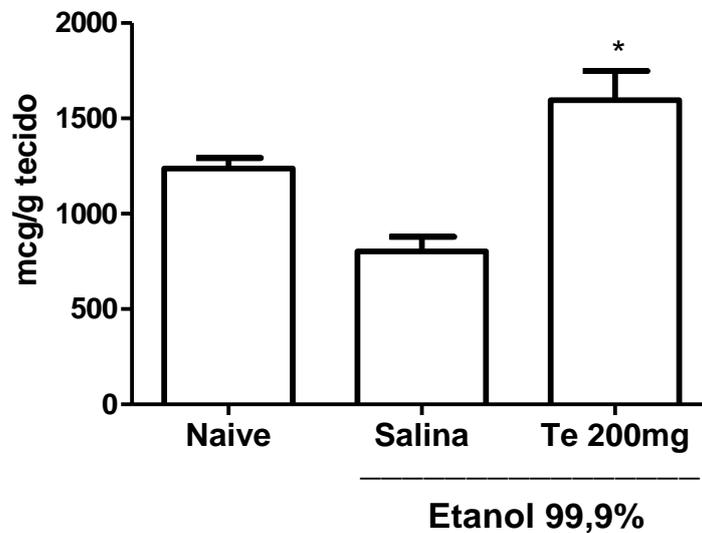


Gráfico 3 – Avaliação da Concentração da Glutathiona Reduzida (GSH), em modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos. A atividade da enzima foi medida através de um espectrofotômetro na absorvância de 412 nm. Os resultados foram expressos como média \pm EPM para cada grupo de 7 camundongos. * $p < 0,05$ em relação ao grupo etanol + Salina. ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni para múltiplas comparações.

6.5 Dosagem de Superóxido Dismutase na citoproteção gástrica em camundongos

O tratamento com TERE (200 mg/Kg) resultou em um aumento significativo ($p < 0,05$) de 51,13% de atividade da enzima superóxido dismutase – SOD, quando comparado ao grupo salina ($2,085 \pm 0,255$ versus $1,019 \pm 0,099$). Estes níveis são próximos aos níveis do grupo de animais sadios (controle) (**Gráfico 4**), indicando menor geração de espécies reativas de oxigênio - EROs no estômago dos animais que receberam este tratamento.

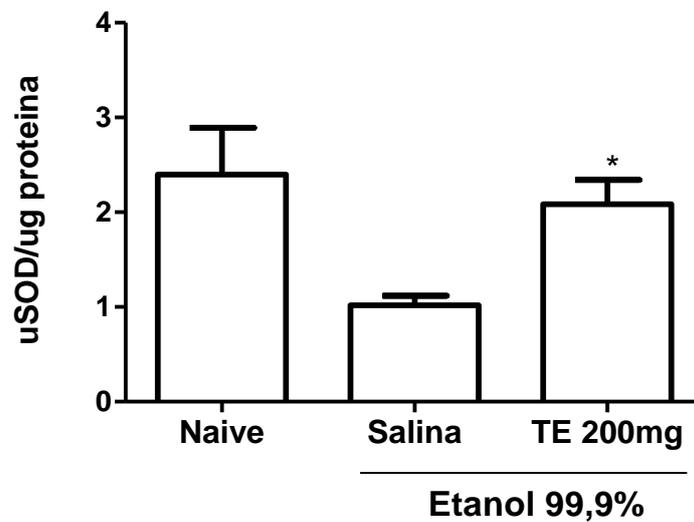


Gráfico 4 – Dosagem de Superóxido Dismutase (SOD), em modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos. A atividade da enzima foi medida através de um espectrofotômetro no comprimento de onda de 560 nm. Os resultados foram expressos como média \pm EPM para cada grupo de 7 camundongos. * $p < 0,05$ em relação ao grupo etanol + Salina. ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni para múltiplas comparações.

6.6 Avaliação do envolvimento das prostaglandinas na gastroproteção induzida pela solução salina do extrato etanólico de raízes de *Tephrosia egregia*

Misoprostol (50 mg/kg, p.o.) possui efeito protetor na gastropatia induzida por etanol. A administração simultânea de etanol (0,2 ml/animal) e Indometacina (10 mg/kg, p.o.), produziu dano hemorrágico, sendo revertido pela injeção de misoprostol. Em ambas as situações, com ou sem pré-tratamento com indometacina, a TERE (200 mg/kg) reduziu significativamente ($p < 0,05$) a área ulcerada ($4,47 \pm 1,56$ versus $27,50 \pm 3,65$ e $2,67 \pm 2,28$ versus $30,46 \pm 2,74$, respectivamente) (**Gráfico 5**).

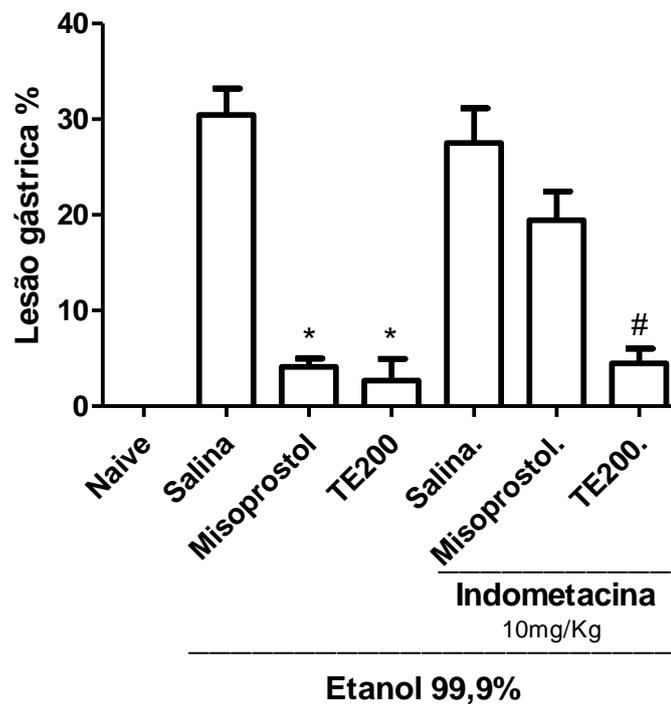


Gráfico 5 – Avaliação do envolvimento de prostaglandinas na gastroproteção induzida por *Tephrosia egregia* em modelo de gastropatia induzida por etanol. Os camundongos receberam por via oral salina (Sal), misoprostol (50 mg/kg) ou TE (200 mg/kg). Uma segunda série experimental utilizando indometacina (10 mg/kg) como pré-tratamento foi utilizada para avaliar a participação de prostaglandinas. Um grupo não tratado (Naive) foi adicionado como comparador geral. Os resultados estão expressos como média±EPM para cada grupo de sete animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Etanol + Salina. # $p < 0,05$ em relação ao grupo Etanol + Indometacina + Salina. ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni para múltiplas comparações.

6.7 Avaliação do envolvimento do Óxido nítrico na gastroproteção induzida pela solução salina do extrato etanólico de raízes de *Tephrosia egregia*

A administração simultânea de etanol e L-NAME (20 mg/kg, i.p.) produziu dano hemorrágico que foi revertido pela injeção de L-Arg (600 mg/kg, i.p.). A *T.egregia* (200 mg/kg) reduziu significativamente ($p < 0,05$) a área lesada na ausência da ferramenta farmacológica L-Arg ($2,67 \pm 2,28$ versus $30,18 \pm 2,94$), porém, através do tratamento prévio com o L-NAME, o efeito gastroprotetor foi revertido ($18,60 \pm 4,43$ versus $27,50 \pm 3,65$), indicando ser uma das vias de atuação do extrato (**Gráfico 6**).

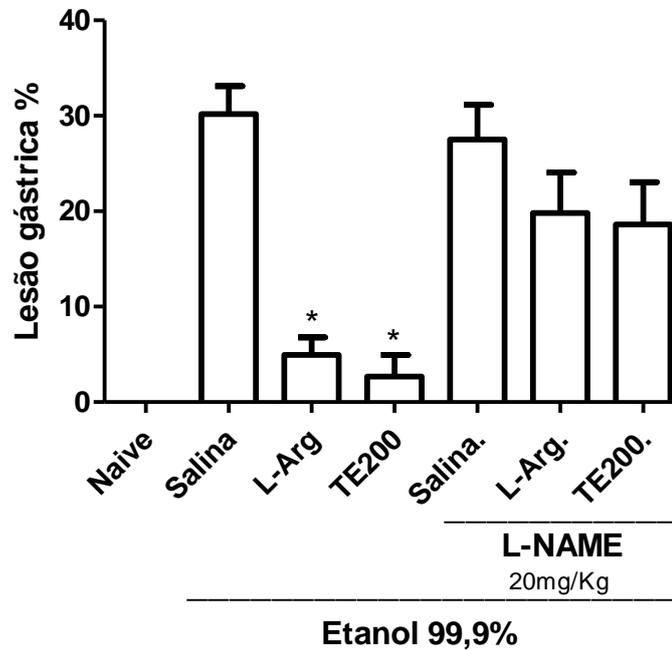


Gráfico 6 – Avaliação do envolvimento do NO na gastroproteção induzida pela solução salina do extrato etanólico de raízes de *Tephrosia egregia* em modelo de gastropatia induzida por etanol. Os animais foram tratados por via oral com salina (Sal), L-Arg (600 mg/kg) ou TERE (200 mg/kg). Uma segunda série com administração prévia de L-NAME (20 mg/kg) foi utilizada para avaliar a possibilidade da participação do NO no efeito de TE. Um grupo não tratado (Naive) foi adicionado como comparador geral. Os resultados estão expressos como média \pm EPM para cada grupo de sete animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Etanol + Salina. ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni para múltiplas comparações.

6.8 Avaliação do envolvimento dos receptores opioides na gastroproteção induzida pela solução salina do extrato etanólico de raízes de *Tephrosia egregia*

A administração da morfina (5 mg/kg, s.c.) reduziu significativamente ($p < 0,05$) as lesões hemorrágicas induzidas por etanol, no entanto sua ação foi revertida pelo tratamento prévio com naloxona (4 mg/kg, i.p.). O tratamento com TERE (200 mg/kg, p.o.) protegeu de forma significativa ($p < 0,05$) os estômagos dos camundongos contra o efeito do etanol ($2,669 \pm 2,281$ versus $30,46 \pm 2,742$). O pré-tratamento com naloxona (4 mg/kg, i.p.) também

reverteu os efeitos protetores de TE ($16,67 \pm 3,07$ versus $27,50 \pm 3,65$), indicando ser uma das vias de atuação (**Gráfico 7**).

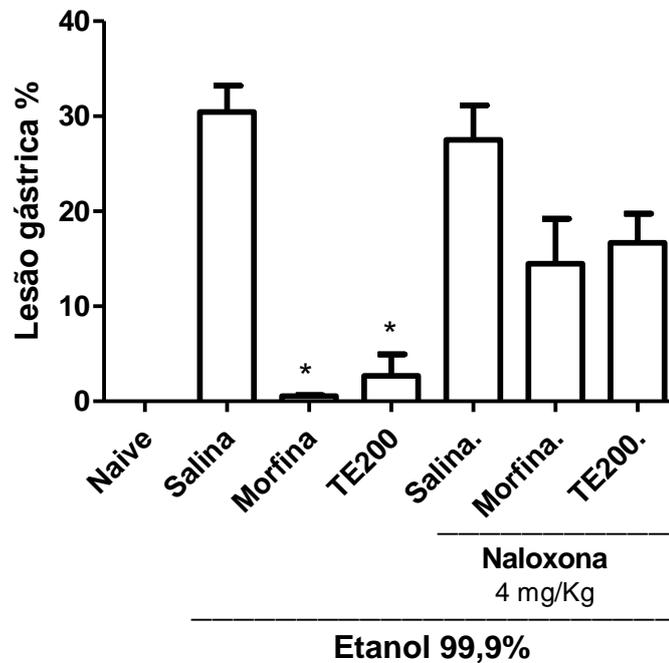


Gráfico 7 – Avaliação do envolvimento de receptores opioides na gastroproteção induzida pela solução salina do extrato etanólico de *Tephrosia egregia* em modelo de gastropatia induzida por etanol. Os camundongos foram tratados via oral com salina (Sal), morfina (5 mg/kg) ou TERE (200 mg/kg). Uma segunda série experimental que utilizou o pré-tratamento com naloxona (4 mg/kg) avaliou a participação dos opióides, prevenindo a gastroproteção da TERE (200 mg/kg). Um grupo não tratado (Naive) foi adicionado como comparador geral. Os resultados estão expressos como média±EPM para cada grupo de sete animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Etanol + Salina. ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni para múltiplas comparações.

7. DISCUSSÃO

Um grande número de pesquisas anuais realizadas com diferentes espécies do gênero *Tephrosia*, revelou uma variedade de composições químicas importantes, apontando várias ações biológicas como: atividade antibacteriana, antiprotozoária, antiplasmodial, antipitética, anti-inflamatória, citotóxica e anticâncer (TOUQEER, *et. al.*, 2013).

Flavonoides são relatados como antioxidantes por sua capacidade de capturar várias espécies oxidantes, como os radicais hidroxila ou peróxidos (VELLOSA, 2006; ABDELWAHED, 2007).

A caracterização de metabolitos secundários de raízes de TERE mostra o predomínio da presença de compostos flavonoídicos, em torno de 85%. Dentre os flavonoides isolados, a maior quantidade está reservada as flavononas, seguido pelas flavonas, rotenoides, chalconas, isoflavonas, flavanois, e pterocarpanos (TEIXEIRA, 2016).

Os flavonoides são de um extenso grupo de metabólitos secundários, cuja biossíntese ocorre através de reações enzimáticas complexas a partir da acetil coenzima A (Acetil-CoA). A adição posterior da coenzima A e de malonil-CoA ao ácido cinâmico e seus derivados (ácidos cafeicos, ferúlico, etc) formam a chalcona, que por ação de enzimas específicas levam a formação de outros compostos flavonoídicos (KARAM, *et al.*, 2013 *apud* TEIXEIRA, 2016).

Muitos aspectos podem estar envolvidos na patogênese das lesões gástricas sendo que, a integridade funcional da mucosa gástrica depende do balanço entre fatores agressores e mecanismos protetores. Assim, o sucesso do tratamento farmacológico contra lesões gástricas depende não somente do controle dos fatores patogênicos, mas também do aumento dos fatores de proteção da mucosa gástrica (CUEVAS, 2011; TAKAYAMA, 2011; ALMEIDA, 2012).

A atividade gastroprotetora de TERE foi caracterizada no modelo de indução de lesões gástricas pelo agente necrosante etanol.

A indução de úlcera por etanol 99,9% produz as lesões e edemas da mucosa por alterar a microcirculação, isquemia, liberação de endotelina, promover a desgranulação de mastócitos, inibir a produção de prostaglandinas, diminuir a produção de muco, decréscimo dos níveis de atividades enzimáticas e dos grupamentos sulfidrílicos não protéicos (NP-SH), além de danos ao DNA (REPETTO, 2002).

As lesões induzidas por etanol estão diretamente relacionadas à produção de espécie reativas de oxigênio (EROs) que produzem um desequilíbrio entre o processo oxidante e atividade antioxidante celular que leva à modificação oxidativa na membrana celular, formando um ambiente favorável para o estresse oxidativo (DAS ; VASUDEVAN, 2007).

A avaliação farmacológica no tratamento utilizado (TERE nas doses 2 mg/Kg e 20 mg/Kg), mostrou uma diminuição não significativa dos danos gástricos. Entretanto, na dose de 200 mg/Kg observou-se uma redução significativa ($p < 0,05$) em 70% do percentual de lesões gástricas, quando comparados com o grupo que recebeu etanol + veículo salina.

De posse destes resultados, passou-se a utilizar a dose de 200mg/kg nos experimentos que visavam verificar o envolvimento de TERE sobre os níveis de hemoglobina no tecido gástrico, atividades enzimáticas da Glutathione reduzida (GSH), Catalase (CAT), e Superóxido dismutase (SOD).

De forma semelhante ao observado nas lesões macroscópicas, a administração de etanol aumentou em 90% os níveis de hemoglobina na mucosa gástrica, indicando que houve hemorragia nesse tecido. Entretanto, nos animais previamente tratados, houve uma redução, de forma dose dependente, dos níveis de hemoglobina, apresentando redução significativa ($p > 0,05$). Assim, esses resultados mostram que a TERE reduz a lesão hemorrágica provocada pelo etanol no estômago corroborando com os achados macroscópicos anterior.

O organismo possui defesas antioxidantes que abrangem um complexo sistema de enzimas e moléculas capazes de “capturar” os radicais livres (SILVA, 2007). A atividade antioxidante do extrato etanólico das raízes de *Tephrosia egregia*, apresentam notável poder de captura de radicais livres de 76,19% na concentração de 1 mg/mL (SANTIAGO, 2005; ARRIAGA, 2009) mostrando que a espécie é uma fonte de compostos bioativos. De acordo

com Repetto e LLesuy, 2002, os antioxidantes naturais derivados de plantas são extremamente úteis para combater o estresse oxidativo.

Sistemas enzimáticos, que eliminam EROs e impedem sua ação destrutiva, protegem as células catalisando glutathiona através do ciclo redox (SILVA, 2007). O ciclo “redox” da glutathiona desempenha importante papel para garantir a integridade da mucosa em exposição ao etanol, pois a glutathiona endógena, em sua forma reduzida, GSH, tem importância na diminuição do estresse oxidativo, por eliminar radicais livres, reduzir os peróxidos e se complexar com compostos eletrofílicos de maneira a proteger estruturas celulares protéicas, DNA e lipídeos. Além de proteger a célula de outros produtos tóxicos, a GSH-Rd é responsável por converter GSSG em GSH utilizando como cofator NADPH (LONG *et al.*, 2011).

Neste estudo, foi investigado o papel da Glutathiona reduzida (GSH) na proteção gástrica mediada por TERE à lesão provocada por etanol. O etanol, por sua propriedade de gerar EROs durante o curso do seu metabolismo, altera a homeostase redox, causando danos à estrutura e função celular, reduzindo os níveis de Glutathiona reduzida na mucosa gástrica. A restauração destes níveis parece ser importante na gastroproteção (PUSHPAKIRAN *et al.*, 2004; CAMPOS *et al.*, 2008).

A *T. egregia* quando administrada antes do etanol aumentou a Glutathiona para os níveis normais, promovendo a proteção. Este efeito pode ter ocorrido devido a um menor consumo de GSH por uma inibição da liberação de radicais livres, ou por aumento na síntese de novo de GSH. Tanto o muco gástrico como a Glutathiona servem como agentes protetores contra lesões da mucosa (CNUBBEN *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2005).

O GSH é considerado o mais importante composto sulfidrila intracelular, sendo seu envolvimento conhecido num grande numero de processos funcionais celulares, principalmente quanto à sua participação em algumas reações de detoxificação.

O estudo mostrou que o extrato salino de raízes de *Tephrosia egregia* normalizou os níveis de SOD, evidenciando mais uma ação da substância na gastroproteção. Ogino et al. (1997) demonstraram que o aumento na atividade da SOD gera substrato para as COXs podendo levar a estimulação da produção de PGE₂ que tem um importante papel na manutenção da integridade da mucosa gástrica através da contínua secreção de bicarbonato e

produção de muco no estômago, via receptores de prostaglandinas E dos subtipos EP1, EP2 e EP3 (BROZOZOWSKI, *et al.*, 2000; TAKEUCHI, *et al.*, 2006). PGE2 em baixas concentrações inibe a secreção ácida através da interação com receptores EP3, enquanto que em concentrações maiores estimulam a secreção ácida através da interação com receptores EP4. Ambos os receptores estão presentes nas células parietais e nas células principais da mucosa gástrica, acoplados a proteína G (DING *et al.*, 1997).

Em continuidade à investigação da atividade antioxidante do extrato salino de raízes de *Tephrosia egregia*, avaliou-se os níveis da enzima catalase, que participa na atividade antioxidante celular, convertendo o H_2O_2 em H_2O e O_2 . Havendo diminuição dos níveis da catalase, ocorre uma peroxidação lipídica, e aumento de dano tecidual pela presença de EROs.

A lesão promovida pelo etanol absoluto veio acompanhada de uma grande redução na atividade da catalase, entretanto, com o pré-tratamento de *T. egregia* 200 mg, observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) da presença da enzima superóxido dismutase, reestabelecendo em níveis semelhantes ao grupo naïve (animais sadios). Assim, a atividade da catalase está também envolvida na atividade antioxidante do extrato.

Os resultados inéditos e promissores obtidos com *T. egregia*, levaram à realização de experimentos que caracterizassem os mecanismos de ação subjacente a essa propriedade protetora, através das vias: Óxido Nítrico (NO); Prostaglandinas (PGs); e Receptores Opioides.

A participação do NO foi evidenciada quando os animais foram pré-tratados com L-NAME (um inibidor da NO sintase, enzima responsável pela produção de NO), e tratados com *T. egregia*. O L-NAME é hidrolisado em L-nitroarginina que inativa a ÓXIDO NÍTRICO SINTETASE - NOS (PFEIFFER *et al.*, 1996).

Neste modelo de mecanismo, o grupo que recebeu tratamento com salina apresentou maior índice de área lesionada, devido à capacidade de dano gástrico promovido pelo etanol. As administrações de L-Arginina e TE200 reduziram o percentual de área gástrica ulcerada. Segundo Nahavandi *et al.* (1999), o L-NAME aumenta e a L-Arginina diminui a quantidade e intensidade da lesão provocada por álcool no estômago.

A proteção gástrica anteriormente observada pela L-Arginina e pelo extrato salino de raízes de *Tephrosia egregia* 200 mg/Kg foi revertida quando os animais foram pré-tratados

com L-NAME, demonstrando, portanto que o efeito do extrato, pelo menos em parte, depende da presença de NO. O principal papel do NO envolve a manutenção do fluxo sanguíneo, isso a partir de sua liberação do endotélio, também atua mantendo a integridade do epitélio gástrico e estimulando a secreção e síntese de muco e bicarbonato (BROZOZOWSKI *et al.*, 2005; FREITAS *et al.*, 2011).

O NO produzido pelas NOS constitutivas a partir de L-arginina, tem papel fundamental no tônus vascular local, agindo como vasodilatador e com isso promovendo proteção da mucosa gástrica, pois aumenta a disponibilidade de bicarbonato oriundo da circulação, por ser responsável pelo controle do fluxo sanguíneo gástrico e microcirculação (UNEYAMA *et al.*, 2009; MORAIS *et al.*, 2010).

As PGs são importantes mediadores envolvidos na proteção da mucosa gástrica e na cicatrização de úlceras gástricas (HIGUCHI, 2010), fazem parte de uma classe de mediadores produzidos pelas enzimas ciclooxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2).

A ação gastroprotetora das PGs é mediada pelo aumento na produção de muco e secreção de bicarbonato, modulação da secreção do ácido gástrico, inibição da liberação de mediadores inflamatórios por mastócitos e pela manutenção do fluxo sanguíneo (BATISTA *et al.*, 2004). Essa capacidade influencia diretamente na cicatrização da úlcera (SCHMASSMANN *et al.*, 2009). Neste ensaio, os grupos que receberam tratamento com TE 200 e com Misoprostol, apresentaram um baixo índice de área lesionada na mucosa gástrica.

O misoprostol é um análogo sintético de prostaglandinas, promovendo ação gastroprotetora por aumentar a secreção de muco e bicarbonato nas células superficiais através de receptores EP3, diminuindo a concentração de AMPc, resultando na diminuição da secreção de ácido. Em seres humanos foram observados em doses que produziram inibição significativa da secreção ácida gástrica (WALLACE, 2008; PALILEO, 2011).

A administração de indometacina (inibidor não específico das COX) resulta no bloqueio da síntese de prostaglandinas aumentando a liberação de mediadores pró-inflamatórios, a aderência leucocitária, a produção de EROs e fatores ativadores de apoptose (MUSUMBA, *et al.* 2009).

Nossos resultados demonstraram que a indometacina foi capaz de reverter completamente os efeitos do misoprostol, entretanto o tratamento com TE 200 continuou

ocorrendo independentemente dos efeitos inibitórios da indometacina, sugerindo que o mecanismo de ação de *T. egregia* provavelmente independe da produção de PGs.

Os receptores opioides (ORs) possuem classes ou subtipos dentre os receptores: μ OR – mu, δ OR – delta, σ OR – sigma, κ OR – kappa. A ativação destes pode afetar uma variedade de funções gastrointestinais. Os opioides endógenos promovem gastroproteção principalmente através da ativação de receptores μ e δ , tanto central como periféricamente (GYIRES, *et al.*, 2012).

A ativação dos receptores μ -opioides no TGI inibe a liberação de acetilcolina, reduzindo a contratilidade da musculatura lisa (GELMAN, 2010). A ativação de ambos os receptores mu e delta está relacionada a uma maior produção de óxido nítrico e prostaglandinas, no modelo de lesões induzidas pelo etanol (GYIRES *et al.*, 2001). A ativação de tais receptores também inibe a inflamação gastrointestinal, provavelmente por regular a produção de TNF- α , resultando em menor infiltração de células inflamatórias (SACCANI *et al.*, 2012).

Diante deste conhecimento, investigamos a gastroproteção de TE 200 pela via dos receptores opioides, através da administração de Naloxona e Morfina.

A naloxona é uma antagonista não seletivo, bloqueando os subtipos μ – mu, δ – delta, σ – sigma, e κ – kappa, revertendo o efeito de proteção gástrica promovido pela morfina (RODRIGUES E SILVA *et al.*, 2012).

A morfina é um agonista opióide e no presente estudo, notamos que a morfina promoveu uma grande redução da área lesionada confirmando assim a influencia de receptores μ e δ na promoção do efeito gastroprotetor. Assim como ocorreu para o grupo tratado com Morfina, o efeito protetor exercido pela TE 200 foi prontamente revertido pela naloxona (antagonista opióide não-seletivo). Este fato sugere que a TE também atua sobre receptores opióides na proteção da mucosa gástrica exercida contra os danos induzidos pelo etanol.

Em resumo, os resultados do presente estudo demonstram que a solução salina do extrato etanólico de raízes de *Tephrosia egregia* possui efeitos gastroprotetores no modelo de lesão gástrica por etanol em camundongos. Estes efeitos são mediados por mecanismos antioxidantes relacionados ao aumento de catalase, SOD e glutatona. Os testes para

determinação do mecanismo da ação demonstraram o envolvimento de diferentes vias como: receptores opioide e óxido nítrico. Deste modo, TERE torna-se uma fonte em potencial para novos estudos que comprovem sua utilização como uma forma alternativa para o possível tratamento de lesões gástricas.

8. CONCLUSÕES

A avaliação da possível atividade gastroprotetora da solução salina do extrato etanólico obtido a partir das raízes de *Tephrosia egregia* (TERE), nos permitiu delinear as seguintes conclusões:

- TERE demonstrou atividade gastroprotetora em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.
- TERE restituiu os níveis de hemoglobina na mucosa gástrica, sugerindo a diminuição da hemorragia tecidual.
- O efeito gastroprotetor de TERE parece estar relacionado com a ação antioxidante, sendo capazes de reestabelecer, de maneira significativa, os níveis de glutatona, como também de aumentar catalase e superóxido dismutase.
- O mecanismo de ação antiulcerogênica de TERE demonstrou estar relacionado com a atividade de receptores opioides e com o aumento da produção de óxido nítrico, mas não envolvendo a síntese de prostaglandinas.

Através deste estudo, fica evidenciada a atividade gastroprotetora de *Tephrosia egregia*, demonstrando sua eficiência através das atividades biológicas aqui demonstradas servindo como requisitos para qualificar esse extrato como ferramenta biotecnológica.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; VINAY KUMAR, M.; FAUSTO, N. ROBBINS & COTRAN. Patologia: Bases Patológica das Doenças. **Elsevier Brazil**. 2005. ISBN 8535213910

ABDELWAHED, A.; BOUHLEL, I.; SKANDRANI, I.; VALENTI, K.; KADRI, M.; GUIRAUD, P.; STEIMAN, R.; MARIOTTE, A.; GHEDIRA, K.; LAPORTE, F.; DIJOUXFRANCA, M.; CHEKIR-GHEDIRA, L.; Study of antimutagenic and antioxidant activities of gallic acid and 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus*. Confirmation by microarray expression profiling, **Chem-Biol. Interact.** 2007.

AIHARA, E.; NOMURA, Y.; SASAKI, Y.; ISE, F.; KITA, K.; TAKEUCHI, K. Involvement of prostaglandina E receptor EP3 subtype in duodenal bicarbonate secretion in rats. **Life Sciences.**, v.80, p.2446-2453., 2007.

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, v. 357, p. 593-615, 2001.

AL-HAZIMI, H. M. A.; AL-JABER, N. A.; RAFIQ, M.; SIDDIQUI, H.; Phenilic compounds from *Tephrosia* plants (leguminosae) review article II. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 9, p. 597, 2006.

ALMEIDA, A. B.; LUIZ-FERREIRA, A.; COLA, M.; DI PIETRO, M. L.; BATISTA, L. M.; DE PAIVA, J. A.; TRIGO, J. R.; SOUZA-BRITO, A. R. Anti-ulcerogenic mechanisms of the sesquiterpene lactone onopordopicrin-enriched fraction from *Arctium lappa* L. (Asteraceae): role of somatostatin, gastrin, and endogenous sulfhydryls and nitric oxide. **J Med Food**. v. 15: p. 378-383. 2012.

ALY, A.; SHULKES, A.; BALDWIN, G. S. Gastrins, cholecystokinins and gastrointestinal cancer. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1704, p.1-10., 2004.

AOI, M.; AIHARA, E.; NAKASHIMA, M.; TAKEUCHI, K. Participation of prostaglandina receptor EP4 subtype in duodenal bicarbonate secretion in rats. **American Journal of Physiology.**, v.287, p.96-103., 2004.

ARRIAGA, A. M.C; LIMA, J. Q.; VASCONCELOS, J. N.; OLIVEIRA, M. C. F.; LEMOS, T. L. G.; FONSECA, A. M.; MALCHER, G. T.; MAFEZOLI, J.; BRAZ-FILHO, R., Antioxidant and Larvicidal Activities of *Tephrosia egregia* Sandw against *Aedes aegypti*, **Natural Product Communications**, v. 4, p. 529-530, 2009.

ATHMANN, C.; ZENG, N.; SCOTT, D. R.; SACHS, G. Regulation of parietal cell calcium signaling in gastric glands. **American Journal of Physiology (Gastrointestinal and Liver Physiology)**. V.279, p.1048-1058. 2000.

BARREIRO, E. J.; DA SILVA BOLZANI, V. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BATISTA, L.M.; ALMEIDA, A.B.; PIETRO, M.L.; TOMA, W.; CALVO, T.R.; VILEGAS, W.; BRITO, B.A.R.S. Gastric antiulcer activity of *Syngonanthus arthrotrichus* Silveira. **Biol. Pharm. Bull**; v. 27, n. 3, p. 328-332, 2004.

BAYIR, Y.; ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; ASLAN, A.; SULEYMAN, H.; HALICI, M.; KAZAZ, C. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. **Phytomedicine**., v.13, p.584-590., 2006.

BEALES, I. L. P. Gastrin and interleukin-1b stimulate growth factor secretion from cultures rabbit gastric parietal cells. **Life Sciences**., v.75, p.2983-2995., 2004.

BELAICHE, J.; BURETTE, A.; DE VOS, M.; LOUIS, E.; HUYBRECHTS, M.; DELTENRE, M. Study Group of NSAID-GI complications: Observational survey of NSAID-related upper gastro-intestinal adverse events in Belgium. **Acta Gastroenterologic Belgiam**., v.65, p.65-73., 2002.

BENTHAM, G. Papilionaceae. In: MARTIUS, C. F. P.; ENDLICHER, S. & URBAN, I. **Flora Brasiliensis. Monachii: Lipsiae**, v 15, p. 1-216, 1859.

BERG, A.; REDEEN, S.; ERICSON, A. C.; SJOSTRAND, S. E. Nitric oxide—an endogenous inhibitor of gastric acid secretion in isolated human gastric glands. **BMC Gastroenterology**, v. 4, p. 16, 2004.

BERG, A.; REDEEN, S.; GRENEGÅRD, M.; ERICSON, A.C.; SJOSTRAND, S.E. Nitric oxide inhibits gastric acid secretion by increasing intraparietal cell levels of cGMP in isolated human gastric glands. **American Journal of Physiology: Gastrintestinal and Liver Physiology**, v. 289, p. G1061–G1066, 2005.

BIGHETTI, A. E.; ANTÔNIO, M. A.; KOHN, L. K.; REHDER, V. L. G.; FOGGIO, M. A.; POSSENTI, A.; VILELA, L.; CARVALHO J. E. Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania laevigata* Schultz Bip. **Phytomedicine**, v. 12, p. 72-77, 2005.

BOLLAND, G.; *Tephrosia egregia* Sandwith. **Bulletin of miscellaneous information** / Royal Botanic Gardens, Periodical Botany XB-U769, p. 249, 1947.

BROUGHTON W. J.; HERNANDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant and Soil**, v. 252, n.1, p. 55-128, 2003.

BROZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P.C.; KONTUREK, S.J.; BRZOZOWSKA, I.; PAWLIK, T. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56, supp. 5, p. 33-55, 2005.

BROZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P. C. H.; KONTUREK, S. J. Involvement of cyclooxygenase (COX-2) products in acceleration of ulcer healing by gastrin and hepatocyte growth factor. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.51, p.751-773., 2000.

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

CAMPOS, D. A.; DE LIMA, A. F.; RIBEIRO, S. R.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. Gastroprotective effect of a flavone from *Lonchocarpus araripensis* Benth. (Leguminosae) and the possible mechanism. **Journal Pharm Pharmacol**. V. 60(3), p.391-7, 2008.

CARVALHO, A. C. B.; NUNES, D. S. G.; BARATELLI, T. G.; SHUQUAIR, S. N. S. M. S. A. Q; NETTO, E. M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, v. 11, p. 26-32, 2007.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico. Revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. 6, p. 417-423, 2002.

CHEN, D.; AIHARA, T.; ZHAO, C.M.; HAKANSON, R.; OKABE, S. Differentiation of the Gastric Mucosa I. Role of histamine in control of function and integrity of oxyntic mucosa: understanding gastric physiology through disruption of targeted genes. **American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.291, p.539-544., 2006.

CHEN, S. H.; LIANG, Y. C.; CHAO, J. C.; TSAI, L. H.; CHANG, C. C.; WANG, C. C.; PAN, S. Protective effects of Ginkgo biloba extract on the ethanol-induced gastric ulcer in rats. **World J Gastroenterol**. v. 11, p. 3746-3750. 2005.

CNUBBEN, N. H. P.; RIETJENS, I. M. C. M.; WORTELBOER, H.; VAN ZANDEN, J.; VAN BLADEREN, P. J. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **J Physiol**. 10, 141-152. 2001.

CUEVAS, V.M.; CALZADO, Y. R.; GUERRA, Y.P.; YERA, A.O.; DESPAIGNE, S.J.; FERREIRO, R.M.; QUINTANA, D.C. Effects of grape seed extract, vitamin C, and vitamin E on ethanol- and aspirin-induced ulcers. **Adv Pharmacol Sci**, 2011:740687, 2011.

DAS, S.K.; VASUDEVAN, D.M., Alcohol-induced oxidative stress. **Life Sciences**; v. 81, p. 177-187, 2007.

DEFONESKA, A.; KAUNITZ, J. D. Gastroduodenal mucosal defense. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 26, n. 6, p. 604, 2010.

DEMIR, S.; YILMAZ, M.; KOSEOGLU, M.; AKALIN, N.; ASLAN, D.; AYDIN, A. Role of free radicals in peptic ulcer and gastritis. **The Turkish Journal of Gastroenterology**., v.14, n. 1, p.39-43., 2003.

DEY, I.; LEJEUNE, M.; CHADEE, K. Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. **British Journal of Pharmacology**, v. 149, n. 6, p. 611-623, 2009.

DING M.; KINOSHITA Y.; KISHI K.; NAKATA H.; HASSAN S.; KAWANAMI C. Distribution of prostaglandin E receptors in the rat gastrointestinal tract. **Prostaglandins**, v.53, pg. 199–216, 1997.

DOS SANTOS, E. B.; SLUSARZ, P. A. A.; JUNIOR, V. A. K.; SCHWARTZ, J. P. Eficácia antimicrobiana de produtos naturais frente a microrganismos causadores da endocardite bacteriana. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13, n. 3/4, 2009.

DUARTE, D. F. Uma Breve História do Ópio e dos Opioides. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 55, n. 1, p. 135–146, 2005.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

FERRAZ, P. G. Receptores e antagonistas opioides: revisão da classificação e propriedades dos receptores e seus dois principais antagonistas: naloxona e naltrexona. **Infanto – Revista de Neuropsiquiatria da Infância e Adolescência**, v.7, n. 3, p. 106-111, 1999.

FIORUCCI, S.; ANTONELLI, S.; MORELLI, A. Mechanism of non-steroidal anti-inflammatory drug-gastropathy. **Digestive and Liver Disease**, v. 33, n. 2, p. S35-43, 2001.

FREITAS, F. F. B. P.; et al. Gastroprotective activity of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. in animal models. **J. Ethnopharmacol.**, v. 137, p. 700-708, 2011.

FURNESS, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 9, n. 5, p. 286-294, 2012.

GAO, T.; YAU, H.; SONG, J.; LIU, C.; ZHU, Y.; MA, X.; PANG, X.; XU, H.; CHEN, S.; Identification of medicinal plants in the Family fabaceae using potential ITS2. **Journal Ethnopharmacology**, v. 130, p. 116-121, 2010.

GELMAN, P. L.; HERRERA, N. E. G.; ORTEGA, M. E. M.; VILLANUEVA, E. B.; SANTILLÁN, C. T.; JUÁREZ, A. S.; PALMA, B. A. Endomorphin peptides: pharmacological and functional implications of these opioid peptides in the brain of mammals. Part one. **Salud Mental**, n. 33, p. 257-272, 2010.

GELMAN, P. L.; HERRERA, N. E. G.; ORTEGA, M. E. M.; ROMERO, L. P.; SANTILLÁN, C. T.; JUÁREZ, A. S.; PALMA, B. A. Endomorphin peptides: pharmacological and functional implications of these opioid peptides in the brain of mammals. Part one. **Salud Mental**, n. 33, p. 179-272, 2010.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P. de.; WANDERLEY, M. das G. L.; VAN DEN BERG, C. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 52-61, 2005.

GOEL, R.; TAVARES, I.; BENNETT, A. Effect of ethanol on eicosanoid synthesis by human gastric and colonic mucosal pieces. **British Journal of Pharmacology**, v. 99, n. 2, p. 289-292, 2012.

GRANGEIRO, N. M. G. C.; CHAVES, H. V.; SILVA, A. A. R.; GRAÇA, J. R. V.; LIMA, V.; BEZERRA, M. M. Enzimas Ciclooxygenases 1 e 2: Inflamação e Gastro-Cardio proteção. **Revista Eletrônica Pesquisa Médica**, v. 2, n. 3, p. 13-20, 2008.

GRANIK, V. G.; GRIGOR'EV, N. B. Nitric oxide synthase inhibitors: biology and chemistry. **Russian Chemical Bulletin**, v. 51, n. 11, p. 1973-1995, 2002.

GUO, J. S.; CHO, C. H.; WANG, W. P.; SHEN, X. Z.; CHENG, C. L.; KOO, M. W. L. Expression and activities of three inducible enzymes in the healing of gastric ulcers in rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 9, n. 8, p. 1767-1771, 2003.

GYIRES, K.; MÜLLNER, K.; FÜRST, S.; RÓNAI, A. Z. Alpha-2 adrenergic and opioid receptor-mediated gastroprotection. **Journal of Physiology (Paris)**, v. 94, p. 117-121, 2000.

GYIRES, K.; MÜLLNER, K.; RÓNAI, A. Z. Activation of central opioid receptors may induce gastric mucosal defense in the rat. **Journal of Physiology (Paris)**, v. 95, p. 189-196, 2001.

GYIRES, K.; RÓNAI, A.Z. Supraspinal δ - and μ -Opioid Receptors Mediate Gastric Mucosal Protection in the Rat. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 297, n. 3, p. 1010-1015, 2001.

GYIRES, K.; RÓNAI, A.Z.; TÓTH, G.; DARULA, ZS.; FÜRST, S. Analysis of the role of delta opioid receptors in gastroprotection in the rat. **Life Sciences**, v. 60, n. 16, p. 1337-1347, 1997.

GYIRES, K.; NÉMETH, J.; ZÁDORI, Z. Gastric Mucosal Protection and Central Nervous System. **Current Pharmaceutical Design**, 2012.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants—*quo vadis*? **Trends in Biochemistry and Sciences**, 1997.
HALLIWELL, B.; J.M.C. GUTTERIDGE. **Free radicals in biology and medicine**, 3^o ed. Oxford University Press Oxford. 1999.

HATAZAWA, R.; TANAKA, A.; TANIGAMI, M.; AMAGASE, K.; KATO, S.; ASHIDA, Y.; TAKEUCHI, K. Cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 accelerates the healing of gastric ulcers via EP 4 receptors. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 293, p. G788-G797, 2007.

HIGUCHI, K.; UMEGAKI, E.; YODA, Y.; TAKEUCHI, T.; MURANO, M.; TOKIOKA, S. The role of prostaglandin derivatives in a treatment and prevention for gastric ulcers in the aged patients. **Nihon Rinsho.**, v. 68, p. 2071-5, 2010.

HOOGERWERF, W. A.; PASRICHA, P. J. Pharmacotherapy of Gastric Acidity, Peptic Ulcer, and Gastroesophageal Reflux Disease. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11. Ed. United States: McGraw-Hill, p. 869-882. 2006.

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

JOLY, A. B. Botânica: Introdução à taxonomia vegetal, 12^a Ed., São Paulo: **Companhia Editora Nacional**, 777p, 1998.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. O tubo digestivo. In: **Histologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 244-269. 1999.

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

KIRKMAN, H.N., ROLFO, M., FERRARIS, A.M., GAETANI, G.F. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. **Journal Biol. Chem.**, v. 274, p.13908-13914, 1999.

KO, J. K. S.; CHING, C. K.; CHOW, J. Y. C.; ZHANG, S. T.; LAM, S. K.; CHO, C. H. The vascular end glandular organoprotective properties of metronidazole in the rodent stomach. **Aliment Pharmacol Ther.**, v.11, p. 811-819, 1997.

KOMASAKA, M.; HORIE, S.; WATANABE, K.; MURAYAMA, T. Antisecretory effect of somatostatina on gastric acid via inhibition of histamine release in isolated mouse stomach. **European Journal of Pharmacology.**, v. 452, p. 235-243., 2002.

KONTUREK, P. C.; KONTUREK, S. J.; OCHMANSKI, W. Neuroendocrinology of gastric H⁺ and duodenal HCO₃ secretion: the role of brain-gut axis. **European Journal of Pharmacology.**, v.499, p.15-27, 2004.

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

KOSONE T.; TAKAGI, H.; KAKIZAKI, S.; SOHARA, N.; HORIGUCHI, N.; SATO, K.; YONEDA, M.; TAKEUCHI, T.; MORI, M. Integrative roles of transforming growth factor-alpha in the cytoprotection mechanisms of gastric mucosal injury. **BMC Gastroenterology**, v. 6, n. 22, 2006. (doi:10.1186/1471-230X-6-22.)

KOSSOULAS, V.; VASSILIOU, S.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J.; TASSIAS, C.; KOTSAKI, A.; BARBATZAS, C.; TZIVRAS, M. Implications for a role of interleukin-23 in the pathogenesis of chronic gastritis and of peptic ulcer disease. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 156, p. 97–101, 2009.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 88, p. 4651-4655, 1991.

KUTCHAI, H. C. Secreções Gastrointestinais. In: BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Fisiologia**. 5. ed., p. 601-632., 2004.

LANAS, A. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract. **Arthritis Research & Therapy**, v. 10, Suppl. 2, p. S4, 2008.

LAU, J. Y.; SUNG, J.; HILL, C.; HENDERSON, C.; HOWDEN, C. W.; METZ, D. C. Systematic review of the epidemiology of complicated peptic ulcer disease: incidence, recurrence, risk factors and mortality. **Digestion**, v. 84, n. 2, p. 102-113, 2011.

LEE, J. S.; OhB, T. Y.; KIMC, Y. K.; BAIK, J. H.; SOC, S.; HAHMB, K. B.; SURH, Y. J. Protective effects of green tea polyphenol extracts against ethanol-induced gastric mucosal damages in rats: Stress-responsive transcription factors and MAP kinases as potential targets. **Mutation Research**, v. 579, p. 214-224, 2005.

LEWIS, G. P; SCHRIRE, B.; MACHINDER, B.; LOCK, M. Legumes of the world. Kew: **Royal Botanic Gardens**. 577p., 2005.

LI, P.; CHANG, T. M.; COY, D.; CHEY, W. Y. Inhibition of gastric acid secretion in rat stomach by PACAP is mediated by secretin, somatostatina, and PGE2. **America Journal of Physiol Gastrointest Liver Physiol**. V. 278 (1), p. 121-127, 2000.

LI, X.; QIAN, J.; CHEN, Y.; CHEN, Y. The mechanism of somatostatina-induced acid secretion inhibition in isolated parietal cells. **Zhonghua Nei Ke Za Zhi**. V. 40 (4), p. 236-238, 2001.

LIEBER, C. S. Gastric ethanol metabolism and gastritis: interactions with other drugs, *Helicobacter pylori*, and antibiotic therapy (1957-1997) – a review. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v.21, p. 1360-1366, 1997.

LIMA, J. Q.; **Contribuição ao Conhecimento Químico de Plantas do Gênero Tephrosia: Investigação Química e Ensaio Biológicos de *Tephrosia egregia* Sandwith (Fabaceae)**. 231f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, 2010.

LIU, C.; CRAWFORD, J. M. O trato gastrointestinal. *In*: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Patologia – Bases patológicas das doenças**. 7. ed. São Paulo: Elsevier, p. 837-918. 2005.

LONG, L. K.; YANG, J.; AN, Y.; LIU, G. Disruption of a glutathione reductase encoding gene in *Acremonium chrysogenum* leads to reduction of its growth, cephalosporin production and antioxidative ability which is recovered by exogenous methionine. **Fungal Genet Biol.**, 2011.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F; Plantas Medicinais: a Necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

- MACMATH, T. L. Alcohol and Gastrointestinal Bleeding. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 8, n. 4, p. 859-872, 1990.
- MAITY, P.; BISWAS, K.; ROY, S.; BANERJEE, R. K.; BANDYOPADHYAY, U. Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer – recent mechanistic update. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.253, p.329-338., 2003.
- MALFERTHEINER, P.; CHAN, F. K. L.; MCCOLL, K. E. L. Peptic ulcer disease. **The Lancet**, v. 374, n. 9699, p. 1449-1461, 2009.
- MARTIN, G. R.; WALLACE, J. L. Gastrintestinal inflammation: a central component of mucosal defense and repair. **Experimental Biology and Medicine**, v. 231, p. 130–7, 2006.
- MARTIN, W. R. Opioid antagonists. **Pharmacological Reviews**, v. 19, n. 4, p. 464-517, 1967.
- MATÉS, J.M.; SANCHEZ-JIMENEZ, F. Antioxidante enzymes and their implications in pathophysiological processes. **Frontiers in Bioscience**, v. 4, p.339-345, 1999.
- MILANI, S.; CALABRÒ, A. Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing. **Microscopy Research and Technique**, v. 53, p. 360-371, 2001.
- MILLS, J. C.; SHIVDASANI, R. A. Gastric epithelial stem cells. **Gastroenterology**. v. 140, n. 2, p. 412-424, 2011.
- MORAIS, T. C.; PINTO, N. B.; CARVALHO, K. M.; RIOS, J. B.; RICARDO, N. M. P. S.; TREVISAN, M. T. S.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. Protective effect of anacardic acids from cashew *Anacardium occidentale* on ethanol-induced gastric damage in mice. **Chemicobiological Interactions**, v. 183, n. 1, p. 264-269, 2010.
- MOURA ROCHA, N. F. **Estudo dos efeitos farmacológicos do (-)- α -bisabolol em modelos animais de nocicepção, inflamação e úlcera gástrica em camundongos.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.
- MUSUMBA, C.; PRITCHARD, D.; PIRMOHAMED, M. Review article: cellular and molecular mechanisms of NSAID-induced peptic ulcers. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 30, n. 6, p. 517-531, 2009.
- NAGY, L.; NAGATA, M.; SZABO, S. Protein and non-protein sulfhydryls and disulfides in gastric mucosa and liver after gastrototoxic chemicals and sucralfate: Possible new targets of pharmacologic agents. **World J. Gastroenterol.**, v. 13, p. 2053-2060, 2007.

NAHAVANDI, A.; DEHPOUR, A. R.; MANI, A. R.; HOMAYOUNFAR, H.; ABDOLI, A. NG-nitro-L-arginine methylester is protective against ethanol-induced gastric damage in cholestatic rats. **European Journal of Pharmacology.**, v. 370, p. 283-286., 1999.

NAKASHIMA, M.; AOI, M.; AIHARA, E.; TAKEUCHI, K. No role for prostacilin IP receptors in duodenal HCO₃ secretion induced by mucosal acidification in mice: comparison with capsaicin-induced response. **Digestion.**, v.70, p.16-25., 2004.

NARUMIYA, S. Prostanoids and inflammation: a new concept arising from receptor knockout mice. **Journal of Molecular Medicine**, v. 87, n. 10, p. 1015-1022, 2009.

NISHIO, H.; HAYASHI, Y.; TERASHIMA, S.; TAKEUCHI, K. Role of endogenous nitric oxide in mucosal defense of inflamed rat stomach following iodoacetamide treatment. **Life Sciences**, v. 79, n. 16, p. 1523-1530, 2006.

OGINO, K. et al. Evaluation of pharmacological profile of meloxicam as an anti-inflammatory agent, with particular reference to its relative selectivity for cyclooxygenase-2 over cyclooxygenase-1. **Pharmacology**, v. 55, n.1, p. 44-53, 1997.

OLBE, L.; CARLSSON, E.; LINDBERG, P. Proton-pump inhibitor expedition: the case histories of omeprazole and esomeprazole. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 132-139, 2003.

OLIVEIRA, F. A.; VIEIRA-JUNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; FLORENCIO, M. G.; LIMA-JR, R. C. P.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacological Research.**, v.49, p.105-111., 2004.

PALILEO, C.; KAUNITZ, J. D. Gastrointestinal defense mechanisms. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 27, n. 6, p. 543-548, 2011.

PESKAR, B.; HOPPE, U.; LANGE, K.; PESKAR, B. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on rat gastric mucosal leukotriene C₄ and prostanoid release: relation to ethanol-induced injury. **British Journal of Pharmacology**, v. 93, n. 4, p. 937-943, 2012.

PESKAR, B.M. Role of cyclooxygenase isoforms in gastric mucosal defense. **Journal of Physiology - Paris**, v. 95, p. 3-9, 2001.

PFEIFFER, S.; LEOPOLD, E.; SCHMIDT, K.; BRUNNER, F.; MAYER, B. Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (LNAME): requirement for

bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. **British Journal of Pharmacology.**, v. 118, n. 6, p. 1433-1440., 1996.

PETRONILHO, F.; ARAÚJO, J.; STECKERT, A.V.; REZIN, G.T.; FERREIRA, G.K.; ROESLER, R.; SCHWARTSMANN, G.; DAL-PIZZOL, F.; STRECK, E.L. Effect of a gastrin-releasing peptide receptor antagonist and a proton pump inhibitor association in an animal model of gastritis. **Peptides**, v. 30, p. 1460-1465, 2009.

PHILLIPSON, M.; JOHANSSON, M. E. V.; HENRIKSNA S. J.; PETERSSON, J.; GENDLER, S. J.; SANDLER, S.; PERSSON, A. E. G.; HANSSON, G. C.; HOLM, L. The gastric mucus layers: constituents and regulation of accumulation. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 295, p. G806–G812, 2008.

PUSHPAKIRAN, G.; MAHALAKSHMI, K.; ANURADHA, C. V. Protective effects of taurine on glutathione and glutathione-dependent enzymes in ethanol-fed rats. **Pharmazie.**, v.11, p.869-872., 2004.

QUEIROZ, R. T.; TOZZI, A. M. G. A.; LEWIS, G. P.; Seed morphology: an addition to the taxonomy of Tephrosia (Leguminosae, Papilionoideae, Millettieae) from South America. **Plant Syst Evol**, v. 299, p. 459-470, 2013.

RAD, R.; DOSSUMBEKOVA, A.; NEU, B.; LANG, R.; BAUER, S.; SAUR, D.; GERHARD, M.; PRINZ, C. Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonisation during Helicobacter pylori infection. **Gut**, p. 53, p. 1082–9, 2004.

RAFFA, R. B.; RAWLS, S. M.; BEYZAROV, E. P. **Atlas de farmacologia de Netter.** Artmed. Porto Alegre, Brasil, p.169-190, 2006.

RAMAKRISHNAN, K.; SALINAS, R. C. Peptic Ulcer Disease. **American Family Physician**, v.76 (7), 2007.

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

RODRIGUES E SILVA, A. A.; MARQUES BEZERRA, M.; VASCONCELOS CHAVES, H.; DE PAULO TEIXEIRA PINTO, V.; DE SOUZA FRANCO, E.; MAGALHÃES VIEIRA, Â.; BARBOSA ARAÚJO, E.; CUNHA RIOS, L.; RESENDE LEITE, A. C.; DE SOUSA MAIA, M. B. Protective effect of Chresta martii extract on ethanol-induced gastropathy depends on alpha-2 adrenoceptors pathways but not on nitric oxide, prostaglandins or opioids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 1, p. 206-212, 2012.

- ROULEAU, A.; HERON, A. C. V.; PILOT, C.; SCHWARTZ, J. C.; ARRANG, J. M. Cloning and expression of the mouse histamine H3 receptor: evidence for multiple isoforms. **Journal of Neurochemistry.**, v.90, p.1331-1338., 2004.
- RUJJANAWATE, C.; KANJANAPOTHI, D.; AMORNLERDPISON, D.; POJANAGAROON, S. Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 1, p. 120-122, 2005.
- SACCANI, F.; ANSEMI, L.; JARAMILLO, I.; BERTONI, S.; BAROCELLI, E.; STERNINI, C. Protective role of μ opioid receptor activation in intestinal inflammation induced by mesenteric ischemia/reperfusion in mice. **Journal of Neuroscience Research**, 2012.
- SAMUELSON, L. C.; HINKLE, K. L. Insights into the regulation of gastric acid secretion through analysis of genetically engineered mice. **Annual Review of Physiology**. v. 65, p. 383-400, 2003.
- SAMUELSSON, B.; FOLCO, G.; GRANSTRÖM, E.; *et al.* Prostaglandins and thromboxanes: biochemical and physiological considerations. **Advances in Prostaglandins and Thromboxane Research**, v. 4, n. 1, p. 1-25, 1978.
- SANTIAGO, G. M. P.; ARRIAGA, A. M. C.; LIMA, J. Q.; MAFELOZI, J.; OLIVEIRA, M. C. F.; LEMOS, T. L. G.; RODRIGUES, A. C. P.; ALMEIDA, M. M. B. Estudo químico e biológico de *Tephrosia egregia* Sandw (Fabaceae). *In*: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 28., 2005. **Anais**. Poços de Caldas, USP, 2005.
- SANTIN, J. R.; LEMOS, M.; JUNIOR, L. C. K.; NIERO, R.; ANDRADE S. F. Antiulcer effects of *Achyrocline satureoides* (Lam.) DC (Asteraceae) (Marcela), a folk medicine plant, in different experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 334–339, 2010.
- SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. 1,8-Cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 46, n. 2, p. 331–337, 2001.
- SCHMASSMANN, A.; PESKAR, B. M.; STETTLER, C.; NETZER, P.; STROFF, T.; FLOGERZI, B.; HALTER, F. Effects of inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in chronic gastro-intestinal ulcer models in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 123, n. 5, p. 795-804, 2009.
- SCHOROETER, G.; *et al.* Estudo de utilização de anti-ulcerosos na população idosa de Porto Alegre, RS, Brasil. **Rev. HCPA**, 28(2):89-95, 2008.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.21, p.636-643., 2005.

SCHUBERT, M. L.; PEURA, D. A. Control of Gastric Acid Secretion in Health and Disease. **Gastroenterology**. v. 134, p. 1842–1860, 2008.

SIEGMUND, S.; HAAS, S.; SCHNEIDER, A.; SINGER, M. V. Animal models in gastrintestinal alcohol research—a short appraisal of the different models and their results. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, n. 4, p. 519–542, 2003.

SIEGMUND, S.; TEYSSEN, S.; SINGER, M. V. Alcohol-associated Organ Damage. Health Sequelae Caused by Moderate Alcohol Drinking. **Internist (Berl)**, v. 43, n. 2, p. 287-293, 2002.

SILVA, J. L., SILVA, R. P., JORGE, R. M., FÁTIMA SILVA, G. D., VIEIRA FILHO, S. A., FONSECA, A. P. N. D., TAGLIATI C. A. Avaliação da atividade antiulcerogênica da *Maytenus truncata* Reiss (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p.30-35, 2005.

SILVA, E. F.; COLA, M.; CALVO, T. R.; BARBASTEFANO, V.; FERREIRA, A. L.; DE PAULA, M. D.; ALMEIDA, A. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. Antioxidant Activity of Indigo and its Preventive Effect against Ethanol-Induced DNA Damage in Rat Gastric Mucosa. **Planta Med.** v. 73(12), p. 1241-6, 2007.

SILVERTHORN, D. U. Digestão. *In: Fisiologia humana: uma abordagem integrada*. 2. ed., São Paulo: Manole, p. 602-637. 2003.

SOBOTTA. Tronco, visceras e extremidade inferior. *In: Atlas de anatomia humana*, v.2, 21° ed., Guanabara Koogan, p.132. 2000.

SOSTRES C, GARGALLO CJ, ARROYO MT, LANAS A. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v.24, p.121-132, 2010.

STOHS, S. J. The role of free radicals in toxicity and disease. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 6, n. 3-4, p. 205-228, 2011.

SÜLEYMAN, H.; ALBAYRAK, A.; BILICI, M.; CADIRCI, E.; HALICI, Z. Different mechanisms in formation and prevention of indomethacin-induced gastric ulcers. **Inflammation**, v. 33, n. 4, p. 224-234, 2010.

SUNG, J.; KUIPERS, E.; EL-SERAG, H. Systematic review: the global incidence and prevalence of peptic ulcer disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 29, n. 9, p. 938-946, 2009.

SZABO, C. Gaseotransmitters: New Frontiers for Translational Science. **Science Translational Medicine**, v. 2, n. 59, p. 1-7, 2010.

TAKAHASHI, S.; TAKEUCHI, K.; OKABE, S. EP4 receptor mediation of prostaglandin E2-stimulated mucus secretion by rabbit gastric epithelial cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, n. 12, p. 1997-2002, 1999.

TAKAYAMA, C.; DE FARIA, F. M.; DE ALMEIDA, A. C.; VALIM, D. E. A.; REHEN, C.S.; DUNDER, R.J.; SOCCA, E. A.; MANZO, L. P.; ROZZA, A. L.; SALVADOR, M. J.; PELLIZZON, C. H.; HIRUMA-LIMA, C. A.; LUIZ-FERREIRA, A.; SOUZA-BRITO, A. R. Gastroprotective and ulcer healing effects of essential oil from *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae). **J Ethnopharmacol.** v. 135(1), p. 147-55. 2011.

TAKEUCHI, K.; AIHARA, E.; SASAKI, Y.; NOMURA, Y.; ISE, F. Involvement of cyclooxygenase-1, prostaglandin E2 and EP1 receptors in acid-induced HCO₃⁻ secretion in stomach. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.57, n. 4, p.661-676., 2006.

TARUS, P. K.; MACHOCHO, A. K.; LANG'at THORUWA, C.; CHHABRA, S. C. Flavonoids from *Tephrosia aequilata*. **Phytochemistry**, v. 60, p. 375-379, 2002.

TEYSSSEN, S.; SINGER, M.V. Alcohol-related diseases of the oesophagus and stomach. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, v.17, n.4, p. 557-573, 2003.

TOMA, W.; *et al.* Preliminary studies of *Mammea americana* L. (Guttiferae) bark/latex extract point to an effective antiulcer effect on gastric ulcer models in mice. **Phytomed.**12(5):345-350, 2005.

TOMA, W.; TRIGO, J.R.; DE PAULA, A.C.B.; BRITO, A.R.M.S. Preventive activity of pyrrolizidine alkaloids from *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) on gastric and duodenal induced ulcer on mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v 95, p. 345-351, 2004.

TOUQEER, S.; SAEED, M. A.; AJAIB, M.; A review on the phytochemistry and pharmacology of genus *Tephrosia*. **Phytopharmacology**, v. 4, p. 598-637, 2013.

TRESCOT, A. M.; DATTA, S.; LEE, M.; HANSEN, H. Opioid Pharmacology. **Pain Physician, Opioid Special Issue**, v. 11, p. S133-S153, 2008.

TULASSAY, Z.; HERSZÉNYI, L. Gastric mucosal defense and cytoprotection. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, v. 24, p. 99-108, 2010.

TUNDIS, R.; *et al.* Natural Products as Gastroprotective and Antiulcer Agents: Recent Developments. **Natural products communication**, 13(12): 2129-2144, 2008.

UNEYAMA, H.; NIJIMA, A.; KITAMURA, A.; TORII, K. Existence of NO-triggered vagal afferent activation in the rat gastric mucosa. **Life Sciences**, v. 85, n. 23, p. 782-787, 2009.

USHIKUBI, F.; SUGIMOTO, Y.; ICHIKAWA, A.; NARUMIYA, S. Roles of prostanoids revealed from studies using mice lacking specific prostanoid receptors. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 83, n. 4, p. 279-85, 2000.

VELLOSA, J. C. R.; KHALIL, M. N.; FORMENTON, V. A. F.; XIMENES, V. F.; FONSECA, L. M.; FURLAN, M.; BRUNETTI, I. L.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark. **Fitoterapia**, p. 77, 243., 2006.

VIEIRA, A. M. **Eficácia do extrato aquoso de *maytenus rigida* mart. (celastraceae) na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos: análise do envolvimento de óxido nítrico, prostaglandinas, receptores opióides e α -2-adrenérgicos.** 2013. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2013.

WALDHOER, M.; BARTLETT, S.E.; WHISTLER, J.L. Opioid receptors. **Annual Reviews in Biochemistry**, v. 73, p. 953–90, 2004.

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

WALLACE, J. L.; DICAY, M.; MCKNIGHT, W.; DUDAR, G.K. Platelets accelerate gastric ulcer healing through presentation of vascular endothelial growth factor. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, p. 274–278, 2006.

WALLACE, J. L.; MCKNIGHT, W.; REUTER, B.K.; VERGNOLLE, N. NSAID-Induced Gastric Damage in Rats: Requirement for Inhibition of Both Cyclooxygenase 1 and 2. **Gastroenterology**, v. 119, n. 706–714, 2000.

WANG YR, RICHTER JE, DEMPSEY DT. Trends and Outcomes of Hospitalizations for Peptic Ulcer Disease in the United States, 1993 to 2006. **Annals of Surgery**, v. 251 p.51-58, 2010.

YOKOYAMA H, UCHIDA H, KUROIWA H, KASAHARA J, ARAKI T. Role of glial cells in neurotoxin-induced animal models of Parkinson's disease. *Neurol Sci.* 32(1):1-7, 2011.

ZIPCODEZOO, Tephrosia (Genus). Disponível em:

http://zipcodezoo.com/Key/Plantae/Tephrosia_Genus.asp. Acesso em: 15 nov. 2016.