



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

JOHNATAN ALISSON DE OLIVEIRA SOUSA

**EFEITO GASTROPROTETOR DO LASSBio-596 EM MODELO
EXPERIMENTAL DE GASTRITE AGUDA INDUZIDA POR ETANOL**

FORTALEZA

2018

JOHNATAN ALISSON DE OLIVEIRA SOUSA

**EFEITO GASTROPROTETOR DO LASSBio-596 EM MODELO
EXPERIMENTAL DE GASTRITE AGUDA INDUZIDA POR ETANOL**

Dissertação apresentada ao curso de
Mestrado em Ciências
Morfofuncionais do Programa de Pós-
Graduação em Ciências
Morfofuncionais da Universidade
Federal do Ceará, como requisito
parcial para obtenção do título de
Mestre em Ciências Morfofuncionais.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Marcos
Gomes Soares

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos
Eduardo da Silva Monteiro

FORTALEZA

2018

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)

S697e Sousa, Johnatan Alisson de Oliveira.

EFEITO GASTROPROTETOR DO LASSBio-596 EM MODELO EXPERIMENTAL DE GASTRITE AGUDA INDUZIDA POR ETANOL / Johnatan Alisson de Oliveira Sousa. – 2018.

81 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes

Soares. Coorientação: Prof. Dr. Carlos Eduardo da Silva Monteiro .

1. Oxido Nítrico. 2. LASSBio-596. 3. Gastrite Aguda. I. Título.

CDD 611

JOHNATAN ALISSON DE OLIVEIRA SOUSA

**EFEITO GASTROPROTETOR DO LASSBio-596 EM MODELO
EXPERIMENTAL DE GASTRITE AGUDA INDUZIDA POR ETANOL**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Ciências Morfofuncionais do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares (Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dra. André Luiz dos Reis Barbosa
Universidade Federal do Piauí – UFPI

Prof. Dr. Emmanuel Prata de Souza
Universidade Federal do Ceará – UFC

À pessoas especiais, pela compreensão de quando minha presença não foi possível e quando minha preocupação e atenção pareciam se voltar exclusivamente para este trabalho: meus pais (Elias e Maria), minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Ceará. A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e técnico.

Ao Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas, pelo apoio em ceder a substância LASSBio-596.

Ao meu orientador Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares, pelo incentivo e apoio científico desde a iniciação científica. Obrigada pela oportunidade, por me aceitar, pela paciência e por toda ajuda.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Carlos Eduardo da Silva Monteiro, pelo incentivo, apoio científico e amizade.

Aos professores participantes da banca examinadora de qualificação e de defesa, pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos professores e demais funcionários do Programa de Pós Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará.

Aos amigos do Laboratório de Estudos da Fisiologia Farmacológica Gastrointestinal (LEFFAG) (Ronaldo Farias, Kaira, Victor, Fabrícia, Rafael, Deysen, Cecília, Samara, Patrícia, Renan, Marielle, Athayde, Lorena, Renata, Paulo, Ruan, Priscilla, Álvaro, João Victor, Tiago Menzes, Tiago Santos, Lucas Nicolau, Marcos Aurélio, Ronaldo Fonteles, Vânia, Jean e Humberto) que me acolheram, ensinaram e incentivaram durante toda a pesquisa;

Aos meus amigos(as) de graduação, Priscila Furtado, Allan Kennedy, Gleicyane Sousa e Bárbara Saraiva, pelo apoio e torcida na minha jornada.

Ao meu companheiro Victor Tabosa por toda paciência e incentivo principalmente no final do mestrado.

Enfim, agradeço a todos que de forma direta ou indireta, embora não citados acima, contribuíram nesta etapa importante em minha vida.

“O que for teu desejo, assim será tua vontade.
O que for tua vontade, assim serão teus atos.
O que forem teus atos, assim será teu destino.”

Deepak Chopra

RESUMO

O protótipo LASSBio-596 é um híbrido molecular da talidomida (fármaco anti-TNF- α), sildenafil (inibidor de fosfodiesterase 5) e arilsulfonamida (inibidor da fosfodiesterase 4). Seus efeitos anti-inflamatórios já foram demonstrados em modelos experimentais de inflamação aguda do pulmão e inflamação alérgica crônica. No presente estudo avaliou-se o efeito gastroprotetor de LASSBio-596 em modelo de gastrite aguda induzida por etanol. O pré-tratamento com LASSBio-596 (0.1, 1, 10 e 20 mg/kg, v.o.) reduziu de forma dose dependente ($p < 0,05$) a percentagem de lesão (0.1 mg/kg: 9,36%, 1 mg/kg: 49,18%, 10 mg/kg: 78,03% e 20 mg/kg: 88,92), quando comparado ao grupo etanol 50% pré-tratado com DMSO. Nas análises microscópicas LASSBio-596 (20 mg/kg) reduziu a perda de células epiteliais e hemorragia. O composto restaurou o sistema antioxidante através da diminuição dos níveis de malondialdeído (MDA) e diminuição do consumo de glutathiona reduzida (GSH). O pré-tratamento com LASSBio-596 diminuiu os níveis das citocinas TNF- α e IL-1 β , somados a diminuição da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) e os níveis de hemoglobina. Houve uma redução significativa do efeito gastroprotetor quando administrado o inibidor não seletivo da síntese de óxido nítrico (L-NAME–3mg/kg i.p.) e seletivo para iNOS (1400w–10mg/kg), antes do pré-tratamento com LASSBio-596. O protótipo preservou ainda o conteúdo de muco aderido a mucosa e não alterou a secreção gástrica e seu pH. Em suma, os resultados encontrados elucidam o efeito gastroprotetor de LASSBio-596, com possíveis mecanismos relacionados à inibição do estresse oxidativo e eventos anti-inflamatórios, além de preservar a barreira muco protetora.

Palavras-chave: Gastrite aguda; etanol; óxido nítrico; LASSBio-596.

ABSTRACT

The LASSBio-596 prototype is a molecular hybrid of thalidomide (anti-TNF- α drug), sildenafil (phosphodiesterase 5 inhibitor) and arylsulfonamide (phosphodiesterase 4 inhibitor). Their anti-inflammatory effects already have been demonstrated in experimental models of acute inflammation of the lung and chronic allergic inflammation. The present study evaluated the gastroprotective effect of LASSBio-596 in a model of ethanol-induced acute gastritis. Pretreatment with LASSBio-596 (0.1, 1, 10 e 20 mg/kg, v.o.) reduced in a manner dose dependent ($p < 0,05$) the percentage of hemorrhagic lesion areas (0.1 mg/kg: 9,36%, 1 mg/kg: 49,18%, 10 mg/kg: 78,03% e 20 mg/kg: 88,92), when compared to the 50% ethanol group pretreated with DMSO. In microscopic analyzes LASSBio-596 (20 mg/kg) reduced epithelial cell loss and hemorrhage. The prototype restored the antioxidant system by decreasing the levels of malondialdehyde (MDA) and reduced consumption of reduced glutathione (GSH). Pretreatment with LASSBio-596 decreased levels of the cytokines TNF- α and IL-1 β , as well as a decrease in myeloperoxidase enzyme activity (MPO) and hemoglobin levels. There was a significant reduction of the gastroprotective effect when was given the inhibitor not selective of the synthesis of nitric oxide (L-NAME, 3 mg/kg i.p.) and selective inhibitor for iNOS (1400w, 10 mg/kg i.p), before pre-treatment with LASSBio-596. The prototype also preserved mucous content adhered to the mucosa and did not alter the gastric secretion and its pH. This way, the results found elucidate the gastroprotective effect of LASSBio-596, with possible mechanisms related to the inhibition of oxidative stress and anti-inflammatory events, besides preserving the protective mucus barrier.

Keywords: Acute gastritis; ethanol; nitric oxide; LASSBio-596.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 -	Etapas de descoberta e desenvolvimento de fármacos.....	19
Figura 02 -	Planejamento e obtenção do LASSBio-596.....	20
Figura 03 -	Anatômia do estômago.....	23
Figura 04 -	Camadas que compõem a parede do estômago.....	25
Figura 05 -	Principais mecanismos envolvidos na secreção de ácido no estômago.....	27
Figura 06 -	Diagrama representativo das defesas da mucosa gástrica..	29
Figura 07 -	Mecanismos de lesão e histologia da úlcera péptica.....	31
Figura 08 -	Ação das enzimas antioxidantes.....	35
Figura 09 -	Representação macroscópica do efeito de LASSBio-596....	47
Figura 10 -	Efeito de LASSBio-596 sobre a macroscopia no modelo de gastrite induzida por etanol 50%.....	48
Figura 11 -	Fotomicrografias da mucosa com lesões gástricas induzidas por etanol e tratados com LASSBio-596.....	50
Figura 12 -	Efeito de LASSBio-596 sobre a atividade da MPO na mucosa gástrica.....	51
Figura 13 -	Efeito de LASSBio-596 sobre os níveis de hemoglobina na mucosa gástrica.....	52
Figura 14 -	Avaliação de LASSBio-596 na peroxidação lipídica.....	53
Figura 15 -	Avaliação da ação gastroprotetora de LASSBio-596 nos níveis de glutathiona reduzida na gastrite por etanol.....	54
Figura 16 -	Avaliação do efeito de LASSBio-596 sobre os níveis de TNF- α e IL-1 β na gastrite induzida por etanol.....	55
Figura 17 -	Efeito de LASSBio-596 sobre o conteúdo de muco na mucosa gástrica.....	56
Figura 18 -	Avaliação da ação de LASSBio-596 sobre a secreção gástrica.....	57
Figura 19 -	Participação do óxido nítrico no efeito gastroprotetor do LASSBio-596, avaliando o índice de lesão.....	58
Figura 20 -	Efeito da inibição da NO síntase: MDA, GSH, hemoglobina e MPO.....	60

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Escores das alterações histopatológicas na mucosa gástrica de camundongos submetidos às lesões gástricas induzidas por etanol e pré-tratadas com LASSBio-596	49
--	----

LISTA DE ABREVIÇÃO E SÍMBOLOS

ACh – Acetilcolina
AMPc – Monofosfato cíclico de adenosina
CAT- Catalase
CaMK II – Proteína kinase II dependente de cálcio/calmodulina
COX – Cicloxigenase
Cl⁻ - Cloreto
DMSO – Dimetil sulfóxido
ECL - células enterocromafins
ERO – Espécies reativas de Oxigênio
EGF – Fator de Crescimento Endotelial
FGF - Fator de crescimento de fibroblasto.
GMPc – Monofosfato cíclico de guanosina
GPx- Glutathione redutase
GSH- Glutathione reduzida
GSSG - Glutathione oxidada
HCO₃⁻- Bicarbonato
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
IBP- Inibidores da bomba de prótons
IL-1 β - Interleucina 1 beta
LASSBio- Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas
MDA- Malondialdeído
MPO- Mieloperoxidase
NF- κ B - Fator nuclear kappa β
NO - Óxido Nítrico
NOS - Óxido nítrico sintase
iNOS - Óxido nítrico sintase induzível
O₂⁻ - Radical superóxido
OH – Radical hidroxila
PDE- Fosfodiesterases
PDE- 4- Enzima fosfodiesterase 4
PDE-5- Enzima fosfodiesterase 5
PDGF - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

PKC – Proteína quinase C

PGs- Prostaglandinas

PGE2- prostaglandinas do tipo 2

PMN's – Polimorfos Funcionais

SOD- Super Oxido Desmutase

SNA – Sistema nervoso autônomo

SNE – Sistema nervoso entérico

SNC – Sistema nervoso central

SLC – Transportador de soluto

TGF- β - Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- β)

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

UP- Ulcera péptica

SÚMARIO

1.	INTRODUÇÃO.....	17
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1.	Química medicinal.....	18
2.2.	LASSBio-596.....	19
2.3.	O estômago: aspectos anatômicos e fisiológicos.....	22
2.4.	Fisiologia da secreção gástrica.....	25
2.5.	Mecanismos de proteção da mucosa gástrica.....	27
2.6.	Fisiologia da úlcera péptica.....	31
2.7.	Radicais livres e defesas antioxidantes.....	32
2.8.	Mecanismos de lesão gástrica do etanol.....	34
2.9.	Medicamentos utilizados na clínica.....	35
2.9.1.	Antiácidos.....	36
2.9.2.	Antagonistas de receptores de histamina-2.....	36
2.9.3.	Inibidores da bomba de prótons.....	37
2.9.4.	Análogos de prostaglandinas.....	37
3.0.	Justificativa.....	38
4.0.	Objetivo geral.....	39
4.1.	Objetivos específicos.....	39
5.0.	Materiais e métodos.....	40
5.1.	Animais.....	40
5.2.	Indução da gastrite por etanol.....	40
5.3.	Avaliação macroscópica.....	41
5.4.	Avaliação histológica.....	41
5.5.	Avaliações bioquímicas.....	42
5.5.1.	Mensuração dos níveis de malondialdeído (MDA).....	42
5.5.2.	Mensuração dos níveis de glutathiona reduzida (GSH).....	42
5.5.3.	Quantificação de hemoglobina.....	43
5.5.4.	Avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO).....	43
5.6.	Dosagem de citocinas.....	44
5.7.	Quantificação da secreção e pH gástrico.....	45
5.8.	Determinação do conteúdo de muco gástrico aderido	45

5.9.	Análise estatística.....	46
6.0.	Resultados.....	47
6.1.	Efeito de LASSBio-596 na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos: curva dose-resposta.....	47
6.2.	Avaliação histopatológica da mucosa gástrica de camundongos tratados com LASSBio-596.....	48
6.3.	Efeito gastroprotetor de LASSBio-596 sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) e os níveis de hemoglobina.....	51
6.4.	Efeito gastroprotetor de LASSBio-596 sobre a peroxidação lipídica por dosagem de molondialdeído (MDA) e no estresse oxidativo por dosagem de glutathiona (GSH).....	52
6.5.	Avaliação do efeito de LASSBio-596 sobre citocinas pró-inflamatórias.....	54
6.6.	Efeito de LASSBio-596 sobre o conteúdo de muco gástrico.....	56
6.7.	Efeito gastroprotetor de LASSBio-596 sobre alterações da secreção e pH gástrico.....	56
6.8.1.	Avaliação dos efeitos de L-NAME e 1400w sobre o efeito gastroprotetor de LASSBio-596, nos parâmetros macroscópicos e histopatológicos.....	57
6.8.2.	Influência do óxido nítrico sobre o efeito de LASSBio-596 na peroxidação lipídica (MDA), estresse oxidativo (GSH), hemoglobina e mieloperoxidase (MPO).....	58
7.0.	Discussão.....	61
8.0.	Conclusão.....	69
9.0.	Referências.....	70

1. INTRODUÇÃO

A gastrite aguda consiste na inflamação da mucosa que reveste o estômago, causada pelo desequilíbrio entre os fatores agressores e protetores (SHIN et al., 2013), com a participação de vários mediadores inflamatórios liberados por células do epitélio e da lâmina própria, tendo como consequência o desenvolvimento de lesões (DEN HOLLANDER; KUIPERS, 2012). Uma série de doenças, condições ambientais, genética e hábitos estão relacionados com a incidência da gastrite. Nesse contexto, a etiologia da doença é variada (CARVALHO, 2000).

Os principais fatores etiológicos para a gastrite são: o uso de cigarro, fármacos anti-inflamatórios não esteroídes (AINEs), infecção por *Helicobacter pylori*, hábitos de vida estressante e o uso em excesso de bebidas alcoólicas (FEINSTEIN et al., 2010; THORSEN et al., 2013). Dentro do contexto dos fatores causadores de lesão gástrica, o etilismo se destaca ao ter grande associação com o desencadeamento da gastrite. Em países desenvolvidos e em desenvolvimento, o uso de bebidas alcoólicas é bastante comum e lícito e tem crescido, especialmente entre jovens e adultos na faixa etária de 18-40 anos (ARAB et al., 2015; SCHEIDT et al., 2015).

A terapêutica atual para a gastrite usa principalmente antagonistas de receptores de histamina (H_2), análogos da prostaglandina, antiácidos e os inibidores da bomba de prótons. Contudo, a presença de efeitos adversos, associada à refratariedade de alguns pacientes, instigam a busca de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da gastrite (BRUNTON et al., 2010).

O Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio®) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, planejou e sintetizou o protótipo LASSBio-596, um híbrido de talidomida e sildenafil, com atividades anti-inflamatórias e imunomoduladoras. O composto foi planejado a partir da modificação estrutural da talidomida (fármaco anti-TNF- α), otimizando as suas propriedades farmacoterapêuticas e a eliminação dos seus efeitos teratogênicos (remoção do anel ftalimida), e hibridação molecular com sildenafil (inibidor de fosfodiesterase 5) e arilsulfonamida (protótipo seletivo de fosfodiesterase 4) (LIMA et al., 2002).

Levando em conta que LASSBio-596 é um composto bioativo sintético (LIMA et al., 2002; LIMA; LIMA, 2009) e levando em conta que a literatura já mostra a eficácia do composto em modelos experimentais de inflamação aguda do pulmão induzida pelo lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (ROCCO et al., 2003), microcistina-LR (CARVALHO et al., 2010), inflamação alérgica crônica (CAMPOS et al., 2006); e modelo de enfisema pulmonar (PADILHA et al., 2015). Surgiu o interesse em estudar os efeitos de LASSBio-596 na inflamação gástrica, uma vez que o composto apresenta efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores.

2.0. Referencial teórico

2.1. Química medicinal

A Química Medicinal, segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), envolve o planejamento, descoberta, invenção, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos (protótipos); o estudo do metabolismo, interpretação do mecanismo de ação a nível molecular e a construção das relações entre estrutura química e a atividade farmacológica (IUPAC, 1998).

No planejamento de novos fármacos, os estudos de reconhecimento molecular em sistemas biológicos assumem grande importância, pois constituem as bases fundamentais para o entendimento das propriedades como potência, afinidade e seletividade. O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos (figura 1) é dividido em duas extensas fases, a pré-clínica e a fase clínica dividida em três estágios, onde é visto a toxicidade do composto. Nos estágios iniciais da fase pré-clínica, as pesquisas se concentram geralmente na identificação e otimização de moléculas capazes de representar novos protótipos, simbióticos ou não (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

Entende-se por agente simbiótico, o protótipo desenhado para atuar no mínimo em dois alvos moleculares pertencentes a janelas bioquímicas

distintas, porém, envolvidos em uma mesma resposta fisiopatológica (LIMA; LIMA, 2009).

Figura 1 - Etapas do processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos (ADME – absorção, distribuição, metabolismo e excreção; NDA – solicitação para um novo fármaco, do inglês new drug application).



Fonte: (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

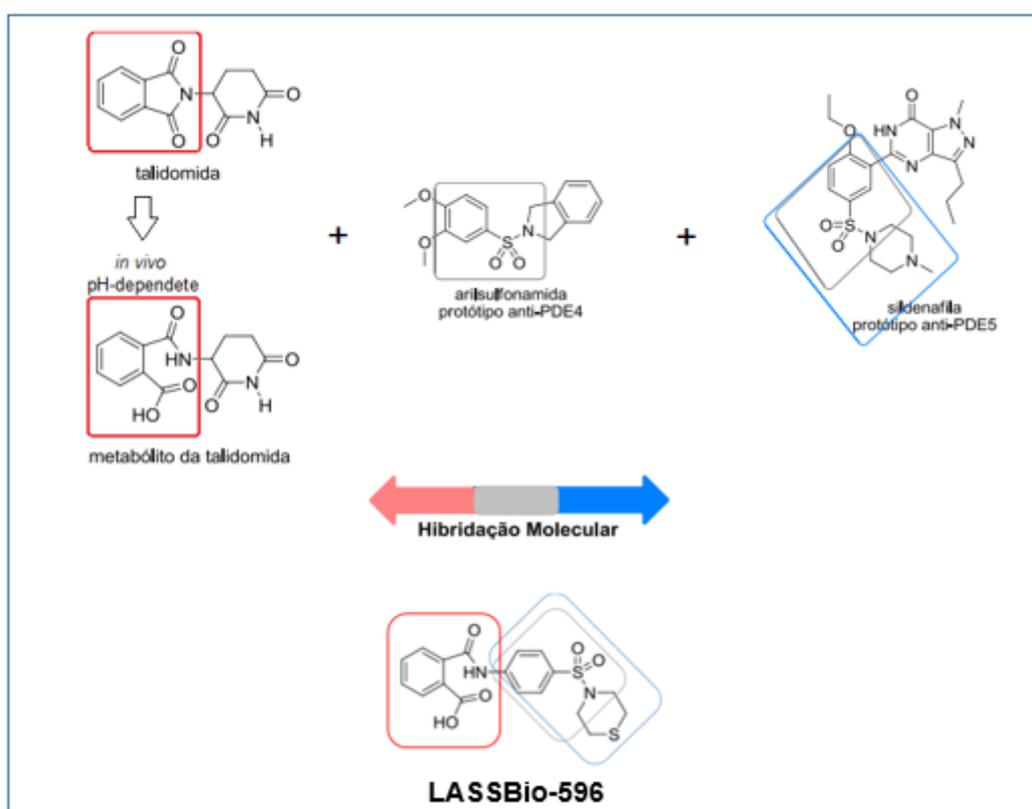
Considerando tais conhecimentos, o Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio®) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, tem planejado e desenvolvido novas moléculas bioativas com inúmeros efeitos biológicos, tais como: anti-inflamatórios, analgésicos, anti-protozoários, cardioativos, vasodilatores, entre outros, para tratamento de desordens crônicas degenerativas como: artrite, asma, câncer, doença de chagas e alzheimer (LIMA, 2007).

2.2. LASSBio-596

O LASSBio® está inserido no Programa de Desenvolvimento de Novos Fármacos, e com intuito de desenvolver novos fármacos anti-inflamatórios para o tratamento de doenças crônicas, foi planejado e sintetizado um composto simbiótico LASSBio-596. O efeito anti-inflamatório do ácido 2-[4-(1,4-tiazinan-4-ilsulfonil)fenilcarbamoil]benzóico ou LASSBio-596 foi descrito em modelo de inflamação pulmonar aguda. O composto foi planejado a partir da modificação estrutural da talidomida (fármaco anti-TNF- α), otimizando os seus efeitos farmacológicos e eliminação do seu efeito teratogênico (remoção do anel

phtalimida), e hibridação molecular com o grupo farmacofórico do sildenafil (inibidor de fosfodiesterase 5) e arilsulfonamida (protótipo seletivo de fosfodiesterase 4). Após processo de dissecção molecular, com identificação dos grupos farmacofóricos, procedeu-se a etapa de combinação dos farmacóforos selecionados, empregando-se a estratégia de hibridação molecular (figura 2) (Lima et al., 2002).

Figura 2 – Planejamento e obtenção do LASSBio-596



Fonte: (LIMA; LIMA, 2009)

O potencial terapêutico de LASSBio-596 têm sido estudado em modelos experimentais de inflamação aguda do pulmão induzida pelo lipopolissacarídeo *Escherichia coli* (Rocco et al., 2003), microcistina-LR (Carvalho et al., 2010), e inflamação alérgica crônica (Campos et al., 2006). O efeito anti-inflamatório foi descrito ainda em modelo de enfisema pulmonar (Calverley, 2014; Padilha et al., 2015).

A talidomida constituinte da estrutura de LASSBio-596 é um potente inibidor da resposta inflamatória, principalmente através da inibição da atividade de TNF- α (MOREIRA et al., 1993). Porém seu uso resultou no maior desastre médico, onde mais de 10.000 crianças nasceram com uma série de malformações graves e debilitantes (WATKINS; STUBBS; LEWIN, 1961). Além disso, houve também aumento das taxas de aborto espontâneo (VARGESSON, 2009). Durante o planejamento de LASSBio-596 foi retirado da estrutura química da talidomida o anel ftalimida, responsável pelo efeito teratogênico, na busca de encontrar um fármaco com ação similar a talidomida, porém sem efeitos indesejados (LIMA et al., 2002).

Dentro deste contexto, no modelo de inflamação aguda do pulmão usando tóxina das microcistinas, LASSBio-596 reduziu os níveis de TNF- α , uma citocina secretada por macrófagos durante a inflamação, que possui atividades pró-inflamatória e imunomoduladora (CASQUILHO et al., 2011). Em baixas concentrações o TNF- α exerce sua função através de ações do tipo parácrina e autócrina, regulando a ativação de células endoteliais e migração de leucócitos, através da indução das moléculas de adesão. Em altas concentrações o TNF- α exerce ações do tipo endócrina, estando associado a vários tipos de enfermidades, dentre elas a gastrite (BLACK et al., 1997; TRACEY, M.D; CERAMI, PH.D, 1994).

Outro fármaco usado para a síntese de LASSBio-596 foi o sildenafil, usado rotineiramente para tratar disfunção erétil e pulmonar, porém seu uso em altas doses tem efeitos indesejáveis como o priapismo (EFREMOV et al., 2017; KRAVIS; LUGNIER, 2012). Contudo, foi retirado da estrutura química do sildenafil o anel responsável pelo aparecimento do priapismo em homens (LIMA et al., 2002).

O mecanismo molecular de sildenafil é inibir de forma seletiva a fosfodiesterase 5 (PDE-5), por sua vez catalisar a hidrólise de GMPc, levando a um efeito relaxante nas células musculares lisas das arteríolas, melhorando o fluxo sanguíneo e promovendo vasodilatação (EFREMOV et al., 2017). Medeiros et al. (2008) usou sildenafil para tratar danos na mucosa gástrica ocasionados pelo etanol, onde foi possível observar uma diminuição da peroxidação lipídica e restauração dos níveis de GSH, bem

como houve uma redução dos parâmetros hemorrágicos. Todos esses efeitos foram dependentes da síntese de óxido nítrico, mostrando que parte dos efeitos de sildenafil dependem dos níveis de NO (MEDEIROS et al., 2008). Além disso, seu efeito anti-inflamatório do fármaco tem sido descrito, reduzindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β (CHEN et al., 2017). Reduzindo assim, aderência e infiltração de granulócitos nos tecidos lesados (SANTOS et al., 2005).

Rocco et al. (2010), constaram que LASSBio-596 apresentou ausência de efeito genotóxico e/ou mutagênico *in vitro* em diferentes linhagens de células, baixa biodisponibilidade e curto tempo de meia-vida, quando administrado pela via oral. Não induziu mortes em murinos nos ensaios de toxicidade aguda (em dose 200 vezes superior a necessária ao efeito anti-inflamatório) e toxicidade crônica (em doses até 25 vezes maior aquela necessária ao efeito antiasmático), embora, alterações histopatológicas e hematológicas pontuais tenham sido observadas com o uso crônico (90 dias consecutivos) de LASSBio-596 (ROCCO et al., 2010).

Araujo et al. (2014), avaliaram um número maior de parâmetros bioquímicos e imunológicos; e a variação de peso dos órgãos, usando doses de 5 e 25 vezes maior a dose habitual durante 90 dias. Nos parâmetros imunológicos foi possível notar apenas uma leve diminuição dos níveis de granulócitos e plaquetas. Os pesos do coração, pulmão, rins e fígado reduziram levemente quando comparado ao grupo controle. Os parâmetros bioquímicos na sua grande maioria se mantiveram intactos. Porém os níveis de creatina quinase (frequentemente aumentado em lesões cardíacas) aumentaram de forma significativa. Além disso, foram realizados testes com embriões de peixe zebra onde demonstraram cardiotoxicidade, com o uso de LASSBio-596 na água do aquário (ARAUJO et al., 2014).

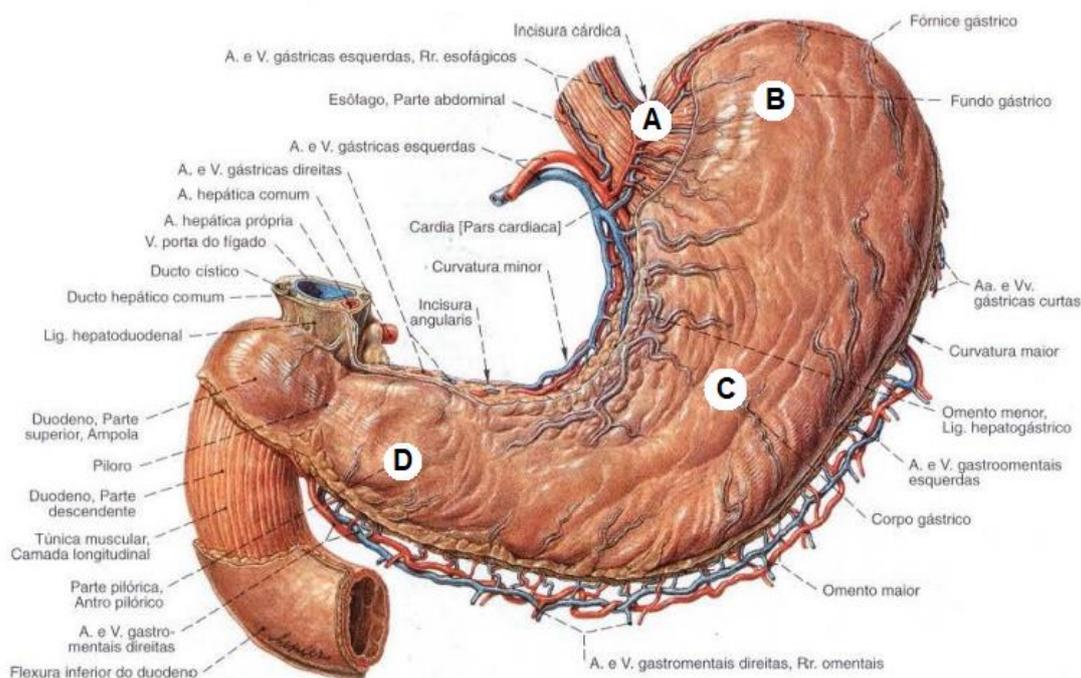
2.3. O estômago: aspectos anatômicos e fisiológicos

O estômago é uma parte expandida do tubo digestório que se situa abaixo do diafragma e conecta o esôfago ao intestino delgado. Seu tamanho e posição variam consideravelmente, dependendo da posição do corpo, da fase

da respiração e se está vazio ou cheio (MOORE; DALLEY; AGUR, 2012). Sua principal função é a digestão parcial dos alimentos, através de mecanismos que envolvem a liberação de secreção gástrica com baixo pH e pela liberação de enzimas e hormônios (funções exócrinas e endócrinas). O bolo alimentar ao passar pelo estômago é transformado em uma massa viscosa (quimo) por meio da atividade muscular e química da mucosa gástrica. A digestão química se deve a adição de ácido gástrico (ácido clorídrico - HCl) ao alimento ingerido e digestão parcial de proteínas (ação da pepsina) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

A anatomia macroscópica subdivide o estômago em quatro regiões: a cárdia, o fundo, o corpo e o antro pilórico (figura 3). A cárdia circunda o óstio cárdico, abertura superior ou entrada do estômago, que contém glândulas cárdicas; o fundo é a maior parte do estômago, situa-se a cima do nível de uma linha horizontal traçada através do orifício esofágico, que contém as glândulas gástricas; o corpo situa-se abaixo dessa linha; e a parte antro-pilórica, região afunilada que leva ao piloro e saída do estômago, que contém as glândulas pilóricas (ROSS; PAWLINA, 2012).

Figura 03 – Anatômia do estômago. (A) Incisura cárdica, (B) Fundo gástrico, (C), Corpo gástrico, (D) Antro pilórico.



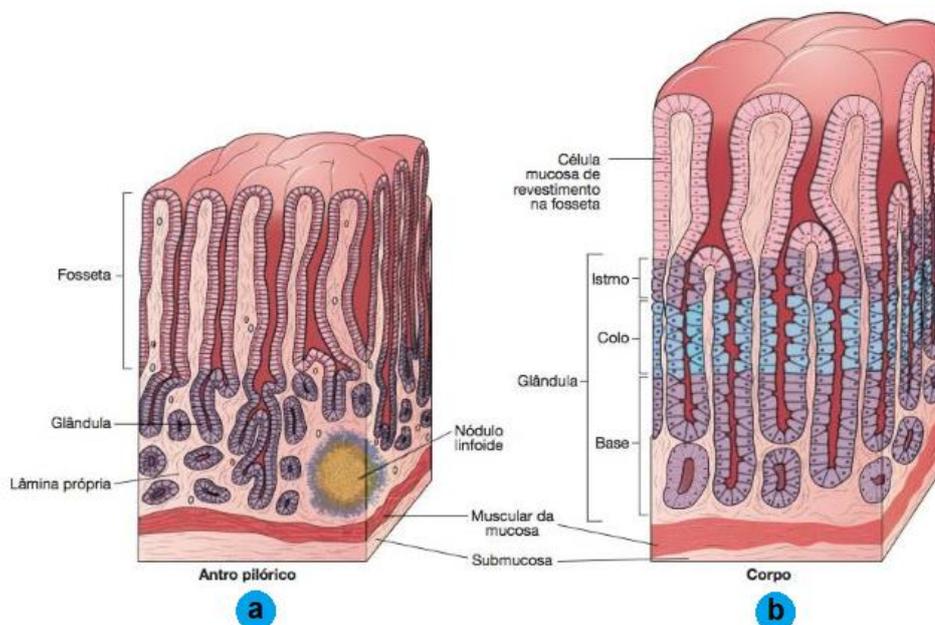
Fonte: (SOBOTTA, 2013)

A inervação do estômago é realizada intrinsecamente pelo o sistema nervoso entérico (SNE), constituído pelo plexo submucoso e plexo mioentérico, e extrinsecamente pelo sistema nervoso autônomo (SNA), a partir do nervo vago e pelo gânglio pré-vertebral celíaco (KOEPPEN; STANTON, 2009). Fenômenos fisiológicos tais como secreção ácida, motilidade, respostas primárias a estímulos químicos e mecânicos são regulados pela liberação de vários mediadores como acetilcolina (ACh), noradrenalina, purinas e óxido nítrico (NO) (WIDMAIER; RAFF; STRANG, 2013).

Histologicamente, o estômago é dividido em quatro camadas com base no tipo de glândula que cada uma contém. Entretanto, o estômago tem o mesmo plano estrutural em toda a sua extensão, consistindo em mucosa, submucosa, muscular externa e serosa (figura 4) (ROSS; PAWLINA, 2012). A cárdia e o antro são revestidos principalmente por células foveolares secretoras de mucina que formam as pequenas glândulas. As glândulas antrais são similares, mas contêm células endócrinas, tais como as células G, que liberam gastrina para estimular a secreção luminal de ácido pelas células parietais dentro do fundo e do corpo gástrico. As glândulas bem desenvolvidas do corpo e do fundo também contêm células principais que produzem e secretam enzimas digestivas, tal como a pepsina (KUMAR et al., 2010).

A mucosa gástrica é formada por epitélio glandular, cuja unidade secretora é tubular e ramificada e desemboca na superfície, em uma área denominada fosseta gástrica. Todo o epitélio gástrico (colunar simples) está em contato com tecido conjuntivo frouxo (lâmina própria), que contém células musculares lisas e células linfóides. Separando a mucosa da submucosa adjacente, existe uma camada de músculo liso, a muscular da mucosa. Quando observado em microscópio é possível observar numerosas invaginações do epitélio de revestimento (aberturas das fossetas gástricas). As células epiteliais da superfície do estômago secretam muco alcalino, composto por água (95%), glicoproteínas e lipídeos. O bicarbonato, também secretado por essas células, forma um gradiente de pH que varia de 1 (porção luminal) a 7 (superfície celular). Na lâmina própria e submucosa existe uma rede de vasos, que possibilita a nutrição e a remoção de metabólicos tóxicos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Figura 04 – Camadas que compõem a parede do estômago. (a) Regiões que compõem o Antro Pilórico; (b) Regiões que compõem o corpo.



Fonte: (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

2.4. Fisiologia da secreção gástrica

O estômago é um importante órgão na digestão mecânica e química dos alimentos. O principal mecanismo de digestão se inicia na liberação de suco gástrico. O suco gástrico ácido atua como uma barreira contra os agentes patogênicos ingeridos e torna possível a digestão enzimática. Durante a digestão, o pH do lúmen gástrico alcança valores entre 1 a 2, o que requer células especializadas para produzir e secretar grandes quantidades de íons de Cl^- e H^+ . Essas células são chamadas células parietais e estão localizadas principalmente na mucosa oxíntica (SCHUBERT, 2010). A secreção de ácido gástrico deve ser rigorosamente regulada para não exceder os fatores de proteção e gerar uma lesão gástrica. Dentro deste contexto existem vários mecanismos que regulam a secreção gástrica, dentre eles, secreção de gastrina (estimula a secreção) pelas células G do antro gástrico, células enterocromafins (ECL) e somatostatina (inibição de hormônios gástricos), além

da estimulação neuronal e mecânica, participam de uma rede regulatória que, em última instância, controla a secreção de ácido por células parietais. Um desequilíbrio em mecanismos de proteção ou regulação da secreção de ácido pode levar a hipersecreção e a doenças gastrointestinais (EL-SERAG et al., 2014).

As células parietais são células epiteliais altamente especializadas, com características morfológicas distintas que autorregulam a secreção ácida. Em estado de repouso, a membrana plasmática apical da célula parietal apresenta pequenas invaginações que se desenvolvem em todo o interior da célula. A membrana das células parietais apresentam receptores responsáveis pela bomba de prótons H^+/K^+ -ATPase, cuja função é liberar íons de H^+ na secreção gástrica (DUMAN et al., 2002; FORTE; YAO, 1996).

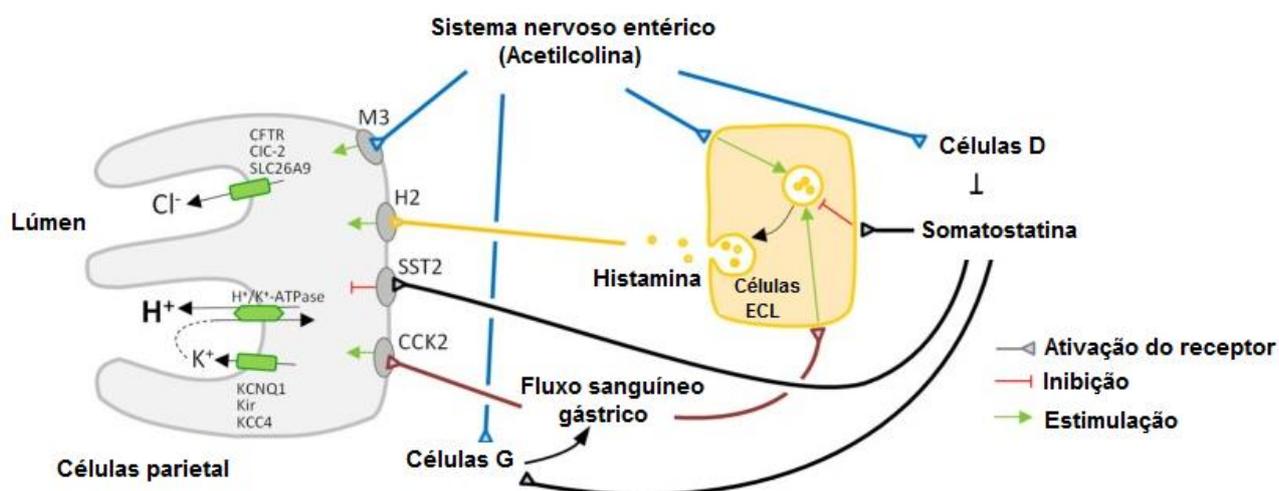
A bomba H^+/K^+ -ATPase troca um íon de hidrogênio intracelular para um íon de potássio extracelular, acoplada a hidrólise de ATP no processo. Este mecanismo ocorre juntamente com extrusão de Cl^- via canais de cloreto e potássio na membrana apical das células parietais, a formação do ácido clorídrico se dá no lúmen gástrico, quando os íons H^+ se encontram com os íons de Cl^- . (PAN et al., 2008a; SIDANI et al., 2007).

As células parietais recebem estimulação vagal direta, geralmente mediada por neurônios colinérgicos do sistema nervoso entérico. ACh atua através de receptores muscarínicos M3 (KAJIMURA; REUBEN; SACHS, 1992) e induz a mobilização de Ca^{2+} do retículo endoplasmático liso através da ativação de fosfolipase C e elevação de inositol trifosfato (CHEW; BROWN, 1986; SCHUBERT, 2010). O Ca^{2+} subseqüentemente ativa várias cinases, como a proteína quinase II dependente do cálcio/calmodulina (CaMK II) e a proteína quinase C (PKC), que juntas controlam a quantidade de intracelular de Ca^{2+} e sensibilizam a célula parietal para liberação de secreção gástrica (FÄHRMANN et al., 2002; TSUNODA et al., 1992).

Em resumo a secreção ácida é regulada por uma rede de componentes parácrinos (histamina, somatostatina), endócrinos (gastrina, somatostatina) e neurais (acetilcolina). Envolve a intercomunicação de células parietais com células especializadas da mucosa gástrica (células ECL no corpo e fundo de

estômago, células G no antro e células D no antro, corpo e fundo de estômago) e neurônios (figura 05) (ARIN et al., 2017).

Figura 05. Principais mecanismos envolvidos na secreção ácida no estômago. A secreção de ácido clorídrico pela célula parietal requer três processos de transporte iônico: uma troca mediada por H^+/K^+ -ATPase de íons H^+ intracelular por um íon de K^+ extracelular e secreção de cloreto e reaproveitamento de K^+ , que são necessários para manter a eletroneutralidade e a depleção de potássio luminal. A secreção é principalmente regulada pela ativação: (i) dos receptores de acetilcolina, histamina e gastrina que são principalmente segregados pelo sistema nervoso entérico, células ECL e células G, respectivamente, e (ii) de receptores de somatostatina que inibem a produção da secreção gástrica.



FONTE: (ARIN et al., 2017).

2.5. Mecanismos de proteção da mucosa gástrica

Em condições normais, a integridade da mucosa é mantida por mecanismos de defesa, que incluem fatores pré-epiteliais (barreira de muco-bicarbonato) como a primeira linha de defesa; e a barreira epitelial (camada contínua de células com junções estreitas) como a segunda linha de defesa. Outros mecanismos de defesa importantes da mucosa gástrica incluem a renovação constante das células epiteliais realizada pela proliferação de células progenitoras (reguladas por fatores de crescimento, prostaglandinas e sobrevivência das células epiteliais). O fluxo de sangue é contínuo através dos microvasos, formando uma "barreira" microvascular endotelial, inervação

sensorial e geração de óxido nítrico e sulfeto de hidrogênio (Figura 6). A defesa da mucosa também é regulada, em parte, pelo sistema nervoso central (estimulação vagal, e melatonina), hormônios (gastrina, colecistocinina, grelina e corticosteróides adrenais) e fatores de crescimento como fator de crescimento endotelial (EGF) (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008a).

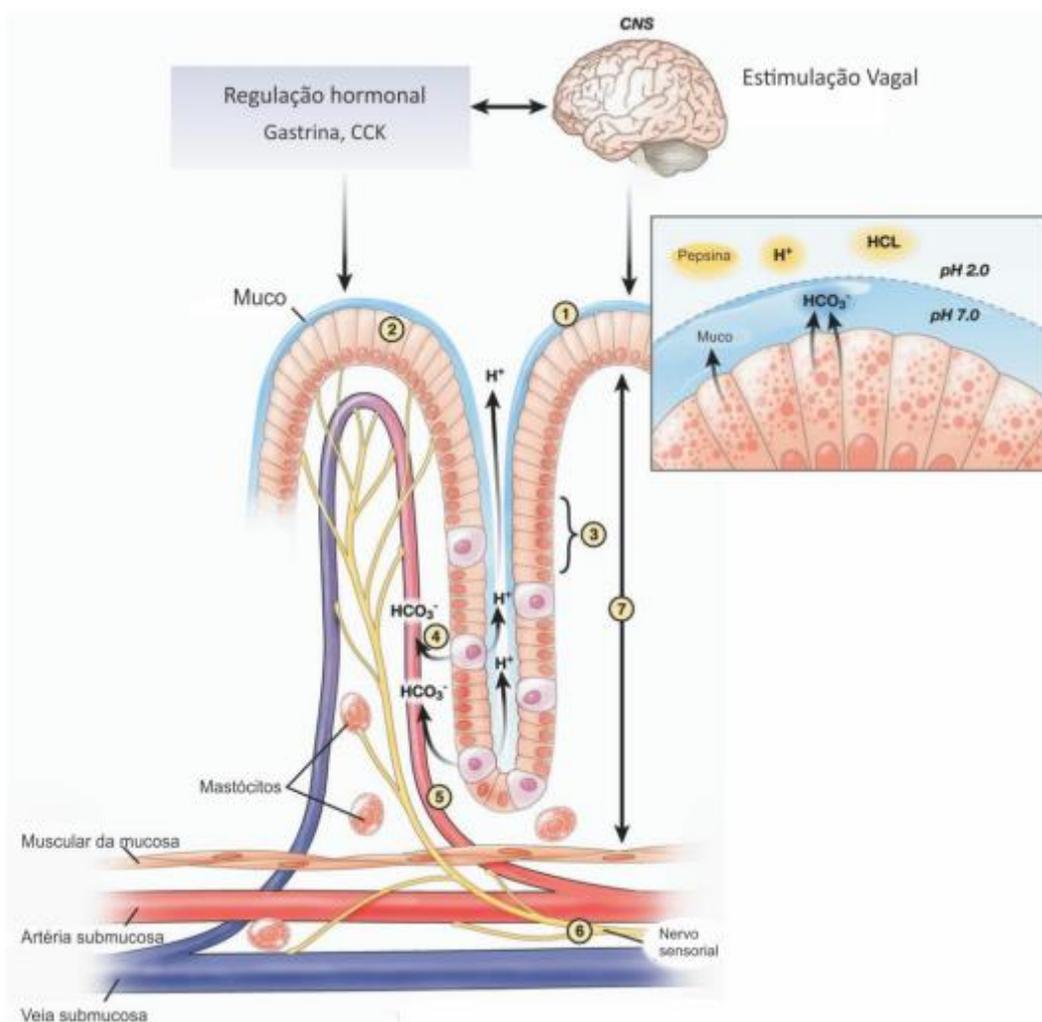
Dentre os fatores epiteliais de proteção da mucosa, a arquitetura do tecido epitelial se destaca por possuir uma camada contínua de células com junções que impedem a difusão de ácido e pepsina. Além disso, o epitélio da superfície secreta muco, bicarbonato, produz prostaglandinas, proteínas de choque térmico e catelicidinas que aceleram a cicatrização de úlceras (MONTROSE et al., 2006). Essa arquitetura ocorre devido ao rearranjo do citoesqueleto que consiste em filamentos de actinas, microtúbulos, filamentos intermediários e adesão focal (SYAM et al., 2009).

As primeiras evidências experimentais associadas a barreira muco bicarbonato foram relatadas há quase quatro décadas, como um componente fundamental dos mecanismos de proteção da mucosa gástrica contra o ácido e pepsina, mostrando existir uma barreira muco bicarbonato *in vivo* e pH próximo ao neutro na superfície epitelial (ROBERT et al., 1979, 1983). A secreção de bicarbonato forma um gradiente de pH na superfície epitelial do estômago e duodeno, fornecendo a primeira linha de defesa da mucosa contra o ácido e pepsina luminal, e as evidências apontam como o principal mecanismo de proteção contra a digestão proteolítica do epitélio da mucosa (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008a).

As prostaglandinas (PGs) são mediadores químicos celulares similares aos hormônios, porém não entram na corrente sanguínea, atuando apenas na própria célula e nas células vizinhas. Na mucosa gástrica são encontradas em altas concentrações, sendo sua existência crucial para a manutenção da integridade da mucosa e proteção contra agentes ulcerogênicos e necrozantes. Vários mecanismos de defesa da mucosa são estimulados e facilitados por PGs. As PGs inibem a secreção de ácido, estimulam a liberação de muco bicarbonato e secreção de fosfolípidos, aumentam o fluxo sanguíneo da mucosa e acelera a reconstrução epitelial e a cicatrização da mucosa. Assim, as PGs, especialmente a PGE₂, desempenham um papel importante na

homeostase gástrica (BRZOZOWSKI et al., 2005). Os receptores ativados pela PGE2 são subdivididos farmacologicamente em 4 subtipos EP1, EP2, EP3 e EP4 (COLEMAN; SMITH; NARUMIYA, 1994).

Figura 6 – Diagrama representativo das defesas da mucosa gástrica. (1) Camada de muco e bicarbonato; **(2)** Células epiteliais que secretam muco e bicarbonato, produzem prostaglandinas e proteínas de choque térmico; **(3)** Região de renovação celular estimulada por fatores de crescimento (TGF α e IGF-1); **(4)** Liberação de bicarbonato na vasculatura do estômago; **(5)** Microcirculação mantida pela contínua produção de prostaglandinas e óxido nítrico, **(6)** Nervos sensoriais que inervam a mucosa gástrica e os vasos submucosos e **(7)** Prostaglandinas (PGE) estão envolvidas nos mecanismos de defesa da mucosa e interagem sinergicamente com o óxido nítrico.



Fonte: (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008a)

As PGs podem promover a cicatrização de feridas não só através de aumentar as defesas da mucosa gástrica, mas também através de efeitos sinalizadores para proliferação celular, angiogênese, reconstrução da matriz extracelular e efeitos anti-inflamatórios, inibindo também a ativação de mastócitos, adesão de leucócitos e plaquetas ao endotélio vascular (KOBAYASHI; ARAKAWA, 1995).

Além das barreiras pré-epiteliais e epiteliais da mucosa gástrica, a terceira barreira é formada por microvasos que revestem a mucosa. A microscopia eletrônica na microvasculatura da mucosa gástrica normal, demonstra um entrelaçamento capilar muito denso em toda a mucosa gástrica e na lâmina própria adjacente às células epiteliais glandulares. Ao redor da camada muscular, os microvasos capilares se ramificam das artérias das submucosas, avançam para a lâmina própria na proximidade das glândulas gástricas e convergem na região mais luminal da lâmina própria subjacente às células da mucosa superficial (GANNON et al., 1984; ICHIKAWA et al., 1994; TARNAWSKI, 1998).

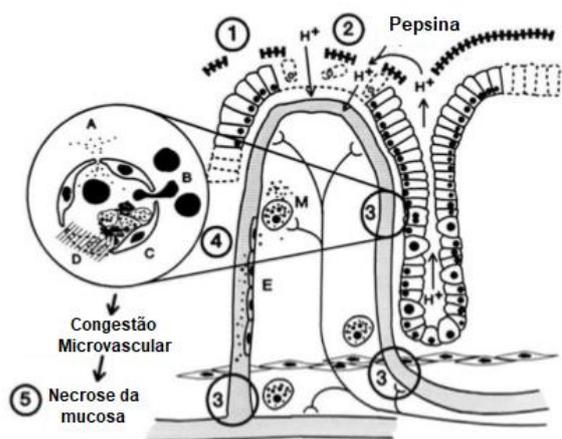
A mucosa gástrica quando exposta a um fator irritante, como AINEs e etanol, rapidamente o fluxo sanguíneo da mucosa aumenta, na tentativa de remover os agentes nocivos, promovendo também a redução do pH estomacal. A estimulação dos nervos sensoriais gástricos leva a liberação de neurotransmissores, como o péptido relacionado a gene da calcitonina e a substância P nos terminais nervosos. O peptídeo relacionado ao gene de calcitonina exerce uma ação protetora na mucosa, provavelmente através de vasodilatação de vasos submucosos mediados pela geração de óxido nítrico (NO) (HOLZER, 2012; LAMBRECHT et al., 1993).

O NO é um mediador gasoso de sinalização autócrina e parácrina, sua síntese acontece de forma fisiológica através da reação do oxigênio com a L-arginina, catalisado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) em meio que forneça oxigênio, ou em condições de hipóxia a sua produção acontece pela redução de nitrato para nitrito (LUNDBERG; WEITZBERG, 2008). O NO aumenta o fluxo sanguíneo, através da ativação da enzima guanilato ciclase, por sua vez aumenta os níveis de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) que promove a vasodilatação ao tecido gástrico (LIU et al., 2015).

2.6. Fisiopatologia da úlcera gástrica

A úlcera péptica (UP) é uma doença heterogênea, com múltiplos fatores envolvidos na sua etiologia e uma das doenças crônicas mais comuns do adulto, ocorrendo em 5 a 10% da população. O conceito fisiopatológico básico é de que a úlcera péptica resulta da ruptura do equilíbrio existente entre os fatores agressivos (ácido e pepsina) e os de proteção da mucosa gastrointestinal (figura 7). A etiopatogênese da doença ulcerosa agrupa fatores genéticos, distúrbios fisiopatológicos e fatores ambientais (DE CARVALHO, 2000).

Figura 7 - Mecanismos de lesão e histologia da úlcera gástrica. (a) A lesão da mucosa gástrica aguda resulta em: (1) interrupção da camada de muco/bicarbonato não ativada e hidrofobicidade superficial, (2) lesão e perda do epitélio superficial, (3) lesão da mucosa gástrica mais profunda: (a) células endoteliais microvasculares, (b) células da zona progenitora e (c) células parietais. (4) O dano ao endotélio capilar leva a um congestionamento microvascular dificultando o aporte de oxigênio, entrega de nutrientes, hipoxia e (5) necrose da mucosa em forma de erosão e/ou úlceras. A perda do epitélio da superfície pode ser rapidamente restaurado dentro de minutos a horas por processo de restituição, entretanto as lesões microvasculares têm consequências mais graves, uma vez que causa necrose das camadas mais profundas da mucosa. (b) Histologia da úlcera.



Fonte: (TARNAWSKI, 1998, 2005)

Histologicamente, uma UP consiste em duas estruturas principais, a margem da úlcera formada pela mucosa não necrótica adjacente (a composição epitelial) e a base, formada por tecido de granulação (o componente do tecido conjuntivo) constituído por fibroblastos, macrófagos e células endoteliais proliferativas formando novos microvasos para reestabelecer a homeostase (figura 7) (TARNAWSKI, 2005).

Inicialmente para a reparação da UP, células epiteliais e fibroblastos migram para a base formada de tecido de granulação, induzindo a re-epitelização e formação de matriz extracelular respectivamente. A migração das células epiteliais e fibroblastos dependem de fatores de crescimento como, fator de crescimento transformador beta (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e citocinas pro-inflamatórias como TNF- α e interleucina 1 (IL-1), liberadas por células inflamatórias, células endoteliais ativadas e macrófagos (SYAM et al., 2009).

2.7. Radicais livres e defesas antioxidantes

Os radicais livres são espécies altamente reativas que possuem elétrons não emparelhados em sua camada mais externa, reagindo rapidamente com as membranas causando degeneração celular e finalmente a morte. As EROs, incluindo radicais de superóxido (O_2), radicais hidroxila (OH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são gerados como subprodutos do metabolismo normal em sistemas biológicos. Baixos níveis de EROs são essenciais para vários processos fisiológicos, incluindo a fosforilação de proteínas, ativação dos fatores de transcrição, diferenciação celular, apoptose, imunidade celular e mensageiros secundários na regulação do funcionamento das células cardíacas e vasculares (RAJENDRAN et al., 2014).

A maioria dos tipos de células são capazes de gerar EROs, no entanto, as principais fontes dessas moléculas reativas são células fagocíticas, especialmente macrófagos, células de Kupffer, neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), células endoteliais e vários tipos de células epiteliais, incluindo

enterócitos, hepatócitos, células epiteliais alveolares e células epiteliais tubulares renais (FINK, 2002).

O estresse oxidativo ocorre quando o equilíbrio entre a formação e a remoção de EROs é alterado, resultando assim no acúmulo de biomoléculas oxidativas. Os sistemas de defesa celular antioxidante desempenham um papel fundamental na proteção de sistemas biológicos, regulando a produção de radicais livres e seus metabolitos (DEPONTE, 2013).

O primeiro estágio mediado pelas EROs é a peroxidação dos componentes das membranas celulares da mucosa gástrica, especialmente lipídios da membrana, chamado peroxidação lipídica. Os peróxidos lipídicos são metabolizados, para malondialdeído (MDA). Os produtos de peroxidação lipídica modificam as propriedades das membranas das células, inserindo grupos polares na região hidrofóbica da membrana, localizada dentro da bicamada lipídica; desta forma a membrana torna-se mais permeável (KWIECIEN et al., 2014).

Como forma de proteção o organismo neutraliza as EROs liberando moléculas antioxidantes (MATSUDA et al., 2013). Uma molécula antioxidante em baixa concentração combate a oxidação de proteínas, carboidratos, lipídios e DNA. As enzimas antioxidantes primárias contra os radicais superóxido incluem, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (figura 8) (SINDHI et al., 2013). Como exemplo de moléculas antioxidantes não enzimáticas temos a glutathione, o mais abundante tiol de baixo peso molecular, que geralmente se apresenta na sua forma reduzida (GSH), que exerce um papel muito importante no sistema antioxidante. Os níveis celulares de GSH são controlados por diversos mediadores enzimáticos (KIMURA et al., 2001). Em condições de estresse oxidativo, os EROs são reduzidas pela GSH com formação de dissulfido oxidado (GSSG). Existem altas concentrações de GSH no tecido gástrico glandular, talvez conferindo alguma proteção adicional dos efeitos do ácido gástrico (BHATTACHARYYA et al., 2014).

O trato gastrointestinal é fonte de espécies reativas de oxigênio (ERO). Fatores etiológicos como maus hábitos alimentares, ingestão de AINE's, consumo de álcool e patógenos podem causar inflamação no epitélio, ativando

os neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) e macrófagos para produzir citocinas inflamatórias e outros mediadores que contribuem para o estresse oxidativo. Várias condições patológicas do trato gastrointestinal, incluindo úlceras gastroduodenais, doenças malignas e doença inflamatória intestinal surgem, em parte, do estresse oxidativo (BHATTACHARYYA et al., 2014).

2.8. Mecanismos de lesão gástrica do etanol

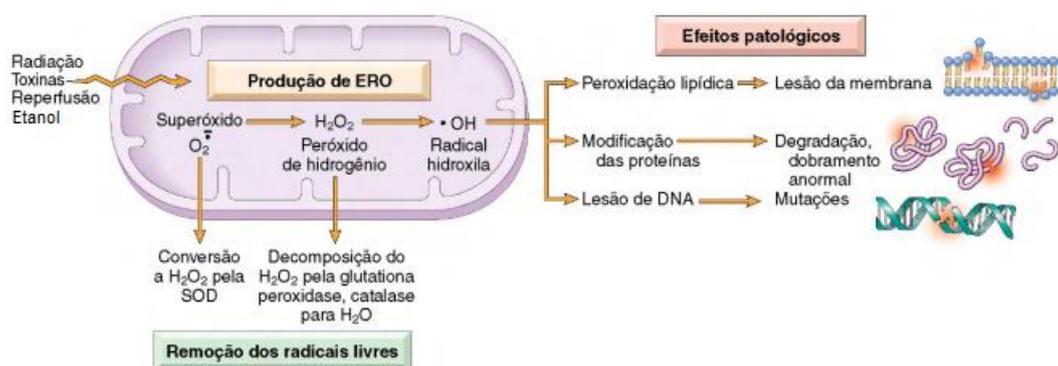
O etanol é uma substância lipofílica, portanto, penetra facilmente nas células epiteliais da mucosa e células endoteliais. A absorção do etanol se dá por difusão passiva através da parede do estômago (cerca de 20%), com os restantes 80% absorvidos pelo duodeno e parede do intestino delgado (NORBERG et al., 2003).

O mecanismo de ação do etanol parece ser tanto tópico, sobre a mucosa, quanto sistêmico, modificando a liberação de hormônios e a regulação neuronal envolvidas na secreção ácida. Estudos em humanos e animais mostram que concentrações alcoólicas superiores a 10% causam rompimento da barreira da mucosa e aumentam sua permeabilidade (BODE; BODE, 1997; FRANKE et al., 2004).

Altas concentrações de etanol induzem lesão vascular no endotélio da mucosa gástrica, com a formação de edema, lesões hemorrágicas dispersas, hemorragia focal, necrose e úlcera. Há também uma perda de células epiteliais, acompanhadas de infiltração de leucócitos difusos principalmente na mucosa e submucosa (ARAB et al., 2015; DAMASCENO et al., 2013; PAN et al., 2008b).

A infiltração de neutrófilos na mucosa gástrica é marcada com aumento da atividade da mieloperoxidase (MPO) e contribui para o dano da mucosa. A ativação de neutrófilos está associada a uma resposta inflamatória controlada com aumento da expressão gástrica do fator nuclear kappa β (NF- κ β) que controla a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF- α . Esses eventos amplificam a cascata inflamatória através da liberação de outros mediadores pró-inflamatórios, como interleucina 1 beta (IL-1 β) e aumento do recrutamento de macrófagos e neutrófilos, contribuindo para a formação de EROs, exacerbando assim a lesão gástrica (ARAB et al., 2015).

Figura 8 – Ação das enzimas antioxidantes. A imagem abaixo exemplifica a formação de espécies reativas de oxigênio e mecanismos antioxidantes nos sistemas biológicos. O ambiente redox (oxidação-redução) do interior das células impede os danos causados pelos radicais livres. Este ambiente redox é mantido pela ação de enzimas antioxidantes endógenas, como a catalase, superóxido desmutase, glutathiona peroxidase, glutathiona redutase e glutathiona reduzida. A produção excessiva ou a remoção inadequada de EROs resulta em acúmulo de radicais livres na célula que lesa os lipídios (por peroxidação), proteínas e DNA, resultando em lesão celular.



Fonte: (ABBAS; KUMAR; FAUSTO, 2016)

A lesão por etanol é mediada principalmente pela liberação de mediadores inflamatórios, devido ao aumento da produção de radicais livres de oxigênio que induzem vasoconstrição/isquemia, estresse oxidativo, peroxidação lipídica e posteriormente morte celular (PAN et al., 2008b). A intoxicação por etanol induz aumento dos produtos finais de MDA, aumento da concentração de peróxido de hidrogênio, bem como atividades de enzimas antioxidantes de depleção, como GPx, CAT e SOD, além de diminuição dos níveis de GSH gástrica (DAMASCENO et al., 2013; SELMI et al., 2017).

2.9. Medicamentos utilizados na clínica

Os fármacos utilizados no tratamento das UPs ou distúrbios ácido-pépticos são usados isoladamente ou em associações, ajudando na cicatrização das lesões gástricas. As terapias estão diretamente ligadas à diminuição da secreção ácida. Os fármacos mais utilizados são antagonistas

de receptores H₂, inibidores da bomba de prótons, antiácidos e análogos das prostaglandinas (BRUNTON et al., 2010).

2.9.1. Antiácidos

A abordagem terapêutica para UP por um longo período foi direcionada para compostos antiácidos, capazes de neutralizar a acidez gástrica como bicarbonato de sódio, carbonato de cálcio, hidróxido de alumínio e hidróxido de magnésio ou associações. Porém, por alterar o pH gástrico e urinário, os antiácidos tem a capacidade de interagir com uma variedade de fármacos através de interações farmacocinéticas de dissolução e absorção, biodisponibilidade e eliminação renal. Alguns podem também quelar fármacos e micronutrientes no trato gastrointestinal, formando complexos insolúveis que passam pelo TGI sem serem absorvidos (BRUNTON et al., 2010; SHI; KLOTZ, 2008).

2.9.2. Antagonistas de receptores de Histamina-2

A supressão da secreção de ácido gástrico começou com a introdução dos antagonistas dos receptores de histamina-2 na década de 1970. Com os melhores resultados clínicos estes fármacos inibem a produção ácida por competirem com a histamina pela ligação aos receptores H₂ na membrana basolateral das células parietais. Atualmente existem quatro diferentes antagonistas de receptores H₂, a cimetidina, a ranitidina, a famotidina e a nizatidina (YUAN; PADOL; HUNT, 2006). Por outro lado, os efeitos colaterais relacionados a essa classe de medicamentos, são cefaleia, sonolência, fadiga, dor muscular e constipação. Em longo prazo, pode agir no SNC, causando confusão, delírio e alucinações, principalmente em pacientes idosos. (BRUNTON et al., 2010).

2.9.3. Inibidores da bomba de prótons (H⁺/K⁺ATPase):

Os IBPs são bases fracas lipofílicas que atravessam a membrana da célula parietal, onde se acumulam nos canalículos secretores de ácido, os IBPs passam por um processo de protonação (ocorre quando um próton H⁺ liga-se a uma molécula), produzindo sua forma ativa que se liga de forma covalente com a enzima H⁺/K⁺ATPase que resulta em inibição da secreção ácida pela bomba de prótons (PLAYFORD; PODAS; MODLIN, 1999). O primeiro a ser comercializado foi o omeprazol, com o decorrer dos anos, outros fármacos seguiram o exemplo, como o lansoprazol (1995), o pantoprazol (1997), o rabeprazol (1999) e esomeprazol (2001) (SHI; KLOTZ, 2008). No entanto, a medida que o uso dos IBPs se expandiu, foi observado efeitos indesejáveis, os mais comuns relatados são dores de cabeça, dor abdominal, e diarreia (MCKEAGE et al., 2008). Estudos também ligaram seu uso à fratura do quadril (YANG et al., 2006), demência (GOMM et al., 2016), problemas renais (MALAVADE; HIREMATH, 2017), pneumonia (JOHNSTONE; NERENBERG; LOEB, 2010), além de provocar dificuldade de absorção de vários íons como magnésio (hipomagnesemia) e cálcio (hipocalcemia) (EPSTEIN; MCGRATH; LAW, 2006).

2.9.4. Análogos de prostaglandinas

Usado principalmente para atenuar os efeitos colaterais oriundos do uso crônico de AINEs, misoprostol um análogo sintético de PGE-1, restaura em partes os níveis de prostaglandina na mucosa gástrica, estimulando por sua vez secreção de muco, bicarbonato e aumento do fluxo sanguíneo no estômago (PARK et al., 2007; RASKIN et al., 1995). O misoprostol é bastante eficaz para combater as UP, contudo, apresenta efeitos adversos como diarreia, dor abdominal, náuseas e provoca também um aumento acentuado na contração da musculatura lisa, principalmente no útero, podendo induzir o aborto (BRUNTON et al., 2010).

3. Justificativa

Estima-se que cerca de 4 milhões de pacientes são diagnosticados com gastrite por ano (FEINSTEIN et al., 2010). No Brasil, são elevados os custos com serviços de saúde associados ao diagnóstico, tratamento e internações hospitalares envolvendo gastrite e doenças correlacionadas. De acordo com o último boletim do sistema de informações do SUS, disponibilizado pelo DATASUS, referente ao período de janeiro de 2016 a junho de 2017, foram contabilizadas 53.509 internações por gastrites, duodenites, úlceras gástricas e/ou duodenais, com custos para o Governo Federal de R\$ 12.505.006,09 em serviços hospitalares (BRASIL, 2017).

Os estudos sobre citoproteção gástrica, que visam à descoberta de substâncias gastroprotetoras são extremamente relevantes, pois apesar dos inúmeros estudos nos últimos anos, os mecanismos gastroprotetores não são completamente elucidados e é notório a necessidade de fármacos com ação preventiva e terapêutica sobre as úlceras gástricas (YU et al., 2017). Embora geralmente não apresentem condições de risco de vida, as complicações relacionadas à úlcera promovem frequentemente perda na qualidade de vida e produtividade do indivíduo acometido (WEN et al., 2014).

O álcool é considerado um dos agentes causais mais comuns da gastrite aguda, causando dissolução do muco e do componente lipoprotéico da membrana celular, afetando a capacidade protetora da mucosa e em seguida comprometendo o fluxo sanguíneo gástrico, levando a hemorragia o sinal clínico mais comum da lesão (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008b; SELMI et al., 2017).

Os inibidores de bomba de prótons, os anti-ácidos e os antagonistas H₂ são os principais fármacos utilizados no tratamento das úlceras gástricas, mas, apresentam ação gastroprotetora limitada e efeitos colaterais indesejados, diminuindo ainda mais a qualidade de vida dos pacientes (BRUNTON et al., 2010). Contudo, torna-se interessante atenuar a inflamação e fluxo sanguíneo na gastrite alcoólica. Neste contexto, investigamos o efeito gastroprotetor do LASSBio-596 na gastrite aguda induzida por álcool e participação do óxido nítrico no seu mecanismo de ação.

4.0. Objetivo geral

Avaliar o efeito gastroprotetor de LASSBio-596 sobre lesão gástrica induzida por etanol em camundongos e o possível mecanismo de ação através da inibição não seletiva da NOS e seletiva da iNOS.

4.1. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de LASSBio-596 sobre lesões macroscópicas e alterações histopatológicas do estômago em modelo de gastrite induzida por etanol 50%;
- Investigar o efeito de LASSBio-596 sobre a hemorragia gástrica através da dosagem de hemoglobina em modelo de gastrite induzida por etanol 50%;
- Avaliar o efeito de LASSBio-596 sobre a migração de neutrófilos através da atividade da mieloperoxidase (MPO) em modelo de gastrite induzida por etanol 50%;
- Investigar o efeito de LASSBio-596 sobre o estresse oxidativo através da dosagem de malondialdeído (MDA) e de glutathiona (GSH) em modelo de gastrite induzida por etanol 50%;
- Mensurar os níveis de TNF- α e IL-1 β no estômago de camundongos tratados com LASSBio-596 em modelo de gastrite induzida por etanol 50%;
- Avaliar o efeito de LASSBio-596 sobre a produção de muco protetor em modelo de gastrite induzida por etanol 50%;
- Investigar o efeito de LASSBio-596 na secreção gástrica e pH, no modelo de ligadura do piloro;
- Avaliar a participação do NO sobre o efeito gastroprotetor de LASSBio-596 em modelo de gastrite aguda induzida por etanol 50%;

5.0. Materiais e métodos

5.1. Animais

Para os ensaios *in vivo*, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) Swiss machos (20-25g) procedentes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram acondicionados em caixas plásticas de polipropileno (41 cm de comprimento x 34 cm de largura x 17 cm de altura) contendo maravalha, com 10 camundongos por caixa, em biotério com exaustor de ar, com condições adequadas de luz e temperatura (22-25°C), e receberam água e ração ad libitum. As trocas das caixas foram realizadas duas vezes por semana. Todos os princípios éticos sobre experimentação e manipulação animais foram respeitados conforme os princípios regidos pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), criado em 2008 pela Lei nº 11.794/08 (Lei Arouca). O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (UFC), sob protocolo de nº 99/2017.

5.2. Indução da gastrite por Etanol

Utilizamos o modelo experimental de gastrite aguda induzida por etanol em camundongos de acordo com metodologia descrita inicialmente por (ROBERT et al., 1979) e adaptado mais tarde para diferentes concentrações de etanol como mostra o trabalho de Medeiros et al. (2008) usando etanol 50%.

Os camundongos foram submetidos a jejum de sólidos entre 18-24h e pré-tratados com LASSBio-596 nas doses de 1, 10 e 20 mg/kg por via oral (LASSBio-596 foi dissolvido em dimetilsulfóxido – DMSO 4%). Após 30 minutos do tratamento, os animais receberam etanol 50% (0,5 mL, v.o.) para indução da gastrite aguda. Decorridos 1 hora da administração de etanol, os animais foram eutanasiados por dose excessiva de anestésico, os estômagos retirados, abertos pela grande curvatura e lavados com solução salina (NaCl 0,9 %). Para investigar a participação do NO frente a gastroproteção de LASSBio-596, administramos N^w-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) 30 minutos antes do

tratamento com LASSBio-596. Os animais foram divididos em 9 grupos de 7 animais cada, descritos a seguir:

- Salina (0,5 ml/25g, v.o.)
- DMSO 4% (0,5 ml/25g, v.o.) + etanol 50%
- Omeprazol (30 mg/kg - 0,5ml/25g, v.o.) + etanol 50%
- LASSBio-596 (0,1 mg/kg – 0,5ml/25g, v.o.)
- LASSBio-596 (1 mg/kg - 0,5ml/25g, v.o.) + etanol 50%
- LASSBio-596 (10 mg/kg - 0,5ml/25g, v.o.) + etanol 50%
- LASSBio-596 (20 mg/kg - 0,5ml/25g, v.o.) + etanol 50%
- L-NAME (3mg/kg, i.p.) + LASSBio-596 (20mg/kg - 0,5ml/25g, v.o.) + etanol 50%
- 1400w (10mg/kg, i.p.) + LASSBio-596 (20 mg/kg – 0,5ml/25g, v.o.) + etanol 50%

5.3. Avaliação macroscópica

Os estômagos foram estirados e fotografados com câmera digital para análise e medições das lesões da mucosa gástrica. A área total e lesionada do segmento glandular dos estômagos foi determinada por análise planimétrica das fotografias, através do programa de computador Image J. As áreas de lesão foram expressas em valores de percentagem em relação a área total do corpo gástrico (MEDEIROS et al., 2008).

5.4. Avaliação histopatológica

As amostras de estômago foram fixadas em solução de formol 10% por 24 horas. Em seguida foram transferidas para uma solução de álcool 70% até a realização dos procedimentos histológicos. O material biológico foi seccionado e embebido em parafina, seguidos de cortes de cinco micrometros, transferidos para a lâmina e corados com hematoxilina-eosina para o estudo no microscópio óptico. As lâminas foram avaliadas de acordo com os critérios de Laine e Weinstein, sendo avaliada a perda de células epiteliais (escores de 0-

3), edema na superfície da mucosa (escores de 0-4), hemorragia (escores de 0-4) e infiltração de células inflamatórias (escores de 0-3). Toda a avaliação histopatológica foi realizada por um avaliador experiente (SOARES, PMG) sem o conhecimento dos tratamentos (LAINE; WEINSTEIN, 1988).

5.5. Avaliações bioquímicas

5.5.1. Mensuração dos níveis de Malondialdeído (MDA)

Para a dosagem de MDA, foi utilizado o método do Tbars adaptado por Lee et al. (2012). A mistura 100mg de tecido para 1mL de dodecil sulfato de sódio ficou em banho-maria por 30min a 37°C. Em seguida foi adicionado 200mL do ácido tiobarbitúrico (0,6%) nos tubos e esta solução permanecerá em banho-maria por mais 50min a 100°C. Como padrão foi utilizada o 1,1,3,3 tetraetoxipropano. O sobrenadante foi mensurado em espectrofotômetro na faixa de 535nm (LEE et al., 2012).

5.5.2. Mensuração dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)

O método de Sedlak e Lindsay (1968) foi utilizado para análise de glutathiona nas amostras de tecido do estômago. Para determinação dos níveis de grupos sulfidrílicos não-proteicos, uma amostra de 50 a 100 mg da mucosa gástrica dos animais foi homogeneizada em 1 ml de (ácido etilenodiamino tetraacético) EDTA 0,02 M para cada 100 mg de tecido. Aliquotas de 400 µL do homogeneizado foram misturadas a 320 µL de água destilada e a 80 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação de proteínas e os tubos foram centrifugados (3.000 rpm, 20 min., 4 °C). Para 400 µL do sobrenadante foi adicionado 800 µL de tampão Tris 0,4 M (pH 8,9) e 20 µL de DTNB 0,01 M (reagente de Ellman). A mistura foi então agitada por 3 minutos e a absorbância lida a 412 nm em espectrofotômetro. As concentrações de grupos sulfidrílicos não-proteicos foram expressas em µg de NPSH/g de tecido.

5.5.3. Quantificação de hemoglobina

A presença de hemorragia na mucosa gástrica foi determinada pelo ensaio de hemoglobina, utilizando o método da cianometogemoglobina (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil). Este kit padrão de hemoglobina (Bioclin) contém o reagente de cor para detecção de hemoglobina (reagente de Drabkin). Um segmento glandular do estômago foi homogeneizado no reagente de Drabkin (100 mg de tecido por 1ml de reagente). Pouco depois, as amostras foram centrifugadas a 10.000rpm durante 10 min. Os sobrenadantes foram então removidos, filtrados utilizando um filtro de 0,22 μm e centrifugados a 10.000 rpm durante 10 min. A absorvância foi medida a 540 nm, e a concentração de hemoglobina foi lida com uma curva padrão e expressa como Hb (mg por g de tecido úmido).

5.5.4. Avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada predominantemente em grânulos azurófilos de leucócitos polimorfonucleares e tem sido usado como índice quantitativo para avaliar a inflamação em vários tecidos. Esse experimento foi realizado utilizando 1 cm do estômago, por animal, onde a amostra foi coletada e incubada com 200 μL de tampão gelado (NaCl 0,1 M, NaPO₄ 0,02 M, NaEDTA 0,012 M; pH 4,7), posteriormente, os tecidos foram homogeneizados com o auxílio de um triturador. Para tanto, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Foi realizado, um choque hipotônico no sedimento celular (pellet) com 1000 μL de NaCl 0,2%. Após nova centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C, o “pellet” foi ressuspensão em tampão NaPO₄ 0,05M (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamonio e novamente homogeneizado. A seguir, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000rpm por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, 50 μL do sobrenadante do homogenato do estômago foram colocados em placa de 96 poços para o ensaio. Em cada poço, adicionaram-se 25 μL de TMB (3, 3', 3, 3-tetramethylbenzidina; 1,6mM) e 100 μL de H₂O₂ (0,5mM) e posteriormente a placa foi incubada por 5min a 37°C. A seguir, a

reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4M. Foi realizada a quantificação dos neutrófilos a partir de uma curva padrão de neutrófilos (1×10^5 neutrófilos/poço/ $50 \mu\text{L}$). Foi determinada a absorbância em leitor de ELISA no comprimento de onda de 450nm. Os resultados foram expressos como unidade de MPO/ 5mg de tecido (BRADLEY et al., 1982).

5.6. Quantificação de citocinas

Para mensuração de citocinas, os fragmentos do estômago foram retirados dos animais para dosagem de IL-1 β e TNF- α . Os fragmentos foram adicionados em um tampão inibidor de protease ($500 \mu\text{L}$ de tampão para cada 100 mg de tecido) e depois processados em um homogenizador de tecido e centrifugado a 3000 rpm a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e incubado com $2 \mu\text{g/ml}$ de anticorpo (anticorpo de captura) diluído em tampão de bicarbonato (pH 8.2), $100 \mu\text{L}$ por poço por 24 horas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. A placa foi lavada com PBS -Tween20 a 0,1%. A reação foi bloqueada com albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem, $100 \mu\text{L}$ por poço por 2 horas à temperatura ambiente. Depois a placa foi novamente lavada usando a mesma solução. A placa foi agora incubada com a curva padrão das citocinas (TNF- α , IL-1 β) diluídas em tampão de lavagem e com as amostras de tecido, $100 \mu\text{L}$ por poço por 24 horas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. A placa foi novamente lavada e depois incubada com o anticorpo biotilado (1:1000) diluído em tampão de lavagem contendo 1% de soro por 1h à temperatura ambiente. Novamente a placa foi lavada e depois incubada com avidina-peroxidase (DAKO) diluída 1:5000 em tampão de lavagem, $100 \mu\text{L}$ por poço por 15 minutos à temperatura ambiente. A placa foi lavada e incubada com o-fenilenediaminadiidrocloreto (OPD) em tampão substrato, $100 \mu\text{L}$ por poço, no escuro à temperatura ambiente por um período que varia de 5 a 20 minutos. A reação foi parada com $150 \mu\text{L}$ por poço de H_2SO_4 1M. A intensidade da coloração foi medida em espectrofotômetro a 490 nm e os resultados foram expressos como média \pm EPM da quantidade de IL-1 β e TNF- α (TAVARES-MURTA et al., 2008).

5.7. Quantificação da secreção e pH gástrico

Para avaliar a ação antissecretória e possível alteração do pH gástrico de LASSBio-596, utilizamos a técnica de ligadura do piloro adaptada de (VISSCHER et al., 1954). Os camundongos foram anestesiados com cetamina (100 mg/Kg, i.p.) e xilazina (20 mg/Kg, i.p.), fixados em decúbito dorsal para realização de uma incisão de 2 cm na região epigástrica. O estômago foi identificado e o piloro amarrado. As seguintes doses foram administradas por via intraduodenal, LASSBio-596 (20 mg/Kg), histamina (20 mg/Kg) ou salina, em volume de 0,5 ml/Kg, logo após a ligadura do piloro. Após 4 h da cirurgia, os animais foram eutanasiados, a cárdia amarrada, para evitar perda do material secretado, e o estômago removido. O estômago foi lavado em água destilada, seco em papel filtro e mantido em béquer sobre placa de gelo. Este foi seccionado ao longo da grande curvatura e o suco gástrico removido em tubo de ensaio imerso em gelo. Os tubos foram centrifugados (3500 rpm, 10 minutos). O sobrenadante do suco gástrico foi transferido para uma proveta e o volume verificado. Foi retirado 0,1 ml de secreção gástrica, adicionado 2 gotas de fenolftaleína a 1% (indicador) e 0,9 de água destilada, o pH foi mensurado através de titulação com hidróxido de sódio a 0,01N.

5.8. Determinação do conteúdo de muco gástrico

A determinação do conteúdo de muco, que forma a barreira protetora da mucosa gástrica, foi realizada nos estômagos de camundongos, seguindo metodologia descrita por Corne e Morrissey (1974). Para isso, a região glandular do estômago foi pesada, segmentada e transferida imediatamente para solução de azul de alcian 1% (solução de sacarose 0,16 M com 0,05 M de acetato de sódio, pH 5) onde ficou por 2h. Em seguida o excesso de azul de Alcian (1%) dos segmentos foi removido deixando-os em uma solução de sacarose (0,2 M) por 15 minutos, e por mais 45 minutos em uma nova solução de sacarose (0,2 M). Após as lavagens os segmentos foram colocados em solução de cloreto de magnésio (0,5 M) e 4 mL dessa solução foram misturados em igual volume de éter dietílico. Essa mistura foi centrifugada a

3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e a absorvância mensurada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 598 nm. A quantificação do azul de alcian foi calculada através da equação da reta de regressão linear da curva de calibração com diferentes concentrações de azul de alcian. Os resultados foram expressos como micrograma de azul de alcian extraído por grama de tecido gástrico.

5.9. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando Software Prisma versão 5.0. Os dados foram serão expressos como média \pm E.P.M (SEM). Para comparação múltipla dos dados paramétricos dos testes comportamentais e farmacológicos foi utilizado à análise de variância (one way - ANOVA) e o nível de significância entre os grupos foram determinados pelos testes Bonferroni e Dunn para detectar as diferenças entre o grupo controle e tratados. Para histologia foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Dados com significância de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

6.0. Resultados

6.1. Efeito protetor de LASSBio-596 na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos: curva dose-resposta.

As avaliações macroscópicas demonstraram que os grupos pré-tratados com LASSBio-596 na dose de 0,1, 1, 10 e 20 mg/kg, com excessão da dose de 0,1 mg/kg e omeprazol reduziram significativamente as lesões gástrica, quando comparado ao grupo etanol 50% tratado apenas com o veículo (DMSO 4%). Não foi observada nenhuma lesão no grupo salina. O LASSBio-596 nas doses de 1, 10 e 20 mg/Kg reduziu significativamente as lesões em 49,18%, 78,03 e 88,92%, respectivamente, em comparação com o grupo etanol 50% pré-tratado com DMSO. Porém, a dose de 0,1 mg/kg não apresentou efeito gastroprotor signicativo, reduzindo apenas em 9,36% a lesão gástrica induzida por etanol 50%. Omeprazol (30 mg/kg) também produziu efeito gastroprotetor significativo em 57,12%. A dose de 20 mg/Kg de LASSBio-596 mostrou atividade gastroprotetora maior em comparação com 0.1, 1 e 10 mg/Kg. Portanto, a dose de 20 mg/Kg foi escolhida como a dose efetiva para os estudos posteriores (figura – 9 e 10).

Figura 9: Representação macroscópica do efeito gastroprotetor de LASSBio-596.

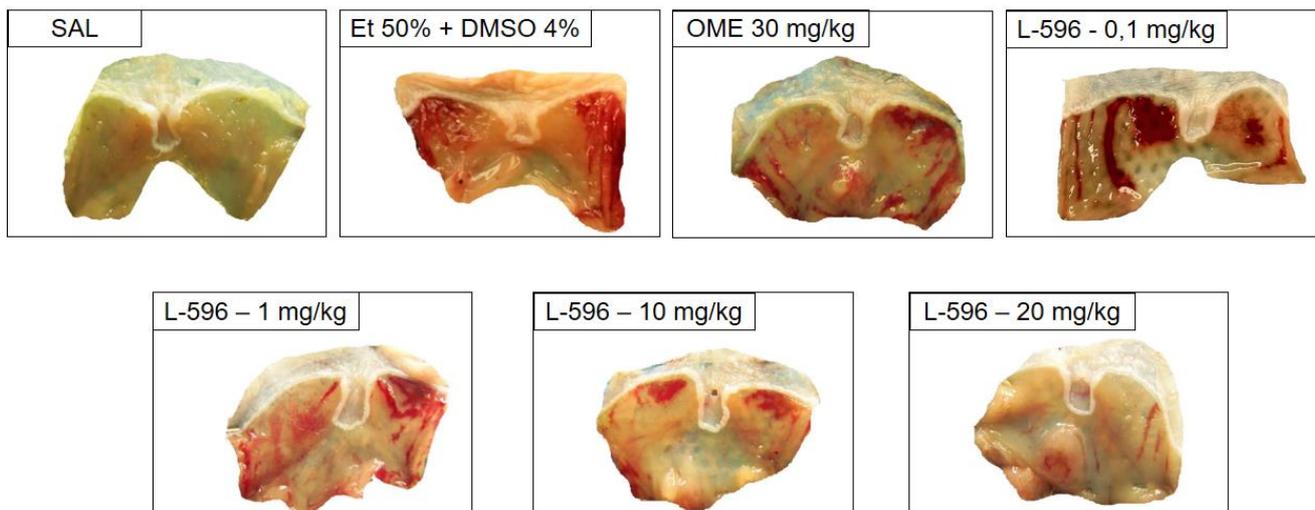
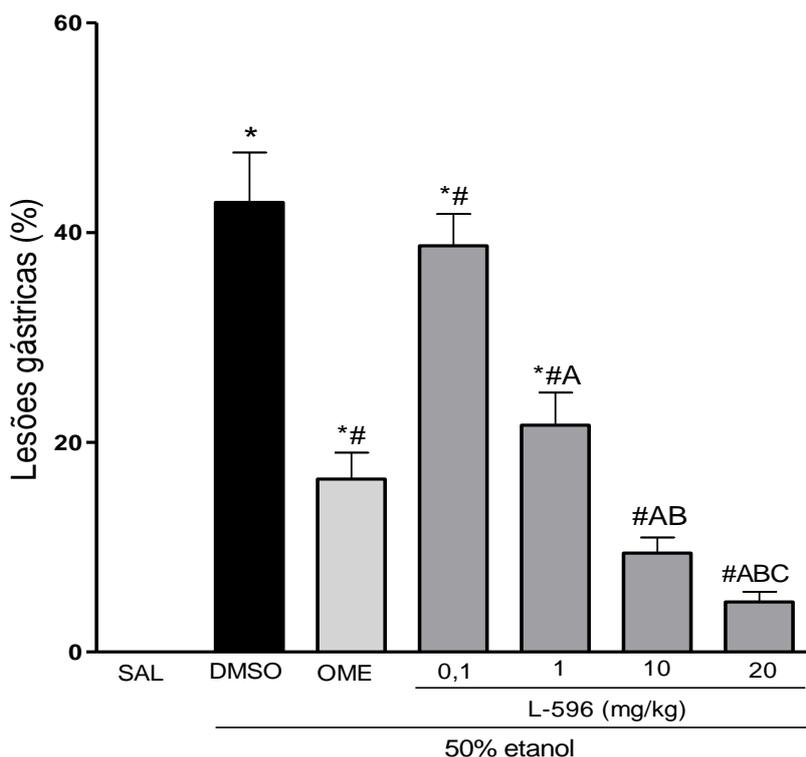


Figura 10: Efeito de LASSBio-596 sobre a macroscopia no modelo de gastrite induzida por etanol 50%. O pré-tratamento ocorreu com LASSBio-596 nas doses de 0,1, 1, 10 e 20 mg/Kg v.o. (L-596) e omeprazol 30 mg/Kg (v.o.), 30 minutos antes da indução da gastrite com etanol 50% (0,5 ml/25 g). O grupo que recebeu apenas salina (0,5 ml/25g). O índice de lesão gástrica foi analisado 1 h após a indução. Média \pm EPM (n=7). (*) $p < 0,05$ versus grupo SAL; (#) $p < 0,05$ versus grupo DMSO 4%; (A) versus LASSBio-596 0,1 mg/kg; (B) versus LASSBio-596 1 mg/kg; (C) versus LASSBio-10 mg/kg (One-way ANOVA seguida do teste de Bonferroni).



6.2. Avaliação histopatológica da mucosa gástrica de camundongos tratados com LASSBio-596

Os resultados referentes à análise histopatológica da mucosa gástrica dos camundongos estão demonstrados na Tabela 1. A referida tabela apresenta o somatório dos parâmetros histopatológicos avaliados, a saber, hemorragia (0-4), edema (0-4), perda de células (0-3), infiltrado neutrofílico (0-3). A administração de etanol 50% (v.o.) aumentou ($p < 0,05$) todos os parâmetros avaliados, em relação ao grupo controle (salina - SAL). O pré-tratamento com LASSBio-596 (L-596) reduziu de forma significativa a hemorragia e a perda de células.

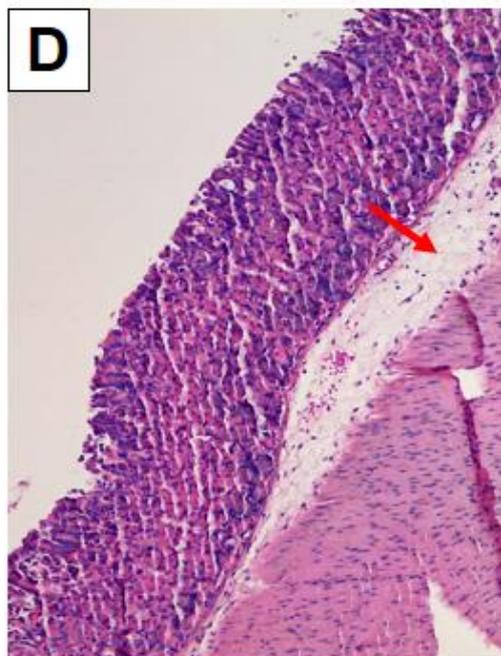
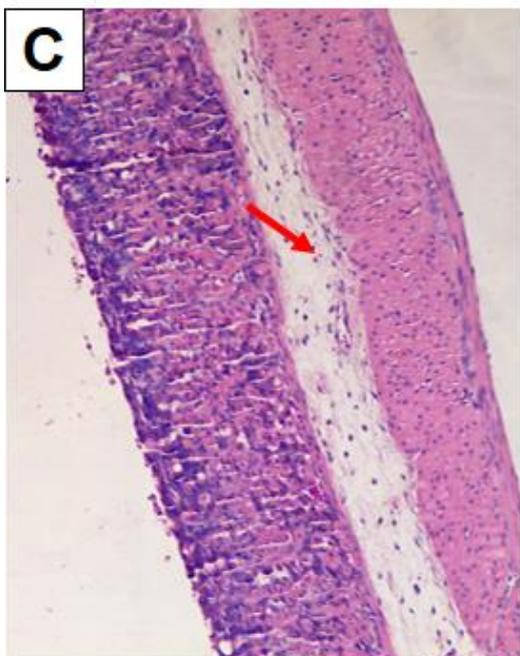
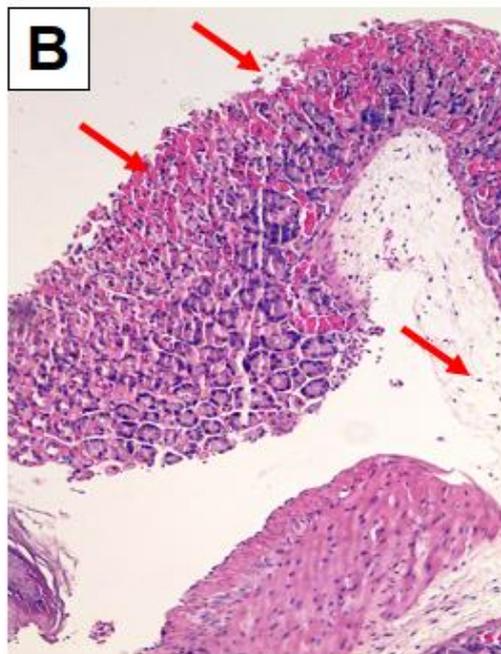
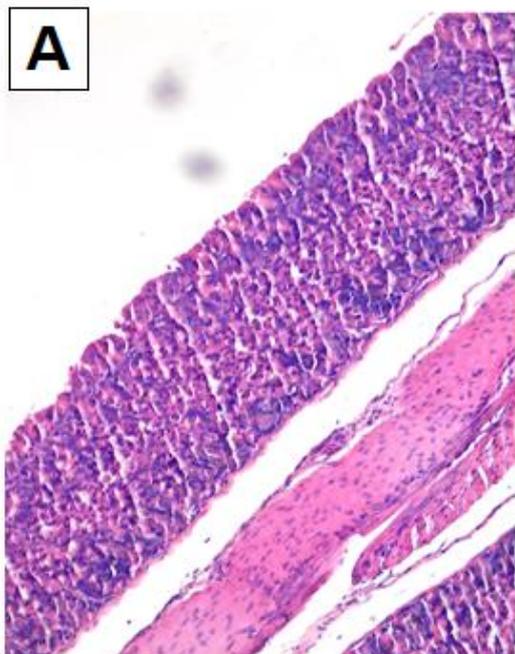
Quadro 01 – Escores das alterações histopatológicas na mucosa gástrica de camundongos submetidos às lesões gástricas induzidas por etanol e pré-tratadas com LASSBio-596

Grupos	Hemorragia (0-4)	Edema (0-4)	Perda de células (0-3)	Infiltrado neutrófilico (0-3)	Total (0-14)
SAL	0 (0-0)	1(0-1)	0,5(0-1)	0(0-1)	0(0-3)
Et 50%+ DMSO	3(2-4)*	2(2-3)*	3(2-3)*	1(1-2)*	9(8-10)*
OME	1(0-2)*	1,5(0-2)	1(0-2)*	1(0-1)	4,5(0-7)*
L-596 20 mg/kg	1(0-1)#	1,5(1-2)	1(0-1)#	1(1-2)*	4,5(3-7)#

Os dados apresentados são as medianas com pontuações mínimas e máximas mostradas entre parênteses. Cada grupo foi representado para 7 animais. Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. * $p < 0,05$ vs grupo SAL; # $p < 0,05$ vs Et 50% + DMSO.

Na figura 11, observamos a representação das alterações histopatológicas na mucosa gástrica de camundongos submetidos às lesões gástricas induzidas por etanol 50% e pré-tratados com LASSBio-596 e Omeprazol. Podemos observar uma significativa destruição da arquitetura da mucosa epitelial representada na figura 11-B, com significativa perda de células epiteliais, hemorragia e edema. Desarranjo esse que não foi observado no grupo controle salina como demonstrado na figura 11-A. No grupo pré-tratado com LASSBio-596 na dose de 20 mg/kg representado na figura 11-D, pôde-se observar uma parcial recuperação da arquitetura da mucosa epitelial. O grupo pré-tratado com omeprazol (30 mg/kg) também preservou a arquitetura do estômago como demonstrado na figura 11-C.

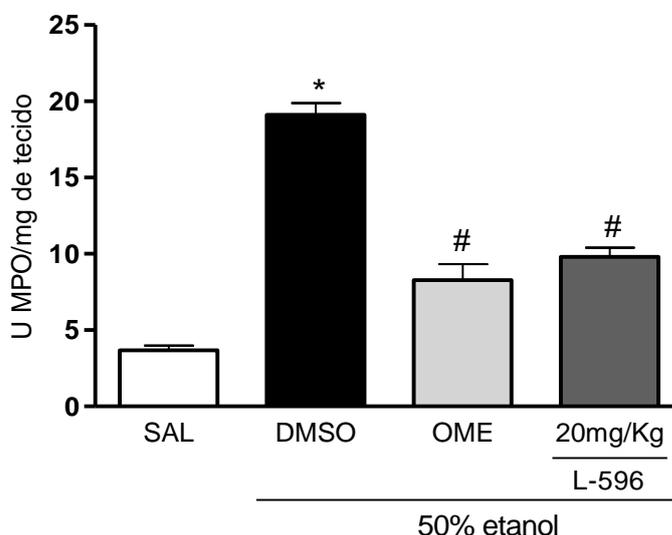
Figura 11 - Fotomicrografias de um segmento da mucosa gástrica de camundongos submetidos às lesões gástricas induzidas por etanol 50% e pré-tratados com LASSBio-596. (A) Salina, (B) Etanol 50% + DMSO, (C) Omeprazol 30 mg/kg, (D) LASSBio-596 20 mg/kg. As setas em vermelho indicam edema, hemorragia e perda de células.



6.3. Efeito gastroprotetor de LASSBio-596 sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) e os níveis de hemoglobina

O grupo etanol 50% tratado com o veículo DMSO 4% mostrou um aumento significativo ($p < 0,05$) a atividade da enzima mieloperoxidase ($19,11 \pm 0,76$ UMPO/mg tecido) quando comparada ao grupo salina ($3,68 \pm 0,30$ UMPO/mg tecido). O grupo controle tratados com omeprazol (30mg/Kg), a atividade foi revertida em 56,7% ($8,27 \pm 1,04$ UMPO/mg de tecido). No grupo que recebeu o tratamento com LASSBio-596 (20 mg/Kg) também houve uma reversão significativa de 49% ($9,811 \pm 0,60$ UMPO/mg de tecido) (Figura 12).

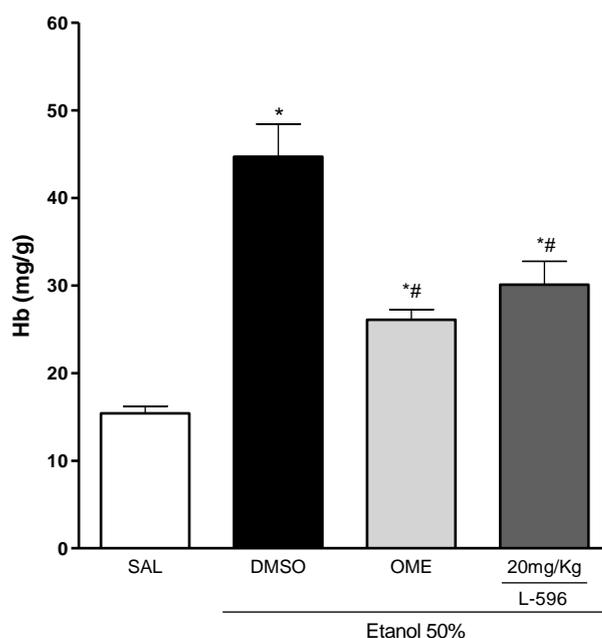
Figura 12 - Efeito de LASSBio-596 sobre a atividade da MPO na mucosa gástrica. O pré-tratamento ocorreu com LASSBio-596 20mg/Kg (v.o.) e omeprazol 30 mg/Kg (v.o.), 30 minutos antes da indução da gastrite com etanol 50% (0,5ml/25g). Grupo não-tratado recebeu salina (0,5 ml/25g - v.o.). A atividade da MPO foi analisada 1 h após a indução a partir no macerado do estômago. Média \pm EPM (n=7). * $p < 0,05$ versus grupo SAL. # $p < 0,05$ versus grupo etanol 50% pré-tratado com DMSO (One-way ANOVA seguida do teste de Bonferrini).



A figura 13 refere aos níveis de hemoglobina na mucosa gástrica dos camundongos. O grupo etanol, pré-tratado com DMSO teve um aumento

significativo dos níveis de hemoglobina ($44,71 \pm 3,74$ mg/g de tecido, $p < 0,05$) quando comparado ao grupo salina ($15,41 \pm 0,79$ mg/g de tecido, $p < 0,05$). O grupo tratado com omeprazol (30 mg/Kg), teve redução significativa dos níveis de hemoglobina ($26,10 \pm 1,159$ mg/g de tecido). O grupo tratado com LASSBio-596 reduziu significativamente os níveis de hemoglobina ($30,10 \pm 2,67$ mg/g de tecido), quando comparado ao grupo etanol 50%.

Figura 13 - Efeito de LASSBio-596 sobre os níveis de hemoglobina na mucosa gástrica. O pré-tratamento ocorreu com LASSBio-596 20mg/Kg (v.o.) e omeprazol 30mg/Kg (v.o.), 30 minutos antes da indução da gastrite com etanol 50% (0,5ml/25g). Os níveis de hemoglobina foram analisados 1 h após a indução a partir no macerado do estômago. Média \pm EPM (n=7). * $p < 0,05$ versus grupo SAL. # $p < 0,05$ versus grupo etanol 50% pré-tratado com DMSO (One-way ANOVA seguida do teste de Bonferrini).



6.4. Efeito gastroprotetor de LASSBio-596 sobre a peroxidação lipídica por dosagem de molondialdeído (MDA) e no estresse oxidativo por dosagem de glutathiona (GSH)

A administração oral de etanol 50% causou a peroxidação lipídica da mucosa gástrica, avaliada pela determinação dos níveis de MDA ($1411 \pm 143,5$, $p < 0,05$) quando comparado ao grupo salina ($253,9 \pm 17,93$, $p < 0,05$).

Nesse parâmetro, LASSBio-596 na dose de 20 mg/Kg previniu a peroxidação lipídica ($115,1 \pm 12,35$, $p < 0,05$). O grupo controle omeprazol ($165,8 \pm 19,15$), também reverteu a peroxidação lipídica (figura 14).

Etanol a 50% (0,5ml/25g; v.o.) reduziu significativamente a concentração de glutathiona reduzida ($183,4 \pm 21,28$ $\mu\text{g/g}$ de tecido, $p < 0,05$) quando comparado ao grupo salina ($409,5 \pm 49,12$ $\mu\text{g/g}$ de tecido, $p < 0,05$). O grupo pré-tratado com LASSBio-596, na dose de 20 mg/Kg previniu a redução da glutathiona ($314,7 \pm 29,66$ $\mu\text{g/g}$ de tecido, $p < 0,05$). O grupo omeprazol, também atenuou a redução dos níveis de GSH, ($285,1 \pm 15,70$ $\mu\text{g/g}$ de tecido, $p < 0,05$). (Figura 15).

Figura 14 – Avaliação de LASSBio-596 na peroxidação lipídica. O pré-tratamento ocorreu com LASSBio-596 20mg/Kg (v.o.) e omeprazol 30mg/Kg (v.o.), 30 minutos antes da indução da gastrite com etanol 50% (0,5ml/25g). A avaliação da peroxidação lipídica foi realizada 1 h após a indução a partir do macerado do estômago. Média \pm EPM (n=7). * $p < 0,05$ versus grupo SAL. # $p < 0,05$ versus grupo etanol 50% pré-tratado com DMSO (One-way ANOVA seguida do teste de Bonferrini).

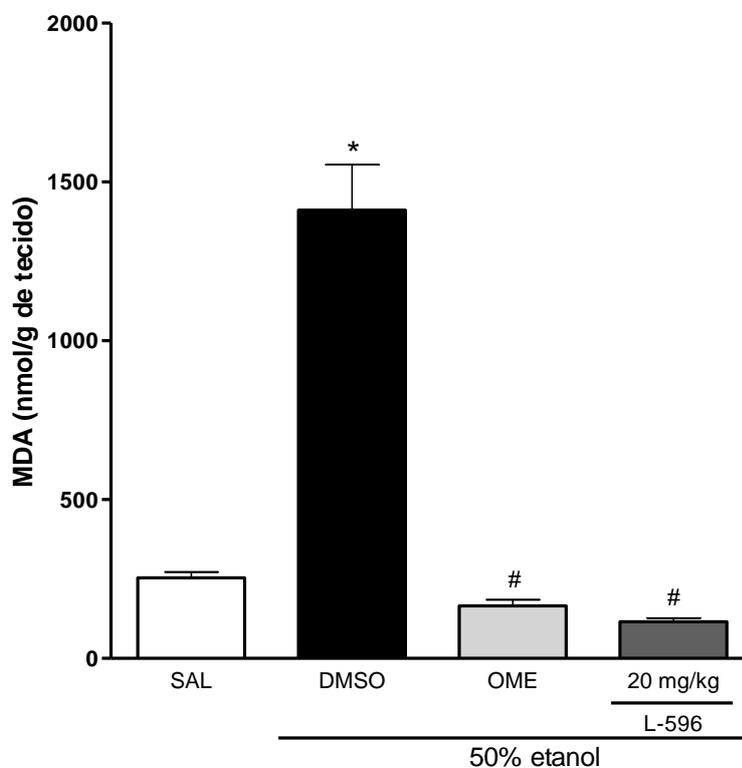
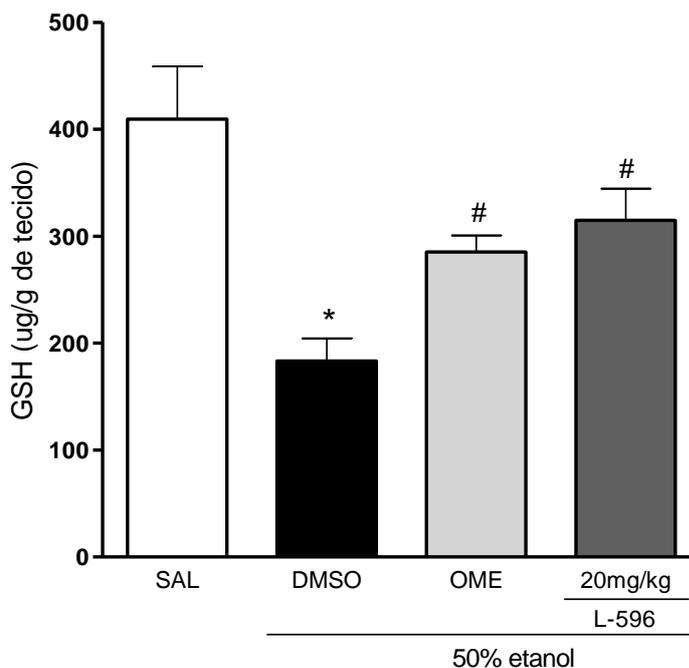


Figura 15 – Avaliação da ação gastroprotetor de LASSBio-596 nos níveis de glutatona reduzida na gastrite aguda induzida por etanol. O pré-tratamento ocorreu com LASSBio-596 20mg/Kg (v.o.) e omeprazol 30mg/Kg (v.o.), 30 minutos antes da indução da gastrite com etanol 50% (0,5ml/25g). A avaliação dos níveis de glutatona reduzida foi realizada 1 h após a indução a partir do macerado do estômago. Média \pm EPM (n=7). *p < 0,05 versus grupo SAL. #p < 0,05 versus grupo etanol 50% pré-tratado com DMSO (One-way ANOVA seguida do teste de Bonferrini).



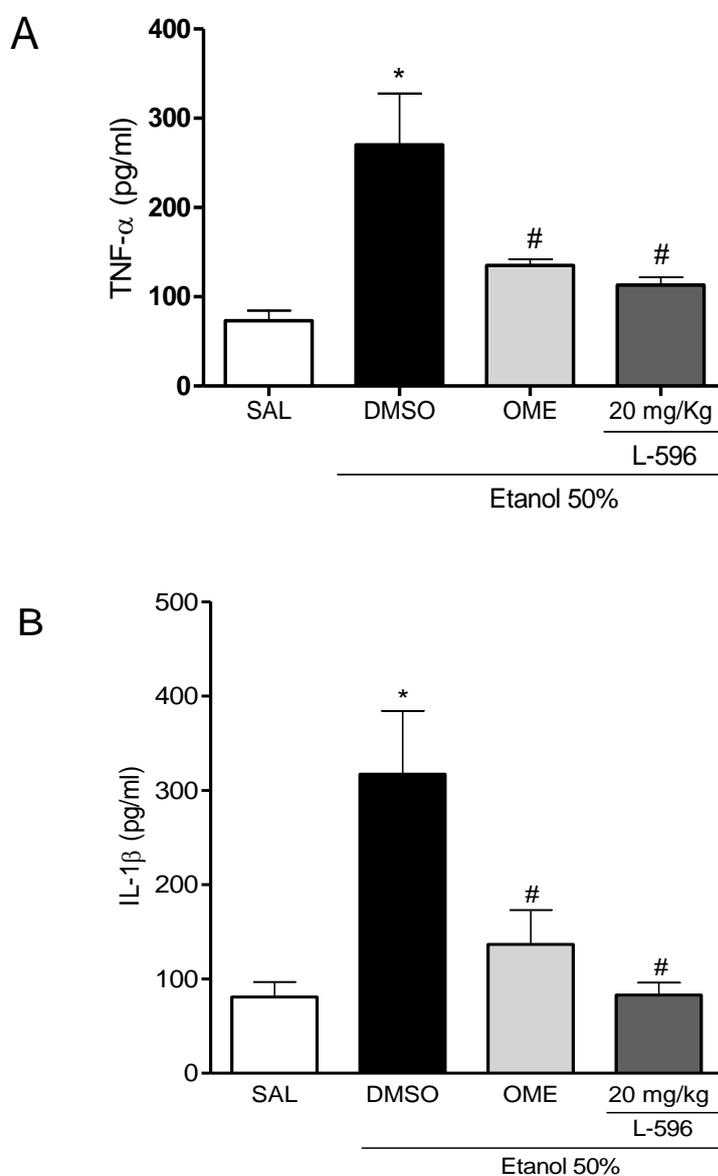
6.5. Avaliação do efeito de LASSBio-596 sobre citocinas pró-inflamatórias

Os animais com lesão gástrica pré-tratados com DMSO tiveram um aumento significativo dos níveis de TNF- α ($270,1 \pm 57,60$), quando comparado ao grupo salina ($73,07 \pm 11,58$). O pré-tratamento com LASSBio-596 (20 mg/kg, v.o.) reduziu significativamente os níveis de TNF- α em 58,12% ($113,1 \pm 8,717$). O grupo pré-tratados com omeprazol, também reduziu significativamente os níveis de TNF- α em 49,9% ($135,3 \pm 6,915$).

A figura 16B mostra que os níveis de IL-1 β na mucosa gástrica de camundongos submetidos às lesões gástricas induzidas por etanol e pré-tratados com DMSO 4% estão aumentados significativamente ($317,1 \pm 67,10$), quando comparados ao grupo salina ($80,88 \pm 15,91$). Porém, o pré-tratamento com LASSBio-596 reduziu em 73,86% ($82,86 \pm 13,30$), os níveis de IL-1 β . O grupo pré-tratado com omeprazol também reduziu significativamente os níveis

de IL-1 β , sendo essa diminuição em 56,92% ($136,6 \pm 36,49$), quando comparado ao grupo etanol 50%.

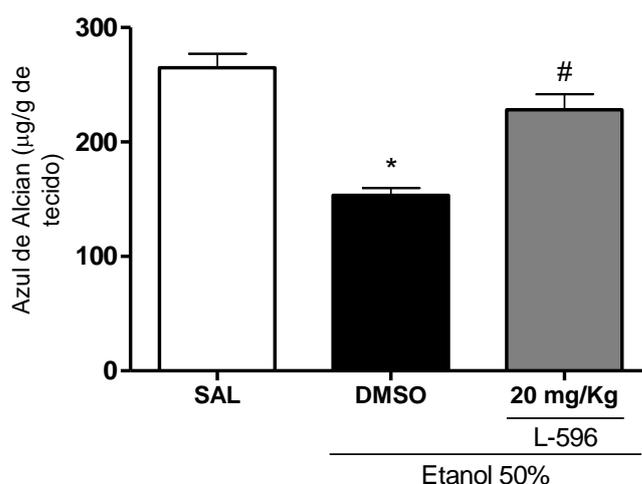
Figura 16 - Avaliação do efeito de LASSBio-596 sobre os níveis de TNF- α e IL-1 β na gastrite induzida por etanol em camundongos. O pré-tratamento ocorreu com LASSBio-596 na dose de 20mg/Kg (v.o.) e omeprazol (30 mg/Kg v.o.), 30 minutos antes da indução da gastrite com etanol 50% (0,5ml/25g). A lesão não foi induzida no grupo controle (SAL), que recebeu apenas salina (0,25ml/25g). A avaliação dos níveis de TNF- α e IL-1 β foi realizada 1 h após a indução em amostras de estômagos. Média \pm EPM (n=5). *p <0,05, versus grupo SAL. #p < 0,05 versus DMSO (One-way ANOVA seguida do teste de Bonferroni).



6.6. Efeito de LASSBio-596 sobre o conteúdo de muco gástrico

Na figura 17 observamos que os animais com lesões gástricas apresentaram redução significativa do conteúdo de muco aderido a mucosa gástrica ($153,5 \pm 6,123 \mu\text{g}$ de Azul de Alcian/g de tecido) quando comparados aos animais do grupo salina ($264,9 \pm 12,35 \mu\text{g}$ de Azul de Alcian/g de tecido). Ao passo que, os animais pré-tratados com LASSBio-596 apresentaram preservação significativa do conteúdo de muco gástrico ($228,1 \pm 13,46 \mu\text{g}$ Azul de Alcian/g de tecido), quando comparados aos animais do grupo DMSO.

Figura 17- Efeito de LASSBio-596 sobre o conteúdo de muco na mucosa gástrica de camundongos submetidos ao protocolo de lesões gástricas induzidas por etanol. Os resultados são apresentados como média \pm E.P.M. (n=7 animais) (*) $p < 0,05$ vs grupo SAL, (#) $< 0,05$ vs grupo DMSO (ANOVA “one way”, seguida do pós-teste de Bonferroni).



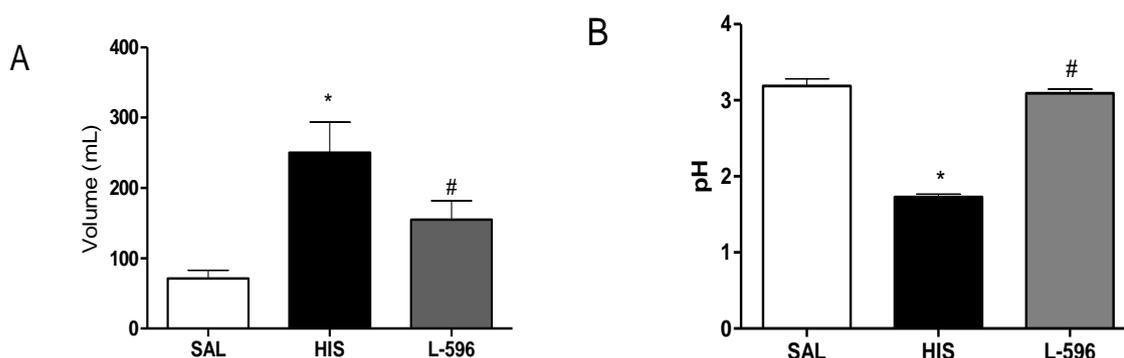
6.7. Efeito de LASSBio-596 sobre alterações da secreção e pH gástrico

A análise de secreção gástrica utilizou como controle os grupos salina e histamina. Procuramos observar a ação direta de LASSBio-596, influenciando ou não a secreção do suco gástrico. Os resultados mostram que a histamina, utilizada como droga controle para aumento no volume de secreção, mostrou aumento em torno de 3,4 vezes ($250,0 \pm 43,63 \mu\text{L}$) em relação ao grupo salina ($71,43 \pm 11,64 \mu\text{L}$), como observado na figura 18-A. O uso de LASSBio-596

não apresentou diferenças estatísticas em relação ao grupo salina ($155,0 \pm 26,86 \mu\text{L}$), porém apresentou-se menor ($p < 0,05$) que o grupo histamina.

Na figura 18B observamos que o grupo histamina quando administrado via intraduodenal, diminuiu o pH da secreção gástrica ($1,730 \pm 0,03659$, $p < 0,05$) em comparação com o grupo salina ($3,190 \pm 0,09076$, $p < 0,05$). O uso de LASSBio-596 não apresentou diferenças estatísticas comparado ao grupo salina ($3,090 \pm 0,05491$, $p < 0,05$), porém houve diferença de forma significativa com o grupo histamina.

Figura 18 - Avaliação da ação de LASSBio-596 sobre alterações na secreção e pH gástrico. Foram utilizados salina, histamina (20 mg/Kg) e LASSBio-596 (20 mg/Kg) por via intraduodenal, em volume de 0,2 ml/Kg. A avaliação do volume de secreção e pH foi realizada 4 h após a ligadura do piloro. Média \pm EPM (n=7). ANOVA t-Teste. (*) $p < 0,05$ vs grupo SAL; (#) $p < 0,05$ vs grupo HIS.

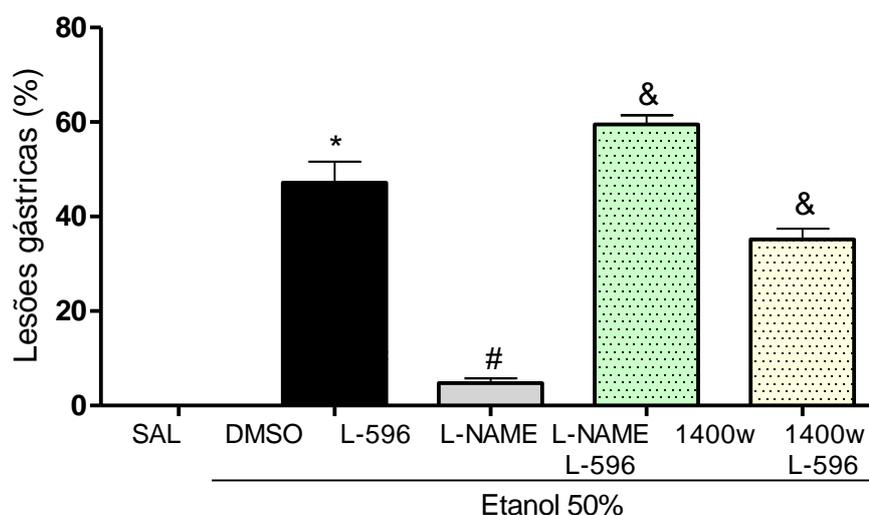


6.8.1. Influência do óxido nítrico no efeito gastroprotetor de LASSBio-596, nos parâmetros macroscópicos

O pré-tratamento com um inibidor não seletivo da NOS (L-NAME - 3 mg/Kg, i.p.) 30 min antes do LASSBio-596 reduziu significativamente ($59,48 \pm 1,975$, $p < 0,05$) o efeito gastroprotetor de LASSBio-596 (20 mg/Kg) ($4,766 \pm 0,9953$). Ademais, o grupo pré-tratado com um inibidor específico da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) 1400w ($35,16 \pm 2,272$), também apresentou redução da gastroproteção exercida por LASSBio-596. O grupo controle salina exibiu uma macroscopia intacta do tecido gástrico. Em contraste, a

percentagem de lesão foi aumentada no grupo etanol 50% pré-tratado com DMSO 4% ($47,16 \pm 4,469$).

Figura 19 – Participação do óxido nítrico no efeito gastroprotetor do LASSBio-596, avaliando o índice de lesão. O índice de lesão gástrica foi analisado 1 h após a indução, usando software Image - J. Média \pm EPM (n=7). (*) $p < 0,05$ versus grupo SAL; (#) $p < 0,05$ versus grupo etanol 50% pré-tratado apenas com DMSO; (&) versus L-596 20 mg/Kg; (One-way ANOVA seguida do teste de Bonferroni).



6.8.2. Influência do óxido nítrico sobre o efeito de LASSBio-596 na peroxidação lipídica (MDA), estresse oxidativo (GSH), hemoglobina e mieloperoxidase (MPO).

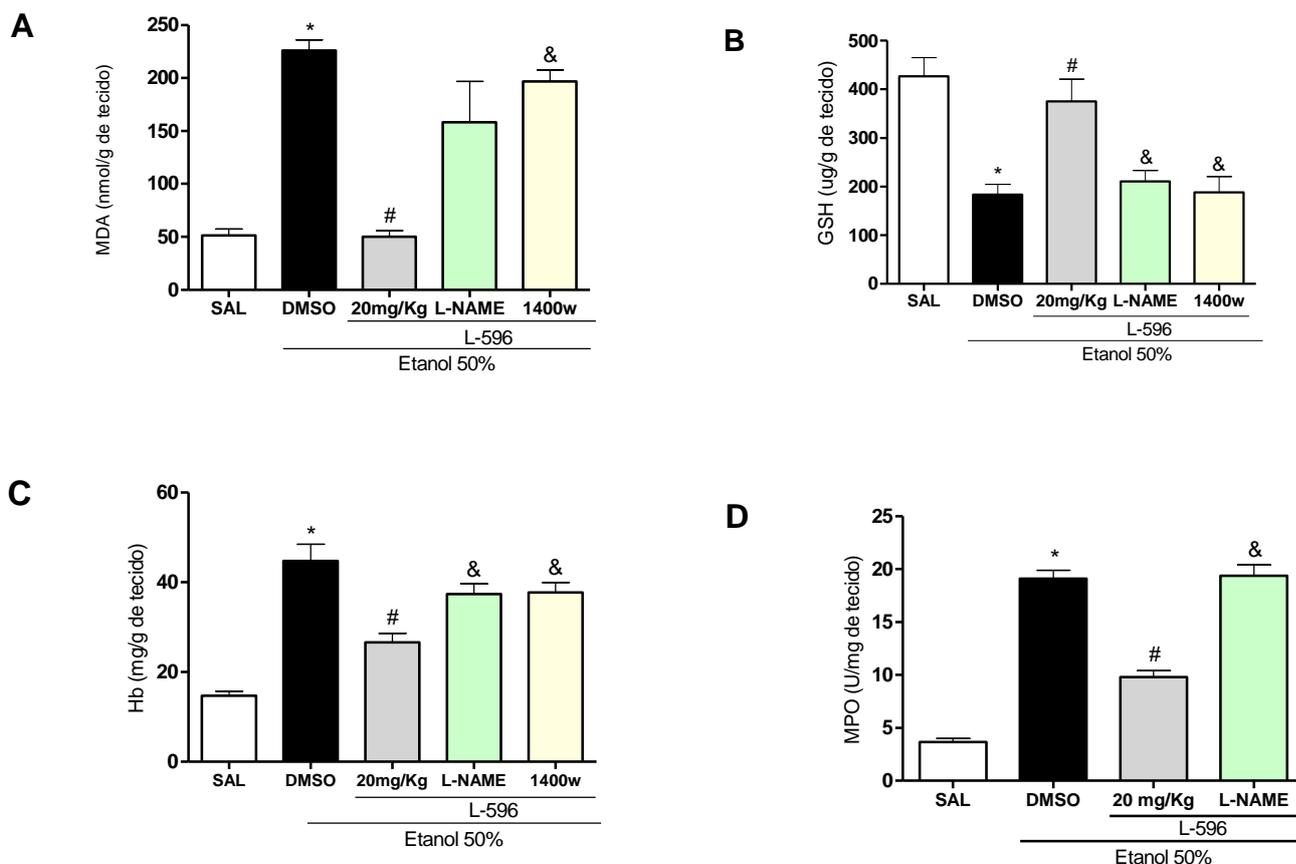
Os animais tratados com DMSO 4% antes da indução da gastrite com etanol 50%, tiveram os níveis de malondialdeído aproximadamente 4 vezes maiores ($225,9 \pm 10,23$ nmol/mg de tecido), quando comparado com o grupo salina ($51,28 \pm 6,114$ nmol/mg de tecido). Contrário a isso, animais pré-tratados com LASSBio-596 (20 mg/kg, v.o.) apresentaram redução significativa dos níveis de MDA ($50,17 \pm 5,795$ nmol/mg de tecido) no tecido gástrico, porém quando administramos L-NAME (3 mg/Kg) e 1400w (10 mg/kg) 30 minutos antes do LASSBio-596, o efeito gastroprotetor do composto foi reduzido em ($158,3 \pm 38,81$ nmol/mg de tecido) e ($196,8 \pm 10,59$ nmol/mg de tecido), respectivamente (figura 20A).

Na avaliação dos níveis de GSH no tecido gástrico, observamos que nos animais tratados com DMSO 4% antes da indução da gastrite com etanol 50%, tiveram uma redução significativa dos níveis de GSH em 57% ($183,4 \pm 21,28$ $\mu\text{g/g}$ de tecido), quando comparado ao grupo salina ($427,0 \pm 38,28$ $\mu\text{g/g}$ de tecido). Contrapondo a isso, o tratamento com LASSBio-596 aumentou os níveis de GSH para $375,1 \pm 45,92$ $\mu\text{g/g}$ de tecido, por outro lado, a administração do L-NAME (3 mg/Kg) e 1400w, 30 minutos antes do pré-tratamento de LASSBio-596, reduziu os níveis de GSH em ($210,8 \pm 22,52$ $\mu\text{g/g}$ de tecido) e ($187,9 \pm 32,56$) quando comparado ao grupo LASSBio-596 sozinho, revertendo assim o efeito anti-oxidante do composto (figura 20B).

Na análise dos níveis de hemoglobina, os animais tratados com DMSO 4% antes da indução da gastrite com etanol 50%, tiveram um aumento dos níveis de Hb ($44,71 \pm 3,747$ Hb por mg/g de tecido) comparado ao grupo salina ($14,67 \pm 1,027$). Os níveis de hemoglobina foram significativamente reduzidos pelo pré-tratamento com LASSBio-596 ($26,61 \pm 2,017$ Hb por mg/g de tecido). Entretanto, os níveis de hemoglobina foram significativamente aumentados após a administração de L-NAME ($37,33 \pm 2,355$ Hb por mg/g de tecido) e 1400w ($37,75 \pm 2,248$), os quais foram injetados 30 min antes do pré-tratamento com LASSBio-596 (figura 20C).

A atividade enzimática da mieloperoxidase nos animais tratados com DMSO 4% antes da indução da gastrite com etanol 50%, foi aumentada em 5,1 vezes ($19,11 \pm 0,7674$ U/mg de tecido), quando comparado ao grupo salina ($3,687 \pm 0,3038$ U/mg de tecido). Enquanto os animais tratados com LASSBio-596 tiveram uma redução da atividade de MPO ($9,811 \pm 0,6022$ U/mg de tecido). Em contra partida, a administração de L-NAME, 30 minutos antes do pré-tratamento com LASSBio-596 ($19,39 \pm 1,012$ U/mg de tecido) reduziu o efeito do composto (figura 20D).

Figura 20 – Efeitos da inibição da NO síntase sobre a gastroproteção de LASSBio-596, através das avaliações dos níveis de MDA, GSH, hemoglobina e MPO. Redução dos efeitos de LASSBio-596 (20 mg/Kg, por v.o.) nas avaliações de malondialdeído (MDA – figura 20A), glutatona reduzida (GSH – figura 20B), hemoglobina (figura 20C) e mieloperoxidase (MPO - 20D). Os animais foram colocados em jejum de sólidos por 18h, foram pré-tratados com L-NAME e 1400w, 30 minutos antes do LASSBio-596 e seguidos mais 30 minutos, foi administrado etanol por via oral. Média \pm EPM (n=7). *p <0,05 versus grupo SAL. #p < 0,05 versus grupo DMSO. &p <0,05 versus grupo L-596 (20 mg/Kg). (One-way ANOVA seguida do teste de Bonferroni).



7.0. Discussão

Os achados do presente estudo demonstram com expressivo ineditismo que o uso de LASSBio-596 reduz as alterações inflamatórias, morfofuncionais e o estresse oxidativo no modelo de gastrite aguda induzida por etanol em camundongos. Os efeitos gastroprotetores de LASSBio-596 estão associados a redução das lesões macroscópicas e microscópicas, diminuição dos níveis de TNF- α e IL-1 β , redução dos níveis de hemoglobina, atenuação do infiltrado neutrofílico (atividade de MPO), prevenção do consumo de glutathiona reduzida (GSH), redução dos níveis de malondialdeído (MDA), preservação do muco protetor, e assim protegendo a integridade da mucosa gástrica. Além disso, nossos dados demonstram que o efeito gastroprotetor de LASSBio-596, dependem da síntese de NO, uma vez que ao administrar um inibidor não seletivo da síntese de NO e outro seletivo para iNOS, os efeitos gastroprotetores de LASSBio-596 foram reduzidos.

Nos últimos anos o modelo de lesão gástrica induzida por etanol tem sido bastante explorado na pesquisa experimental, para avaliação pré-clínica de agentes com atividade anti-úlceras, uma vez que o etanol foi considerado um dos principais fatores etiológicos para úlcera gástrica em seres humanos. As lesões iniciais causadas pelo etanol acontecem por solubilização da barreira muco protetor, tornando a mucosa suscetível ao ácido gástrico e pepsina (TARNAWSKI, 2005). Além disso, o etanol estimula a produção de secreção ácida e prolonga o tempo de esvaziamento gástrico, desta forma, aumentando o contato do etanol na mucosa, levando a alteração da rede vascular local e rompimento dos vasos sanguíneos (FRANKE et al., 2004; OATES; HAKKINEN, 1988; SCHUBERT, 2010).

A administração de etanol causa lesões hemorrágicas difusa na mucosa gástrica, devido ao aumento da peroxidação lipídica, a um consumo de GSH e GPx, a diminuição de óxido nítrico, a aumento de citocinas pró-inflamatórias, a redução de citocinas anti-inflamatórias, a infiltração de leucócitos e aumento dos marcadores de apoptose e diminuição dos níveis de PGE-2. Desta forma escolhemos o modelo de gastrite aguda induzida por etanol e avaliamos os possíveis efeitos gastroprotetor de LASSBio-596, frente as características das lesões encontradas nesse modelo experimental (ARAB et al., 2015).

No presente estudo, quatro doses de LASSBio-596 (0.1, 1, 10 e 20 mg/kg) foram testadas no modelo de gastrite aguda induzida por etanol, no intuito de determinar possíveis doses efetivas para causar efeito gastroprotetor. A curva dose resposta foi determinada a partir da dose de 10 mg/kg de LASSBio-596, utilizada em estudos de inflamação aguda em estudos anteriores (PADILHA et al., 2015; SILVA et al., 2016). Nossos resultados demonstraram que os animais pré-tratados com LASSBio-596 (0.1, 1, 10 e 20 mg/kg – v.o.), diminuíram as lesões gástricas induzidas por etanol 50%, tendo o grupo com 20 mg/Kg apresentado uma maior gastroproteção e o grupo 0.1 mg/kg não apresentou diferença estatística entre o grupo etanol 50%. Em posse dessa informação, decidimos por utilizar a dose de 20 mg/kg nas investigações consecutivas. Como esperado, omeprazol na dose de 30 mg/kg usado como controle positivo protegeu o dano a mucosa, porém vale ressaltar que este fármaco apresenta muitos efeitos colaterais (HUANG et al., 2017).

O efeito gastroprotetor foi confirmado através da análise histopatológica da parte glândular dos estômagos, onde a administração de etanol 50% intensificou todos os parâmetros histopatológicos analisados, tais como hemorragia, infiltrado de células inflamatórias, perda de células epiteliais e edema na superfície da mucosa gástrica. No entanto, após administrar LASSBio-596 (20 mg/kg v.o) foi observado redução dos escores histopatológicos (atenuação da perda de células do epitélio da mucosa e hemorragia), comparados ao grupo etanol.

O uso em excesso de etanol causa dano hemorrágico observado principalmente nas endoscopias, a qual pode ser resultante da lesão vascular provocada pelo etanol. Diante desse conhecimento, avaliamos o dano hemorrágico utilizando um ensaio comercial de hemoglobina. Observamos que o grupo com lesão gástrica pré-tratado com o veículo DMSO, apresentou aumento dos níveis de hemoglobina. Esse perfil se apresenta pelo contato do etanol com a mucosa, gerando necrose das células endoteliais, marcado por contração das vênulas e dilatação das arteríolas. Outro fator que leva a hemorragia, é a contração da musculatura gástrica que leva a compressão dos vasos sanguíneos quando em contato com o etanol (MAGIEROWSKI et al.,

2017; OATES; HAKKINEN, 1988). O pré-tratamento com LASSBio-596 reduziu os níveis de hemoglobina, ficando próximo aos níveis do grupo salina.

Medeiros et al., (2008) demonstraram o efeito gastroprotetor do sildenafil em modelo experimental de gastrite aguda induzida por etanol 50%, sendo reduzidos os escores histopatológicos: edema, perda de células e hemorragia, somados a diminuição dos níveis de hemoglobina presentes no tecido gástrico. O efeito gastroprotetor de sildenafil está atrelado aos efeitos do NO (MEDEIROS et al., 2008; SANTOS et al., 2005). Na literatura, trabalhos descrevem que o óxido nítrico exerce um papel importante na regulação do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica promovendo vasodilatação e melhorando o aporte sanguíneo (WALLACE; MILLER, 2000). Assim corroborando com os achados do LASSBio-596 nos parâmetros hemorrágicos na macroscopia, microscopia e os níveis de hemoglobina.

A úlcera gástrica é resultado de um processo de necrose e isquemia da mucosa. As áreas de necrose da mucosa passam a não receber mais nutrientes e oxigênio por conta do dano a microvascular, com constrição e consequente oclusão dos vasos. Além disso, o tecido com necrose libera leucotrienos que ativam as células residentes, estes fagocitam as áreas de necrose e produzem citocinas pró-inflamatórias responsáveis pela migração de PMNs (TARNAWSKI; AHLUWALIA; JONES, 2012).

Os neutrófilos desempenham um papel vital no processo de lesão e inflamação gástrica, principalmente ao liberar substâncias altamente lesivas a mucosa, como a liberação das EROs (ARAB et al., 2015; KOBAYASHI et al., 2001). A infiltração de neutrófilos na mucosa gástrica pode ser estimada pela atividade de MPO, uma enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, que causa lesão ao DNA, proteínas e lipídeos (LI et al., 2013; NISHIDA; OHTA; ISHIGURO, 1998).

Neste estudo, a infiltração de neutrófilos na mucosa gástrica foi evidenciada pelo aumento da atividade de MPO no grupo etanol, e o pré-tratamento com LASSBio-596 reduziu a atividade da enzima, revelando assim seu efeito anti-inflamatório e gastroprotetor através da diminuição do infiltrado de neutrófilos. Carvalho et al. (2010) utilizou LASSBio-596 na dose de 10 mg/kg (i.p.) em um modelo de inflamação aguda induzida por microcistinas de

cianobactérias, onde também houve uma diminuição significativa na atividade da mieloperoxidase. Prosseguindo a investigação, decidimos avaliar os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β presentes no tecido gástrico após indução da gastrite por etanol e pré-tratamento com LASSBio-596.

A migração neutrofílica está associada ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α e IL-1 β (BAMIAS et al., 2012; YAMAGUCHI et al., 2000). Os níveis de TNF- α e IL-1 β são rapidamente aumentados na mucosa intestinal após a ativação inicial das células imunes, frente a uma inflamação (NICOLAU et al., 2017; VERMA; KUMAR, 2016). Além disso, o TNF- α é responsável por iniciar a liberação da cascata de outros mediadores pró-inflamatórios, que resultam na adesão e migração de neutrófilos (APPLEYARD et al., 1996). Contudo, a ausência ou inibição da atividade de TNF- α melhora a progressão da inflamação, ao diminuir a migração de neutrófilos. A IL-1 β é sintetizada por muitas células, mas, sobretudo por macrófagos, neutrófilos e células endoteliais. Além disso, a citocina IL-1 β pode induzir a liberação de histamina a partir de mastócitos no local da inflamação, em seguida, promovendo vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (LICHTMAN et al., 1988).

Nós demonstramos nesse estudo que as citocinas IL-1 β e TNF- α encontram-se elevadas no estômago de animais com gastrite alcoólica. Por outro lado, a dose de 20mg/kg de LASSBio-596 reduziu de forma significativa os níveis de IL-1 β e TNF- α . Assim, pode-se considerar que a redução da atividade da mieloperoxidase no foco inflamatório, foi decorrente da redução dos níveis das citocinas TNF- α e IL-1 β na mucosa gástrica.

Casquilho et al. (2011) usou a dose de 50mg/Kg (i.p.) de LASSBio-596 e relatou uma diminuição significativa dos níveis de TNF- α e IL-1 β no pulmão e fígado de camundongos, em um modelo experimental de inflamação aguda induzida por microcistinas de cianobacterias. Amirshahrokhi e Khalili (2015) utilizando o mesmo modelo experimental que o nosso, usou a dose de 60mg/kg (v.o.) de talidomida e observou uma redução dos níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β . Moustafa et al. (2013) observaram aumento dos níveis de TNF- α e IL-1 β , no modelo de gastrite aguda induzida por indomentacina, onde o pré-tratamento com sildenafil foi capaz de reduzir de

forma significativa os níveis dessas citocinas pró-inflamatórias. Os nossos resultados experimentais estão alinhados com dados anteriores que mostram que o uso de LASSBio-596, talidomida e sildenafil diminuem os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α .

Dentro deste contexto, o tratamento com talidomida em várias patologias é baseado em sua capacidade para inibir a produção de TNF- α . A talidomida inibe a síntese de TNF- α ao induzir a degradação do RNA mensageiro responsável pela produção da citocina, além disso, existem evidências que a talidomida suprime a liberação desta citocina pro-inflamatória por macrófagos e monócitos, exibindo, assim, atividade anti-inflamatória e imunomoduladora (MOREIRA et al., 1993). Fundamentando em partes a gastroproteção exercida pelo LASSBio-596, tendo em vista que a talidomida faz parte da composição química deste protótipo.

O aumento do estresse oxidativo também desempenha um papel importante no recrutamento de neutrófilos e quando ativados, são fonte de EROs (WINTERBOURN; PICHORNER; KETTLE, 1997). Está bem estabelecido, na literatura, que a geração de radicais livres associados à patogênese de lesões gástricas induzidas por etanol, medeiam à injúria no tecido estimulando a peroxidação dos lipídios, consequência da reação dos EROs contra a membrana celular, detectados pelo acúmulo de MDA (ARAB et al., 2015; MARQUES, 2017; MEDEIROS et al., 2008; VARGESSON, 2015). Carvalho et al. (2010) foi único a relatar os efeitos de LASSBio-596 atuando como uma molécula capaz de controlar o estresse oxidativo, ao demonstrar que os níveis de super óxido desmutase e catalase foram restaurados após o tratamento com LASSBio-596, ao utilizar um modelo experimental de lesão aguda pulmonar. Desta forma, decidimos avaliar o efeito de LASSBio-596 na via do estresse oxidativo, dosando MDA.

No presente estudo, observou-se que o etanol aumentou significativamente os níveis de MDA, comparados ao grupo salina. Por outro lado, o pré-tratamento com LASSBio-596 reduziu por total os níveis de MDA. Contudo, é provável que a redução total dos níveis de MDA por LASSBio-596, em partes esteja atrelada a diminuição do infiltrado neutrófilico e consequentemente uma menor produção de EROs por estes. Uma segunda

explicação para os possíveis efeitos de LASSBio-596 pode se fundamentar pela via oxidativa, onde os níveis aumentados de MDA estimularia a ação de substâncias endógenas antioxidantes, onde um possível efeito do protótipo estaria em aumentar os níveis destas substâncias antioxidantes.

A fim de elucidar o possível efeito de LASSBio-596 atuando como uma molécula antioxidante no dano gástrico induzido por etanol, dosamos os níveis de GSH. Como esperado, o grupo etanol apresentou aumento do consumo de GSH quando comparado ao grupo salina. O pré-tratamento com LASSBio-596 foi capaz de diminuir o consumo de GSH, quando comparado a grupo etanol, porém essa reverção não se deu por total, ou seja, parte dos efeitos de LASSBio-596 estão atrelados ao aumento do GSH e possivelmente para que aja a reversão total da peroxidação lipídica de acordo com nossos achados, outras moléculas antioxidantes podem também estar envolvidas como catalase, superóxido desmutase, glutathione peroxidase glutathione reductase ou substâncias não enzimáticas como ubiquinona, melatonina, tioredoxina (TxR) e ácido lipóico, ainda podem ser investigadas (BHATTACHARYYA et al., 2014; KWIECIEN et al., 2014).

O fármaco omeprazol (inibidor da bomba de prótons) foi adicionado ao atual estudo por ser um fármaco amplamente utilizado na clínica (HUANG et al., 2017; NANDY et al., 2016). Uma das características dos efeitos do omeprazol é o aumento do pH gástrico (entre 4-6); essa mudança de pH leva a uma não absorção de alguns sais minerais ou vitaminas que necessitam do pH ácido para serem ativados e absorvidos. Além disso, o uso de omeprazol causa uma disbiose uma vez que o pH ácido do estômago é uma barreira da imunidade inata para combater microorganismos (BAVISHI; DUPONT, 2011; BOUWKNEGT et al., 2014). De posse dessa informação, um tratamento eficaz frente as lesões gástricas, não pode elevar tanto o pH gástrico, mas sim modular os eventos inflamatórios e/ou oxidantes presentes na maioria dos modelos de lesões gástricas.

A secreção ácida é regulada por agentes hormonais, fatores paracrinos e neurais representados respectivamente pela gastrina, histamina e acetilcolina (ARIN et al., 2017). Compostos que podem inibir qualquer um desses fatores poderia diminuir substancialmente o conteúdo ácido. A fim de elucidar o

possível efeito antissecretório e de possíveis mudanças do pH gástrico de LASSBio-596, foi realizado o experimento da ligadura de piloro. A administração de LASSBio-596 não modificou o pH e o volume de secreção gástrica. Demonstramos assim que o composto não tem ação protetora por essas vias, desta forma, LASSBio-596 não irá interferir na absorção de nutrientes vindos da alimentação e não modificará a microbiota intestinal.

Diversos estudos demonstram que o etanol reduz o pH gástrico (PALLE; KANAKALATHA; KAVITHA, 2017; SCHUBERT, 2010). Desta forma, as lesões iniciais causadas pelo etanol acontecem por solubilização da barreira muco protetora, tornando a mucosa susceptível ao ácido gástrico e pepsina (TARNAWSKI, 2005). Em busca de justificar melhor os efeitos pelos quais LASSBio-596 exerce gastroproteção, decidimos investigar se o protótipo teria algum efeito frente aos níveis de muco protetor aderido a mucosa.

O muco é um dos principais constituintes da barreira protetora da mucosa gástrica, que é a primeira linha de defesa da mucosa contra agentes agressores, como ácido e pepsina (SCHUBERT, 2010). A barreira mucobicarbonato-fosfolipídeos também atua como um antioxidante, e assim pode reduzir o dano da mucosa mediada por EROs. As propriedades protetoras da barreira do muco dependem não apenas da estrutura do gel, mas também da quantidade ou espessura da camada que cobre a superfície da mucosa (PENISSI; PIEZZI, 1999). O pré-tratamento com LASSBio-596 na dose de 20 mg/kg preservou o conteúdo de muco da mucosa gástrica, quando comparado ao grupo etanol 50%.

No presente trabalho, avaliamos também o mecanismo de ação gastroprotetor de LASSBio-596 através da inibição não seletiva da NOS, utilizando L-NAME. A administração de L-NAME antes do pré-tratamento com LASSBio-596, reduziu o efeito gastroprotetor nas avaliações macroscópicas, na peroxidação lipídica, no infiltrado neutrofílico (atividade de MPO) e nos níveis de hemoglobina e consumo de GSH. Santos et al. (2005) mostraram que o uso de sildenafil em um modelo de lesão gástrica induzido por AINEs, exerceu efeito gastroprotetor ao inibir a atividade da mieloperoxidase e adesão de neutrófilos na mucosa gástrica. Contudo, o uso de L-NAME antes do pré-tratamento com sildenafil, reverteu o efeito gastroprotetor do fármaco inibidor da PDE-5

(SANTOS et al., 2005). Medeiros et al. (2008) também demonstrou que o efeito gastroprotetor de sildenafil no modelo experimental de lesão gástrica induzida por etanol, foi revertido com a administração de L-NAME. Em seguida, investigamos a inibição seletiva da isoforma da enzima NOS induzível, aos efeitos protetores do LASSBio-596. Utilizamos o inibidor seletivo para iNOS, 1400W e observamos que o efeito gastroprotetor foi reduzido significativamente quase ao nível do controle. Em contrapartida, o papel da iNOS no processo de defesa da mucosa ainda é uma questão de controvérsia, existem achados na literatura que o NO gerado a partir da iNOS, contribui para proteção da mucosa durante a fase adaptativa da citoproteção ao mesmo tempo que aumenta a lesão tecidual na fase crônica (YAMAMOTO et al., 1999).

Silva et al. (2014) demonstraram que a inibição seletiva da iNOS com 1400w, agravou a extensão das lesões gástricas induzidas pelo alendronato. Contrapondo com os nossos achados, Sousa et al (2004) demonstraram que a inibição farmacológica utilizando (1400W e L-NAME) inibiu o dano gástrico induzido por indometacina, desta forma tendo um papel gastroprotetor. Porém, na lesão gástrica induzida por etanol, o papel do óxido nítrico pode ser ainda mais importante uma vez que o comprometimento vascular é maior (CORUZZI et al., 2002; SOUZA et al., 2004).

Diante dos resultados obtidos, evidenciou-se o efeito gastroprotetor do LASSBio-596, frente aos danos à mucosa gástrica causados pelo etanol. Seus efeitos gastroprotetores envolvem mecanismos relacionados com aumento de fatores protetores da mucosa gástrica, como a preservação do muco gástrico, envolvimento de defesas antioxidantes e seu efeito é dependente da síntese de óxido nítrico. O efeito de LASSBio-596 também cursou em diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α), o que resultou na redução da migração de neutrófilos, marcada pela diminuição da atividade da mieloperoxidase. Por fim, os achados com expressivo ineditismo apresentam o LASSBio-596 como potencial fármaco antiulcerogênico e fornecem novas perspectivas para estudos mecanísticos e de toxicidade mais aprofundados desse protótipo.

8. Conclusão

Concluimos que a hibridação molecular dos grupos farmacofóricos manteve os efeitos gastroprotetores dos fármacos sildenafil e talidomida no híbrido molecular (LASSBio-596), elencando-o como um possível e interessante protótipo para a prevenção e tratamento da úlcera gástrica. Contudo, estudos posteriores precisam ser conduzidos em busca de entender melhor os mecanismos de ação envolvidos no efeito gastroprotetor de LASSBio-596.

9. REFERENCIAS

ABBAS, ABUL K.; KUMAR, V.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran - Patologia - Bases Patológicas Das Doenças**. 9º Ed. ed. [s.l: s.n.].

APPLEYARD, C. B. et al. Tumor necrosis factor mediation of NSAID-induced gastric damage: role of leukocyte adherence. **The American journal of physiology**, v. 270, n. 1 Pt 1, p. G42-8, jan. 1996.

ARAB, H. H. et al. Diosmin protects against ethanol-induced gastric injury in rats: novel anti-ulcer actions. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0122417, 2015.

ARAUJO, G. L. et al. Toxicological in vitro and subchronic evaluation of LASSBio-596. **Food and Chemical Toxicology**, v. 73, p. 148–156, nov. 2014.

ARIN, R. M. et al. Adenosine: Direct and Indirect Actions on Gastric Acid Secretion. **Frontiers in Physiology**, v. 8, 22 set. 2017.

BAMIAS, G. et al. New insights into the dichotomous role of innate cytokines in gut homeostasis and inflammation. **Cytokine**, v. 59, n. 3, p. 451–9, set. 2012.

BAVISHI, C.; DUPONT, H. L. Systematic review: the use of proton pump inhibitors and increased susceptibility to enteric infection. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 34, n. 11–12, p. 1269–81, dez. 2011.

BHATTACHARYYA, A. et al. Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 2, p. 329–354, 1 abr. 2014.

BLACK, R. A. et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. **Nature**, v. 385, n. 6618, p. 729–733, 20 fev. 1997.

BODE, C.; BODE, J. C. Alcohol's role in gastrointestinal tract disorders. **Alcohol health and research world**, v. 21, n. 1, p. 76–83, 1997.

BOUWKNEGT, M. et al. Potential association between the recent increase in campylobacteriosis incidence in the Netherlands and proton-pump inhibitor use - an ecological study. **Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 19, n. 32, 14

ago. 2014.

BRADLEY, P. P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **The Journal of investigative dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206–9, mar. 1982.

BRASIL. **TabNet Win32 3.0: Morbidade Hospitalar do SUS - por local de residência - Brasil**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sih/cnv/nrbr.def>>. Acesso em: 14 out. 2017.

BRUNTON, L. L. et al. **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. [s.l: s.n.].

BRZOZOWSKI, T. et al. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 56 Suppl 5, p. 33–55, set. 2005.

CAMPOS, H. S. et al. Protective effects of phosphodiesterase inhibitors on lung function and remodeling in a murine model of chronic asthma. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 39, n. 2, p. 283–7, fev. 2006.

CARVALHO, G. M. C. et al. Can LASSBio 596 and dexamethasone treat acute lung and liver inflammation induced by microcystin-LR? **Toxicon**, v. 56, n. 4, p. 604–612, 15 set. 2010.

CASQUILHO, N. V. et al. LASSBio 596 per os avoids pulmonary and hepatic inflammation induced by microcystin-LR. **Toxicon**, v. 58, n. 2, p. 195–201, ago. 2011.

CHEN, X.-G. et al. Phosphodiesterase inhibitor ameliorates neuronal injury in spinal cord ischemia/reperfusion injured rat model. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 93, p. 1213–1219, set. 2017.

CHEW, C. S.; BROWN, M. R. Release of intracellular Ca²⁺ and elevation of inositol trisphosphate by secretagogues in parietal and chief cells isolated from rabbit gastric mucosa. **Biochimica et biophysica acta**, v. 888, n. 1, p. 116–25,

29 ago. 1986.

COLEMAN, R. A.; SMITH, W. L.; NARUMIYA, S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. **Pharmacological reviews**, v. 46, n. 2, p. 205–29, jun. 1994.

CORUZZI, G. et al. Gastroprotective effects of amtolmetin guacyl: a new non-steroidal anti-inflammatory drug that activates inducible gastric nitric oxide synthase. **Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver**, v. 34, n. 6, p. 403–10, jun. 2002.

DAMASCENO, S. R. B. et al. Role of the NO/KATP pathway in the protective effect of a sulfated-polysaccharide fraction from the algae *Hypnea musciformis* against ethanol-induced gastric damage in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 320–328, mar. 2013.

DE CARVALHO, A. S. T. Jornal de Pediatria Úlcera péptica Peptic ulcer. **Jornal de Pediatria**, v. 76, n. 2, 2000.

DEN HOLLANDER, W. J.; KUIPERS, E. J. Current pharmacotherapy options for gastritis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 13, n. 18, p. 2625–2636, 20 dez. 2012.

DEPONTE, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 5, p. 3217–3266, 1 maio 2013.

DUMAN, J. G. et al. Three-dimensional reconstruction of cytoplasmic membrane networks in parietal cells. **Journal of cell science**, v. 115, n. Pt 6, p. 1251–8, 15 mar. 2002.

EFREMOV, E. A. et al. [PDE-5 inhibitors: patients preferences]. **Urologiia (Moscow, Russia : 1999)**, n. 3, p. 120–126, jul. 2017.

EL-SERAG, H. B. et al. Update on the epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. **Gut**, v. 63, n. 6, p. 871–80, jun. 2014.

EPSTEIN, M.; MCGRATH, S.; LAW, F. Proton-Pump Inhibitors and Hypomagnesemic Hypoparathyroidism. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 17, p. 1834–1836, 26 out. 2006.

FÄHRMANN, M. et al. Different actions of protein kinase C isoforms α and ϵ on gastric acid secretion. **British Journal of Pharmacology**, v. 136, n. 6, p. 938–946, jul. 2002.

FEINSTEIN, L. B. et al. Trends in Hospitalizations for Peptic Ulcer Disease, United States, 1998–20051. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 9, p. 1410–1418, set. 2010.

FINK, M. P. Reactive oxygen species as mediators of organ dysfunction caused by sepsis, acute respiratory distress syndrome, or hemorrhagic shock: potential benefits of resuscitation with Ringer's ethyl pyruvate solution. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 5, n. 2, p. 167–74, mar. 2002.

FORTE, J. G.; YAO, X. The membrane-recruitment-and-recycling hypothesis of gastric HCl secretion. **Trends in cell biology**, v. 6, n. 2, p. 45–8, fev. 1996.

FRANKE, A. et al. Effect of ethanol and some alcoholic beverages on gastric emptying in humans. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 39, n. 7, p. 638–644, 8 jan. 2004.

GANNON, B. et al. Mucosal microvascular architecture of the fundus and body of human stomach. **Gastroenterology**, v. 86, n. 5 Pt 1, p. 866–75, maio 1984.

GOMM, W. et al. Association of Proton Pump Inhibitors With Risk of Dementia: A Pharmacoepidemiological Claims Data Analysis. **JAMA neurology**, v. 73, n. 4, p. 410–6, 1 abr. 2016.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Drug design, biotechnology and medicinal chemistry: applications to infectious diseases. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010.

HOLZER, P. Neural Regulation of Gastrointestinal Blood Flow. In: **Physiology of the Gastrointestinal Tract**. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 817–845.

HUANG, L. et al. Omeprazole promotes carcinogenesis of fore-stomach in mice

with co-stimulation of nitrosamine. **Oncotarget**, v. 8, n. 41, p. 70332–70344, 19 set. 2017.

ICHIKAWA, Y. et al. Distorted microangioarchitecture and impaired angiogenesis in gastric mucosa of portal hypertensive rats. **Gastroenterology**, v. 106, n. 3, p. 702–8, mar. 1994.

IUPAC. **Glossary of Terms Used in Medicinal Chemistry**. Disponível em: <<http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iupac/medchem/ix.html#m1>>. Acesso em: 26 out. 2017.

JOHNSTONE, J.; NERENBERG, K.; LOEB, M. Meta-analysis: proton pump inhibitor use and the risk of community-acquired pneumonia. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 31, n. 11, p. 1165–1177, 4 mar. 2010.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12° Ed. ed. [s.l: s.n.].

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. In: 13° ed. [s.l: s.n.].

KAJIMURA, M.; REUBEN, M. A.; SACHS, G. The muscarinic receptor gene expressed in rabbit parietal cells is the m3 subtype. **Gastroenterology**, v. 103, n. 3, p. 870–5, set. 1992.

KERAVIS, T.; LUGNIER, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 5, p. 1288–1305, mar. 2012.

KIMURA, M. et al. Impairment of glutathione metabolism in human gastric epithelial cells treated with vacuolating cytotoxin from *Helicobacter pylori*. **Microbial Pathogenesis**, v. 31, n. 1, p. 29–36, jul. 2001.

KOBAYASHI, K.; ARAKAWA, T. Arachidonic acid cascade and gastric mucosal injury, protection, and healing: topics of this decade. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 21 Suppl 1, p. S12-7, 1995.

KOBAYASHI, T. et al. Teprenone promotes the healing of acetic acid-induced chronic gastric ulcers in rats by inhibiting neutrophil infiltration and lipid

peroxidation in ulcerated gastric tissues. **Pharmacological research**, v. 43, n. 1, p. 23–30, jan. 2001.

KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Berne & Levy - Fisiologia**. [s.l: s.n.].

KUMAR, V. et al. **Robbins e Cotran - Bases Patológicas das Doenças, 8 ed.** [s.l: s.n.].

KWIECIEN, S. et al. Lipid peroxidation, reactive oxygen species and antioxidative factors in the pathogenesis of gastric mucosal lesions and mechanism of protection against oxidative stress - induced gastric injury. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 65, n. 5, p. 613–22, out. 2014.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. **Gastroenterology**, v. 135, n. 1, p. 41–60, jul. 2008a.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. **Gastroenterology**, v. 135, n. 1, p. 41–60, jul. 2008b.

LAINE, L.; WEINSTEIN, W. M. Histology of alcoholic hemorrhagic "gastritis": a prospective evaluation. **Gastroenterology**, v. 94, n. 6, p. 1254–62, jun. 1988.

LAMBRECHT, N. et al. Role of Calcitonin Gene-Related Peptide and Nitric Oxide in the Gastroprotective Effect of Capsaicin in the Rat. **GASTROENTEROLOGY**, v. 104, p. 1371–1380, 1993.

LEE, J. H. et al. Prevention effects of ND-07, a novel drug candidate with a potent antioxidative action and anti-inflammatory action, in animal models of severe acute pancreatitis. **European journal of pharmacology**, v. 687, n. 1–3, p. 28–38, 15 jul. 2012.

LI, W. et al. Protective effect of tetrahydrocoptisine against ethanol-induced gastric ulcer in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 272, n. 1, p. 21–29, out. 2013.

LICHTMAN, A. H. et al. Role of interleukin 1 in the activation of T lymphocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 24, p. 9699–703, dez. 1988.

LIMA, L. M. et al. Synthesis and anti-inflammatory activity of phthalimide derivatives, designed as new thalidomide analogues. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 10, n. 9, p. 3067–73, set. 2002.

LIMA, L. M. Química Medicinal Moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1456–1468, dez. 2007.

LIMA, L. M.; LIMA, N. M. Contribuição do LASSBio® no Desenvolvimento de Novos Candidatos a Protótipos de Fármacos Antiasmáticos. **Rev. Virtual Quim**, v. 1, n. 1, 2009.

LIU, M. et al. Nitrite-mediated renal vasodilatation is increased during ischemic conditions via cGMP-independent signaling. **Free radical biology & medicine**, v. 84, p. 154–160, jul. 2015.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E. Nitrite reduction to nitric oxide in the vasculature. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 295, n. 2, p. H477-8, 27 ago. 2008.

MAGIEROWSKI, M. et al. Carbon monoxide released from its pharmacological donor, tricarbonyldichlororuthenium (II) dimer, accelerates the healing of pre-existing gastric ulcers. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 20, p. 3654–3668, out. 2017.

MALAVADE, P.; HIREMATH, S. Proton pump inhibitors: More indigestion than relief? **Indian Journal of Nephrology**, v. 27, n. 4, p. 249, 2017.

MARQUES, F. C. J. EFEITO GASTROPROTETOR DA GALACTOMANANA DE *Caesalpinia pulcherrima* NA GASTRITE INDUZIDA POR ANTI-INFLAMATÓRIO NÃO ESTERIOIDAL (AINE). **Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual do Ceará**, p. 85, 2017.

MATSUDA, T. et al. Lipid peroxidation-induced DNA adducts in human gastric mucosa. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 1, p. 121–127, 1 jan. 2013.

MCKEAGE, K. et al. Esomeprazole: a review of its use in the management of gastric acid-related diseases in adults. **Drugs**, v. 68, n. 11, p. 1571–607, 2008.

MEDEIROS, J. V. R. et al. Role of the NO/cGMP/K(ATP) pathway in the protective effects of sildenafil against ethanol-induced gastric damage in rats. **British journal of pharmacology**, v. 153, n. 4, p. 721–7, fev. 2008.

MONTROSE, M. H. et al. Gastroduodenal Mucosal Defense. In: **Physiology of the Gastrointestinal Tract**. [s.l.] Elsevier, 2006. p. 1259–1291.

MOORE, K. L.; DALLEY, A. F.; AGUR, A. M. R. **Anatomia Orientada Para a Clínica**. 6 Ed. ed. [s.l: s.n.].

MOREIRA, A. L. et al. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. **The Journal of experimental medicine**, v. 177, n. 6, p. 1675–80, 1 jun. 1993.

NANDY, N. et al. Solitary Gastric Carcinoid Tumor Associated with Long-Term Use of Omeprazole: A Case Report and Review of the Literature. **Digestive diseases and sciences**, v. 61, n. 3, p. 708–12, 29 mar. 2016.

NICOLAU, L. A. D. et al. Epiisopiloturine hydrochloride, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus* leaves, protects against naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 188–195, mar. 2017.

NISHIDA, K.; OHTA, Y.; ISHIGURO, I. Contribution of NO synthases to neutrophil infiltration in the gastric mucosal lesions in rats with water immersion restraint stress. **FEBS letters**, v. 425, n. 2, p. 243–8, 27 mar. 1998.

NORBERG, A. et al. Role of variability in explaining ethanol pharmacokinetics: research and forensic applications. **Clinical pharmacokinetics**, v. 42, n. 1, p. 1–31, 2003.

OATES, P. J.; HAKKINEN, J. P. Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats. **Gastroenterology**, v. 94, n. 1, p. 10–21, jan. 1988.

PADILHA, G. A. et al. Therapeutic effects of LASSBio-596 in an elastase-induced mouse model of emphysema. **Frontiers in Physiology**, v. 6, p. 267,

30 set. 2015.

PALLE, S.; KANAKALATHA, A.; KAVITHA, C. N. Gastroprotective and Antiulcer Effects of *Celastrus paniculatus* Seed Oil Against Several Gastric Ulcer Models in Rats. **Journal of Dietary Supplements**, p. 1–13, 17 ago. 2017.

PAN, J.-S. et al. Oxidative stress disturbs energy metabolism of mitochondria in ethanol-induced gastric mucosa injury. **World journal of gastroenterology**, v. 14, n. 38, p. 5857–67, 14 out. 2008a.

PAN, J.-S. et al. Oxidative stress disturbs energy metabolism of mitochondria in ethanol-induced gastric mucosa injury. **World journal of gastroenterology**, v. 14, n. 38, p. 5857–67, 14 out. 2008b.

PARK, S.-H. et al. Comparison of Prevention of NSAID-Induced Gastrointestinal Complications by Rebamipide and Misoprostol: A Randomized, Multicenter, Controlled Trial-STORM STUDY. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 40, n. 2, p. 148–155, 2007.

PENISSI, A. B.; PIEZZI, R. S. Effect of dehydroleucodine on mucus production: a quantitative study. **Digestive diseases and sciences**, v. 44, n. 4, p. 708–12, abr. 1999.

PLAYFORD, R. J.; PODAS, T.; MODLIN, I. Pantoprazole, Prout and the proton pump. **Hospital medicine (London, England : 1998)**, v. 60, n. 7, p. 500–4, jul. 1999.

RAJENDRAN, P. et al. Antioxidants and human diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 436, p. 332–347, 25 set. 2014.

RASKIN, J. B. et al. Misoprostol dosage in the prevention of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric and duodenal ulcers: a comparison of three regimens. **Annals of internal medicine**, v. 123, n. 5, p. 344–50, 1 set. 1995.

ROBERT, A. et al. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. **Gastroenterology**, v. 77, n. 3, p. 433–43, set. 1979.

ROBERT, A. et al. Mild irritants prevent gastric necrosis through "adaptive

cytoprotection” mediated by prostaglandins. **The American journal of physiology**, v. 245, n. 1, p. G113-21, jul. 1983.

ROCCO, P. R. M. et al. Therapeutic potential of a new phosphodiesterase inhibitor in acute lung injury. **The European respiratory journal**, v. 22, n. 1, p. 20–7, jul. 2003.

ROCCO, P. R. M. et al. LASSBio-596: da Descoberta aos Ensaios Pré-clínicos. **Rev. Virtual Quim**, v. 2, n. 1, p. 10–27, 2010.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia - Texto e Atlas**. 6° Ed. ed. [s.l: s.n.].

SANTOS, C. L. et al. Sildenafil prevents indomethacin-induced gastropathy in rats: role of leukocyte adherence and gastric blood flow. **British journal of pharmacology**, v. 146, n. 4, p. 481–6, out. 2005.

SCHEIDT, L. et al. Ethanol during adolescence decreased the BDNF levels in the hippocampus in adult male Wistar rats, but did not alter aggressive and anxiety-like behaviors. **Trends in psychiatry and psychotherapy**, v. 37, n. 3, p. 143–51, set. 2015.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 26, n. 6, p. 598–603, nov. 2010.

SELMİ, S. et al. Protective effects of orange (*Citrus sinensis* L.) peel aqueous extract and hesperidin on oxidative stress and peptic ulcer induced by alcohol in rat. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n. 1, p. 152, 14 dez. 2017.

SHI, S.; KLOTZ, U. Proton pump inhibitors: an update of their clinical use and pharmacokinetics. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 64, n. 10, p. 935–951, 5 out. 2008.

SHIN, D. W. et al. Preferences for the “screen and treat” Strategy of *Helicobacter pylori* to Prevent Gastric Cancer in Healthy Korean Populations. **Helicobacter**, v. 18, n. 4, p. 262–269, ago. 2013.

SIDANI, S. M. et al. Δ F508 Mutation Results in Impaired Gastric Acid Secretion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 9, p. 6068–6074, 2 mar. 2007.

SILVA, J. D. et al. Respiratory and Systemic Effects of LASSBio596 Plus

Surfactant in Experimental Acute Respiratory Distress Syndrome. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 2, p. 821–835, 24 fev. 2016.

SINDHI, V. et al. Potential applications of antioxidants – A review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 9, p. 828–835, set. 2013.

SOBOTTA, J. **Sobotta - Atlas de Anatomia Humana**. 23° Ed. ed. [s.l: s.n.].

SOUZA, M. H. L. P. et al. Gastric damage and granulocyte infiltration induced by indomethacin in tumour necrosis factor receptor 1 (TNF-R1) or inducible nitric oxide synthase (iNOS) deficient mice. **Gut**, v. 53, n. 6, p. 791–6, jun. 2004.

SYAM, A. F. et al. Molecular mechanism on healing process of peptic ulcer. **Acta Med Indones**, v. 41, n. 2, p. 95–98, 2009.

TARNAWSKI, A. Cellular and molecular mechanisms of mucosal defense and repair. In: Bioregulation and Its Disorders in Gastrointestinal Tract. **Blackwell Science**, p. pp.317, 1998.

TARNAWSKI, A. S. Cellular and Molecular Mechanisms of Gastrointestinal Ulcer Healing. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, n. S1, p. S24–S33, out. 2005.

TARNAWSKI, A. S.; AHLUWALIA, A.; JONES, M. K. The mechanisms of gastric mucosal injury: Focus on microvascular endothelium as a key target. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 4–15, 2012.

TAVARES-MURTA, B. M. et al. Local profile of cytokines and nitric oxide in patients with bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. **European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology**, v. 138, n. 1, p. 93–9, maio 2008.

THORSEN, K. et al. Epidemiology of perforated peptic ulcer: Age- and gender-adjusted analysis of incidence and mortality. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 3, p. 347, 2013.

TRACEY, M.D, K. J.; CERAMI, PH.D, A. TUMOR NECROSIS FACTOR: A Pleiotropic Cytokine and Therapeutic Target. **Annual Review of Medicine**, v. 45, n. 1, p. 491–503, fev. 1994.

TSUNODA, Y. et al. An inhibitor of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II, KN-62, inhibits cholinergic-stimulated parietal cell secretion. **The American journal of physiology**, v. 262, n. 1 Pt 1, p. G118-22, 1 jan. 1992.

VARGESSON, N. Thalidomide-induced limb defects: resolving a 50-year-old puzzle. **BioEssays**, v. 31, n. 12, p. 1327–1336, dez. 2009.

VARGESSON, N. Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 105, n. 2, p. 140–156, 1 jun. 2015.

VERMA, S.; KUMAR, V. L. Attenuation of gastric mucosal damage by artesunate in rat: Modulation of oxidative stress and NFκB mediated signaling. **Chemico-Biological Interactions**, v. 257, p. 46–53, 25 set. 2016.

VISSCHER, F. E. et al. PHARMACOLOGY OF PAMINE BROMIDE. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 110, n. 2, 1954.

WALLACE, J. L.; MILLER, M. J. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. **Gastroenterology**, v. 119, n. 2, p. 512–20, ago. 2000.

WATKINS, E. S.; STUBBS, J. D.; LEWIN, W. Urea in the management of head injuries. **Lancet (London, England)**, v. 1, n. 7173, p. 358–63, 18 fev. 1961.

WEN, Z. et al. Health related quality of life in patients with chronic gastritis and peptic ulcer and factors with impact: a longitudinal study. **BMC Gastroenterology**, v. 14, n. 1, p. 149, 20 dez. 2014.

WIDMAIER, E. P.; RAFF, H.; STRANG, K. T. **Fisiologia Humana Os mecanismos das funções corporais**. [s.l: s.n.].

WINTERBOURN, C. C.; PICHORNER, H.; KETTLE, A. J. Myeloperoxidase-dependent generation of a tyrosine peroxide by neutrophils. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 338, n. 1, p. 15–21, 1 fev. 1997.

YAMAGUCHI, K. et al. Involvement of interleukin-1 in the inflammatory actions of aminobisphosphonates in mice. **British journal of pharmacology**, v. 130, n. 7, p. 1646–54, ago. 2000.

YAMAMOTO, H. et al. Inducible types of cyclooxygenase and nitric oxide

synthase in adaptive cytoprotection in rat stomachs. **Journal of physiology, Paris**, v. 93, n. 5, p. 405–12, nov. 1999.

YANG, Y.-X. et al. Long-term proton pump inhibitor therapy and risk of hip fracture. **JAMA**, v. 296, n. 24, p. 2947–53, 27 dez. 2006.

YU, L.-Y. et al. A Review of the Novel Application and Potential Adverse Effects of Proton Pump Inhibitors. **Advances in Therapy**, v. 34, n. 5, p. 1070–1086, 20 maio 2017.

YUAN, Y.; PADOL, I. T.; HUNT, R. H. Peptic ulcer disease today. **Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology**, v. 3, n. 2, p. 80–89, fev. 2006.