



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

CÉSAR BRAGA DE HOLANDA OSÓRIO

**ATIVIDADE GASTROPROTETORA DO HIDROXICITRONELAL EM MODELOS
DE LESÃO GÁSTRICA AGUDA EM CAMUNDONGOS**

FORTALEZA

2011

CÉSAR BRAGA DE HOLANDA OSÓRIO

**ATIVIDADE GASTROPROTETORA DO HIDROXICITRONELAL EM MODELOS
DE LESÃO GÁSTRICA AGUDA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador (a): Prof^a. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar

FORTALEZA

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

O92a

Osório, César Braga de Holanda

Atividade gastroprotetora do hidroxycitronelal em modelos de lesão gástrica aguda
/ César Braga de Holanda Osório. – 2011.
89 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2011.

Orientação: Prof.^a Dr.^a Nylane Maria Nunes de Alencar.

1. Óleos Voláteis 2. Úlcera Gástrica 3. Etanol 4. Indometacina I. Título.

CDD:615.32

CÉSAR BRAGA DE HOLANDA OSÓRIO

**ATIVIDADE GASTROPROTETORA DO HIDROXICITRONELAL EM MODELOS
DE LESÃO GÁSTRICA AGUDA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a. Dr.^a. Nylane Maria Nunes de Alencar (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof.^a. Dr.^a. Danielle Silveira Macêdo
Universidade Federal do Ceará - UFC

*Aos meus pais, com todo carinho e respeito.
Aos meus amigos com todo o apreço.
Á minha namorada com todo amor.*

AGRADECIMENTOS

Aos Mestres,

À professora Nylane, minha orientadora, primeiramente pela oportunidade, pelo acolhimento e confiança. Obrigado por todos os conselhos e orientações. Obrigado pela sua paciência e por todos os ensinamentos.

Ao professor Marcellus e professora Danielle, pela disposição e ter aceitado participar da banca de defesa deste trabalho e contribuir de forma tão essencial para o enriquecimento deste.

Ao professor Marcus Vale pelo companheirismo e inspiração.

À família,

Aos meus pais Afonso e Edlamar, sem vocês nada disso seria possível. Obrigado por nunca ter deixado me faltar nada, sobretudo educação e conhecimento, disciplina e princípios. Amo vocês!

Ao meu irmão Cássio pelos momentos extrovertidos e pelas brigas! Aprendemos muito juntos.

As minhas mães substitutas, vovó Ailza e Teté por todo o suporte em todas as fases da minha vida. Por toda atenção e carinho. Amo vocês!

Aos colegas,

Aos meus amigos colegas de laboratório Italo, Ingrid, Patrícia, Lyara, Rachel, Tamyres, Luana, Larisse, Alana, Flávio, Patricia Samara e Emanuel. Por todos os momentos extrovertidos e produtivos. Obrigado por toda a ajuda e apoio.

Às funcionárias do departamento Aura e Márcia pela eterna dedicação e ajuda.

Aos amigos,

Primeiramente aos meus irmãos Tiago e Danilo. Vocês são a definição de amizade, obrigado por tudo!

Aos meus amigos da graduação Amanda, Gilberto, Duvilardo, Paloma, Vanessa, Camila e Mara por todos os momentos alegres.

Aos amigos de pós-graduação Raffaely e André.

À Maira, obrigado por estar ao meu lado durante todo o tempo! Seu apoio, seu carinho são essenciais! Obrigado te amo!

À Mailu, Murilo, Bel, Márcio e Mara. Obrigado por todo apoio!

*“Do not go where the path may lead, go instead
where there is no path and leave a trail.”
Ralph Waldo Emerson*

RESUMO

O hidroxicitronelal é um composto amplamente usado como fragrância em cosméticos. Este composto pode ser obtido a partir da semi-síntese do citronelal, um terpeno isolado do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon marginatus*) ou de cidreira (*Melissa officinalis*), e também várias outras plantas. O objetivo deste estudo é demonstrar a atividade gastroprotetora do hidroxicitronelal em modelos de lesão gástrica aguda.

A manipulação dos animais e os protocolos experimentais foram registrados no Comitê de Ética Institucional (CEPA) sob o número 052/2011. Foram utilizados camundongos swiss, que foram divididos em grupos de 8 (n = 8), e foram submetidos a um período de jejum de 16h, então foram tratados com HC nas doses de 0,5; 2,5 e 12,5 mg/Kg ou NAC (750 mg/Kg). Após 30 minutos os animais receberam 0,2 ml de etanol absoluto v.o. E após 30 min, os animais foram sacrificados, os estômagos removidos e analisados para determinação do índice de lesão ou feito homogenatos para a dosagem de GSH (glutathiona reduzida). A fim de se investigar o envolvimento das prostaglandinas, NO e dos canais de potássio, antes do tratamento com HC os animais receberam L-NAME(20mg/Kg) e/ou L-arginina(600mg/Kg), indometacina (10mg/Kg) e/ou misoprostol(0.03µg/Kg), Glibenclamida(5mg/Kg) e/ou Diazóxido(3mg/Kg). Para investigar a participação dos receptores TRPV1, os animais receberam capsaicina(0,3mg/Kg) e/ou capsazepina(5mg/Kg). No modelo de úlcera gástrica induzida por AINEs, os animais foram tratados com HC (12.5; 50 e 200 mg/Kg) ou Cimetidina (100 mg/Kg) 30 min antes do tratamento com indometacina (60 mg/Kg), e depois de 6h os animais foram sacrificados, os estômagos removidos e analisados sob o critério de escores de lesão.

No modelo de lesão por etanol, HC nas doses de 0,5; 2,5 e 12 mg/Kg foi capaz de inibir a lesão em 31; 53 e 69% respectivamente. HC também recuperou os níveis de GSH na mucosa em 31.19% quando comparados com o grupo lesão. L-NAME, Glibenclamida e Indometacina foram capazes de reverter o efeito de HC, demonstrando o envolvimento das Prostaglandinas, NO e dos canais de potássio, em seu mecanismo de ação. Capsazepina foi inefetiva em reverter o efeito de HC, assim excluindo o possível envolvimento dos receptores TRPV1. No modelo de lesão por AINEs, HC nas doses testadas reduziu os escores de lesão em 28.8, 56.3, e 84.1% respectivamente.

Podemos concluir que HC possui uma atividade farmacológica gastroprotetora sobre a mucosa do estômago. Essa proteção parece ser mediada em parte pela modulação de Prostaglandina/NO/ K_{ATP}, que é de papel fundamental na manutenção do fluxo sanguíneo e na defesa da mucosa gástrica.

Palavras-chave: Hidroxicitronelal. Lesão gástrica. Etanol. Indometacina.

ABSTRACT

The hydroxycitronellal is a compound widely used as fragrance in cosmetics. This compound can be obtained by semi-synthesis from citronellal, a terpenoid isolated from essential oil of citronella (*Cymbopogon marginatus*) or Balm (*Melissa officinalis*), and also found in other plants. The aim of this study is to demonstrate the gastroprotective of hydroxycitronellal in gastric ulcer models. Animal handling and experimental protocols were registered on the Institutional Ethics Committee (CEPA) under number 052/2011. Swiss mice were used, were divided into groups of 8 (n = 8), and undergo fasting of 16h, then were treated with HC in doses 0.5; 2.5 and 12,5 mg/Kg or NAC (750 mg/Kg). After 30 min they received 0, 2 ml of absolute ethanol per oral and after 30 min, the animals were sacrificed and stomachs removed and analyzed the lesion index and dosage of GSH (reduced glutathione). In order to investigate the involvement of prostaglandins, NO and potassium channels, before treatment with HC animals received L-NAME (20mg/Kg) or L-arginine (600mg/Kg), indomethacin (10mg/Kg) or misoprostol (0.03 μ g/Kg), Glibenclamide (5mg/Kg) or Diazoxide (3mg/Kg). To investigate the participation of TRPV1 receptors, animals received capsaicin (0,3mg/Kg) or capsazepina (5mg/Kg). In the model of injury by NSAID's, the animals were treated with HC (12.5; 50 and 200 mg/Kg) or Cimetidine (100 mg/Kg) 30 min before treatment with indomethacin (60 mg/Kg), and after 6h animals were sacrificed and stomachs removed and examined under-rated scores. In model of injury by ethanol, HC at the doses 0,5; 2.5 and 12 mg/Kg was able to prevent injury in 31.0; 52.9 and 69.3% respectively. HC also restored the GSH levels in mucosa in 31.19% compared to the ethanol group. LNAME, Glibenclamide and Indometacin were able to reverse the protective effect of HC, demonstrating the involvement of Prostaglandins, NO and potassium channels in its mechanism of action. Capsazepine was unable to reverse the effect of HC, thus excluding a possible involvement of TRPV1 receptors. In the model of injury by NSAID's, HC in tested doses reduces the injury scores in 28.8, 56.3, and 84.1% respectively. We can conclude that the HC has pharmacological activity with gastroprotetor effect in the gastric mucosa. This protection appears to be mediated in part by modulation of Prostaglandin/NO/K_{ATP}, which is of great importance in mucosal defense and in maintaining blood flow to the stomach.

Key-Words: Hydroxycitronellal. Gastric ulcer. Ethanol. Indomethacin.

LISTA DE FIGURAS

1. Morfologia da glândula oxíntica e célula parietal.....	18
2. Mecanismos e moduladores da secreção ácida.....	20
3. Mecanismos da vasodilatação arteriolar.....	26
4. Fisiopatologia da úlcera gástrica.....	30
5. Estrutura molecular do Citronelal.....	37
6. À esquerda <i>Cymbopogon nardus</i> (capim-citronela) e à direita <i>Melissa officinalis</i> (cidreira).....	37
7. Estrutura molecular do Hidroxicitronelal.....	38
8. Protocolo utilizado para determinação do efeito protetor de HC em lesão gástrica induzida por etanol.....	43
9. Protocolo utilizado para determinação do efeito protetor de HC em lesão gástrica induzidas por indometacina.....	47
10. Efeito do Hidroxicitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol.....	50
11. Efeito macroscópico e microscópico do tratamento com HC na lesão gástrica induzida por etanol absoluto.....	52
12. Envolvimento do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor do Hidroxicitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol.....	54
13. Microfotografias de cortes histológicos da porção glandular de estômagos imunomarcados para iNOS.....	55
14. Envolvimento do GMPc no efeito gastroprotetor do Hidroxicitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.....	56
15. Envolvimento dos canais de potássio ATP - dependente no efeito gastroprotetor do Hidroxicitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.....	58

16. Envolvimento das prostaglandinas no efeito gastroprotetor do Hidroxicitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.....	59
17. Envolvimento dos receptores TRPV1 no efeito gastroprotetor do Hidroxicitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.....	61
18. Efeito do HC sobre a glutathiona da mucosa gástrica agredida por etanol.....	62
19. Efeito do HC sobre a glutathiona reduzida da mucosa gástrica sem lesão induzida por etanol.....	63
20. Efeito do Hidroxicitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por indometacina.....	65
21. Mecanismo hipotético do efeito gastroprotetor do HC.....	76

LISTA DE QUADROS

1. Determinação do índice de lesões gástricas induzidas por indometacina	47
--	----

LISTA DE TABELAS

1. Efeito do Hidroxycitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol	49
2. Efeito do Hidróxicitronelal sobre a análise histopatológica da lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.....	51
3. Envolvimento do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor do Hidroxycitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol	53
4. Envolvimento do GMP cíclico no efeito gastroprotetor do Hidroxycitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol	56
5. Envolvimento dos canais de potássio ATP - dependentes no efeito gastroprotetor do Hidroxycitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol.....	57
6. Envolvimento das prostaglandinas no efeito gastroprotetor do Hidroxycitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol.....	59
7. Envolvimento dos receptores TRPV1 no efeito gastroprotetor do Hidroxycitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol.....	60
8. Efeito do HC sobre a glutathiona reduzida da mucosa gástrica agredida por etanol.	62
9. Efeito do HC sobre a glutathiona reduzida da mucosa gástrica sem lesão induzida por etanol.....	63
10. Efeito do Hidroxycitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por indometacina	64
11. Efeitos do Hidróxicitronelal sobre parâmetros hematológicos no sangue periférico.....	66
12. Efeitos do Hidróxicitronelal sobre parâmetros bioquímicos no sangue periférico..	66

LISTA DE SIGLAS

µg	Micrograma
µl	Micro litro
5-HT	Serotonina
ADP	Adenosina Difosfato
AINE	Antiinflamatório não esteroideal
ALT	Enzima Alanina Aminotransferase
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP-1	(fator de transcrição)
AST	Enzima Aspartato Aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BH4	Tetrahidrobiopterina
BSA	Albumina sérica bovina
Cag	Produtos associados ao gene da citotoxina
CAT	Catalase
CCK-B	Colecistoquinina
CCK2R	Receptor de gastrina/CCK-B
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico complementar
CEPA	Comitê de Ética Institucional
CGRP	<i>Calcitonin Gene-related Peptide</i>
COX	Ciclooxigenase
DTNB	ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)
ECL	<i>Enterocromafin like cell</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	Fator de crescimento epidermal
Egr-1	(fator de transcrição)
eNOS	NOS endotelial (tipo 3)
EP1	Receptor de Prostaglandina tipo 1
EP3	Receptor de Prostaglandina tipo 3
EP4	Receptor de Prostaglandina tipo 4
EPM	Erro Padrão da Média
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
g	Gramma
GC	Guanilato Ciclase
GCs	Guanilato Ciclase Solúvel
GMP	Guanosina monofosfato
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico

GR	Glutationa Redutase
GS	Glutationa Sintase
GSH	Glutationa reduzida
GSH-px	Glutationa Peroxidase
GSSG	Disulfeto Glutationa
-GT	Sistemas enzimáticos -glutamyltranspeptidase
h	Hora
H2R	Receptor Histamínico tipo 2
HC	Hidroxicitronelal
HE	Hematoxilina-eosina
i.p.	Intraperitoneal
ICAM	Molécula de adesão intracelular
IL	Interleucina
iNOS	NOS induzida (tipo 2)
IP	Receptor de Prostaglandina I
JNK	(molécula sinalizadora)
K _{ATP}	Canais de Potássio sensíveis a ATP
Kg	Kilograma
L-NAME	N ^G -Nitro-L-arginina-metiléster
M	Molar
M3R	Receptor colinérgico muscarínico M3
MALT	(linfoma)
MAPK p38	<i>Mytogen activated protein kinase</i>
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NAC	N-acetilcisteína
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF-κB	Fator nuclear κB
nm	Nanômetro
nNOS	NOS neuronal (tipo 1)
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintetase
NOS-II	NOS indutível
NSAID	<i>Nonsteroidal anti-inflammatory drugs</i>
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
p	Nível de significância
CYP2B1	Sub-família 2B, citocromo p450
PACAP	Polipeptídeo Ativador da Adenilato Ciclase Pituitária
PAF	Fator de Agregação Plaquetário
PBS	Tampão fosfato
PG	Prostaglandina
PGD2	Prostaglandina D2

PGE2	Prostaglandina E2
PGF2	Prostaglandina F2
PGI2	Prostaglandina I2
pH	Potencial hidrogeniônico
PKG	Proteínas Quinases G
rpm	Rotação por minuto
SOD	Superóxido Dismutase
SODex	Superóxido Dismutase extracelular
TGI	Trato Gastrointestinal
TNF	Fator de necrose tumoral
Ton	Tonelada
TRPV1R	Receptor de Potencial Transiente Vanilóide 1
UFC	Universidade Federal do Ceará
v.o.	Via oral
VacA	Citotoxina Vacuolizante A
VEGF	Fator de crescimento derivado do endotélio
VGCC	Canais de Cálcio Voltagem Dependentes
vs	Versus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Fisiologia do estômago.....	18
1.2 Fatores de defesa da mucosa gástrica.....	21
1.2.1 Barreira Muco-Bicarbonato.....	21
1.2.2 Prostaglandinas.....	22
1.2.3 Microcirculação.....	23
1.2.4 Neurônios Sensoriais Aferentes.....	23
1.2.5 Óxido Nítrico (NO).....	24
1.2.6 Canais de Potássio ATP dependentes.....	25
1.2.7 Renovação Epitelial.....	27
1.2.8 Sistema Antioxidante.....	27
1.3 Fisiopatologia da Úlcera Péptica.....	29
1.3.1 Úlcera Péptica e Abordagens Terapêuticas.....	31
1.4 Modelos animais de indução aguda de lesão gástrica.....	32
1.4.1 Modelo experimental de lesão gástrica induzida por etanol absoluto.....	32
1.4.2 Modelo experimental de lesão gástrica induzida por indometacina.....	33
1.5 Produtos naturais na proteção gástrica.....	35
1.5.1 Hidroxicitronelal e terpenos de óleos essenciais.....	36
2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	39
3 OBJETIVOS.....	40
3.1 Objetivo Geral.....	40
3.2 Objetivos Específicos.....	40
4 MATERIAIS.....	41
4.1 Animais experimentais.....	41
4.2 Drogas e reagentes.....	41
4.3 Equipamentos.....	42
5 MÉTODOS.....	43
5.1 Efeito protetor do Hidroxicitronelal (HC) na lesão gástrica induzida por etanol: curva dose-resposta.....	43
5.2 Avaliação histopatológica.....	44
5.3 Investigação dos mecanismos gastroprotetores do HC no modelo de lesão gástrica induzida por etanol.....	44
5.3.1 Estudo do envolvimento do óxido nítrico (NO).....	44

5.3.2 Efeito sobre expressão da iNOS.....	44
5.3.3 Investigação do papel da guanosina monofosfato cíclico (GMPc).....	45
5.3.4 Investigação do papel dos canais de potássio dependentes de ATP (K _{ATP}).....	45
5.3.5 Investigação do papel das prostaglandinas (PGs).....	45
5.3.6 Investigação do papel de neurônios primários aferentes via receptor de potencial transiente vanilóide 1 (TRPV1).....	45
5.3.7 Papel da glutathiona reduzida (GSH).....	46
5.4 Efeito protetor do Hidroxycitronelal (HC) na lesão gástrica induzida por Indometacina: curva dose-resposta.....	46
5.5 Avaliação toxicológica aguda.....	48
5.6 Análise Estatística.....	48
6 RESULTADOS.....	49
6.1 Hidroxycitronelal (HC) reduz de forma dose-dependente as lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	49
6.2 Hidroxycitronelal (HC) reduz os escores histopatológicos de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.....	51
6.3 Efeito gastroprotetor do Hidroxycitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol é revertido pelo pré-tratamento dos animais com L-NAME.....	53
6.4 Tratamento com Hidroxycitronelal diminui a imunomarcagem para iNOS na mucosa gástrica induzida por etanol.....	54
6.5 Efeito gastroprotetor do Hidroxycitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos é dependente da enzima Guanilato-Ciclase.....	55
6.6 Efeito gastroprotetor do Hidroxycitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol é dependente da abertura dos canais de potássio ATP-dependentes.....	57
6.7 Efeito gastroprotetor do Hidroxycitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos é dependente da atividade da enzima COX.....	58
6.8 O efeito gastroprotetor do Hidroxycitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos independe da ativação dos receptores TRPV1 nos neurônios aferentes.....	60
6.9 Hidroxycitronelal inibe a redução dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) na mucosa gástrica de camundongos com lesão gástrica induzida por etanol.....	61
6.10 Hidroxycitronelal (HC) reduz de forma dose-dependente as lesões gástricas induzidas por Indometacina em camundongos.....	64
6.11 Avaliação Toxicológica Aguda.....	65
7 DISCUSSÃO.....	67

8 CONCLUSÃO.....	76
9 REFERÊNCIAS.....	77

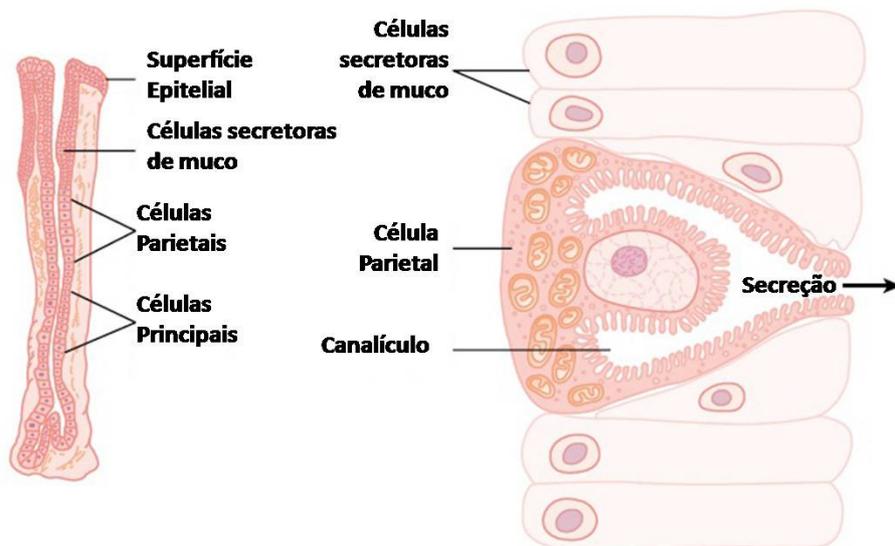
1 INTRODUÇÃO

1.1 Fisiologia estômago

O estômago corresponde a maior dilatação do tubo digestivo, repousa entre o esôfago e o duodeno, está no lado esquerdo da cavidade abdominal, tem um volume de cerca de 50 mL e apresenta pregas quando vazio. Depois de uma refeição, ele geralmente se expande para suportar cerca de 0,8 a 1,5 litro. Anatomicamente, ele é subdividido em cárdia, fundo, corpo e antro (HAM, 1991).

A superfície mucosa do estômago é coberta por células secretoras de muco e por dois tipos principais de glândulas: glândula oxíntica e glândula pilórica. As glândulas oxínticas estão localizadas nas superfícies do corpo e fundo estomacal, constituindo aproximadamente 80 por cento do estômago, e secretam ácido clorídrico (HCl), pepsinogênio, fator intrínseco e muco. As glândulas pilóricas secretam, sobretudo, muco e também os hormônios gastrina e somatoestatina pelas células G e células D, respectivamente. Se localizam na porção antral que representa aproximadamente 20 por cento do estômago (JASS, 2001).

FIGURA 1 – Morfologia da glândula oxíntica e célula parietal.



A glândula oxíntica possui em sua estrutura três células principais organizadas na forma de um canal (Figura1). No topo estão células produtoras de muco, em seguida temos as células parietais que secretam HCl e fator intrínseco, e por fim temos as células principais que secretam grandes quantidades de pepsinogênio.

O pepsinogênio secretado não possui função digestiva, porém, quando entra em contato com o meio ácido, é clivado à pepsina, que possui atividade proteolítica em meio ácido (pH ótimo de 1,8 a 3,5) e perde atividade em pH maior que 5. O ácido estomacal também auxilia na absorção de ferro, cálcio e vitamina B12, e graças ao meio inóspito formado pelo HCl, auxilia na defesa do organismo contra infecções (SCHUBERT; PEURA, 2008).

A regulação da secreção ácida é controlada por um contínuo controle neural, com envolvimento da acetilcolina e do peptídeo liberador de gastrina, um controle hormonal, pela ação da gastrina, e há ainda um controle de forma parácrina pela histamina liberada pelas células semelhantes a mastócitos (ECL – “enterocromafin like cell”), que estão intimamente ligadas às células parietais (Figura 2) (ZANNER; GRATZL; PRINZ, 2002).

Este controle direto ou indireto da célula parietal é mediado principalmente por três receptores: receptor colinérgico muscarínico M3 (M3R), receptor histamínico H2 (H2R), e receptor gastrina/CCK-B (CCK2R). Destes três receptores, H2R parece possuir um papel chave, uma vez que antagonistas para este receptor não inibem somente a secreção estimulada por histamina, mas também aquela estimulada por acetilcolina e gastrina (SHANKLEY; WELSH; BLACK, 1992).

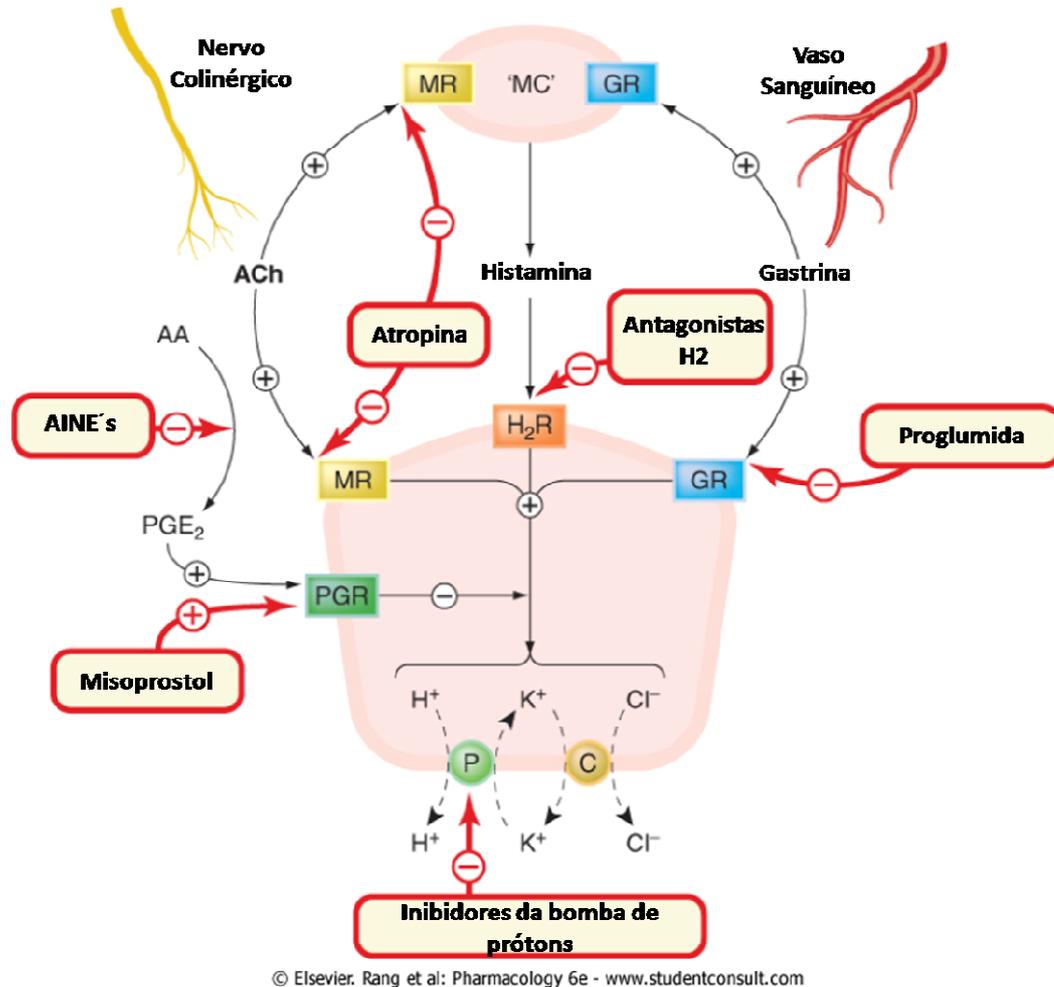
A estimulação dos receptores M3R pela acetilcolina e CCK2R pela gastrina, resultam em um aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} . Nas células parietais este aumento do cálcio ativa proteínquinases que estimulam a secreção ácida. Nota-se, porém, que existe uma concentração mínima de AMP cíclico (AMPC), requerida para que haja secreção ácida induzida pela gastrina (GEIBEL, 1995; COCKRAY; VARRO; DIMALINE, 2001; HOCKER, 2004).

As ECLs, quando estimuladas tanto pela gastrina quanto pela acetilcolina agindo sobre receptores CCK2R ou pelo receptor do polipeptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária (PACAP) geram estimulação da liberação de histamina (ZENG, 1999; SANDVIK et al., 2001).

A liberação de histamina ativa na célula parietal o receptor H2R acoplado à proteína G aumentando a concentração intracelular de AMPC, que no papel de segundo mensageiro transduz o sinal à bomba de prótons. A ativação destes receptores estimula as bombas de prótons nos canalículos secretores das células parietais. Depois que uma quantidade suficiente de ácido foi secretada, um mecanismo de “feedback” finaliza a secreção (BARRETT; KEELY, 2000).

A diminuição do pH estimula as células D anrais a liberarem somatoestatina, um inibidor da secreção ácida, e inibe a liberação de gastrina pelas células G. Adicionalmente, a acidificação do duodeno causa liberação do hormônio secretina, que também age inibindo a secreção ácida (COCKRAY; VARRO; DIMALINE, 1996; AIHARA et al., 2003).

FIGURA 2 - Mecanismos e moduladores da secreção ácida.



Apesar das altas concentrações de ácido clorídrico e pepsina, o estômago não se digere. Fatores de proteção da mucosa são capazes de barrar essa ação lesiva. Em condições fisiológicas, há um balanço entre fatores agressores (HCl, pepsina) e fatores protetores da mucosa como muco, bicarbonato, proliferação celular, prostaglandinas, mediadores gasosos (óxido nítrico e sulfeto de hidrogênio) e neuropeptídeos (“calcitonin gene-related peptide” - CGRP) (WALLACE, 2008).

1.2 Fatores de defesa da mucosa gástrica

Os fatores de defesa da mucosa também protegem o estômago de fatores externos, como a ingestão de alimentos em alta temperatura ou osmolalidade, baixo pH, com ação detergente, etanol e alimentos contaminados por bactérias ou toxinas que possam vir a gerar algum processo inflamatório na mucosa gástrica (BRZOZOWSKI et al., 2005).

Os mecanismos de defesa da mucosa gástrica podem ser classificados em três níveis de proteção: pré-epitelial, epitelial ou subepitelial. A proteção pré-epitelial é realizada pela barreira muco-bicarbonato. A proteção epitelial é dada pelos surfactantes (fosfolipídios anfóteros) que aumentam a hidrofobicidade das membranas biológicas, e compostos antioxidantes como os grupos sulfidrílicos não-protéicos e GSH (glutathiona reduzida), constituindo fatores importantes da proteção epitelial contra radicais livres. A proteção subepitelial é dada pelo fluxo sanguíneo que supre a mucosa com nutrientes e oxigênio, além de remover íons hidrogênio e outros agentes nocivos, sendo regulada por diferentes mecanismos (WALLACE; GRANGER, 1996).

1.2.1 Barreira Muco-Bicarbonato

A barreira de muco bicarbonato e fosfolipídios são a primeira linha de defesa da mucosa gástrica. É a primeira barreira física entre o conteúdo gástrico e a mucosa. Existem pelo menos dois tipos de células secretoras de muco em diferentes camadas: células de superfície da mucosa e glandulares. Ambas as células produzem e secretam mucina, uma glicoproteína de alto peso molecular, que forma um muco com aspecto de gel por cima da mucosa; estas células bombeiam constantemente íons bicarbonato e fosfolipídios para a camada de muco, mantendo um pH entre 5 e 6 e um caráter hidrofóbico. Quando ocorre a secreção ácida, uma camada de ácido se forma acima da barreira de muco e ambas não se misturam devido à diferença de polaridade. Na luz, durante a secreção ácida, o pH chega perto de 1. É sabido que esse caráter hidrofóbico é o maior responsável por evitar a difusão contrária de ácido, protegendo a mucosa (BERNHARD et al., 1995; ICHIKAWA et al., 2000).

Os íons bicarbonato têm papel de tamponar o excesso de íons H^+ no muco e também ocasionalmente no sangue, quando a barreira de defesa é rompida. As células parietais quando liberam H^+ para o canalículo da glândula oxíntica, transportam simultaneamente íons bicarbonato pela membrana basolateral em troca com cloreto, o que resulta em uma maior

disponibilidade de bicarbonato. Além disso, para cada íon H^+ secretado pela célula parietal, uma molécula de CO_2 é convertida em bicarbonato, provocando o que se conhece como maré alcalina após a secreção de ácido gástrico. O papel da maré alcalina em proteger a mucosa gástrica é fortemente sustentado por outros estudos que demonstram que a administração parenteral de bicarbonato “in vivo” e a infusão de bicarbonato na mucosa gástrica “in vitro” protegem a mucosa contra lesões (KIVILUOTO et al., 1993; GOEL; BHATTACHARYA, 1991).

As células são estimuladas a produzir muco tanto por estímulo mecânico como por estímulo de autacóides como as prostaglandinas.

1.2.2 Prostaglandinas (PGs)

As prostaglandinas possuem papel fundamental na proteção da mucosa. São sintetizadas a partir do ácido araquidônico pelas enzimas ciclooxigenases (COX). Existem duas isoformas da COX no estômago: a COX-1 é expressa constitutivamente e produz a maior parte da prostaglandinas em condições normais, já a COX-2 é a forma induzida, está presente nos processos inflamatórios e tem importância nos processos de cicatrização, uma vez que sua inibição aumenta o tempo de cicatrização das úlceras independentemente de sua síntese de prostaglandinas (PERINI; MA; WALLACE, 2003). No estômago as PGs se ligam, sobretudo, aos receptores E_1 acoplados às proteínas G. Estes, quando ativados, estão relacionados ao aumento da secreção de bicarbonato, aumento do fluxo sanguíneo na mucosa lesionada e diminuição da motilidade gástrica. Quando ligadas aos receptores E_2 e E_3 , exercem ações marcadamente importantes para proteção gástrica como a inibição da secreção ácida nas células parietais via proteína G inibitória, e nas células epiteliais provoca um aumento da secreção de muco (HOOGERWERF; PASRICHA, 2006; AIHARA et al., 2007). Além disso, as PGs diminuem a ativação e aderência de plaquetas e leucócitos ao endotélio vascular (LAINE et al., 2008). Os mecanismos de defesa da mucosa gástrica que são estimulados ou facilitados por PGs, são total ou parcialmente abolidos quando são utilizadas inibidores da Ciclooxigenase (COX).

1.2.3 Microcirculação

O estômago se protege da lesão gástrica por diversos mecanismos, dentre estes o controle do fluxo sanguíneo da microcirculação é fundamental. O controle do fluxo sanguíneo deve ser garantido para suprir o aporte de nutrientes devido à alta atividade metabólica, para transportar oxigênio para mucosa gástrica e para que possa haver a remoção de substâncias tóxicas. Os capilares entram na lamina própria e se direcionam para atingir as proximidades das células glandulares epiteliais. Na base das células epiteliais os capilares convergem para vênulas coletoras (GANNON, 1984). A elevação do fluxo sanguíneo é importante em prover bicarbonato para secreção tamponante das células epiteliais e para drenar o excesso de ácido em momentos que a barreira protetora da mucosa é rompida e ocorre uma redifusão de íons H^+ para a mucosa (MAITY et al., 2003).

1.2.4 Neurônios sensoriais aferentes

Os neurônios aferentes funcionam como sensores luminiais, que regulam o fluxo sanguíneo local por liberarem substâncias neuroendócrinas. São fibras do tipo C sensíveis à capsaicina e lidocaína, e podem ser ativadas por estímulos mecânicos ou térmicos, isquemia ou hipóxia. Este reflexo vasodilatador parece ser mediado em parte pela atividade sináptica de nervos inibitórios dos gânglios simpáticos e mioentéricos e pela atividade de neurônios do plexo submucoso que contêm peptídeo intestinal vasoativo. Essa transmissão neurogênica é caracterizada pela regulação pré-sináptica de transmissores liberados das varicosidades neurais perivasculares e pela recaptação por ativação de receptores pré-sinápticos. Diversas substâncias como a noradrenalina, acetilcolina, serotonina (5-HT), bradicininas, adenosina, ATP, prostaglandinas, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), vasopressina, neuropeptídeo Y, somatoestatina, peptídeo vasoativo intestinal e substância P, estão envolvidas nestes processos. Estas substâncias estimulam nervos do plexo submucoso e causam vasodilatação das arteríolas submucosas (CHOU; ALEMAYEHU, 1993; SURPRENANT, 1994; HANSEN et al., 1998).

1.2.5 Óxido Nítrico (NO)

O óxido nítrico (NO) é um gás ubíquo no organismo, de natureza lipofílica difunde-se rapidamente, iniciando sinais intercelulares e intracelulares. O óxido nítrico é gerado a partir da reação entre L-arginina e O₂ catalisada pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS) utilizando NADPH e BH₄ como co-fatores (PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987). Três diferentes cDNAs codificam três distintas isoformas da NOS. A NOS neuronal (nNOS ou NOS tipo 1) identificada constitutivamente nos neurônios; a endotelial (eNOS ou tipo 3), identificada constitutivamente do endotélio vascular e plaquetas, e a forma induzida (iNOS ou tipo 2), que é induzida por citocinas e/ou endotoxinas em uma variedade de células, incluindo-se macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condriócitos, neutrófilos e plaquetas (MACMICKING et al., 1997; DUSSE et al., 2003).

As três diferentes isoformas possuem a capacidade de gerar o NO por mecanismos regulatórios complementares e distintos. As isoformas constitutivas são dependentes de Ca²⁺, e são ativadas quando há influxo de cálcio no interior da célula quando estas são estimuladas por neurotransmissores como acetilcolina (endotélio) e glutamato (neurônio). A NOS induzida (NOS-II) não é expressa sob condições normais, e não depende de elevação no cálcio intracelular.

O óxido nítrico gerado então se difunde pelo músculo liso vascular e ativa a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), onde o NO liga-se no grupamento HEME da enzima, estimulando a formação de GMPc, que por sua vez ativam proteínas quinases G (PKG), iniciando uma cascata de fosforilação para obter a função efetora de vasodilatação (DENNINGER et al., 2001).

Entretanto, em determinadas situações, patológicas ou não, a sinalização mediada pelo NO pode ser independente da ativação da GC. O NO, por exemplo, regula diretamente a função de canais iônicos, enzimas e várias proteínas. Esta regulação parece ocorrer, ao menos em parte, pela nitrosilação de grupamentos tióis do resíduo de cisteína presentes nas proteínas (JAFFREY et al., 2001).

A atividade do óxido nítrico na mucosa gástrica contribui com uma série de fatores protetores. Está envolvido na produção de muco e bicarbonato (WHITTLE, 1992; HOLM et al., 1998), na diminuição da secreção ácida estimulada pela histamina (KATO et al., 1998) e no aumento do fluxo capilar na mucosa do trato gastrointestinal (WALLACE; GRANGER, 1996). O NO atua ainda em sinergia com outros mediadores endógenos como as

prostaglandinas e os neuropeptídeos na proteção da mucosa gástrica, atuando de forma citoprotetora (TEPPERMAN; WHITTLE, 1992).

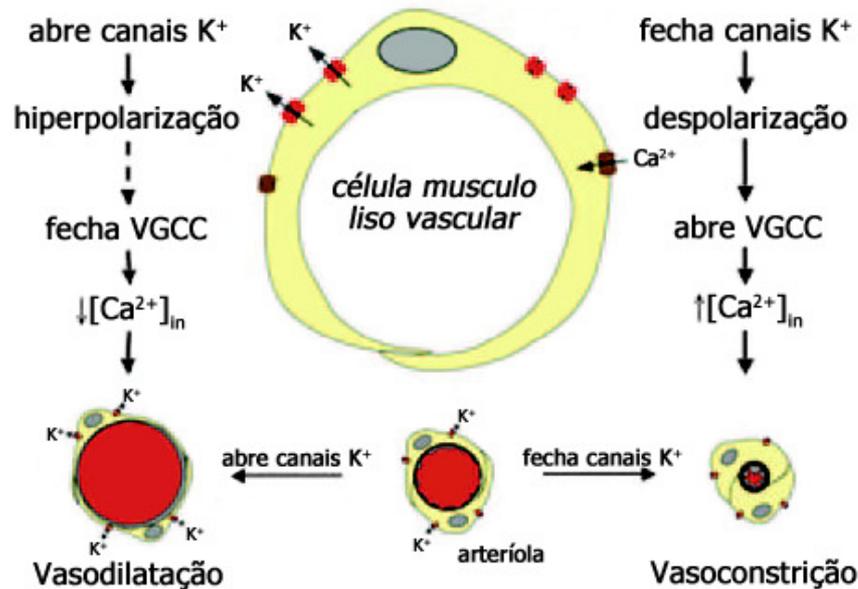
Contudo, estudos mais recentes demonstram que o NO atua de maneira bifásica na resposta ulcerogênica da mucosa gastrointestinal dependendo das isoformas da NOS, ou seja, o NO produzido pela NOS constitutiva apresentaria efeito protetor, e o NO originário da NOS induzível teria um efeito pró-ulcerogênico (NISHIO et al., 2006).

1.2.6 Canais de potássio ATP dependentes.

Os canais iônicos têm papel fundamental na regulação da microcirculação. Nas membranas plasmáticas e nas membranas dos retículos endoplasmáticos, os canais iônicos controlam a entrada de Ca^{2+} para os citoplasmas das células endoteliais e de músculo liso arteriais. Nas células musculares, a concentração de Ca^{2+} determina o tônus contrátil, enquanto que na célula endotelial controlam a produção e liberação de autacóides, como o NO e PGs (QUAYLE; NELSON; STANDEN, 1997).

O influxo de Ca^{2+} é controlado pelos Canais de Cálcio voltagem dependentes (VGCC), que são ativados ou desativados de acordo com o potencial de membrana da célula. As mudanças no gradiente eletroquímico por sua vez são controlados pelos canais de potássio, que quando abertos, o influxo de K^+ hiperpolariza a célula, e com isso fecha os VGCC, diminuindo a concentração de Ca^{2+} , levando à vasodilatação. Por sua vez, o fechamento dos canais de potássio causa despolarização da célula, com isso acontece a abertura dos VGCC, aumentando a concentração de Ca^{2+} e assim levando à vasoconstrição (Figura 3) (NILIUS; DROOGMANS, 2001).

FIGURA 3 – Mecanismos da vasodilatação arteriolar.



Os canais de potássio sensíveis à ATP (K_{ATP}), como o próprio nome explica, são sensíveis às concentrações intracelulares de ATP. Estes canais são modulados por uma miríade de outros mediadores intracelulares como ADP, H^+ e Ca^{2+} . Os canais K_{ATP} das células de músculo liso possuem estruturas tetrâmeras de subunidades KIR 6.1 (receptor ATP) dispostas em volta do poro central e possuem subunidades tipo SUR 2B (receptor de sulfoniluréia). Os canais K_{ATP} são bloqueados por sulfoniluréias como a glibenclamida e abertos por agonistas como pinacidil e cromakalim. (QUAYLE; NELSON; STANDEN, 1997). Estudos mostram que estes canais podem ser ativados por proteínaquinase A e proteínaquinase dependente de GMPc, esta atividade vem sendo relacionada à atividade vasodilatadora de mediadores endógenos como adenosina, prostaglandinas, CGRP e NO. Por sua vez, a ativação de proteínaquinase C e o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , pela ação de vasoconstritores como a adrenalina, vasopressina, endotelina e angiotensina II, inativariam os canais K_{ATP} (JACKSON, 1993; NELSON; QUAYLE, 1995).

Células endoteliais dos capilares também expressam canais K_{ATP} . Há algum tempo que sua presença vem sendo inferida pelos efeitos de antagonistas (sulfoniluréias) e agonistas (pinacidil e cromakalim) na microcirculação. Estes canais estão relacionados aos efeitos vasodilatadores nas arteríolas induzidas por hiperosmolaridade, adenosina e isoflurano (GAMPERL et al., 2002; ISHIZAKA; KUO, 1997; MARSHALL; THOMAS; TURNER, 1993).

1.2.7 Renovação Epitelial

A alta taxa de renovação do epitélio é uma característica de defesa da mucosa gástrica, sofre influência da secreção de alguns hormônios e outras moléculas autacóides.

Nas populações celulares sob constante renovação, a produção contínua de novas células geralmente resulta da divisão de células tronco e sua descendência, equilibrado por uma perda equivalente de células mais velhas. Na mucosa gástrica, essas células-tronco estão localizadas no istmo, que tem posição central na unidade gástrica, e demonstra recursos comumente encontrados em células embrionárias. As células istmais funcionalmente têm alta capacidade de proliferação, a fim de garantir sua própria renovação enquanto produz três tipos de células: células “pré-pit” (superfície), “pré-neck” e pré-parietal (glandulares). Células do tipo “pré-pit” e seus precursores representam a maioria das células istmais e geram as células da superfície da mucosa, que migram unidirecionalmente para o lúmen. As células de superfície têm vida média curta, de 3 a 5 dias (KARAM; LEBLOND, 1993).

Células “pré-neck” diferenciadas movem-se em direção à base da glândula e passam por nova diferenciação para formar as células principais, ou zimogênicas. Células parietais diferenciadas migram bidirecionalmente, um pequeno número de células migra em direção ao lúmen e a maioria das células progride para a base da glândula. As células parietais têm vida mais longa, de 50 a 60 dias (LACY et al., 1996).

1.2.8 Sistema Antioxidante

Um radical livre é definido como qualquer espécie química que contém um ou mais elétrons desemparelhados. Espécies reativas derivadas de oxigênio (ERO) é uma expressão que inclui radicais de oxigênio, como radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxila (OH^{\bullet}), peroxila (RO_2) e hidroperoxila (HO_2) e outros agentes oxidantes que não são radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$) e ozônio (O_3), porém podem ser convertidos fácil e rapidamente em radicais (HALLIWELL; GUTRIDGE, 2006).

A formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) é um evento constante nas células e acontece em decorrência do metabolismo normal, como na respiração celular ou em condições patológicas, como na inflamação (CNUBBEN, 2001).

Em condições fisiológicas, cerca de 95% de oxigênio molecular sofre redução controlada na mitocôndria pelo sistema citocromo oxidase formando água. Os outros 5% do

oxigênio molecular sofre redução incompleta, o que leva a formação das EROs (FESHARAKI et al., 2006). Essas espécies são bastante danosas para as células, pois são moléculas altamente reativas e interagem indiscriminadamente com diversas estruturas celulares como lipídeos e proteínas podendo alterar a fisiologia celular comprometendo a integridade das estruturas celulares, levando à morte destas. Quando reagem com DNA podem ocasionar mutações e desenvolvimento de câncer (CNUBBEN, 2001; KOCEVAR et al., 2008).

As células em geral, assim como as do trato gastrointestinal, possuem sistemas de defesa antioxidante capazes de evitar a citotoxicidade das EROs através de mecanismos que envolvem a ação de enzimas e compostos com potencial de sequestrar radicais livres. Entre as enzimas envolvidas nessa ação estão a superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GSH-px) e catalase (CAT.). Além de contar com moléculas com capacidade de se reduzir e “sequestrar” as EROs como tióis, glutatona reduzida (GSH), alfa-tocoferol (vitamina E), vitamina C, carotenóides, metionina e taurina, que se ligam aos radicais de oxigênio e impedem as suas ações lesivas (FESHARAKI et al., 2006).

A SOD é uma metaloproteína que dismuta o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2). Existem três tipos de SOD: CuZn-SOD, Mn-SOD e Fe-SOD. A CuZn-SOD é encontrada no citosol de células eucarióticas, em cloroplastos e algumas espécies de bactérias; a Mn-SOD é encontrada na mitocôndria de eucarióticos e procarióticos e a Fe-SOD em procarióticos. As mitocôndrias são muito susceptíveis aos danos causados pelas EROs, os quais são gerados continuamente na cadeia respiratória, e é por essa razão que existe uma enzima antioxidante nesta organela (RAHA; ROBINSON, 2000). Existe também uma forma extracelular de CuZn-SOD (SODex), que difere estruturalmente da forma citosólica e é encontrada principalmente na matriz e no fluido extracelular dos tecidos (OURY et al., 1996). A formação do radical superóxido acontece espontaneamente na membrana mitocondrial, mas pode ser produzido também endogenamente, por flavoenzimas, como xantina oxidase ativada na isquemia de reperfusão, lipoxigenase, ciclooxigenase e NADPH oxidase (NORDBERG; ARNER, 2001).

O peróxido de hidrogênio não é considerado um radical livre, mas é altamente importante pela sua habilidade de penetrar nas membranas biológicas e por ser intermediário na formação de moléculas mais reativas, tais como o ácido hipocloroso (HOCl) pela ação da mieloperoxidase (enzima presente nos fagossomas de neutrófilos), e mais importante na formação de radicais hidroxila ($\bullet OH$) via ativação de metais de transição. O peróxido de hidrogênio é removido por três sistemas enzimáticos antioxidantes: catalase, glutatona

peroxidase e peroxiredoxinas (NORDBERG; ARNER, 2001). A catalase localiza-se principalmente nos peroxissomos, onde catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. A catalase tem a função também de detoxificação de diferentes substratos, como fenóis e alcoóis pela redução do peróxido de hidrogênio. A catalase liga-se com NADPH, o qual protege a enzima da inativação e aumenta assim sua eficiência (KIRKMAN; GAETANI, 1984; KIRKMAN et al., 1999).

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo e representa o mais proeminente tiol de baixo peso molecular presente nas células. Os níveis celulares de GSH são controlados por diversos sistemas enzimáticos -glutamyltranspeptidase (-GT), transportador de aminoácidos, glutathiona sintase (GS), glutathiona peroxidase (GSH-px) e glutathiona redutase (GR) (ISHIKAWA et al., 1997). Sobre condições de estresse oxidativo, as ERO são reduzidas pela GSH com formação concomitante de GSSG (dissulfeto glutathiona). A GSH reage rapidamente e não enzimaticamente com o radical hidroxila, com N_2O_3 e peroxinitrito (GRIFFITH, 1999), indicando a sua ação antioxidante química. A glutathiona age como um co-fator da GSH-px mediando a redução de peróxido resultando na formação de GSSG (CNUBBEN et al., 2001). Em condições normais o GSSG é reduzido para GSH pela glutathiona redutase (GR) na presença de NADPH, formando o ciclo redox (LU, 2000). Em condições de estresse oxidativo, para manter o balanço redox, o GSSG é exportado da célula por proteínas transportadoras dependentes de ATP, implicando que em condições severas de estresse oxidativo ocorre a depleção dos níveis de GSH (LEIER et al., 1996).

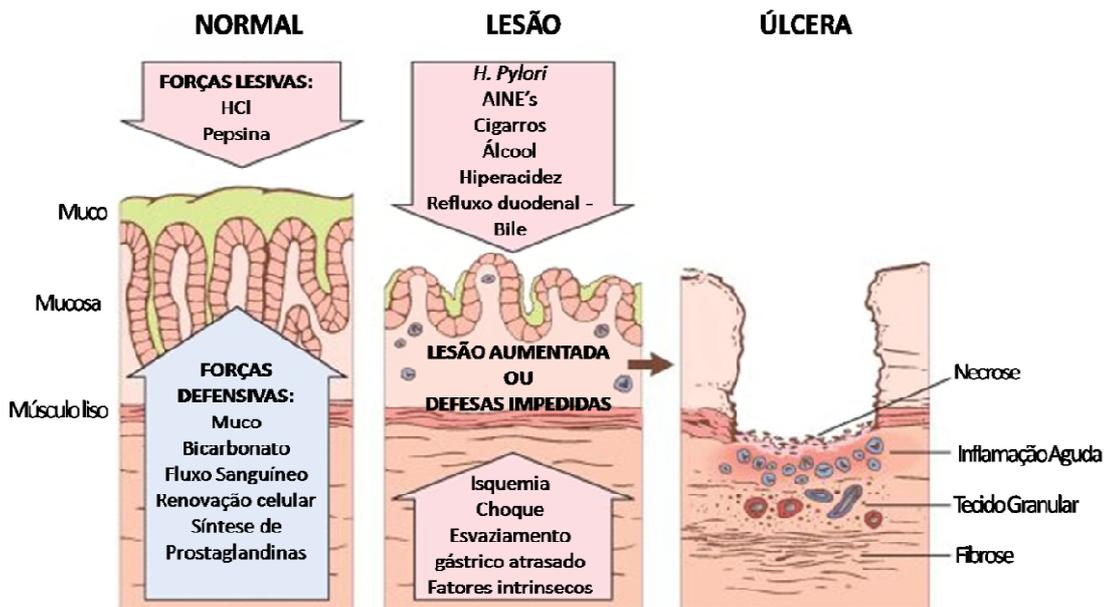
1.3 Fisiopatologia da úlcera péptica

“Sem atividade ácido-péptica, sem úlcera”, Schwartz em 1910 reconheceu que “ a úlcera péptica é um processo de auto-digestão, resultante de um excesso do poder auto-péptico do suco gástrico sobre o poder defensivo da mucosa gástrica e intestinal”. Três principais linhas de defesa funcionam em diferentes níveis, a nível pré-epitelial, epitelial e pós-epitelial, que preservam a integridade da mucosa. Quando estas defesas estão sobrecarregadas, mecanismos de reparação epitelial intrínsecos têm poder de restaurar essa integridade. Quando ambos os processos falham, feridas são formadas na membrana basal, levando a um processo inflamatório e que se cessado o fator lesivo, remodelam o tecido para permitir o crescimento de novo tecido epitelial (GUTH, 1982; DIXON, 2000).

A úlcera péptica envolve a falha da cicatrização dessas feridas. Os mecanismos de defesa, reparo e cicatrização geralmente falham quando perturbados por fatores exógenos,

como infecção por *Helicobacter pylori* e uso de AINEs e/ou álcool. Na ausência destes fatores, úlceras seriam uma doença incomum. Em 1999, os ditos seguintes podem ser anexados ao dito de Schwartz: “sem *H. pylori*, sem AINEs: quase sem úlcera” e “defesa, reparação e cura normais: sem úlcera”. (Figura 4).

FIGURA 4 – Fisiopatologia da úlcera gástrica.



As úlceras pépticas geralmente ocorrem no estômago ou no duodeno proximal, e mais raramente no baixo esôfago, duodeno distal ou no jejuno.

Fumo, álcool, estresse, uso de medicamentos, faixa etária, infecção pelo *H. pylori*, hereditariedade de afecções pépticas, entre outros, são alguns dos fatores que podem desempenhar diferentes papéis na gênese da doença (CHAN; LEUNG, 2002).

Dos indivíduos infectados com *H. pylori*, 15% desenvolvem úlcera péptica. O estabelecimento da úlcera depende de fatores ambientais, idiossincráticos e também da virulência da cepa infectante. Quanto maior a virulência, maiores as chances de desenvolver úlcera. Os fatores de virulência melhores descritos compreendem a expressão da forma ativa da citotoxina vacuolizante A (VacA) e do aparato secretor de proteína (Cag), que estimulam uma resposta inflamatória no hospedeiro. As cepas Cag positivas interagem mais intimamente com as células epiteliais e induzem a liberação de citocinas pró-inflamatórias, iniciando o processo de lesão (VIALA et al., 2004). Não se sabe se estes fatores relacionados à virulência possam ser a causa primária da doença, ainda deve ser levado em conta que a interação com

outros fatores como consumo de álcool, tabagismo e uso de AINEs, elevam exponencialmente os riscos (CHEN et al., 2005).

1.3.1 Úlcera péptica e abordagens terapêuticas

Antiácidos, tais como o bicarbonato de sódio, carbonato de cálcio, hidróxido de alumínio, hidróxido de magnésio ou preparações combinadas, prontamente proporcionam um alívio eficaz da dor por meio de neutralização do ácido intraluminal (FEURLE, 1975).

Contudo, o tempo de duração efetivo de antiácidos no estômago humano é muito curto para exercer um efeito neutralizante. Além disso, dado que antissecretórios mais seguros e potentes, tais como antagonistas dos receptores histamínicos tipo 2 (H₂R) e inibidores da bomba de prótons estão disponíveis para uso, a terapia antiácida não é comumente utilizada para tratamento de úlcera péptica atualmente.

A cimetidina e outros compostos desenvolvidos a partir da modificação de sua estrutura química como a ranitidina, famotidina e nizatidina, pertencem à classe de inibidores dos H₂R (BLACK et al., 1972). O bloqueio destes receptores inibe a secreção ácida ao impedir que a histamina liberada das ECLs se ligue ao receptor e ative a secreção ácida. Estes compostos inibem também a ação secretória do carbacol e da gastrina, evidenciando a dependência de histamina destes secretagogos (AIHARA, 2003).

Os inibidores da bomba de prótons (omeprazol, lansoprazol e pantoprazol) são derivados benzimidazólicos que se ligam irreversivelmente à proteína transportadora de H⁺/K⁺-ATPase. Inibindo a secreção ácida estimulada por acetilcolina, gastrina e histamina de forma dose dependente (KONTUREK et al., 1984).

Desde que Marshall e Warren (1984) descobriram a bactéria *Helicobacter pylori* em estômagos, esta vem sendo interpretada como um fator de risco, não somente pelo desenvolvimento de gastrites e úlceras, mas também na recidiva de úlceras cicatrizadas (OSATO; GRAHAM, 1999). Além disso, pesquisas epidemiológicas têm mostrado que *H. pilory* diretamente e indiretamente induz a formação de neoplasias, tais como carcinoma gástrico e linfoma MALT (DANESH, 1999; HUANG et al., 1998; KONTUREK et al., 1999; UEMURA et al., 2001). Por conseguinte, a erradicação de *H. pylori* em seres humanos com ou sem doença gástrica atual representa sem dúvida o mais importante passo inicial para a prevenção de doenças gástricas benignas e malignas.

1.4 Modelos animais de indução aguda de lesão gástrica

Os modelos experimentais em úlcera gástrica são experimentos clássicos na Farmacologia, que vêm sendo utilizados durante décadas. Diferentes pesquisadores desenvolveram variados métodos de indução da úlcera. Os principais são os seguintes: Administração de agente necrosante, etanol absoluto, soluções hiperosmóticas, HCl e NaOH (ROBERT et al., 1979) ou etanol acidificado (MIZUI; DOTEUCHI, 1986), por uma droga antiinflamatória não-esteroidal (SZABO et al., 1985), por estresse (TAKAGI; KASUYA; WATANABE, 1964; TAKAGI; OKABE, 1968), por imobilização a frio (SENAY; LEVINE, 1967), por isquemia e reperfusão (UEDA et al., 1989) e por ligadura do piloro (SHAY et al., 1945).

Os modelos continuam clássicos, porém as técnicas de medição de diferentes parâmetros, por exemplo, a medida do fluxo sanguíneo, estudo dos mecanismos de ação envolvidos e dos processos de formação e descoberta dos mediadores envolvidos, tiveram um salto de evolução, pois novos pesquisadores lançaram mão de tecnologias e técnicas modernas, o que só foi possível nas últimas décadas. (GLAVIN; SZABO, 1992).

1.4.1 Modelo experimental de lesão gástrica induzida por etanol absoluto

Gottfried, Korsten e Lieber (1978) verificaram que a ingestão aguda de etanol numa dose de 1g/Kg de peso corpóreo diluído em água era capaz de causar alterações microscópicas e macroscópicas no antro gástrico em humanos, rapidamente gerando a formação de lesões no estômago, que é devido essencialmente a uma reação inflamatória. O etanol penetra na mucosa gastroduodenal causando danos ao epitélio, hemorragia, esfoliação de células com erosão, reação inflamatória com edema e infiltração celular. (SZABO et al., 1985).

O etanol em altas concentrações é capaz de romper a barreira de muco, e uma vez quebrada a hidrofobicidade e efeito tampão do bicarbonato, a exposição da mucosa aumenta a permeabilidade epitelial, causando re-difusão de íons H^+ (DAVENPORT, 1969). O etanol ainda influencia a atividade da musculatura e reduz o fluxo sanguíneo, provocando estase gástrica, congestão capilar e aumento da permeabilidade vascular, aumentando os riscos de hemorragias e ulcerações, associados às injúrias macroscópicas e histológicas na mucosa (SANTOS; RAO, 2001). O etanol lesa os microvasos e promove vasoconstrição nas artérias da submucosa, efeito este provocado pela liberação de mediadores como endotelina e histamina proveniente da degranulação de mastócitos. Entre outros mediadores envolvidos

com a lesão podemos citar as lipoxigenases, leucotrienos, diversas citocinas pró-inflamatórias, tromboxanos e espécies reativas de oxigênio (EROs).

A formação desses mediadores se dá pela atividade do etanol em ativar enzimas como a iNOS, e fatores de transcrição como AP-1 e NF-kB, que induzem a formação de COX-2, que ao contrário da COX-1, favorece a lesão gástrica. Além de ativar a MAPK p38, que está relacionada à transcrição de mediadores pró-inflamatórios (KISHORE et al., 2002; NANJI et al., 2003).

As EROs são formadas decorrentes da isquemia gerada pelo fluxo sanguíneo deficiente, que acabam por lesionar as células onde são formadas. Como resultado do estresse oxidativo ocorre depleção dos níveis de GSH e dos grupos sulfidrilas não protéicos (RAO et al., 2004). Este modelo possui fundamental importância para a pesquisa científica no que concerne ao fato de podermos avaliar possíveis mecanismos pelos quais as substâncias podem atuar promovendo gastroproteção.

Alguns estudos relatam o aparecimento de gastrite aguda após a ingestão de bebidas alcoólicas em humanos, ainda que os danos na mucosa gástrica sejam menores do que aqueles produzidos pela ingestão de etanol absoluto em concentração semelhante. Apesar dos danos conhecidos que o etanol causa a mucosa gástrica, o consumo de bebidas alcoólicas não tem sido associado a riscos aumentados de desenvolvimento de úlceras gástricas (FRIEDMAN; SIEGELAUB; SELTZER, 1974; TEYSSEN; SINGER, 2003; CORRAO et al., 2004).

1.4.2 Modelo experimental de lesão gástrica induzido por indometacina

A lesão gástrica decorrente do tratamento com drogas antiinflamatórias não esteroidais (AINEs), são reconhecidamente um sério efeito adverso desta classe de medicamentos (SSCHOEN, 1999), e tem sido a causa da busca incessante por drogas antiinflamatórias isentas deste efeito e drogas gastroprotetoras mais efetivas.

Lesões experimentalmente induzidas por indometacina são consideradas ferramentas de valor para o estudo da patogênese da ulceração aguda da mucosa gástrica e como teste de novas substâncias com potencial atividade gastroprotetora (SZABO et al., 1985; ALAM et al., 2009).

Os AINEs apresentam atividade deletéria contra os mecanismos de defesa da mucosa. O que torna a mucosa incapaz de se defender contra os fatores lesivos, até mesmo com uma carga reduzida de ácido. A presença de ácido parece ser essencial para o estabelecimento da gastrite ou úlcera causada por AINEs. O ácido estomacal não somente lesa o tecido pela

difusão reversa, mas também aumenta a absorção dos AINEs, pois estes são geralmente ácidos fracos.

Estes compostos aparentemente causam lesão gastrointestinal por dois mecanismos principais: a inibição da atividade da COX-1 gera uma deficiência da produção de prostaglandinas e isso causa redução da produção de muco e bicarbonato, e a diminuição do fluxo sanguíneo e aumento da secreção ácida. Além disso, alguns outros mecanismos vêm sendo demonstrados como desacoplamento da fosforilação oxidativa, diminuição da síntese de DNA e proliferação celular, ativação de neutrófilos. Trabalhos recentes mostram que a administração de AINEs aumenta a aderência de neutrófilos no endotélio vascular, com consequente redução da perfusão e liberação de mediadores pró-inflamatórios e lesivos (SANTOS et al., 2005).

No desenvolvimento das úlceras gástricas associadas aos AINEs, a inibição da COX-1 está ligada à diminuição do fluxo sanguíneo da mucosa, enquanto a inibição da COX-2 está relacionada com o aumento da aderência de leucócitos ao endotélio vascular local (WALLACE et al., 2000). Essas lesões estão relacionadas com aumento nos marcadores de infiltração de neutrófilos e intensa geração de radicais livres (SULEYMAN et al., 2009).

Até pouco tempo, apenas a inibição da COX-1 estava associada à gastroproteção. Contudo, a ação lesiva à mucosa gástrica de drogas inibidoras altamente específicas para a COX-1 (SC-570), é consideravelmente menor e com características diferentes das lesões induzidas por drogas não seletivas como indometacina ou ibuprofeno. Na realidade, a COX-2 parece ser expressa em resposta a inibição da COX-1, assim, em situações normais, a administração de inibidores seletivos de COX-2 apresentam pouca ou nenhuma toxicidade gástrica. Porém a inibição da COX-1 e COX-2 ao mesmo tempo por drogas seletivas diferentes produzem grandes lesões gástricas com semelhantes características daquelas produzidas pelos AINEs tradicionais não seletivos. Esses achados sugerem que ambos os tipos de COX devem estar suprimidas para que ocorram as lesões gástricas características dos AINEs (WALLACE et al., 2000; TANAKA et al., 2001; TANAKA et al., 2002).

Em seres humanos, quando observadas por endoscopia, as lesões induzidas por AINEs se mostram como hemorragias subepiteliais, erosões e úlceras (LAINE, 2002). Em animais, as lesões induzidas experimentalmente podem se apresentar como petéquias, hemorragias, edemas, erosões, úlceras e perfurações (SZABO, 1985).

1.5 Produtos naturais na proteção gástrica

Existem relatos fósseis do uso de plantas como ferramenta medicinal pelos seres humanos que datam de mais de 60 mil anos atrás (FABRICANT; FARENSWORTH, 2001). Fontes sobre o uso de plantas como medicamento foram reveladas pelos papiros egípcios (2.000 a.C.), dentre os quais, encontram-se os papiros de Ebers e Smith dedicados a questões de medicina e cirurgia. Ainda, os gregos Hipócrates (considerado o pai da Medicina) e Dioscórides, deixaram legados sobre a prática médica e as drogas utilizadas na época para a cura dos males (FONT QUER, 1988).

Até o início do século passado, cerca de 90% dos medicamentos disponíveis compreendiam plantas medicinais (LAPA, 2000).

Atualmente as plantas e os extratos vegetais continuam sendo de grande relevância na área farmacêutica, tendo em vista a utilização das substâncias ativas isoladas como protótipos para a obtenção de fármacos, para a obtenção de adjuvantes, ou ainda, de medicamentos elaborados exclusivamente à base de extratos vegetais: os medicamentos fitoterápicos (SCHENKEL et al., 2001).

Melhor conceituando o termo fitoterápico, segundo a ANVISA, é um medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas (ANVISA, 2004).

Além disso, o Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo com mais de 55.000 espécies catalogadas (DIAS, 1996) de um total estimado em 350 a 550 mil espécies (NODARI; GUERRA, 2000). Esses dados mostram de forma concreta o potencial botânico que o Brasil tem em relação à descoberta de novos princípios ativos e ao desenvolvimento de novos medicamentos a partir de plantas.

Contudo, existe na flora mundial um grande número de espécies usadas na medicina popular, a exemplo da *Momordica charantia* (GURBUZ et al., 2000), *Angélica archangelica*, *Carum carvi*, *Chelidonium majus*, *Iberis amara*, *Matricharia recutita*, *Melissa officinalis*, *Mentha piperita*, *Silybum marianum* (KHAYYAL et al., 2001), *Anthemis nobilis*, *Brassica oleracea*, *Maytenus aquifolium*, *Symphytum officinalis*, *Sorocea blomplandii*, *Zolernia ilicifolia* (ALONSO, 1998) que são utilizadas no tratamento da úlcera gástrica por produzirem atividade antiulcerogênica dose-dependente associada a uma redução ácida e aumento da

secreção de mucina, além de produzirem aumento na liberação de PGE2 e diminuição de leucotrienos (REPETTO; LLESUY, 2002).

Os compostos obtidos de plantas com atividade antiulcerogênica apresentam estruturas químicas diversas e distintos mecanismos de ação. Dentre as principais classes de compostos relacionados a essa atividade têm-se os terpenos, óleo-resinas, xantonas, flavonóides, alcalóides, saponinas, taninos e polissacarídeos (RAO et al., 1997; PAIVA et al., 1998; SANTOS; RAO, 2001; BAGGIO et al., 2005; MORIKAWA et al., 2006).

Substâncias com atividade antiulcerogênica, obtidas a partir de plantas, exercem seus efeitos estimulando os fatores de proteção da mucosa gástrica, aumentando a síntese de prostaglandina e/ou estimulando a secreção de muco e bicarbonato, ou ainda inibindo a secreção ácida (LEWIS; SHAW, 2001; BORRELL; IZZO, 2000; BEIL; BIRKHOLZ; SEWING, 1995).

1.5.1 Hidroxicitronelal e terpenos de óleos essenciais

O citronelal é um monoterpeneo, um produto do metabolismo secundário vegetal, e componente majoritário de mistura de terpenóides que confere ao óleo de citronela seu odor característico de limão. É tipicamente isolado como uma mistura racêmica (enantiômeros R e S) por destilação fracionada ou extração por solventes a partir do óleo essencial de plantas do gênero *Cymbopogon* (*Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon winterianus*), popularmente conhecidas como capim-citronela, “lemon-grass” ou erva-limão (HASHIMOTO; YASUDA; OHSAWA, 1992). Nas plantas do gênero *Cymbopogon* (capim-limão) e na *Melissa officinalis* (cidreira), o citronelal é considerado o principal constituinte das folhas, e contribui em grande medida no perfume destas plantas aromáticas (LU et al., 2006). O citronelal e outros compostos relacionados também são os principais compostos em *M. Officinalis* (“bálsamo”, “cidreira”), que é largamente utilizada na forma de chás e infusões, e como flavorizante de alimentos no Brasil, Inglaterra e sul da Europa (VIANA et al., 2000). O óleo de citronela é também utilizado na culinária, como anti-séptico e como repelente (KORTVELYESSY, 1985).

Os óleos essenciais são extraídos de diversas plantas e um número crescente de estudos demonstram que estes possuem uma série de atividades biológicas dentre as quais podemos citar efeitos analgésicos (ALMEIDA et al., 2001), anticonvulsivantes (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2008a) e ansiolíticos (CARLINI, 2003). Estes efeitos são atribuídos aos

monoterpenos, que são os componentes primários dos óleos essenciais (GHERLARDINI et al., 2001; DE SOUSA et al., 2006).

O citronelal é composto majoritário de uma miríade de óleos essenciais. Por exemplo, as plantas do gênero *Cymbopogon*, que são ricas em mono, di e triterpenos, são amplamente utilizadas para tratar diferentes formas de dor (QUINTAS-JÚNIOR et al., 2010a). Além disso, o citronelal e outros monoterpenóides relacionados quando isolados foram descritas atividades antinociceptiva (MELO et al., 2010), antioxidante (QUINTAS-JÚNIOR et al., 2011) inibidores do citocromo P450 CYP2B1 e outras desidrogenases (DE-OLIVEIRA; RIBEIRO-PINTO; PAUMGARTTEN, 1997), indicando que tais compostos possuem diversificadas atividades biológicas.

FIGURA 5 – Estrutura molecular do Citronelal.

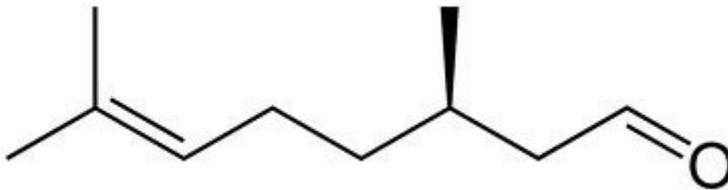


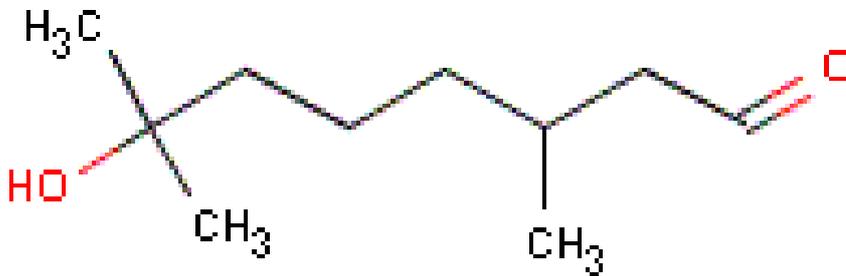
FIGURA 6 - À esquerda *Cymbopogon nardus* (capim-citronela) e à direita *Melissa officinalis* (cidreira).



Hidroxicitronelal (3,7-dimethyl-7-hydroxyoctanal) é usado como ingrediente de fragrâncias e é encontrado em uma ampla variedade de produtos de consumo. É utilizado como fragrância na indústria de cosméticos, saneantes e inseticidas, nas mais variadas fórmulas e concentrações. Hidroxicitronelal utilizado na Europa é produzido principalmente dentro da União Européia em quantidade estimada em 88 ton/ano. Estima-se que 35% deste (35 ton/ano) é usado em produtos domésticos de limpeza e manutenção. O Hidroxicitronelal pode ser obtido a partir da hidroxilação do citronelal.

Apesar de uma ampla variedade de aplicações, pouco se sabe sobre as propriedades farmacológicas do Hidroxicitronelal. Existem alguns estudos demonstrando sua segurança toxicológica nas apresentações e concentrações utilizadas na indústria (NARDELLI et al., 2011). No entanto, o contato direto com a substância pode provocar irritação na pele e nos olhos. HC também é considerado um hapteno e está lista de substâncias sensibilizantes de cosméticos comercializados na Europa (MERCCKEL et al., 2010).

FIGURA 7 - Estrutura molecular do Hidroxicitronelal.



2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O Hidroxicitronelal é um composto de fácil obtenção e já é produzido para uso indústria de cosméticos. Esta produção é da ordem de toneladas por ano. Possui estrutura molecular semelhante a do citronelal, um terpeno encontrado no óleo essencial de diversas plantas e que já possui algumas atividades farmacológicas descritas, e o próprio óleo essencial de citronela onde o composto majoritário é o citronelal, vem sendo utilizado na medicina popular em diversos países por várias gerações. Dada essa familiaridade entre os compostos, há grandes chances de o Hidroxicitronelal possuir alguma atividade farmacológica. Sua toxicidade já foi testada por órgãos regulatórios na Europa e EUA, para comprovar sua segurança nos produtos que apresentam este composto em sua fórmula (HERA, 2005).

A incidência de úlcera péptica vem declinando nas últimas décadas, principalmente pela diminuição de infecções por *H. pylori* e do surgimento das drogas antissecretórias (antagonistas H₂R e inibidores da bomba de prótons). Todavia, o número de casos de complicação e de hemorragias não modificou ou até aumentaram, principalmente entre os idosos, causada pelo alto consumo de AINEs e por mudanças no estilo de vida (SAUL et al., 2007).

Apesar da grande diversidade de fatores que modulam o equilíbrio da mucosa gástrica, os tratamentos atuais afetam somente um deles: a secreção ácida. Moléculas que atuem sobre outros mecanismos de proteção seriam de grande valia para o arsenal terapêutico. Novas drogas para auxiliar o tratamento da úlcera, que apresentem menos efeitos colaterais, de fácil acesso a população e com preços acessíveis.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade gastroprotetora do hidroxicitronelal e seus possíveis mecanismos de ação farmacológica em modelos experimentais de lesão gástrica e sua segurança terapêutica.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar o efeito gastroprotetor do HC nos modelos experimentais de lesão gástrica induzida por etanol e indometacina.
- Avaliar o mecanismo gastroprotetor do HC no modelo de lesão gástrica induzido por etanol, através da investigação do envolvimento do óxido nítrico (NO, GMPc, canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}), prostaglandinas e receptores TRPV1.
- Em extensão ao mecanismo gastroprotetor do HC, estudar seu efeito sob o consumo de glutatona na mucosa gástrica induzida por etanol.
- Verificar a segurança terapêutica do uso do HC através da avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos.

4 MATERIAIS

4.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*) machos e fêmeas, pesando entre 20 a 25 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus do Pici – UFC e mantidos no Biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os protocolos experimentais foram aprovados e registrados no comitê de ética de experimentação animal da Universidade Federal do Ceará (nº 052/2011). Todos foram acondicionados em gaiolas apropriadas (6 – 10), sob condições adequadas de luz e temperatura, permanecendo nas mesmas condições ambientais durante os experimentos. Foram utilizados no mínimo oito animais por grupo experimental. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas pela comissão de ética com animais de experimentação da Universidade Federal do Ceará.

4.2 Drogas e reagentes

Hidroxicitronelal foi sintetizado a partir da hidratação do citronelal sob a supervisão do Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa da Universidade Federal de Sergipe, executado conforme descrito na literatura (Hydroxycitronellal. Gradef, Peter S.; Bertrand, Claude. (Societe des usines chimiques de Rhone-Poulenc). Ger. Offen. (1972), 19 pp. CODEN: GWXXBX DE 2221032 19721102 Patent written in German).

Citronelal foi tratado com anidrido acético para gerar diacetato de citronelila, o qual foi hidratado com ácido sulfúrico obtendo como produto diacetato de citronelila hidroxilado. Em seguida, este produto foi hidrolisado com solução de NaOH para obter hidroxicitronelal com rendimento de 72%.

Produto	Origem
N-AcetilCisteína	EMS, Brasil
Polisorbato 80	Fluka, EUA
Etanol Absoluto	Merck, Alemanha
L-NAME	Sigma, EUA
L- Arginina	Sigma, EUA
Glibenclamida	Sigma, EUA

Diazóxido	Sigma, EUA
Indometacina	Sigma, EUA
Misoprostol	Biolab Searle, Brasil
ODQ	Sigma, EUA
Capsaicina	Sigma, EUA
Capsazepina	Sigma, EUA
EDTA	VETEC, Brasil
Ácido Tricloroacético	Sigma, EUA
Tris-HCl	Merck, Alemanha
DTNB	Sigma, EUA
Cimetidina	Medley, Brasil
Carboximetilcelulose	VETEC, Brasil
Formol	VETEC, Brasil
Kits de análise bioquímica	Labtest, Brasil

4.3 Equipamentos

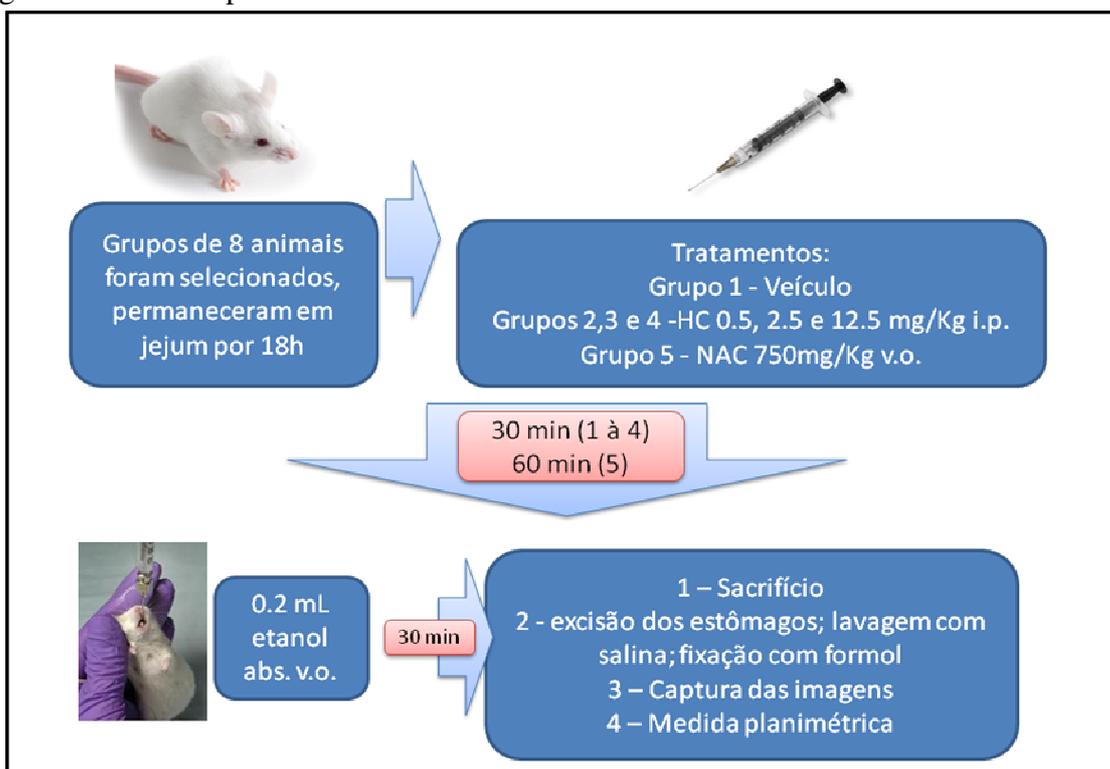
Equipamento	Origem
Balança para animais (mod. MF-6)	Filizola, Brasil
Balança analítica (mod. AX-200)	Shimadzu, Japão
Máquina Fotográfica	CASIO, EUA
Leitora de Microplacas	ASYS, Áustria
Microscópio	Quimis, EUA
Banho-maria	Fanen, Brasil

5 MÉTODOS

5.1 Efeito protetor do Hidroxicitronelal (HC) na lesão gástrica induzida por etanol: curva dose-resposta

A lesão gástrica foi induzida seguindo protocolo anteriormente descrito por Robert e colaboradores (1979). Para tanto, camundongos em jejum de sólidos de 18h, foram divididos em grupos de 8 animais, tratados com veículo (solução de Polisorbato 80 0,2%) HC (0,5 , 2,5 e 12,5 mg/Kg i.p.), ou N-acetilcisteína (NAC; 750 mg/kg, v.o.). Trinta minutos após os tratamentos com veículo e HC, e uma hora depois do tratamento com NAC, os animais receberam 0,2 mL de etanol 96% via oral. Decorridos 30 minutos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, foi feita uma laparotomia a qual permitiu a retirada do estômago. Estes foram abertos pela grande curvatura, lavados com solução salina 0,9% e comprimidos entre duas placas de petri para captura digital da imagem. A área de lesão gástrica glandular foi determinada com o auxílio de um programa de planimetria gráfica (ImageJ) e os dados expressos em termos de porcentagem de área lesada em relação à área total do corpo gástrico. Amostras dos estômagos foram retiradas, fixadas em formol a 10% e, 24 horas após, colocadas em álcool etílico a 70% para posterior avaliação histopatológica.

FIGURA 8 – Protocolo utilizado para determinação do efeito protetor de HC em lesão gástrica induzida por etanol.



5.2 Avaliação histopatológica

Nos testes de lesão gástrica induzida por etanol os estômagos foram preparados para fixação e corte e confeccionadas as laminas para avaliação microscópica. O critério para a avaliação histológica foi o de Laine & Weinstein (1998), que atribui escores aos parâmetros edema (0-4), hemorragia (0-4), perda de células epiteliais (0-3) e infiltrado inflamatório (0-3), totalizando um máximo de 14 escores. As análises foram levadas como estudo cego.

5.3 Investigação dos mecanismos gastroprotetores do HC no modelo de lesão gástrica induzida por etanol

5.3.1 Estudo do envolvimento do óxido nítrico (NO)

O papel da via L-arginina-óxido nítrico foi avaliado pela administração de um inibidor inespecífico das isoenzimas da óxido nítrico sintase, o L-NAME (20 mg/Kg i.p.) 30 min. antes da administração do HC (12,5 mg/Kg, i.p.) e do substrato precursor da síntese de óxido nítrico, a L-arginina (600 mg/Kg, i.p.). Após 30 min da administração de L-arginina e HC a lesão gástrica foi induzida por etanol e avaliada como descrito no item 5.1.

5.3.2 Efeito sobre expressão da iNOS

O efeito do hidroxycitronelal sobre a expressão da iNOS no estomago após a lesão induzida por etanol foi estudado utilizando marcação imunohistoquímica. Para isso utilizamos o método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU et al., 1981). Após a indução da lesão o estômago foi removido e fixado em formol 10% por 24 horas para confecção de lâminas apropriadas para imunohistoquímica. Os cortes foram desparafinizados, hidratados em xilol e álcool e imersos em tampão citrato 0,1 M (pH 6,0), sob aquecimento por 15 minutos para a recuperação antigênica. Após o resfriamento, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS), intercaladas com o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ a 3% (15 minutos). Os cortes foram então incubados overnight (4°C) com os anticorpos primários anti-iNOS, diluídos em PBS com albumina sérica bovina 5% (PBS-BSA) na concentração 1:200. Após a lavagem, foi feita a incubação com o anticorpo secundário biotilado anti-IgG, diluídos 1:400 em PBS-BSA, por 30 minutos. Depois de lavado, os cortes foram incubados com o complexo estrepto-avidina peroxidase conjugada (complexo ABC Vectastain®) por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, seguiu-se coloração com o cromógeno peróxido de diaminobenzidina 3,3 (DAB), seguida por contracoloração com hematoxilina de Mayer. Por fim, realizou-se a desidratação das amostras e montagem das

lâminas. Controles negativos foram processados simultaneamente como descrito acima, sendo que o anticorpo primário foi substituído por PBS-BSA 5%.

5.3.3 Investigação do papel da guanosina monofosfato cíclico (GMPc)

O envolvimento do GMPc foi avaliado pela administração de ODQ (10 mg/Kg, i.p.), inibidor específico da guanilato ciclase, 30 minutos antes da administração do HC (12,5 mg/Kg, i.p.). A lesão gástrica foi induzida com etanol 30 min após o tratamento com o HC e avaliada como descrito no item 5.1.

5.3.4 Investigação do papel dos canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP})

O envolvimento dos canais de potássio foi avaliado pela administração de um bloqueador destes canais, a glibenclamida (5 mg/Kg i.p.) 30 min antes do HC (12,5 mg/Kg, i.p.) e de um ativador de K_{ATP} , o diazóxido (3 mg/Kg, i.p.). Após 30 min da administração do HC e do diazóxido a lesão gástrica foi induzida por etanol e avaliada como descrito no item 5.1.

5.3.5 Investigação do papel das prostaglandinas (PG's)

O papel das prostaglandinas foi avaliado pela administração de indometacina (10 mg/Kg, v.o.), droga inibidora inespecífica das isoenzimas da ciclooxigenase, 60 minutos antes da administração do HC (12,5 mg/Kg, i.p.) e de um análogo da prostaglandina E2 o misoprostol (50 µg/Kg, v.o.) .Após 30 min da administração do HC e do misoprostol a lesão gástrica foi induzida por etanol e avaliada como descrito no item 5.1.

5.3.6 Investigação do papel de neurônios primários aferentes *via* receptor de potencial transiente vanilóide 1 (TRPV1)

A participação de neurônios sensoriais aferentes foi avaliada indiretamente através do envolvimento dos receptores TRPV1 no efeito gastroprotetor do HC. Para tanto, os animais foram pré-tratados com capsazepina (5 mg/Kg, i.p.), antagonista de TRPV1, 30 minutos antes da administração do HC (12,5 mg/Kg, i.p.) e da capsaicina (0,3 mg/Kg, v.o.). A lesão gástrica foi induzida com etanol 30 min após o tratamento com o HC e capsaicina e avaliada como descrito no item 5.1.

5.3.7 Papel da glutathiona reduzida (GSH)

Objetivando-se investigar uma possível atividade antioxidante no efeito gastroprotetor do Hidroxicitronelal, foram utilizadas duas abordagens: os animais foram divididos em grupos de 8 e tratados com HC 50mg/Kg e veículo, após os tratamentos a lesão foi induzida pelo método do etanol. Outros 3 grupos receberam veículo, HC 50mg/Kg e NAC 750mg/Kg, mas não foi induzida lesão gástrica. Após a formação das lesões e dos tratamentos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as porções glandulares dos estômagos retiradas e feitos homogenatos a 10% em solução gelada de EDTA 0,02M. Alíquotas de tecido (400 µl) homogeneizado foram misturadas com 320 µl de água destilada e 80 µl de ácido tricloroacético (50%) em tubos de vidros e centrifugados a 4000 rpm por 15 min. Subseqüentemente, o sobrenadante (400 µl) foi misturado com 800 µl de solução tampão Tris-HCL (0,4 M, pH 8,9) e 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB; 0,01 M) foi adicionado. Depois de agitada a mistura reacional por 3 minutos, foi medida a absorbância em 412 nm (SEDLAK; LINDSAY, 1968). A concentração de GSH foi calculada através de uma curva padrão de glutathiona reduzida (GSH) e os resultados expressos em µg de GSH/g de tecido.

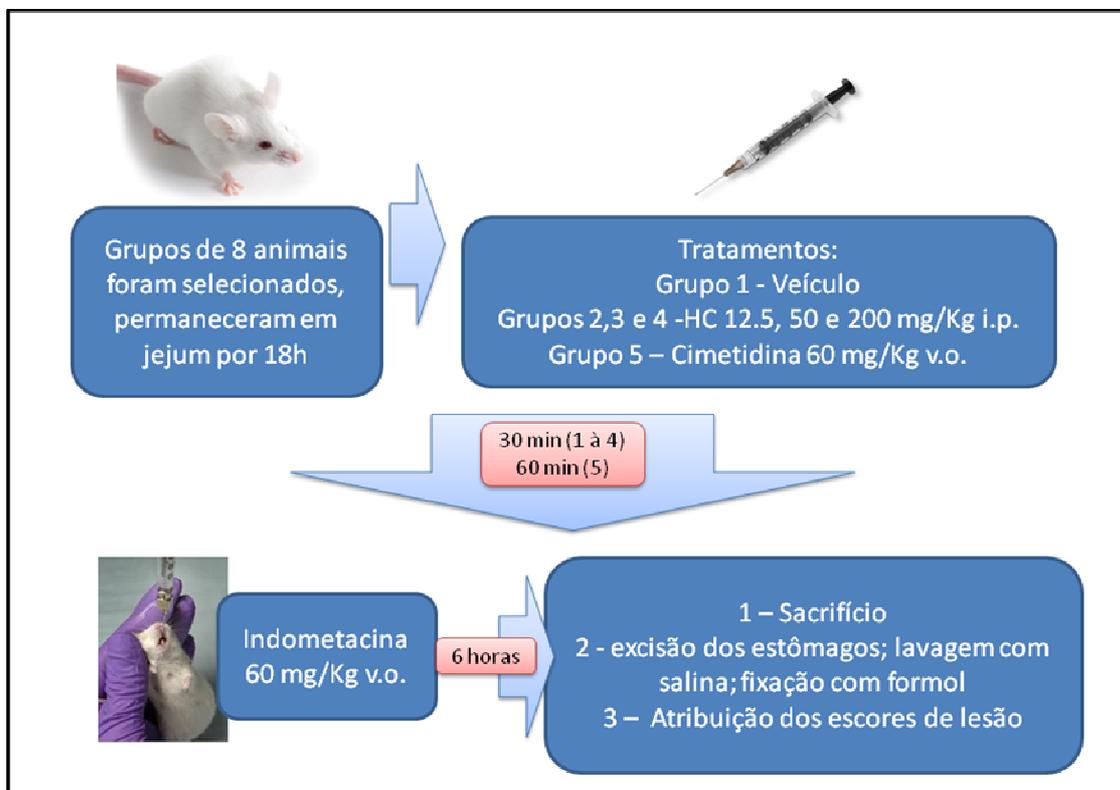
5.4 Efeito protetor do Hidroxicitronelal (HC) na lesão gástrica induzida por Indometacina: curva dose-resposta

Camundongos Swiss, em jejum de sólidos de 18h, (n=8/grupo) foram tratados com veículo (solução de Polisorbato 80 0,2%), HC (12,5, 50, ou 200 mg/Kg, i.v.) ou Cimetidina (60 mg/Kg, v.o.) 30 ou 60 min antes da administração oral de indometacina (60 mg/Kg), preparada em 0,5 % de carboximetilcelulose. Após 6 h da administração da indometacina, os animais foram sacrificados, os estômagos removidos, instilados com formalina a 5 % por 30 min e em seguida abertos pela grande curvatura, lavados em salina 0,9 % (RAINSFORD, 1982) e a extensão das lesões foram registradas, atribuindo-se escores de acordo com a escala de Szabo et al. (1985), evidenciada no quadro abaixo.

QUADRO 1 - Determinação do índice de lesões gástricas induzidas por indometacina (SZABO et al., 1985).

1. Perda de pregas da mucosa	1 ponto
2. Descoloração da mucosa	1 ponto
3. Edema	1 ponto
4. Hemorragias	1 ponto
5. Número de petéquias até 10 mais de 10	2 pontos 3 pontos
6. Intensidade da ulceração úlceras ou erosão de até 1mm úlceras ou erosão maiores que 1mm úlceras perfuradas	n x 2 pontos n x 3 pontos n x 4 pontos

FIGURA 9 – Protocolo utilizado para determinação do efeito protetor de HC em lesões induzidas por indometacina.



5.5 Avaliação toxicológica aguda

No sentido de avaliar a segurança terapêutica da administração do HC, um estudo de possíveis efeitos tóxicos foi realizado. Foram utilizados dois grupos experimentais os quais foram tratados diariamente por um período de sete dias com veículo i.p. e HC (200 mg/Kg).

Após o período de tratamento, os animais foram pesados e sua massa corporal comparada com o massa anterior (antes do tratamento) e o resultado expresso como variação de massa corpórea antes e após os tratamentos. Em seguida, foi coletado sangue dos animais de ambos os grupos pelo plexo orbital para avaliação do leucograma e dosagens bioquímicas, sendo estes então sacrificados, e seus órgãos (fígado, coração, rim e baço) removidos ainda úmidos e pesados.

Na avaliação do leucograma, uma gota de sangue foi colocada sobre lâminas para a confecção de esfregaços, corados pelo método HE, e destinados à contagem diferencial das células em microscópio óptico, utilizando a objetiva de imersão (aumento de 100 vezes). A contagem total foi feita de acordo com o método de Souza e Ferreira (1985). Após este procedimento, obteve-se então o número de células $\times 10^6$ / mL de sangue.

O restante da amostra de sangue foi centrifugado, e o plasma removido para realização das dosagens bioquímicas de uréia como indicador de função renal e avaliação da atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), como indicadores da função hepática. As dosagens foram realizadas utilizando “Kits” específicos.

5.6 Análise estatística

Os resultados do teste de lesão gástrica induzida por etanol foram expressos como média das percentagens das áreas ulceradas + ou - o Erro Padrão da Média (EPM). Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos foi realizada Análise de Variância (ANOVA) e teste de Newman-Keuls. Os dados não paramétricos resultantes do teste de lesão gástrica por indometacina de análise macroscópica e da avaliação histopatológica foram reportados como medianas e foram aplicados os testes estatísticos de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney. Para todas as análises foi considerado significativo $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Hidroxicitronelal (HC) reduz de forma dose-dependente as lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos

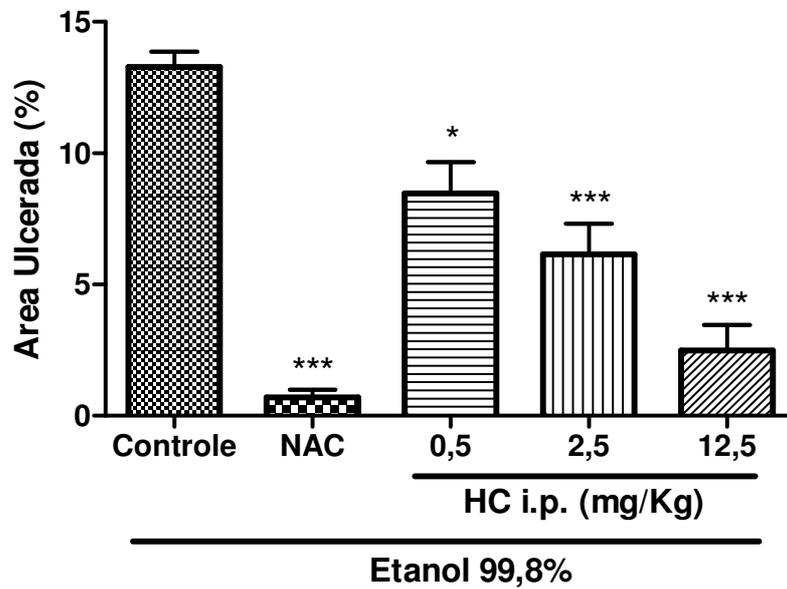
As avaliações macroscópicas realizadas nas mucosas gástricas para investigação do efeito gastroprotetor do HC, estão descritas na tabela 1 e figura 10. O tratamento com etanol promoveu intenso dano à mucosa gástrica no grupo de animais que recebeu somente veículo (controle). A área lesionada, expressa como percentual em relação à área total do corpo gástrico no grupo controle foi de $13,28 \pm 0,59\%$. O HC, nas três doses utilizadas (0,5 , 2,5 e 12,5 mg/Kg), reduziu de forma significativa a lesão gástrica induzida pelo etanol ($8,47 \pm 1,19$; $6,15 \pm 1,17$ e $2,49 \pm 0,97 \%$, respectivamente) correspondendo a uma inibição de 36, 54 e 81%. O efeito do HC foi dose dependente nas doses de 2,5 e 12,5 mg/Kg. N-acetilcisteína (NAC; 750 mg/Kg, v.o.), um conhecido antioxidante, reduziu significativamente as lesões gástricas ($0,71 \pm 0,28$), o que corresponde a uma redução de 94,64%. É importante ressaltar que o efeito promovido pelo HC na maior dose utilizada, não foi estatisticamente diferente do promovido pela NAC.

TABELA 1 – Efeito protetor do Hidroxicitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol

Grupos	Doses (mg/Kg)	Área Ulcerada (%)	% de inibição
Controle	-	$13,28 \pm 0,59$	
NAC	750	$0,71 \pm 0,28^{***}$	94,6
Hidroxicitronelal	0.5	$8,47 \pm 1,19^*$	36,3
Hidroxicitronelal	2.5	$6,15 \pm 1,17^{***}$	53,7
Hidroxicitronelal	12.5	$2,49 \pm 0,97^{***}$	81,3

Os valores representam a média \pm E.P.M. do percentual da área lesionada do estomago, após 30 min. da indução da lesão. Grupos de oito animais foram tratados com Veículo (Controle); N-acetilcisteína (NAC, 750 mg/Kg, v.o.) e hidroxi-citronelal (HC 0.5 ; 2.5 e 12.5 mg/Kg, i.p.) * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ representam significância em relação ao grupo controle (ANOVA e Teste de Newman-Keul).

FIGURA 10 – Efeito protetor do Hidroxicitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol.



As barras representam a média \pm E.P.M. do percentual da área lesionada do estômago, após 30 min. da indução da lesão, grupos de oito animais foram tratados com Veículo (Controle); N-acetilcisteína (NAC, 750 mg/Kg, v.o.) e hidroxi-citronelal (HC 0,5 ; 2,5 e 12,5 mg/Kg, i.p.) * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ representam significância em relação ao grupo controle (ANOVA e Teste de Newman-Keul).

6.2 Hidroxicitronelal (HC) reduz os escores dos parâmetros histopatológicos de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos

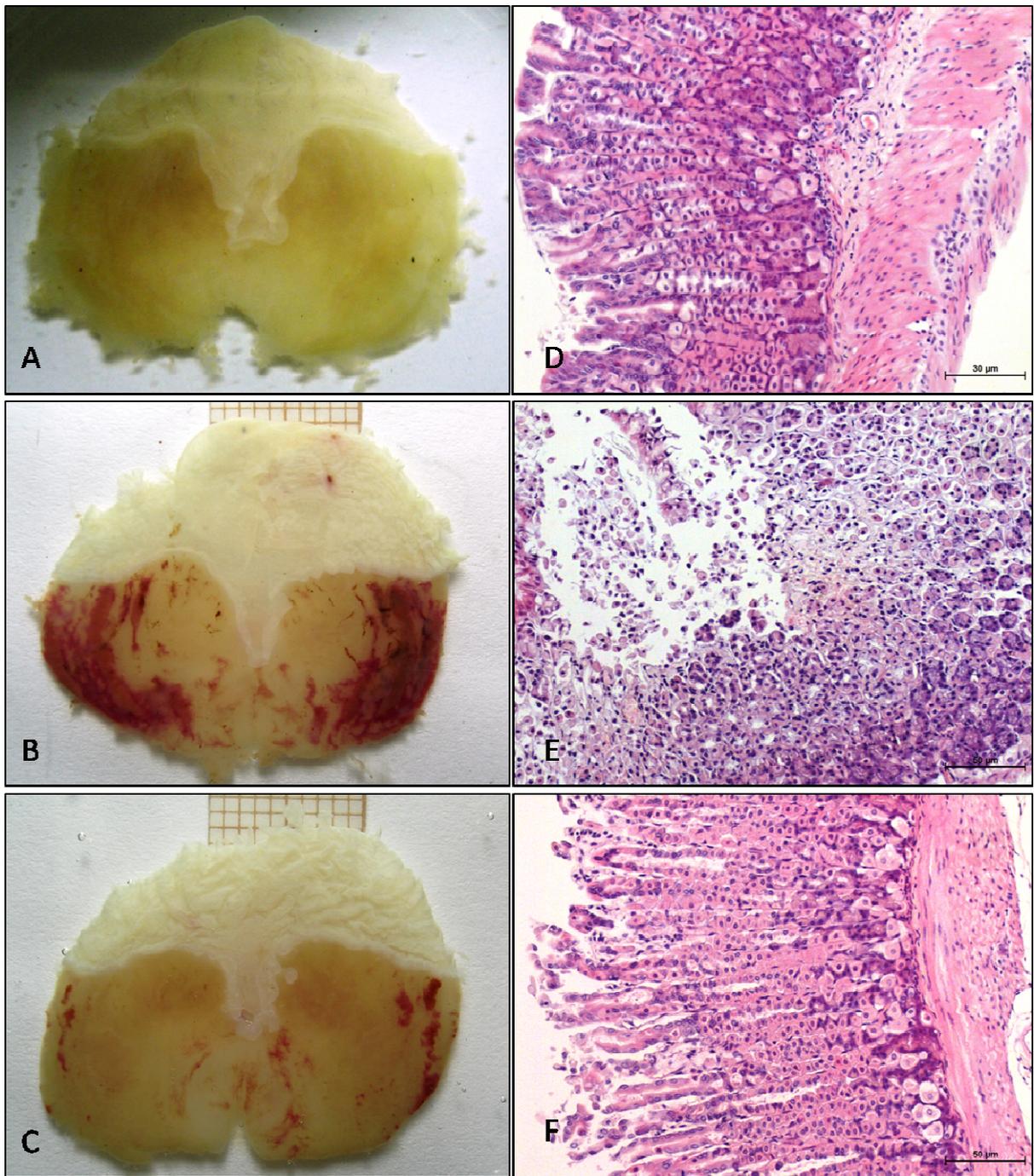
Na tabela 2 e figura 11 está demonstrado que o grupo de animais tratados somente com veículo, após a indução da lesão gástrica por etanol, apresentaram em seus estômagos, após análise macroscópica e histopatológica, extensa área lesionada com intensa hemorragia (4 escores), edema (3 escores) e perda de células epiteliais (3 escores). Entretanto, o tratamento dos animais com HC (12,5 mg/Kg i.p.) foi potente em reduzir de forma significativa todas as alterações visualizadas macro- e microscopicamente induzidas pelo etanol.

TABELA 2 – Efeito do Hidroxicitronelal sobre a análise histopatológica da lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.

Grupos	Escore			
	Hemorragia (0-4 escores)	Edema (0-4 escores)	Perda de Células Epiteliais (0-3 escores)	Células Inflamatórias (0-3 escores)
Controle normal	0	0	0 (0-1)	0
Controle lesão	4 (2-4)*	3 (1-4)*	3 (2-3)*	0
Etanol + HC	0 [#]	1 (0-1) [#]	1 (1-1) [#]	0

Os valores representam a mediana (mínimo – máximo) dos escores de lesão gástrica do estômago mensurados de acordo com os critérios de Laine & Weinstein (1998). Os animais foram tratados com veículo (controle lesão); HC (12,5 mg/Kg i.p.) e em seguida 0,2ml de Etanol 99,8% v.o. * p < 0.05 representa significância em relação ao grupo controle normal e [#] em relação ao grupo controle lesão (Kruskall-Wallis e teste de Dunn).

FIGURA 11 – Efeito macroscópico e microscópico do tratamento com HC na lesão gástrica induzida por etanol absoluto.



O HC diminuiu a hemorragia, edema e perda de células epiteliais induzidas pelo etanol na mucosa gástrica. Painéis A, B e C e Painéis D, E e F mostram as fotografias dos estômagos abertos ao longo da grande curvatura e as microfotografias em aumento de 400x dos cortes histológicos das mucosas gástricas dos animais. Painel A e D (normal), B e E (ulcerado com etanol) e C e F (ulcerado + HC).

6.3 Efeito gastroprotetor do Hidroxycitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol é revertido pelo pré-tratamento dos animais com L-NAME.

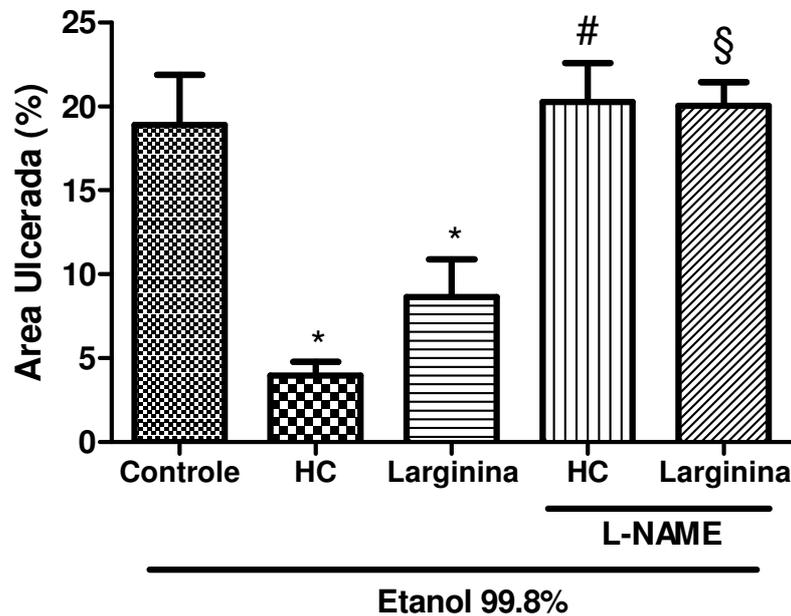
O tratamento dos animais com hidroxycitronelal (12,5 mg/kg, i.p.) promoveu uma inibição significativa ($p < 0,01$) do percentual de área lesionada ($3,97 \pm 0,8\%$) em comparação ao grupo controle ($21,41 \pm 5,5\%$), correspondente a percentual de inibição de 81,4%. L-Arginina (450 mg/Kg, i.p.), um aminoácido que é usado como substrato para a síntese de NO, também foi capaz de reduzir a área lesionada ($10,7 \pm 2,92\%$), quando comparado ao grupo controle veículo (50,21% inibição). Entretanto, o pré-tratamento com L-NAME (20 mg/kg, i.p.), um inibidor não seletivo das isoformas da óxido nítrico sintase (NOS), foi capaz de reverter a ação protetora do hidroxycitronelal ($20,25 \pm 2,35\%$) e do grupo L-Arginina ($18,66 \pm 1,75\%$) de forma significativa ($p < 0,05$) quando comparados ao grupos que não receberam L-NAME. (Tabela 3 e Figura 12).

TABELA 3 - Envolvimento do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor do hidroxycitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol.

Grupos	Doses (mg/Kg)	Área Ulcerada (%)	% de inibição
Controle	-	18,91 \pm 2,98	
HC	12.5	3,97 \pm 0,80*	79.0
L-Arginina	600	8,66 \pm 2,23	54,2
L-NAME + HC	20	20,25 \pm 2,35#	
L-NAME + L-arginina	20 + 600	20,03 \pm 1,41§	

Os valores representam a média \pm E.P.M. do percentual da área lesionada do estômago, após 30 minutos da indução da lesão. Foram utilizados grupos de oito animais, os quais foram tratados com Veículo (controle); HC (12.5 mg/Kg, i.p.); L-arginina (600 mg/Kg, i.p.); L-NAME (20 mg/Kg, i.p.) + HC (12.5 mg/Kg, i.p.) e L-NAME (20 mg/Kg, i.p.) + L-arginina (600 mg/Kg, i.p.) sendo L-NAME 30 min antes de HC e da L-arginina. * $p < 0,05$ vs. grupo tratado com veículo; # $p < 0,05$ vs. grupo tratado somente com HC; § $p < 0,05$ vs. grupo tratado somente com L-arginina. (ANOVA e Teste de Newman-Keul).

FIGURA 12 – Envolvimento do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor do Hidroxicitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol.

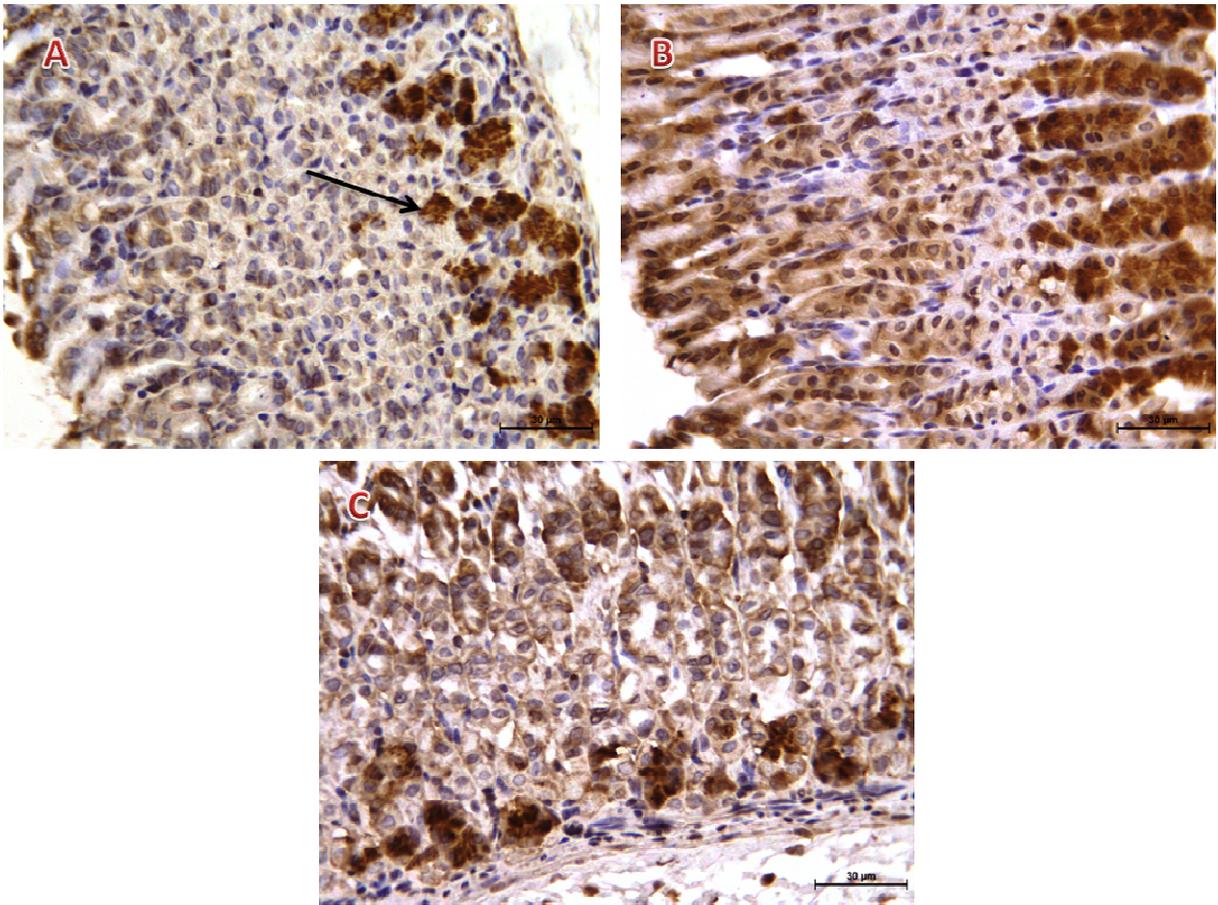


As barras representam a média \pm E.P.M. do percentual da área lesionada do estômago, após 30 minutos da indução da lesão. Foram utilizados grupos de oito animais, os quais foram tratados com Veículo (controle); HC (12.5 mg/Kg, i.p.); L-arginina (600 mg/Kg, i.p.); L-NAME (20 mg/Kg, i.p.) + HC (12.5 mg/Kg, i.p.) e L-NAME (20 mg/Kg, i.p.) + L-arginina (600 mg/Kg, i.p.) sendo L-NAME 30 min antes de HC e da L-arginina. * $p < 0.05$ vs. grupo tratado com veículo; # $p < 0.05$ vs. grupo tratado somente com HC; § $p < 0.05$ vs. grupo tratado somente com L-arginina. (ANOVA e Teste de Newman-Keul).

6.4 Tratamento com Hidroxicitronelal diminui a imunomarcção para iNOS na mucosa gástrica induzida por etanol.

Na figura 13 (painel A) podemos observar que a microfotografia do grupo de animais sem lesão e tratado somente com veículo apresenta uma imunomarcção sutil para iNOS quando comparada àquela do grupo com lesão gástrica induzida por etanol, na qual observa-se intensa e generalizada imunomarcção das células da mucosa gástrica (painel B). Na microfotografia do grupo de animais com lesão gástrica induzida por etanol e pré-tratados com HC (12,5 mg/Kg) observa-se uma forte diminuição da imunomarcção para iNOS nas células da mucosa gástrica (painel C) em relação àquela observada no grupo com lesão e sem tratamento.

FIGURA 13 – Microfotografias de cortes histológicos da porção glandular de estômagos imunomarcados para iNOS.



Marcação imunohistoquímica para iNOS no estômago de animais sem lesão gástrica (painel A), com lesão gástrica induzida por etanol (painel B) e com lesão gástrica por etanol e pré-tratados com HC (painel C). A seta representa imunomarcação das células (400x)

6.5 Efeito gastroprotetor do Hidroxicitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos é dependente da enzima Guanilato-Ciclase

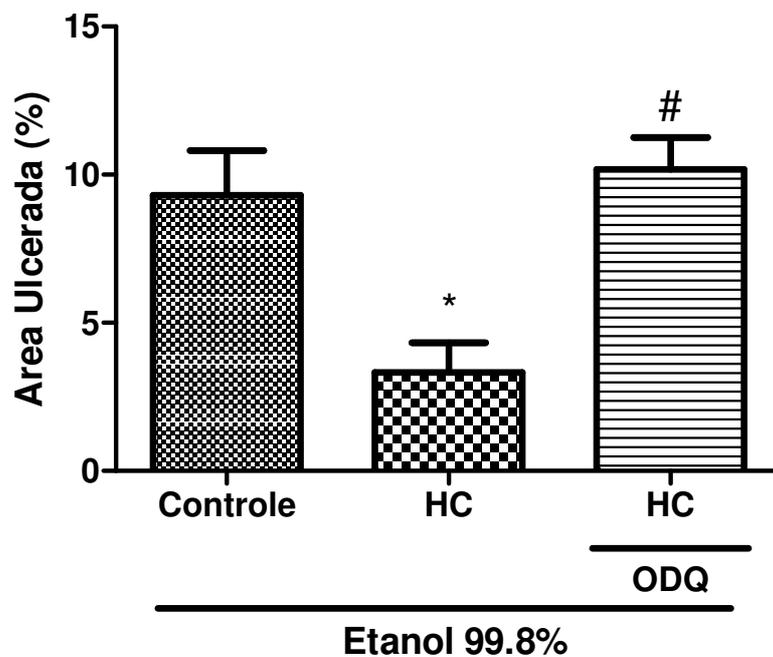
O grupo tratado com hidroxicitronelal (12,5 mg/kg, i.p.) apresentou uma inibição significativa ($p < 0,01$) do percentual de área lesionada ($3,34 \pm 0,99\%$) em comparação ao grupo veículo ($9,31 \pm 1,49\%$), correspondente a um percentual de inibição de 64,16%. O grupo pré-tratado com ODQ, um inibidor seletivo da guanilato ciclase, inibiu a ação protetora do hidroxicitronelal ($10,18 \pm 1,08\%$) de forma significativa ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo que foi tratado somente com HC. (Tabela 4 e Figura 14).

TABELA 4 - Envolvimento do GMP cíclico no efeito gastroprotetor do Hidroxicitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol.

Grupos	Doses (mg/Kg)	Área Ulcerada (%)	% de inibição
Controle	-	9,31 ±1,49	
HC	12.5	3,34 ±0,99*	64,2
ODQ + HC	10 + 12.5	10,18 ±1,08#	

Os valores representam a média ± E.P.M. do percentual da área lesionada do estomago, após 30 minutos da indução da lesão. Grupos de oito animais foram tratados com Veículo (controle); HC (12.5 mg/Kg, i.p.) ou ODQ (10 mg/Kg, i.p.) + HC (12.5 mg/Kg, i.p.). * p < 0.05 vs grupo controle; # p < 0.05 vs grupo tratado somente com HC (ANOVA e Teste de Newman-Keul).

FIGURA 14 – Envolvimento do GMPc no efeito gastroprotetor do Hidroxicitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.



As barras representam a média ± E.P.M. do percentual da área lesionada do estomago, após 30 min. da indução da lesão. Grupos de oito animais foram tratados com Veículo (controle); HC (12.5 mg/Kg, i.p.) ou ODQ (10 mg/Kg, i.p.) + HC (12.5 mg/Kg, i.p.). * p < 0.05 vs grupo controle; # p < 0.05 vs grupo tratado somente com HC (ANOVA e Teste de Newman-Keul).

6.6 Efeito gastroprotetor do Hidroxicitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol é dependente da abertura dos canais de potássio ATP-dependentes.

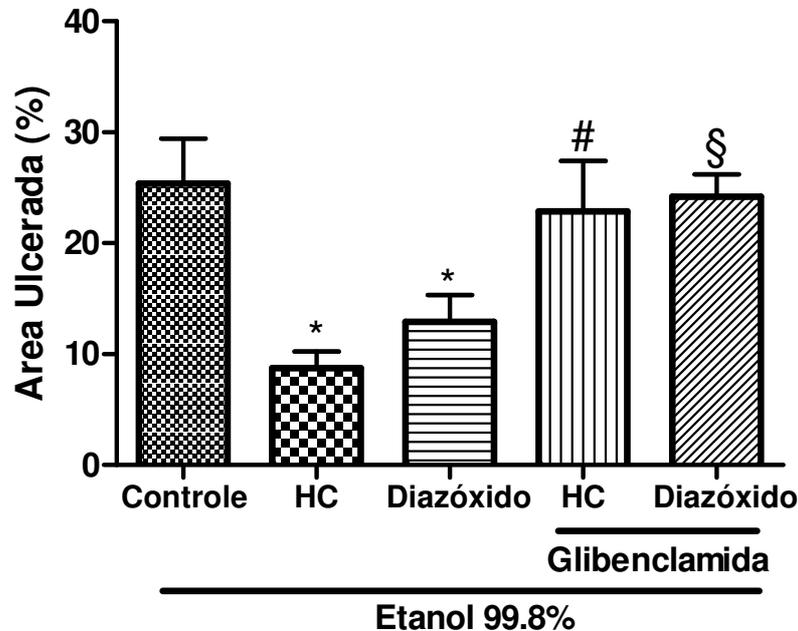
O tratamento dos animais com hidroxi-citronelal (12,5 mg/kg, i.p.) promoveu uma inibição significativa ($p < 0,01$) do percentual de área lesionada ($8,76 \pm 1,49\%$) em comparação ao grupo controle ($25,38 \pm 4,04\%$), correspondente a percentual de inibição de 65,49%. O tratamento dos animais com Diazóxido (450 mg/Kg, i.p.), um vasodilatador que atua abrindo canais de potássio ATP dependentes, também foi capaz de reduzir a área lesionada ($12,91 \pm 2,39\%$), quando comparado ao grupo controle (49,1% de inibição). O pré-tratamento com Glibenclamida (20 mg/kg, i.p.), um bloqueador dos canais de potássio ATP dependentes, foi capaz de reverter a ação protetora do hidroxi-citronelal ($22,88 \pm 4,55\%$) e do grupo Diazóxido ($24,18 \pm 2,04\%$) de forma significativa ($p < 0,05$) quando comparados aos grupos que não receberam Glibenclamida. (**Tabela 5 e Figura 15**).

TABELA 5 - Envolvimento dos canais de potássio ATP-dependentes no efeito gastroprotetor do Hidroxicitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol.

Grupos	Doses (mg/Kg)	Área Ulcerada (%)	% de inibição
Controle	-	25,38 \pm 4,04	
HC	12.5	8,76 \pm 1,49*	65,5
Diazóxido	3	12,91 \pm 2,39	49,1
Glibenclamida + HC	5 + 12.5	22,88 \pm 4,55#	9,8
Glibenclamida + Diazóxido	5 + 3	24,18 \pm 2,04§	4,7

Os valores representam a média \pm E.P.M. do percentual da área lesionada do estomago após 30 minutos da indução da lesão. Grupos de oito animais foram tratados com Veículo (controle); HC (12.5 mg/Kg, i.p.); diazóxido (3 mg/Kg, i.p.); Glibenclamida (5 mg/Kg, i.p.) + HC (12.5 mg/Kg, i.p.) ou Glibenclamida (5 mg/Kg, i.p.) + diazóxido (3 mg/Kg, i.p.). * $p < 0,05$ vs grupo controle; # $p < 0,05$ vs grupo tratado somente com HC; § $p < 0,05$ vs grupo tratado somente com diazóxido. (ANOVA e Teste de Newman-Keul).

FIGURA 15 – Envolvimento dos canais de potássio ATP-dependente no efeito gastroprotetor do Hidroxicitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.



As barras representam a média \pm E.P.M. do percentual da área lesionada do estomago após 30 minutos da indução da lesão. Grupos de oito animais foram tratados com Veículo (controle); HC (12.5 mg/Kg, i.p.); diazóxido (3 mg/Kg, i.p.); Glibenclamida (5 mg/Kg, i.p.) + HC (12.5 mg/Kg, i.p.) ou Glibenclamida (5 mg/Kg, i.p.) + diazóxido (3 mg/Kg, i.p.). * $p < 0.05$ vs grupo controle; # $p < 0.05$ vs grupo tratado somente com HC; § $p < 0.05$ vs grupo tratado somente com diazóxido. (ANOVA e Teste de Newman-Keul).

6.7 Efeito gastroprotetor do Hidroxicitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos é dependente da atividade da enzima COX

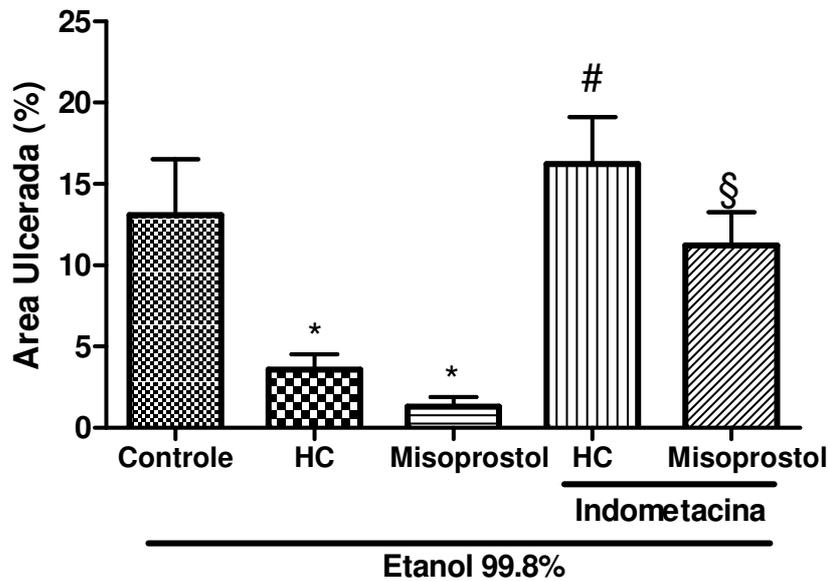
O Hidroxicitronelal (12,5 mg/kg, i.p.) foi capaz de promover uma inibição significativa ($p < 0,01$) do percentual de área lesionada ($3,59 \pm 0,95\%$) em comparação ao grupo tratado com veículo ($13,10 \pm 3,44\%$), correspondente a percentual de inibição de 72,58%. Misoprostol (450 mg/Kg, i.p.), um análogo de prostaglandina E1 (PGE1), foi capaz de reduzir significativamente a área lesionada, quando comparado ao grupo controle veículo ($1,31 \pm 0,59\%$, 89,99% inibição). O pré-tratamento com Indometacina (20 mg/kg, i.p.), um antiinflamatório não esteroideal (AINE) inibidor não seletivo das isoformas da COX (ciclo oxigenase), foi capaz de reverter a ação protetora do Hidroxicitronelal ($16,23 \pm 2,89\%$) e do grupo Misoprostol ($11,21 \pm 2,05\%$) de forma significativa quando comparados ao grupos que não receberam Indometacina. (Tabela 6 e Figura 16).

TABELA 6 - Envolvimento das prostaglandinas no efeito gastroprotetor do hidroxycitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol.

Grupos	Doses (mg/Kg)	Área Ulcerada (%)	% de inibição
Controle	-	13,10 ±3,44	
HC	12.5	3,59 ±0,95*	72,6
Misoprostol	0.05	1,31 ±0,59*	90,0
Indometacina + HC	10 + 12.5	16,23 ±2,89#	
Indometacina + Misoprostol	10 + 0.05	11,21 ±2,05§	14,4

Os valores representam a média ± E.P.M. do percentual da área lesionada do estomago, após 30 minutos da indução da lesão. Grupos de oito animais foram tratados com Veículo (controle); HC (12.5 mg/Kg, i.p.); Misoprostol (50 µg/Kg, v.o.); Indometacina (10 mg/Kg, v.o.) + HC (12.5 mg/Kg, i.p.) ou Indometacina (10 mg/Kg, v.o.) + Misoprostol (50 µg/Kg, v.o.). * p < 0.05 vs grupo controle; # p < 0.05 vs grupo tratado somente com HC; § p < 0.05 vs grupo tratado somente com misoprostol. (ANOVA e Teste de Newman-Keul).

FIGURA 16 – Envolvimento das prostaglandinas no efeito gastroprotetor do hidroxycitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.



As barras representam a média ± E.P.M. do percentual da área lesionada do estomago, após 30 minutos da indução da lesão. Grupos de oito animais foram tratados com Veículo (controle); HC (12.5 mg/Kg, i.p.); Misoprostol (50 µg/Kg, v.o.); Indometacina (10 mg/Kg, v.o.) + HC (12.5 mg/Kg, i.p.) ou Indometacina (10 mg/Kg, v.o.) + Misoprostol (50 µg/Kg, v.o.). * p < 0.05 vs grupo controle; # p < 0.05 vs grupo tratado somente com HC; § p < 0.05 vs grupo tratado somente com misoprostol. (ANOVA e Teste de Newman-Keul).

6.8 O efeito gastroprotetor do Hidroxicitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos independe da ativação dos receptores TRPV1 nos neurônios aferentes.

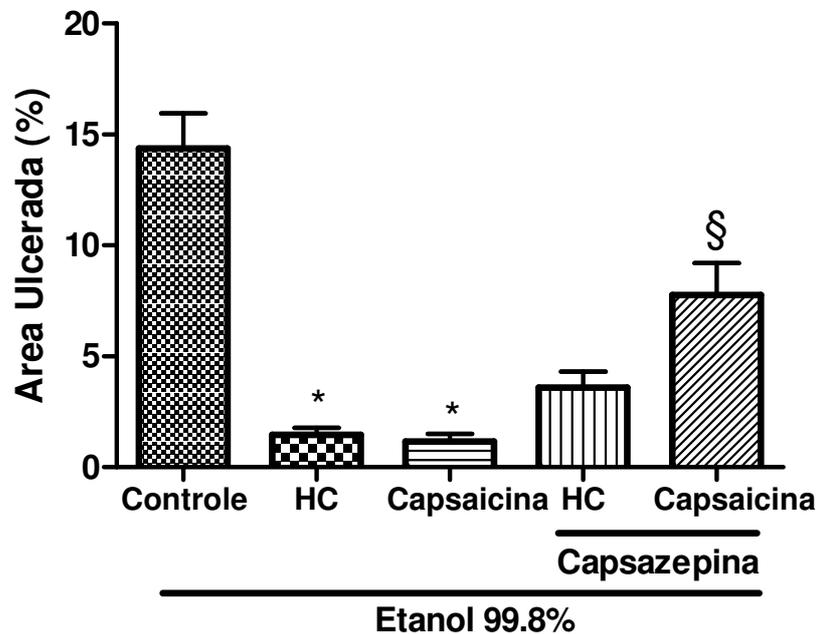
O grupo tratado com hidroxicitronelal (12,5 mg/kg, i.p.) apresentou uma inibição significativa ($p < 0,01$) do percentual de área lesionada ($1,46 \pm 0,31\%$) em comparação ao grupo tratado somente com veículo ($14,38 \pm 1,58\%$), que correspondente a uma inibição percentual de 89,82%. Capsaicina (450 mg/Kg, i.p.), um agonista dos receptores TRPV1, foi capaz de reduzir significativamente a área lesionada, quando comparado ao grupo controle veículo ($1,15 \pm 0,36\%$, 91,99% inibição). O pré-tratamento com capsazepina (20 mg/kg, i.p.), um bloqueador seletivo dos recptores TRPV1, foi capaz de reverter a ação protetora do grupo capsaicina ($7,76 \pm 1,44\%$) de forma significativa, porém não foi capaz de inibir a atividade protetora do Hidroxicitronelal de forma significativa ($3,59 \pm 0,73\%$), quando comparados ao grupos que não receberam capsazepina. (Tabela 7 e Figura 17)

TABELA 7 - Envolvimento dos receptores TRPV-1 no efeito gastroprotetor do hidroxicitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol.

Grupos	Doses (mg/Kg)	Área Ulcerada (%)	% de inibição
Controle	-	14,38 \pm 1,58	
HC	12.5	1,46 \pm 0,31*	89,8
Capsaicina	0.3	1,15 \pm 0,36*	92,0
Capsazepina + HC	5 + 12.5	3,59 \pm 0,73	
Capsazepina + Capsaicina	5 + 3	7,76 \pm 1,44§	

Os valores representam a média \pm E.P.M. do percentual da área lesionada do estomago, após 30 minutos da indução da lesão. Foram utilizados grupos de oito animais, os quais foram tratados com Veículo (controle); HC (12.5 mg/Kg, i.p.); Capsazepina (5 mg/Kg, i.p.); Capsaicina (0.3 mg/Kg, v.o.) + HC (12.5 mg/Kg, i.p.), capsaicina 60 min antes do HC; Capsaicina (0.3 mg/Kg, v.o.) + Capsazepina (5 mg/Kg, i.p.), capsaicina 60 min antes da capsazepina. * $p < 0,05$ vs. grupo tratado com veículo; § $p < 0,05$ vs. grupo tratado somente com misoprostol. (ANOVA e Teste de Newman-Keul).

FIGURA 17 – Envolvimento dos receptores TRPV-1 no efeito gastroprotetor do hidroxicitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.



As barras representam a média \pm E.P.M. do percentual da área lesionada do estômago, após 30 min. da indução da lesão, grupos de oito animais foram tratados com Veículo (solução de Polisorbato 80 0,2%); HC (12.5 mg/Kg, i.p.); Capsazepina (5 mg/Kg, i.p.); Capsaicina (0.3 mg/Kg, v.o.) + HC (12.5 mg/Kg, i.p.) ou Capsaicina (0.3 mg/Kg, v.o.) + Capsazepina (5 mg/Kg, i.p.). * $p < 0.05$ vs grupo controle; § $p < 0.05$ vs grupo tratado somente com misoprostol. (ANOVA e Teste de Newman-Keul).

6.9 Hidroxicitronelal inibe a redução dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) na mucosa gástrica de camundongos com lesão induzida por etanol

A concentração de GSH das amostras foram calculadas a partir da leitura das absorbâncias após a reação com o DNTB, contra uma curva padrão de GSH. As médias dos valores calculados estão expressas nas tabelas 8 e 9, e nos gráficos 18 e 19. Na primeira abordagem, (tabela 8 e gráfico 18), o grupo que recebeu somente etanol mostra significativa redução na concentração de GSH do tecido ($99,2 \pm 8,0 \mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido), quando comparado com o grupo controle ($199,7 \pm 22,6 \mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) que recebeu somente veículo. O pré tratamento com HC foi efetivo em proteger contra o dano oxidativo ($161,5 \pm 18,8 \mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido), evitando a depleção nos níveis de GSH no tecido.

Na segunda abordagem, (tabela 9 e gráfico 19) o efeito do HC sobre a GSH gástrica foi avaliada em animais sem lesão. Observou-se que o hidroxicitronelal não aumenta os níveis de glutathiona ($160,6 \pm 18,3 \mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) quando comparado ao grupo controle ($175,0$

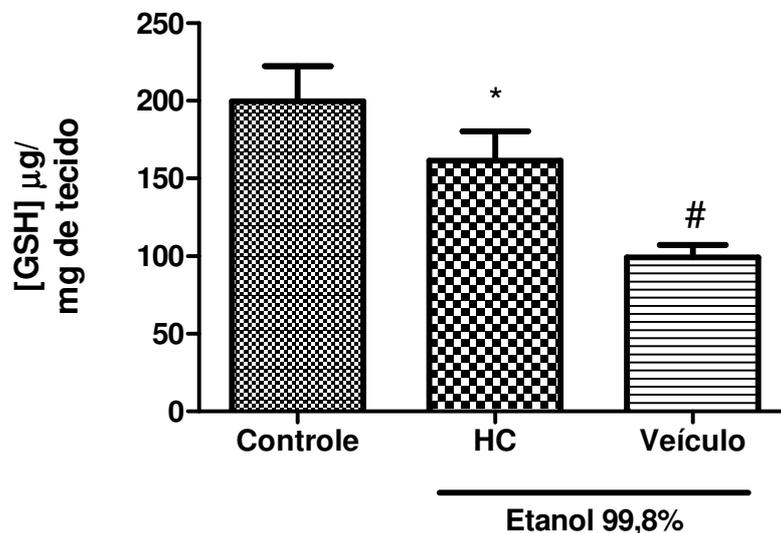
$\pm 23,7 \mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido), porém o grupo tratado com NAC, uma droga antioxidante, observou-se um aumento nos níveis de GSH ($285,6 \pm 22,4 \mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) quando comparado ao controle.

TABELA 8 - Efeito do HC sobre a glutatona reduzida da mucosa gástrica agredida por etanol.

Grupos	Doses (mg/Kg)	[GSH] ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido)	% de redução
Veículo	-	$199,7 \pm 22,6$	
Veículo + etanol	-	$99,2 \pm 8,0^*$	50.3
HC + etanol	12.5	$161.5 \pm 18,8^\#$	19.1

Os valores representam a média \pm E.P.M. da concentração de GSH nos homogenatos de estômago após 30 min. da indução da lesão, grupos de oito animais foram tratados com Veículo (solução de Polisorbato 80 0,2%) sem pós-tratamento com etanol; HC (12.5 mg/Kg, i.p.); Veículo (solução de Polisorbato 80 0,2%) com pós-tratamento com etanol. * $p < 0.05$ representa significância em relação ao grupo veículo; # $p < 0.05$ representa significância em relação ao grupo veículo + etanol (ANOVA Teste de Bonferroni).

Figura 18 – Efeito do HC sobre a glutatona da mucosa gástrica agredida por etanol.



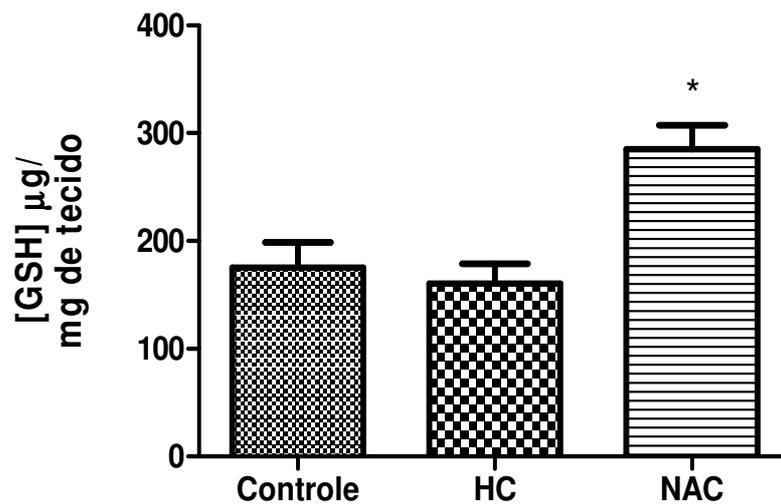
As barras representam a média \pm E.P.M. da concentração de GSH nos homogenatos de estômago após 30 min. da indução da lesão, grupos de oito animais foram tratados com Veículo (solução de Polisorbato 80 0,2%) sem pós-tratamento com etanol; HC (12.5 mg/Kg, i.p.); Veículo (solução de Polisorbato 80 0,2%) com pós-tratamento com etanol. * $p < 0.05$ representa significância em relação ao grupo veículo; # $p < 0.05$ representa significância em relação ao grupo veículo + etanol (ANOVA Teste de Bonferroni).

TABELA 9 - Efeito do HC sobre a glutathiona reduzida da mucosa gástrica sem lesão induzida por etanol

Grupos	Doses (mg/Kg)	[GSH] ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido)	% de recuperação
Controle	-	175,0 \pm 23,7	
HC	12.5	160,6 \pm 18,3*	-8.2
NAC	750	285,6 \pm 22,4#	63.2

Os valores representam a média \pm E.P.M. da concentração de GSH nos homogenatos de estômago após 30 e 60 min após os tratamentos, grupos de oito animais foram tratados com Veículo (solução de Polisorbato 80 0,2%); HC (50 mg/Kg, i.p.); ou NAC (750 mg/Kg v.o.). * $p < 0.05$ representa significância em relação ao grupo controle (ANOVA Teste de Bonferroni).

FIGURA 19 – Efeito do HC sobre a glutathiona reduzida da mucosa gástrica sem lesão induzida por etanol.



As barras representam a média \pm E.P.M. da concentração de GSH nos homogenatos de estômago após 30 e 60 min após os tratamentos, grupos de oito animais foram tratados com Veículo (solução de Polisorbato 80 0,2%); HC (12.5 mg/Kg, i.p.); ou NAC (750 mg/Kg v.o.). * $p < 0.05$ representa significância em relação ao grupo controle (ANOVA Teste de Bonferroni).

6.10 Hidroxicitronelal (HC) reduz de forma dose-dependente as lesões gástricas induzidas por Indometacina em camundongos

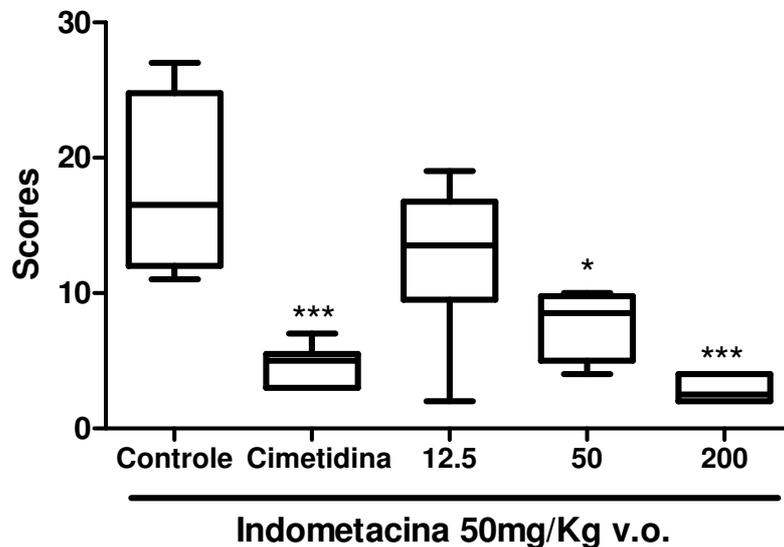
Os animais que receberam somente com veículo apresentaram após administração oral de indometacina (60 mg/Kg) uma elevado índice de lesão gástrica com base nos escores obtidos com referência na escala de Szabo et. al. (1985) apresentando valor mediano de 16,5(11,0 à 27,0). HC na dose de 12.5 mg/Kg, i.p., não foi capaz de reduzir de forma significativa ($p > 0,05$) os escores de lesão gástrica, 13,5 (2,0 à 19,0), em comparação com o grupo veículo, o que representa uma pequena inibição de 18.18%. HC nas doses de 50 e 200 mg/Kg, i.p., reduziram de forma significativa ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente) e dose-dependente o índice de lesão gástrica, 8,5 (4,0 à 10,0) e 2,5 (2,0 à 4,0), respectivamente, quando comparado ao grupo Veículo, o que corresponde a um percentual de inibição de 48.48 e 84.85%, respectivamente. Cimetidina (x mg/Kg, v.o.), um inibidor da secreção ácida antagonista dos receptores H2, reduziu significativamente ($p < 0,001$) os escores de lesão gástrica, 5,0 (3,0 à 7,0), quando comparada ao grupo veículo, o que corresponde a uma redução de 69.70 %.

TABELA 10 - Efeito do Hidroxicitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por indometacina.

Grupos	Doses (mg/Kg)	Escore	% de inibição
Veículo	-	16,5 (11,0 à 27,0)	
Cimetidina	60	5,0 (3,0 à 7,0)***	69,70
Hidroxicitronelal	12.5	13,5 (2,0 à 19,0)	18,18
Hidroxicitronelal	50	8,5 (4,0 à 10,0)*	48,48
Hidroxicitronelal	200	2,5 (2,0 à 4,0)***	84,85

Os valores representam a mediana (mínimo – máximo) dos scores de lesão gástrica do estômago mensurados de acordo com o quadro 1. Grupos de 10 animais foram tratados Veículo (solução de Polisorbato 80 0,2%); Cimetidina (60 mg/Kg, v.o.); HC (12.5 mg/Kg i.p., 50 mg/Kg i.p. e 200 mg/Kg, i.p.) * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ representam significância em relação ao grupo controle (ANOVA e Teste de Newman-Keul).

FIGURA 20 – Efeito do Hidroxicitronelal no modelo de lesão gástrica induzida por indometacina.



As barras representam a mediana com seus respectivos mínimos e máximos do índice de lesão gástrica relacionada aos escores obtidos com a escala proposta em SZABO, 1985 (Quadro 1). Grupos de oito animais foram tratados com Veículo (solução de Polisorbato 80 0,2%); Cimetidina (60 mg/Kg, v.o.); HC 12.5 mg/Kg, i.p. ; 50 mg/Kg, i.p. e 200 mg/Kg, i.p. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ representam significância em relação ao grupo controle (ANOVA e Teste de Newman-Keul)

6.11 Avaliação Toxicológica Aguda

Esta abordagem foi realizada com o objetivo de avaliar a segurança terapêutica do tratamento dos animais com HC. Para tanto, o HC foi administrado i.p. em animais normais, uma vez ao dia e durante sete dias, na dose de 200 mg/Kg. Através da análise da tabela 11 se observa que a única diferença significativa nos parâmetros hematológicos dos animais tratados com HC e aqueles tratados somente com veículo, foi em relação ao número de plaquetas. O tratamento com HC reduziu o número a contagem média destas células em 31% ($6,9 \pm 0,4 \times 10^5$ /mL), quando comparado ao grupo de animais tratados somente com veículo ($10,0 \pm 0,9 \times 10^5$ /mL).

A avaliação da função renal e hepática dos animais tratados com HC, foi realizada através das dosagens séricas de uréia e das transaminases (ALT e AST), respectivamente e está demonstrada na tabela 12. O tratamento com HC não promoveu mudanças significativas nos valores séricos de uréia e AST. Entretanto, a atividade sérica da ALT no grupo de animais que receberam o HC, foi significativamente maior ($47,54 \pm 5,8$ UI/L) da observada no grupo tratado somente com o veículo ($22,9 \pm 3,9$ UI/L).

Em acréscimo, é importante ressaltar que o HC não provocou alterações no peso úmido dos órgãos avaliados (fígado, coração, baço e rins) e nem na massa corpórea dos animais. No grupo de animais tratados com HC, o ganho de massa corpórea durante os sete dias de avaliação, foi semelhante ao grupo de animais tratados somente com veículo (resultados não mostrados)

TABELA 11 – Efeitos do Hidroxicitronelal sobre parâmetros hematológicos no sangue periférico.

Grupo	Dose (mg/kg i.p)	Plaquetas (10 ⁵ cells/mL)	Leucócitos Totais (10 ³ cells/mL)	Contagem diferencial de Leucócitos (%)			
				Eosinófilos	Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos
Veículo	-	10,0 ± 0,9	3,1 ± 0,2	0,0	88,5	10,2	1,1
HC	200	6,9 ± 0,4 *	2,4 ± 0,3	0,0	92,8	6,4	0,8

Os valores representam a média ± E.P.M. da contagem das respectivas células após o período de sete dias, grupos de oito animais foram tratados com Veículo (solução de Polisorbato 80 0,2%) ou HC (200 mg/Kg, i.p.). * p < 0.05 representa significância em relação ao grupo controle (Teste T de Student).

TABELA 12 - Efeitos do Hidroxicitronelal sobre parâmetros bioquímicos no sangue periférico.

Grupo	Dose (mg/kg)	Urea (mg/dL)	ALT (UI/L)	AST (UI/L)
Veículo	-	38,12 ± 1,7	22,9 ± 3,9	78,2 ± 8,5
HC	200	42,4 ± 1,8	47,54 ± 5,8 *	113,7 ± 15,5

Os valores representam a média ± E.P.M. dos parâmetros analisados após o período de sete dias, grupos de oito animais foram tratados com Veículo (solução de Polisorbato 80 0,2%) ou HC (200 mg/Kg, i.p.). * p < 0.05 representa significância em relação ao grupo controle (Teste T de Student).

7 DISCUSSÃO

A gastrite é uma lesão, patologicamente caracterizada pela inflamação inespecífica da mucosa gástrica. Apesar de a definição ser histológica, o diagnóstico geralmente é feito pelo clínico e/ou endoscopista, prescindindo da microscopia (WANG et al., 2009). A gastrite ocorre em qualquer região do globo, a prevalência é alta e aumenta com a idade. Algumas destas lesões são de natureza microbiana (*Helicobacter pylori*), virais (citomegalovirus) e fúngicas (histoplasma), *stress* agudo, agentes químicos, biológicos ou físicos (álcool, AINES, intoxicações, infecções). Sua maior prevalência é pela *Helicobacter pylori*, mas também ocorre frequentemente pela ingestão de álcool ou de antiinflamatórios não-esteróides (AINES) e intoxicações ou infecções. O desequilíbrio entre fatores agressivos (radicais livres, pepsina, ácido clorídrico e proteases) e aqueles responsáveis pela manutenção da integridade da mucosa gástrica (óxido nítrico, prostaglandinas, muco, bicarbonato, fluxo sanguíneo e grupos sulfidrílicos não-protéicos) é o mecanismo comum do desenvolvimento da gastrite (CALABUIG et al., 2009).

O tratamento da úlcera gástrica consiste basicamente em modular a secreção ácida. A busca por novas drogas que atuem por diferentes mecanismos auxiliaria o tratamento como uma alternativa às drogas atuais ou para atuar em sinergismo com estas e evitar alguns efeitos adversos dos tratamentos. Nas plantas temos um potencial enorme na prospecção de moléculas bio-ativas. Há milhares de anos o homem utiliza as plantas como alternativa de tratamento, porém agora temos a tecnologia para isolar, testar e definir a segurança dos compostos ativos, e para determinar parâmetros farmacológicos e farmacocinéticos.

O Hidroxicitronelal é um monoterpene largamente utilizado na indústria de cosméticos, saneantes e inseticidas. É produzido na ordem de bilhões de toneladas. Possui perfil toxicológico bem definido nas aplicações onde já é utilizado, e tem importância no estudo de processos alérgicos. (FORD; API; SUSKIND, 1988; DE GROOT; FROSCHE, 1997) Entretanto, suas atividades farmacológicas ainda não foram devidamente estudadas.

O citronelal é um composto obtido a partir do óleo essencial de plantas do gênero *Cymbopogon* e outras plantas. Possui uma série de atividades terapêuticas descritas sendo utilizada por diversas culturas ao redor do mundo. (HASHIMOTO; YASUDA; OHSAWA, 1992) O citronelal isoladamente já foi quimicamente caracterizado e suas propriedades farmacológicas estudadas. Foram atribuídas a este composto atividades antiinflamatória, antinociceptiva e antioxidante (QUINTAS-JUNIOR et al., 2011). Podemos inferir então que,

o Hidroxicitronelal por possuir semelhança estrutural com seu precursor citronelal, possam compartilhar algumas atividades farmacológicas. Nosso grupo testou HC em um modelo clássico de inflamação, migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de ratos induzida por carragenina e não se obteve resultados significativos, porém quando o HC foi testado sob modelos de lesão gástrica aguda apresentou efeito protetor na mucosa gástrica.

A variedade e disponibilidade de bebidas alcoólicas fazem do álcool a substância psicoativa mais popular do planeta. O álcool, certamente, contribui fortemente na etiologia e manutenção de vários problemas sociais, econômicos e de saúde enfrentados no mundo e nosso país. Em 2002, a Organização Mundial de Saúde divulgou que o consumo de etanol era responsável por 4,5% dos problemas mundiais de saúde, sendo a quinta causa de morte (WHO, 2002). Em 2004, foi realizado um estudo estatístico no qual se demonstrou a gravidade do problema no nosso país, sendo o álcool responsável por mais de 10% dos problemas de saúde no período da pesquisa no trato gastrointestinal. O consumo indiscriminado e crônico do etanol pode provocar diversas complicações e entre as mais graves estão a gastrite e as úlceras gástricas (MELONI; LARANJEIRA, 2004).

O modelo de úlcera induzida por etanol é uma abordagem clássica para demonstração de atividade citoprotetora e outros mecanismos que atuam no tecido gástrico. O etanol promove uma série de efeitos lesivos sobre a esta mucosa. Após o contato com a mucosa gastrointestinal, o etanol por uma ação físico-química consegue romper a barreira de muco bicarbonato, expondo a mucosa ao ácido e pepsina liberados no estômago. A redifusão de íons H^+ para a mucosa leva a um decréscimo de pH do microambiente lesando estas células e gerando radicais livres, que levam à necrose tecidual. Nos primeiros minutos após a administração do etanol, ocorre uma série de alterações na microcirculação, com lesão da rede capilar, vasoconstrição venosa, degranulação de mastócitos e consequente liberação de histamina que provoca vasodilatação arteriolar. Estes fenômenos levam a uma estase sanguínea e geração de edema. O etanol modula uma série de moléculas sinalizadoras importantes, que incluem ERK1/2, p38 MAPK, JNK, e os fatores de transcrição NF κ B e Egr-1 (DIAMOND; GORDON, 2000), as quais ativam a transcrição de mRNAs da ciclooxigenase-2 (COX-2), de citocinas (IL-6, IL-8, TNF- α) e da i-NOS. Durante a ação lesiva do etanol diversos mediadores são liberados, dentre eles leucotrieno C4, tromboxanos, endotelina, adenosina, histamina e PAF. Estes mediadores são os responsáveis por orquestrar os fenômenos vasculares induzidos pelo etanol. (KALIA et al., 2000)

Neste estudo ficou demonstrado através de avaliações macro e microscópicas das mucosas gástricas, que o HC quando administrado por via intraperitoneal em diferentes doses,

30 minutos antes da indução da úlcera por etanol, teve a capacidade de proteger a mucosa contra a lesão gástrica, inibindo de forma dose dependente a instalação das lesões.

Considerando a amplitude de fatores envolvidos na lesão gástrica no modelo experimental de úlcera induzida por etanol em camundongos, este modelo foi escolhido para dar prosseguimento ao estudo e investigar os mecanismos envolvidos no efeito gastroprotetor do HC na dose que apresentou melhor efeito farmacológico (12,5 mg/Kg). Neste sentido, a estratégia experimental foi delineada tendo como objetivo a investigação do envolvimento da via $\text{NO} \setminus \text{GMPc} \setminus \text{K}_{\text{ATP}}$, das prostaglandinas endógenas, dos grupos sulfidrílicos não protéicos (glutationa), bem como dos neurônios aferentes no efeito gastroprotetor do composto aqui estudado.

A primeira abordagem experimental realizada foi a investigação da participação do NO na atividade gastroprotetora do Hidroxicitronelal. Para estudar a influência deste mediador gasoso, foi feita uma modulação farmacológica com NG-Nitro-L-arginina-metiléster (L-NAME), que é um bloqueador inespecífico NOS. A L-NAME é um análogo do substrato da NOS e compete com a L-arginina pelo seu sítio de ligação (KNOWLES; MONCADA, 1994). Ao bloquear os efeitos da e-NOS, o mecanismo vasodilatador que protege a mucosa via liberação de NO fica inativado, pois o NO liberado das células endoteliais auxilia a manutenção da perfusão estomacal, provocando vasodilatação e inibindo aderência de leucócitos (SANTOS et al., 2005).

Ao administrarmos o HC juntamente com o bloqueador L-NAME, observamos que o efeito citoprotetor do Hidroxicitronelal foi suprimido. Demonstrando que o efeito protetor do HC é dependente da liberação de NO no endotélio.

No entanto, durante a lesão provocada pelo etanol, as propriedades citoprotetoras podem se tornar agressoras devido à uma extensiva produção de NO, independente de Ca^{++} , pela i-NOS (WHITTLE, 1993). O NO se combina às EROs formadas durante o estresse oxidativo gerado pelo etanol e forma peroxinitrito ONOO^- , que é um composto oxidante, e atua de forma deletéria ao reagir com proteínas ou DNA. (CHO, 2001; PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007).

O grupo tratado com HC apresentou uma menor marcação imunohistoquímica em comparação aos animais não tratados, demonstrando assim que existe uma menor expressão da iNOS nos animais tratados com HC. Efeito este que pode advir por inibição direta da transcrição, ou pela inibição da lesão, esta última que parece ser mais provável.

O mecanismo do NO na vasodilatação ocorre por estimular a enzima guanilato ciclase, que aumenta a concentração de GMPc intracelular. Esta molécula age ativando canais iônicos

e proteíno-quinases dependentes de GMPc, que atuam diminuindo a concentração intracelular de Ca^{++} , provocando assim relaxamento do músculo liso e seguinte vasodilatação (DENNINGER et al., 2001). No intuito de se demonstrar que a dependência do NO no efeito gastroprotetor do HC é devido ao efeito vasodilatador do NO, decidimos investigar se ao bloquearmos o GMPc este efeito seria também bloqueado, e os resultados comprovaram que sim.

Para bloquearmos os efeito do GMPc utilizamos o ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one). O ODQ é um inibidor da guanilato ciclase que se liga irreversivelmente ao grupamento HEME da enzima competindo com o NO por este sítio de ligação. (SCHRAMMEL et al., 1996). O tratamento com ODQ reverteu os efeitos gastroprotetores de HC. Os animais tratados com as duas drogas simultaneamente apresentaram altos índices de ulceração, demonstrando assim a dependência da ativação da guanilato ciclase solúvel pelo NO para a manutenção do efeito protetor.

Os canais de potássio ATP dependentes são controlados pela concentração de ATP no citosol, entretanto são ativados também por proteíno-quinases dependentes de GMPc. Uma vez ativada a guanilato ciclase pelo NO, esta enzima rapidamente catalisa a formação de GMPc. O aumento da concentração de GMPc ativa proteíno quinases dependentes de GMP que vão ativar canais de potássio ATP dependentes (WALDRON; COLE, 1999). Quando ativados os canais de K hiperpolarizam a célula, o que leva ao fechamento dos canais de cálcio voltagem dependentes (VGCC), que bloqueiam a entrada de cálcio na célula levando assim à vasodilatação. Essa hiperpolarização pode acontecer tanto pela atuação sobre os canais de potássio da célula do músculo liso vascular, quanto nas células endoteliais que pelas junções GAP, hiperpolarizam as anteriores também (STANDEN; QUAYLE, 1998).

Como demonstramos anteriormente, o efeito protetor do HC é dependente da produção de NO e da ativação da guanilato ciclase. No intuito de investigar se a vasodilatação ativada pela via NOGMP tinha a participação dos K_{ATP} , utilizamos as drogas glibenclamida, um bloqueador dos K_{ATP} , e diazóxido, um agonista destes canais.

O tratamento com glibenclamida foi efetivo em reverter a proteção mediada pelo HC e pelo diazóxido. Podemos desta forma concluir que o efeito gastroprotetor do Hidroxicitronelal é dependente da ativação dos K_{ATP} .

Um segundo mecanismo protetor que poderia estar envolvido nesta proteção seria a produção de prostaglandinas endógenas. Andre Robert cunhou o termo “citoproteção”, ele demonstrou que a administração de prostaglandinas em uma dose não anti-secretória protegia a mucosa gástrica, parcial ou completamente, contra agentes necrosantes como etanol,

soluções hiperosmóticas, sais biliares e ácidos (ROBERT et al., 1979). Desde então diversos estudos demonstraram o papel das prostaglandinas na defesa da mucosa e no tratamento da úlcera gástrica.

As prostaglandinas contribuem para a manutenção do fluxo sanguíneo, esse efeito vasodilatador é mediado no estômago pelos receptores EP2/EP4 para a prostaglandinas E, e IP para as prostaglandinas I. As prostaglandinas derivadas da COX-1 contribuem com a circulação basal da mucosa, entretanto em circunstâncias onde a integridade da mucosa é desafiada, as prostaglandinas derivadas da COX-2 são de maior importância para a manutenção do fluxo sanguíneo (KOTANI et al., 2006).

A PGE2 e a PGI2, são os prostanóides em maior quantidade no estômago, porém PGF2 e PGD2 também são detectadas em menores quantidades. As prostaglandinas atuam sobre outros fatores protetores como inibição da secreção ácida via receptores EP3 e IP. Estimulam a secreção de muco e bicarbonato no estômago e em outras partes do TGI, efeito mediado pelos receptores EP4 e EP1. As prostaglandinas podem também aumentar a eficácia da camada de fosfolípídeos superfície na superfície mucosa (NISHIO et al., 2007).

As PGs inibem a liberação de outros mediadores inflamatórios que contribuem para o agravamento da lesão (MARTIN e WALLACE, 2006). A PGE2 é um potente inibidor da liberação de histamina, TNF- α e PAF, por mastócitos e da liberação de leucotrieno B4 e IL-8 por neutrófilos (HOGABOAM, 1993; WERTHEIM, 1993).

A administração de prostaglandinas inibe a aderência de leucócitos no endotélio vascular provocada por AINEs, contribuindo para o efeito protetor das prostaglandinas. As prostaglandinas endógenas exercem papel sobre a cicatrização e reparação tecidual, sendo que os produtos da COX-2 parecem mediar esta atividade, uma vez que o uso de inibidores seletivos da COX-2 impede o reestabelecimento da mucosa. Os processos de reparação parecem ser mediados via receptores EP4 (TAKEUCHI, 2007).

No intuito de pesquisarmos se o efeito gastroprotetor do HC poderia ser mediado por um mecanismo que fosse dependente da atividade das PGs endógenas, utilizamos um inibidor não seletivo da COX, a indometacina, em doses que não afetassem a secreção ácida. Observamos que ao administramos indometacina no grupo tratado com HC, os animais desenvolviam úlcera. A indometacina, então, capaz de reverter o efeito protetor do HC, demonstra que em algum momento em seu mecanismo de ação o HC é dependente das prostaglandinas endógenas para exercer seu efeito gastroprotetor.

Um terceiro mecanismo envolvido seria o envolvimento dos neurônios aferentes. Ivan Pavlov um grande fisiologista russo, foi o primeiro a reconhecer que as vísceras possuíam a habilidade de se adaptar ao seu inconstante ambiente. Hoje é sabido que esta adaptabilidade se deve ao sistema nervoso entérico e a plasticidade de suas sinapses. Os neurônios aferentes primários do sistema nervoso entérico estão localizados no plexo mientérico ou no plexo submucoso, e projetam suas fibras para mucosa, submucosa (particularmente arteríolas), músculo, outros neurônios do plexo e para a mucosa. Essas projeções permitem às fibras sensoriais responderem a mudanças químicas no microambiente do lúmen, espaço intersticial ou na vasculatura, e também a estímulos mecânicos (GRUNDY, 2002)

Um subgrupo destes neurônios aferentes espinhais desempenha um papel protetor na mucosa. Eles são capazes de sinalizar reações protetoras como reações vasculares, secretórias e/ou motoras, quando detectam que a integridade da mucosa está ameaçada por algum agente nóxico. Essa função eferente-símile é mediada por transmissores neuropeptídeos como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), substância P e neuroquinina-A e NO, que são liberados nas terminações periféricas destes neurônios nos tecidos. Assim, a estimulação das terminações nervosas sensoriais causam aumento do fluxo sanguíneo e aumento a permeabilidade vascular, um processo que foi denominado de “inflamação neurogênica” (HOLZER, 1988; GUTH, 1992; MAGGI, 1995).

Essa defesa neural é importante na resposta à retro-difusão de íons H^+ para a mucosa, que acontece quando fatores lesivos como ingestão de álcool, AINEs, comidas irritantes, fatores mecânicos ou refluxo da bile, rompem a barreira protetora de muco-bicarbonato e permitem o contato da mucosa com o ácido clorídrico e a pepsina.

Quando a concentração de íons H^+ aumenta na lâmina própria, os neurônios aferentes são ativados, e pelo mecanismo descrito anteriormente aumenta o fluxo sanguíneo que dá início a outros mecanismos de defesa (AKIBA, 1999).

A capsaicina é uma substância encontrada nas pimentas e possui a atividade de ativar os neurônios aferentes via receptores TRPV1 (receptor vanilóide transiente de canal de cátions tipo 1), abrindo canais iônicos despolarizando e ativando esses neurônios. Em doses baixas a capsaicina possui atividade protetora por levar esses neurônios a ativarem o mecanismo de proteção descrito anteriormente. Entretanto, em altas doses, a capsaicina age de forma neurotóxica inativando as terminações nervosas impedindo a ativação e liberação dos mediadores, dessa forma a mucosa perde seu mecanismo de defesa neuronal e fica mais susceptível ao desenvolvimento de lesões (TAKEUCHI, 1994a).

Para investigarmos se a proteção neuronal estaria envolvida com a atividade protetora do Hidroxicitronelal utilizamos a capsazepina, um bloqueador no receptor TRPV1. Os animais pré-tratados com capsaicina desenvolveram menor índice de lesão. Todavia, quando pré-tratados também com capsazepina esse efeito foi revertido. O tratamento com capsazepina, porém, não reverteu a proteção mediada pelo HC. Nossos resultados mostram que quando bloqueados os receptores TRPV1, HC continua exercendo seu efeito protetor, demonstrando assim uma independência desta via.

A lesão induzida por etanol é uma lesão que gera no tecido um alto nível de estresse oxidativo, principalmente pelos danos na microcirculação que geram regiões isquêmicas na superfície gástrica e assim o aparecimento de espécies reativas de oxigênio. O estresse oxidativo gerado depleta os compostos sulfidrílicos, que são necessários na estabilização das membranas celulares e no sequestro de radicais livres. Entre estes compostos sulfidrílicos, o mais importante e em maior quantidade é a glutatona, que em sua forma reduzida (GSH) atua como um antioxidante intracelular (MACMATH, 1990).

Após a indução da úlcera por etanol nós dosamos a concentração de GSH no tecido, e observamos que a concentração de GSH no grupo etanol reduziu significativamente, representando uma diminuição de 50,3% comparado ao grupo controle, enquanto o grupo tratado com HC teve uma redução de 19,1%, demonstrando que o tratamento com HC protegeu a mucosa do estresse oxidativo.

Desenvolvemos uma segunda abordagem para definirmos se esse efeito protetor era mediado por aumentar os níveis de GSH ou por evitar a lesão e, conseqüentemente, a depleção destes grupos. Neste experimento dosamos GSH nos estômagos de animais tratados, mas sem induzir a úlcera. Os animais foram tratados com HC e com NAC uma droga com intensa atividade antioxidante. Como era esperado, NAC aumentou a concentração de GSH em 63% comparado ao grupo controle, porém HC foi inefetivo e não apresentou diferença estatística.

Dessa forma, podemos afirmar que HC possui uma atividade protetora contra a lesão aguda induzida por etanol, mas aparentemente este efeito não é mediado pelo aumento do aparato antioxidante nas células.

Para investigarmos o efeito do Hidroxicitronelal sobre a proteção da mucosa gástrica, decidimos testar o composto em um segundo modelo de lesão, sendo o modelo escolhido o de lesão gástrica induzida por AINE. Neste modelo os animais receberam uma dose tóxica de AINE, que neste trabalho foi utilizada a indometacina. A toxicidade do AINE nestas doses se manifesta por formar úlceras estomacais características, isso se dá principalmente por dois

mecanismos principais, um local outro sistêmico. A nível local alguns AINEs possuem capacidade de eliminar diretamente células epiteliais, esta atividade citotóxica pode se dar por diferentes mecanismos, incluindo a lise osmótica devido ao aprisionamento de moléculas carregadas dentro das células, desacoplamento da fosforilação-oxidativa e rompimento da barreira mucosa. Estes efeitos acontecem independentemente dos efeitos sobre a síntese de prostaglandinas (PHILLIPSON et al., 2002). Os AINEs podem também dificultar a proliferação celular por inibir a ação do EGF.

Á nível sistêmico, os AINEs vão atuar sobre a COX inibindo a produção de prostaglandinas, que é o principal mecanismo da toxicidade dos AINEs sobre a mucosa. Este efeito diminui a atividade protetora das prostaglandinas, e são aumentadas as chances de lesão endotelial por outros fatores lesivos e em alguns casos pelo próprio AINE. A supressão da atividade da COX-1 está ligada à diminuição do fluxo sanguíneo. Ocorre também um aumento da adesão de neutrófilos no endotélio vascular pela expressão aumentada de moléculas de adesão ICAM-1. Este processo parece ser mediado em parte pelo leucotrieno B₄, que também tem papel na lesão da mucosa. TNF- α também aparece ter participação nestes processos (YOSHIDA et al., 1993). Outro efeito importante é a atuação dos AINEs sobre as plaquetas, diminuindo a produção de tromboxano e VEGF, que são de importância na cicatrização e recuperação do tecido (MA et al., 2001).

No modelo de lesão gástrico por AINEs, a administração da indometacina em uma dose tóxica promoveu o aparecimento de lesões na mucosa e o Hidroxicitronelal foi efetivo em proteger a mucosa gástrica contra esta lesão provocada pela indometacina. HC foi capaz de reduzir as lesões significativamente nas doses de 50 e 200 mg/kg, correspondente a uma inibição de 48 e 85% respectivamente.

Atualmente, apesar da crescente importância dos medicamentos fitoterápicos, relativamente poucos estudos foram realizados a fim de comprovar sua eficácia e segurança através de estudos pré-clínicos e clínicos, sendo que muitas plantas ainda são utilizadas com base somente no seu uso popular bem estabelecido.

No Brasil, a legislação para medicamentos fitoterápicos vem sofrendo modificações nos últimos anos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) vem elaborando normas para a regulamentação destes medicamentos, desde a Portaria nº. 6 de 1995, que estabeleceu prazos para que as indústrias farmacêuticas apresentassem dados de eficácia e segurança dos medicamentos fitoterápicos, passando pela RDC nº. 17 de 2000, e a Resolução RDC nº. 48 de 16 de março de 2004, atualmente em vigor, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 2004).

A segurança terapêutica deste composto já foi amplamente estudada. Entretanto, os estudos toxicológicos foram realizados para uso em cosméticos e domissanitários (DE GROOT; FROSCHE, 1997). Desta forma, considerando que o objetivo principal deste estudo foi demonstrar atividade gastroprotetora de um composto originado da natureza, e como meta a sua possível indicação como alternativa farmacológica, considerou-se imprescindível a realização de um estudo toxicológico pré-clínico do HC. Neste, foram avaliados os principais parâmetros hematológicos, parâmetros bioquímicos marcadores de função renal (uréia) e hepática (AST e ALT), massa corpórea e avaliação macroscópica de órgãos vitais. Podemos inferir que neste estudo, o tratamento diário dos animais com o HC durante sete dias, apresentou baixa toxicidade. De todos os parâmetros avaliados as únicas alterações observadas foram a diminuição no número de plaquetas e o aumento da atividade sérica de ALT. Estes resultados não desabonam um possível uso terapêutico deste composto considerando as seguintes razões: 1) dentre as dificuldades dos estudos pré-clínicos estão a falta de uma padronização dos valores de referência de parâmetros hematológicos e bioquímicos em pequenos roedores; 2) os estudos pré-clínicos não são decisivos e precisam ser complementados com estudos clínicos; 3) neste estudo não foi realizada avaliação histopatológica dos órgãos e 4) o grupo controle utilizado foi tratado com o Polissorbato 80. Apesar deste composto ser amplamente utilizado como veículo de drogas na indústria farmacêutica, não foi encontrado nenhum estudo científico que demonstre sua segurança pela via de administração utilizada neste estudo (i.p).

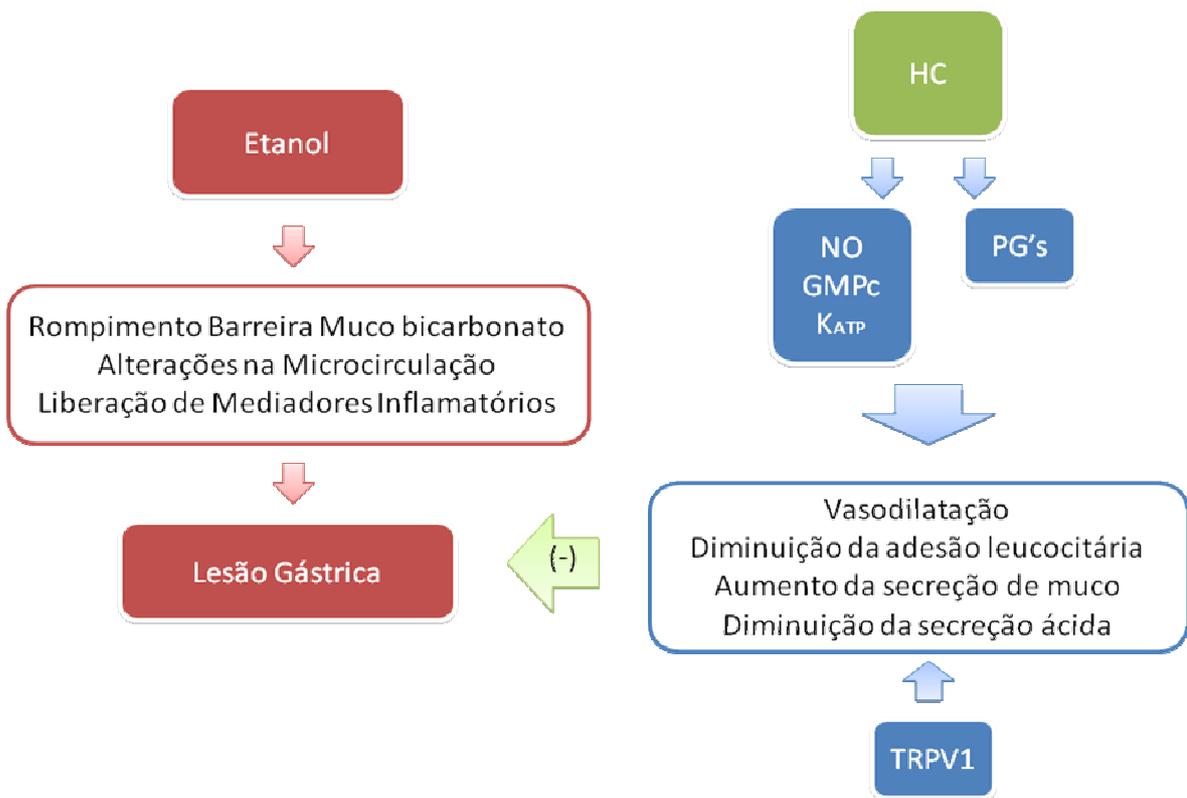
Finalmente, neste trabalho foi demonstrado efeito gastroprotetor do HC em dois modelos experimentais clássicos, úlcera gástrica induzida por etanol e indometacina em camundongos. Os resultados aqui obtidos são consistentes para a hipotetização de que o HC age facilitando a microcirculação da mucosa gástrica, mecanismo este essencial para a proteção desta mucosa, uma vez que a manutenção do fluxo sanguíneo nos níveis apropriados é necessário para o processo de restituição, além de prover íons bicarbonato para a secreção e retirar o excesso de ácido que possa retro-difundir para a mucosa (SILEN, 1987).

8 CONCLUSÃO

Neste trabalho demonstramos que o HC possui efeito gastroprotetor na mucosa. Esse efeito demonstrou relação dose dependência nos modelos de lesão por etanol e por indometacina. Demonstramos que o efeito gastroprotetor é dependente dos mecanismos vasodilatadores mediados pela via NO\GMP\K_{ATP}, e das prostaglandinas endógenas. Demonstramos uma independência dos neurônios aferentes no efeito do HC. HC protege a mucosa também dos radicais livres produzidos na lesão por etanol, mas não por aumentar a concentração destes grupos, mas por evitar a extensão das lesões.

Podemos dessa forma sugerir uma hipótese mecânica para o efeito gastroprotetor do HC, Figura 21.

FIGURA 21 – Mecanismo hipotético do efeito gastroprotetor do HC



REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). RDC nº 48, de 16 de março de 2004. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004.
- AIHARA, E.; NOMURA, Y.; SASAKI, Y.; ISE, F.; KITA, K.; TAKEUCHI, K. Involvement of prostaglandin E receptor EP3 subtype in duodenal bicarbonate secretion in rats. **Life Sci.**, v. 80, p. 2446–2453, 2007.
- AIHARA, T.; NAKAMURA, E.; AMAGASE, K.; TOMITA, K.; FUJISHITA, T.; FURUTANI, K.; OKABE, S. Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: past, present, and future. **Pharmacol. Ther.**, v. 98, p.109-127, 2003.
- AKIBA, Y.; GUTH, P.H.; ENGEL, E.; NASTASKIN, I.; KAUNITZ, J.D. Acidsensing pathways of rat duodenum. **Am. J. Physiol.** v. 277, G268– G274, 1999.
- ALAM, S.; ASAD, M.; ASDAQ, S. M.; PRASAD, V. S. Antiulcer activity of methanolic extract of *Momordica charantia* L. in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 123, p 464–469, 2009.
- ALMEIDA, R.N.; NAVARRO, D.S.; BARBOSA-FILHO, J.M. Plants with central analgesic activity. **Phytomedicine**, v. 8, p. 310-322, 2001.
- ALONSO, J. Bases Clínicas y Farmacológicas In: _____. **Tratado de Fitomedicina**. Buenos Aires: ISIS, 1998. p.198-735.
- BAGGIO, C. H.; DE MARTINI OTOFUJI, G.; DE SOUZA, W. M.; DE MORAES SANTOS, C. A.; TORRES, L. M.; RIECK, L.; DE ANDRADE MARQUES, M. C.; MESIAVELA, S. Gastroprotective mechanisms of indole alkaloids from *Himatanthus lancifolius*. **Planta Med.**, v. 71, n. 8, p. 733-738, 2005.
- BARRETT, K.E.; KEELY, S.J. Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 62, p. 535, 2000.
- BEIL, W.; BIRKHOLZ, C.; SEWING, K-FR. Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and *Helicobacter pylori* growth. **Drug Res.**, v. 45, n. 1, p. 697-700, 1995.
- BERNHARD, W.; POSTLE, A. D.; LINCK, M.; SEWING, K. F. Composition of phospholipid classes and phosphatidylcholine molecular species of gastric mucosa and mucus. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1255, p. 99-104, 1995.
- BILICI, D.; SÜLEYMAN, H.; BANOĞLU, Z. N.; KIZILTUNÇ, A.; AVCI, B.; CIFTÇIOĞLU, A.; BILICI, S. Melatonin prevents ethanol-induced gastric mucosal damage possibly due to its antioxidant effect. **Dig. Dis. Sci.**, v. 47, n. 04, p. 856-861, 2002.

BLACK, J. W.; DUNCAN, W. A.; DURANT, C. J.; GANELLIN, C. R.; PARSONS, E. M. Definition and antagonism of histamine H₂-receptors. **Nature**, v. 236, p. 385–390, 1972.

BORRELLI, F.; IZZO, A.A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytother. Res.**, v. 14, p. 581-591, 2000.

BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P.C.; KONTUREK, S.J.; BRZOZOWSKA, I.; PAWLIK, T. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 5, p.33-55, 2005.

CARLINI, E.A. Plants and the central nervous system. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 75, p. 501-512, 2003.

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

CHEN, T.S.; LEE, Y.C.; LI, F.Y.; CHANG, F.Y. Smoking and hyperpepsinogenemia are associated with increased risk for duodenal ulcer in *Helicobacter pylori*-infected patients. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 39, p.699-703, 2005.

CHO, C.H. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders. **J. Physiol.**, v. 95, p. 253-256, 2001.

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

CNUBBEN, N.H.P.; RIETJENS, I.M.C.M.; WORTELBOER, H.; ZANDEN, J.; BLADEREN, P.J. The interplay of glutathione-released process in antioxidant defense. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 10, p. 141 – 152, 2001.

CORRAO, G.; BAGNARDI, V.; ZAMBON, A.; LA VECCHIA, C. A meta-analysis of alcohol consumption and the risk of 15 diseases. **Prev. Med.**, v. 38, n. 5, p. 613-619, 2004.

DANESH, J. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: systematic review of the epidemiological studies. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 13, p. 851–856, 1999.

DAVENPORT, H. W. Gastric mucosal hemorrhage in dogs. Effects of acid, aspirin, and alcohol. **Gastroenterology**. v. 56, p. 439-449, 1969.

DE GROOT, A. C.; FROSCHE, P. J. Adverse reactions to fragrances. A clinical review. **Contact Dermatitis**, v. 36, p. 57–87, 1997.

DE SOUSA, D.P.; GONÇALVES, J.C.R.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; CRUZ, J.S.; ARAÚJO, D.A.M.; ALMEIDA, R.N. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. **Neurosci. Lett.** v. 401, p. 231-235, 2006.

DENNINGER, J.; MARLETTA, M. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1411, n. 2/3, p. 334–350, 1999.

DE-OLIVEIRA, A.C.; RIBEIRO-PINTO, L.F.; PAUMGARTTEN, J.R. In vitro inhibition of CYP2B1 monooxygenase by beta-myrcene and other monoterpenoid compounds. **Toxicol. Lett.**, v. 92, p.39–46, 1997.

DIAMOND, I.; GORDON, A.S. Cellular and molecular neuroscience of alcoholism. **Physiol. Rev.**, v. 77, p. 1-20, 1997.

DIAS, B.F.S. **A implementação da convenção sobre a diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades.** Campinas: André Tosello, 1996.

DIXON, M. F. Patterns of inflammation linked to ulcer disease. **Baillière's Clinical Gastroenterology**, v. 14, p. 27-40, 2000.

DOCKRAY, G.J.; VARRO, A.; DIMALINE, R. Gastric endocrine cells: gene expression, processing, and targeting of active products. **Physiol. Rev.**, v. 76, p. 767, 1996.

DOCKRAY, G.J.; VARRO, A.; DIMALINE, R.; WANG, T. The gastrins: their production and biological activities. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 63, p. 119, 2001.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G.; Revisão sobre óxido nítrico. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 39, n. 04, p. 343-350, 2003.

FABRICANT, D.S.; FARNSWORTH, N.R. The values of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environ. Health Perspec.**, v. 109, Suppl. 1, 2001.

FESHARAKI, M.; NASIMI, A.; MOKHTARI, S.; MOKHTARI, R.; MORADIAN, R.; AMIRPOOR, N. Reactive oxygen metabolites and anti-oxidative defenses in aspirin-induced gastric damage in rats: Gastroprotection by Vitamin E. **Pathophysiology**, v. 13, n. 4, p. 237-243, 2006.

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

FONT QUER, P. **Plantas Medicinales: el discórdides renovado.** Labor: Calábria, 1988.

FORD, R.A.; API, A.M.; SUSKIND, R.R. Allergic contact sensitization potential of hydroxycitronellal in humans. **Food Chem. Toxicol.**, v. 26, p. 921-926, 1988.

FRIEDMAN, G. D.; SIEGELAUB, A. B.; SELTZER, C. C. Cigarettes, alcohol, coffee and peptic ulcer. **N. Engl. J. Med.**, v. 290, p. 469–473, 1974.

GAMPERL, A.K.; HEIN, T.W.; KUO, L.; CASON, B.A. Isoflurane-induced dilation of porcine coronary microvessels is endothelium dependent and inhibited by glibenclamide. **Anesthesiology**, v. 96, p. 1465–1471, 2002.

GANNON, B.; BROWNING, J.; O'BRIEN, P.; ROGERS, P. Mucosal microvascular architecture of the fundus and body of the human stomach. **Gastroenterology**, v. 86, p. 866–875, 1984.

- GEIBEL, J.; ABRAHAM, R.; MODLIN, I.; SACHS, G. Gastrin-stimulated changes in Ca²⁺ concentration in parietal cells depends on adenosine 3',5'-cyclic monophosphate levels. **Gastroenterology**, v. 109, p. 1060–1067, 1995.
- GHERLARDINI, C.; GALEOTTI, N.; MAZZANTI, G. Local anaesthetic activity of monoterpenes and phenylpropanes of essential oils. **Planta Med.**, v. 67, p. 564-566, 2001.
- GLAVIN, G.B.; SZABO, S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. **FASEB J.**, v. 6 p. 825-831, 1992.
- GOEL, R. K.; BHATTACHARYA, S. K. Gastroduodenal mucosal defense and mucosal protective agents. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 29, p. 701-714, 1991.
- GRIFFITH, O.W. Biological and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 27, p. 922-935, 1999.
- GRUNDY, D. Neuroanatomy of visceral nociception: vagal and splanchnic afferent. **Gut**, v. 51, p. i2–i5, 2002.
- GURBUZ, I.; AKYUZ, C.; YESILADA, E.; SENER, B. Anti-ulcerogenic effect of *Mormodica charantia* L. fruits on various ulcer models in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 71, p. 77-82, 2000.
- GUTH, P.H. Current concepts in gastric microcirculatory pathophysiology. **Yale J. Biol. Med.**, v. 65, p. 677–688, 1992.
- GUTH, P.H. Pathogenesis of Gastricmucosal Injury. **Ann. Rev. Med.**, v. 33, p. 183-196, 1982.
- HAM, A. W. **Histologia**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.
- HANSEN, M. B. L. S. DRESNER & R. B. WAIT: Profile of neurohumoral agents on mesenteric and intestinal blood flow in health and disease. **Physiol. Res.**, v. 47, p. 307–327, 1998.
- HASHIMOTO, K.; YASUDA, T.; OHSAWA, K. Determination of synephrine from Chinese medicinal drugs originating from Citrus species by ion-pair high-performance liquid-chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 623, p. 386–389, 1992.
- HASHIMOTO, K.; YASUDA, T.; OHSAWA, K.: Determination of synephrine from Chinese medicinal drugs originating from Citrus species by ion-pair high-performance liquid-chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 623, p. 386–389, 1992.
- HOCKER, M. Molecular mechanisms of gastrin-dependent gene regulation. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 1014, p. 97 - 109, 2004.
- HOGABOAM, C.M.; BISSONNETTE, E.Y.; CHIN, B.C.; BEFUS, A.D.; WALLACE, J. L. Prostaglandins inhibit inflammatory mediator release from rat mast cells. **Gastroenterology**, v. 104, p. 122–129, 1993.

HOLM, M.; JOHANSSON, B.; PETTERSSON, A.; FANDRIKS, L. Acid-induced duodenal mucosal nitric oxide output parallels bicarbonate secretion in the anaesthetized pig. **Acta Physiol. Scand.**, v. 162, p. 461-468, 1998.

HOLZER, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. **Neuroscience**, v. 24, p. 739–768, 1988.

HOOGERWERF, W. A.; PASRICHA, P. J. Gastric acid pharmacotherapy's, peptic ulcer and gastroesophageal reflux disease. In; BRUNTON, L.L. **Goodman & Gilman's: pharmacological basis of therapeutics**. 11st ed. New York: McGraw-Hill Companies, 2006.

HSU, S. M.; RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 29, n. 11, p. 1349-53, 1981.

HUANG, J. Q.; SRIDHAR, S.; CHEN, Y.; HUNT, R. H. Meta-analysis of the relationship between *Helicobacter pylori* seropositivity and gastric cancer. **Gastroenterology**, v. 114, p. 1169– 1179, 1998.

ICHIKAWA, T.; ENDOH, H.; HOTTA, K.; ISHIHARA, K. The mucin biosynthesis stimulated by epidermal growth factor occurs in surface mucus cells, but not in gland mucus cells, of rat stomach. **Life Sci.**, v. 67, p. 1095-1101, 2000.

ISHIKAWA, T.; LI, Z. S.; LU, Y. P.; REA, P. A. The GS-X Pump in Plant, Yeast, and Animal Cells: Structure, Function, and Gene Expression. **Bioscience Reports**, v. 17, p. 189–207, 1997.

ISHIZAKA, H.; KUO, L. Endothelial ATP-sensitive potassium channels mediate coronary microvascular dilation to hyperosmolarity. *Am J Physiol*, v. 273, p. H104–H112, 1997. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 56, p. 33-55, 2005.

JACKSON, W.F. Arteriolar tone is determined by activity of ATP-sensitive potassium channels. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 265, p. H1797–H1803, 1993.

JAFFREY, S.R.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; FERRIS, C. D.; TEMPST, P.; SNYDER, S.H. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. **Nat. Cell Biol.**, v.3, 193-197, 2001.

JASS, J.R.; WALSH, M.D. Altered mucin expression in the gastrointestinal tract: a review. **J. Cell Mol. Med.**, v. 5, p. 327, 2001.

KALIA, N.; BARDHAN, K.D.; REED, M.W.; JACOB, S.; BROWN, N.J. Mast cell stabilization prevents ethanol-induced rat gastric mucosal injury: mechanisms of protection. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 15, p. 133-41, 2000.

KARAM, S.M.; LEBLOND, C.P. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. I. Identification of proliferative cell types and pinpointing of the stem cell. **Anat. Rec.**, v. 236, p.259–279, 1993.

- KATO, S.; KITAMURA, M.; KOROLKIEWICZ, R. P.; TAKEUCHI, K. Role of nitric oxide in regulation of gastric acid secretion in rats: effects of NO donors and NO synthase inhibitor. **Br. J. Pharmacol.**, v. 123, p. 839-846, 1998.
- KHAYYAL, M.; EL-GHAZALY, M.; KENAWY, S.; SEIF-EL-NASR, M.; MAHRAN, L.; KAFABI, Y.; OKPANYI, S. Antiulcerogenic effect of some gastrointestinally acting plant extracts and their combination. **Arzneim- Forsch.**, v. 51, p. 545-553, 2001.
- KIRKMAN, H.N.; GAETANI, G.F. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 81, p. 4343 - 4347, 1984.
- KIRKMAN, H.N.; ROLFO, M. FERRARIS, A.M.; GAETANI, G.F. Mechanism of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 13908 – 13914, 1999.
- KISHORE, R.; MCMULLEN, M.R.; NAGY, L.E. Stabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA by chronic ethanol: role of A + U-rich elements and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 9, p. 276, 2001.
- KIVILUOTO, T.; AHONEN, M.; BÄCK, N.; HÄPPÖLÄ, O.; MUSTONEN, H.; PAIMELA, H.; KIVILAAKSO, E. The pre-epithelial mucus-HCO₃ layer protects against intracellular acidosis in acid-exposed gastric mucosa. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 264, p. G57-G63, 1993.
- KNOWLES R.G.; MONCADA S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem. J.**, v. 298, p. 249-58, 1994.
- KOCEVAR, N.; GLAVAC, I.; INJAC, R.; KREFT, S. Comparison of capillary lectrophoresis and high performance liquid chromatography for determination of flavonoids in *Achillea millefolium*. **J. Pharmacol. Biochem. Anal.**, v. 46, p. 609 – 614, 2008.
- KONTUREK, P. C.; BIELANSKI, W.; KONTUREK, S. J.; HAHN, E. G. Helicobacter pylori associated gastric pathology. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 50, p. 695– 710, 1999.
- KONTUREK, S. J.; CIESZKOWSKI, M.; KWIECIEN, N.; KONTUREK, J.; TASLER, J.; BILSKI, J. Effects of omeprazole, a substituted benzimidazole, on gastrointestinal secretions, serum gastrin, and gastric mucosal blood flow in dogs. **Gastroenterology**, v. 86, p. 71– 77, 1984.
- KORTVELYESSY, G. Preparation of derivatives of citronellal. **Acta Chim. Hung Models Chem.**, v. 119, p. 347–354, 1985.
- KOTANI, T.; KOBATA, A.; NAKAMURA, E.; AMAGASE, K.; TAKEUCHI, K. Roles of cyclooxygenase-2 and prostacyclin/IP receptors in mucosal defense against ischemia/reperfusion injury in mouse stomach. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 316, p. 547–555, 2006.

KURATA, J.H.; NOGAWA A.N. Meta-analysis of risk factors for peptic ulcer. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, Helicobacter pylori, and smoking. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 24, p. 2-17, 1997.

LACY, E.R.; COWART, K.S.; KING, J.S.; DELVALLE, J.; SMOLKA, A.J. Epithelial response of the rat gastric mucosa to chronic superficial injury. **Yale J. Biol. Med.**, v. 69, p. 105 – 108, 1996.

LAINE, L. The gastrointestinal effects of nonselective NSAIDs and COX-2-selective inhibitors. **Semin. Arthritis Rheum.**, v. 32, n. 3, Suppl. 1, p. 25-32, 2002.

LAPA, A. J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2001.

LEIER, I.; JEDLITSCHKY, G.; BUCHHOLZ, U.; CENTER, M.; COLE, S.P.; DEELEY, R.G.; KEPPLER, D. ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump. **Biochem. J.**, v. 314, p. 433 – 437, 1996.

LEWIS, D. A. E.; SHAW, G. P. A natural flavonoid and synthetic analogues protect the gastric mucosa from aspirin-induced erosions. **J. Nutr. Biochem.**, v. 12, p. 95-100, 2001.

LU, Y. H.; ZHANG, C. W.; BUCHELI, P.; WEI, D. Z. Citrus flavonoids in fruit and traditional Chinese medicinal food ingredients in China. **Plant Foods Hum. Nutr.**, v. 61, p. 57–65, 2006.

LU, U.; HOLMGREN, A. Selenoproteins, **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 723-727, 2009.

MA, L.; ELLIOTT, S.N.; CIRINO, G.; BURET, A.; IGNARRO, L.J.; WALLACE, J.L. Platelets modulate gastric ulcer healing: role of endostatin and vascular endothelial growth factor release. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 98, p. 6470–6475, 2001.

MACMATH, T.L. Alcohol and gastrointestinal bleeding. **Emerg. Med. Clin. North Am.**, v. 8, p. 859-872, 1990.

MACMICKING, J.; XIE, Q.; NATHA, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 15, p. 323–50, 1997.

MAGGI, C.A. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. **Prog. Neurobiol.**, v. 45, p. 1 – 98, 1995.

MAITY, P.; BISWAS, K.; ROY, S.; BANERJEE, R.K.; BANDYOPADHYAY, U. Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer – recent mechanistic update. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 253, p. 329–338, 2003.

MARSHALL, J. M.; THOMAS, T.; TURNER, L. A link between adenosine, ATP-sensitive K⁺ channels, potassium and muscle vasodilatation in the rat in systemic hypoxia. **J. Physiol. (London)**, v. 472, p. 1–9, 1993.

MARTIN, G.R.; WALLACE, J. L. Gastrointestinal inflammation: a central component of mucosal defense and repair. **Exp. Biol. Med.**, v. 231, p. 130–137, 2006.

MELO, M.S.; SENA, L.C.S.; BARRETO, F.J.N.; BONJARDIM, L.; ALMEIDA, J.R.G.S.; LIMA, J.T.; DE SOUSA, D.P.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Antinociceptive effect of citronellal in mice. **Pharm. Biol.**, v. 48, p. 411-416, 2010.

MERCKEL, F.; BERNARD, G.; MUTSCHLER, J.; GIMÉNEZ-ARNAU, E.; GERBERICK, G.F.; LEPOITTEVIN, J.P. Effect of a microemulsion system on hapten-peptide reactivity studies: examples of hydroxycitronellal and citral, fragrance skin sensitizers, with glutathione. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 20, p. 1433-1441, 2010.

MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Lipid peroxidation: a possible role in gastric damage induced by ethanol in rats. **Life Sci.**, v. 38, p. 2163-2167, 1986.

MORIKAWA, T.; LI, N.; NAGATOMO, A.; MATSUDA, H.; LI, X.; YOSHIKAWA, M. Triterpene saponins with gastroprotective effects from tea seed (the seeds of *Camellia sinensis*). **J. Nat. Prod.**, v. 69, n. 2, p. 185-190, 2006.

NANJI, A.A., JOKELAINEN, K.; TIPOE, G.L.; RAHEMTULLA, A.; THOMAS, P.; DANNENBERG, A.J. Curcumin prevents alcohol-induced liver disease in rats by inhibiting the expression of NF-kappa B-dependent genes. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 284, p. G321- G327, 2003.

NARDELLI, A.; DRIEGHE, J.; CLAES, L.; BOEY, L.; GOOSSENS, A. Fragrance allergens in 'specific' cosmetic products. **Contact Dermatitis**, v. 64, p.212-219, 2011.

NELSON, M.T.; QUAYLE, J.M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 268, p. C799–C822, 1995.

NILIUS, B.; DROOGMANS, G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. **Physiol. Rev.**, v. 81, p. 1415–1459, 2001.

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

NISHIO, H.; TERASHIMA, S.; NAKASHIMA, M.; AIHARA, E.; TAKEUCHI, K.. Involvement of prostaglandin E receptor EP2 subtype and prostacyclin IP receptor in decreased acid response in damaged stomach. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 58, p. 407–421, 2007.

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Biodiversidade: Aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2001.

NORDBERG, J.; ARNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 31, p. 1287 – 1312, 2001.

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

OURY, T.D.; DAY, B.J.; CRAPO, J.D. Extracellular superoxide dismutase in vessels and airways of humans and baboons. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 20, p. 957 – 965, 1996.

PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol. Rev.**, v. 87, p. 315-424, 2007.

PAIVA, L. A.; RAO, V. S.; GRAMOSIA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 62, n. 1, p. 73-78, 1998.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, p. 524–526, 1987.

PERINI, R. F.; MA, L.; WALLACE, J. L. Mucosal Repair and COX-2 Inhibition. **Curr. Pharm. Design**, v. 9, p. 2207-2211, 2003.

PHILLIPSON, M.; ATUMA, C.; HENRIKSNA, S.J.; HOLM, L. The importance of mucus layers and bicarbonate transport in preservation of gastric juxtamucosal pH. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 282, p. G211–G219, 2002.

QUAYLE, J.M.; NELSON, M.T.; STANDEN, N.B. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. **Physiol. Ver.**, v. 77, p. 1165–1232, 1997.

QUINTANS-JÚNIOR, L.; DA ROCHA, R.F.; CAREGNATO, F.F.; MOREIRA, J.C.; DA SILVA, F.A.; ARAÚJO, A.A.; DOS SANTOS, J.P.; MELO, M.S.; DE SOUSA, D.P.; BONJARDIM, L.R.; GELAIN, D.P.J. Antinociceptive action and redox properties of citronellal, an essential oil present in lemongrass. **Med. Food**, v. 14, p. 630-9, 2011.

QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; ALMEIDA, J.R.G.S.; LIMA, J.T.; NUNES X.P.; SIQUEIRA, J.S.; OLIVEIRA, L.E.G.; ALMEIDA, R.N.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Plants with anticonvulsant properties: a review. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, p. 798-819, 2008.

QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; MELO, M.S.; DE SOUSA, D.P.; ARAÚJO, A.A.S.; ONOFRE, A.C.S.; GELAIN, D.P.; GONÇALVES, J.C.R.; ARAÚJO, D.A.M.; ALMEIDA, J.R.G.S.; BONJARDIM, L.R. Antinociceptive activity of citronellal in formalin-, capsaicin- and glutamate-induced orofacial pain in rodents and its action on nerve excitability. **J. Orofac. Pain**, v. 24, p. 305-312, 2010.

QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; ROCHA, R.F.; CAREGNATO, F.F.; MOREIRA, J.C.F.; SILVA, F.A.; ARAUJO, A.A.S.; SANTOS, J.P.A.; MELO, M.S.; DE SOUSA, D.P.; BONJARDIM, L.R.; GELAIN, D.P. Antinociceptive action and redox properties of citronellal, an essential oil present in lemon grass. **J. Med. Food**, v. 14, p. 630-639, 2011.

RAHA, S.; ROBINSON, B.H. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. **Trends Biochem. Sci.**, v. 25, p. 502 – 508, 2000.

RAO, Ch. V.; OJHA, S. K.; RADHAKRISHNAN, K.; GOVINDARAJAN, R.; RASTOGI, S.; MEHROTRA, S.; PUSHPANGADAN, P. Antiulcer activity of *Utreria salicifolia* rhizome extract. **J. Ethnopharmacol.**, v. 91, n. 2/3, p. 243-249, 2004.

RAO, V. S. N.; SANTOS, F. A.; SOBREIRA, T. T.; SOUZA, M. F.; MELO, C. L.; SILVEIRA, E. R. Investigations on the gastroprotective and antidiarrhoeal properties of ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa*. **Planta Med.**, v. 63, p. 146-149, 1997.

REPETTO, M. G.; LLESUY, S. L. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, n. 5, p.523-534, 2002.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J.; LANCSATER, C.; HANCHAR, J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterology**, v. 77, p. 433-443, 1979.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J.E.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A.J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterology**. v. 77, p. 433-440, 1979.

SAHNOUN, Z.; JAMOSSI, K.; ZEGHAL, K.M. Free radicals and antioxidants: human physiology, pathology and therapeutic aspects. **Therapie**, v. 52, p.251-270, 1997.

SANDVIK, A.K.; CUI, G.; BAKKE, I.; MUNKVOLD, B.; WALDUM, H.L. PACAP stimulates gastric acid secretion in the rat by inducing histamine release. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 281, p. G997-G1003, 2001.

SANTOS, C.L.; SOUZA, M.H.; GOMES, A.S.; LEMOS, H.P.; SANTOS, A.A.; CUNHA, F.Q.; WALLACE, J.L. Sildenafil prevents indomethacin-induced gastropathy in rats: role of leukocyte adherence and gastric blood flow. **Br. J. Pharmacol.**, v. 146, p. 481-486, 2005.

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

SAUL, C.; TEIXEIRA, C.R.; PEREIRA-LIMA, J.C.; TORRESINI, R.J.S. Prevalence reduction of duodenal ulcer: a Brazilian study. (Retrospective analysis in the last decade:1996-2005). **Arq Gastroenterol.**, v. 44, p. 320-324, 2007.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2001.

SCHOENFELD, P.; KIMMEY, M.B.; SCHEIMAN, J.; BJORKMAN, D.; LAINE L. Review article: nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated gastrointestinal complications-guidelines for prevention and treatment. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 13, p. 1273-1285, 1999.

SCHUBERT, M.L.; PEURA, D.A. Control of Gastric Acid Secretion in Health and Disease. **Gastroenterology**, v. 134, n. 07, p. 1842-1860, 2008.

SCHWARTZ, K. iiber penetrierende magen und jejuna geschwtire. **Beitr. Klin. Chir.**, v. 67, p. 96-128, 1910.

SENAY, E.C.; LEVINE, R.J. Synergism between cold and restraint for rapid production of stress ulcers in rats. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 124, p. 1221-1223, 1967.

SHANKLEY, N.P.; WELSH, N.J.; BLACK, J.W. Histamine Dependence of Pentagastrin-Stimulated Gastric Acid Secretion in Rats. **Yale J. Biol. Med.**, v. 65, p. 613-619, 1992.

SHAY, H.; KOMAROV, S. A.; FELS, S. E.; MERAZE, D.; GRUENTEIN, M.; SIPLET, H. A Simple Method for the Uniform Production of Gastric Ulceration in the rat. **Gastroenterology**, v. 5, n. 1, p. 43-61, 1945.

SILEN, W. Gastric mucosal defense and repair. In: JOHNSON, L.R. (Ed.). **Physiology of the Gastrointestinal Tract**. 2nd ed. New York: Raven Press, 1987. p. 1055–1069.

SONNENBERG, A.; EVERHART, J.E. The prevalence of self-reported peptic ulcer in the United States. **Am. J. Public Health**, v. 86, p. 200 – 205, 1996.

SOUZA, G.E.P.; FERREIRA, S.H. Blockade Antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflammed peritoneal cavity. **Agents Actions**, v. 17, p. 97-103, 1985.

SCHRAMMEL, A.; BEHREND, S.; SCHMIDT, K.; KOESLING, D.; MAYER, B. Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. **Mol. Pharmacol.**, v. 50, p. 1-5, 1996.

STANDEN, N.B.; QUAYLE, J.M. K⁺ channel modulation in arterial smooth muscle. **Acta Physiol. Scand.**, v.164, p. 549-557, 1998.

SULEYMAN, H.; CADIRCI, E.; ALBAYRAK, A.; POLAT, B.; HALICI, Z.; KOC, F.; HACIMUFTUOGLU, A.; BAYIR, Y. Comparative study on the gastroprotective potential of some antidepressants in indomethacin-induced ulcer in rats. **Chem. Biol. Interact.**, v. 180, p. 318-324, 2009.

SURPRENANT, A. Control of the gastrointestinal tract by enteric neurons. **Annu. Rev. Physiol.** v. 56, p. 117–140, 1994.

SZABO, S.; SZELENYI, I. ‘Cytoprotection’ in gastrointestinal pharmacology. **TIPS**, v. 8, p. 149-154, 1987.

SZABO, S.; TRIER, J.S.; BROWN, A.; SCHNOOR, J. Early vascular injury and increase vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in rat. **Gastroenterology**. v. 88, p. 228, 1985.

TAKAGI, K.; KASUYA, Y.; WATANABE, K. Studies on the drugs for peptic ulcer: a reliable method for producing stress ulcer in rats. **Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)**, v. 12, p. 465-472, 1964.

TAKAGI, K.; OKABE, S. The effects of drugs on the production and recovery processes of the stress ulcer. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 18, p. 9-18, 1968.

TAKEUCHI, K.; OHUCHI, T.; OKABE, S. Capsaicin-sensitive sensory neurons in healing gastric lesions induced by HCl in rats. **Dig. Dis. Sci.**, v. 39, p. 2543– 2546, 1994.

TAKEUCHI, K.; TANAKA, A.; KATO, S.; AIHARA, E.; AMAGASE, K.. Effect of (S)-4-(1-(5-chloro-2-(4-fluorophenoxy)benzamido)ethyl) benzoic acid (CJ-42794), a selective antagonist of prostaglandin E receptor subtype 4, on ulcerogenic and healing responses in rat gastrointestinal mucosa. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 322, p. 903–912, 2007.

TANAKA, A.; ARAKI, H.; KOMOIKE, Y.; HASE, S.; TAKEUCHI, K. Inhibition of both COX-1 and COX-2 is required for development of gastric damage in response to nonsteroidal antiinflammatory drugs. **J. Physiol.**, v. 95, p. 21-27, 2001.

TANAKA, A.; HASE, S.; MIYAZAWA, T.; OHNO, R.; TAKEUCHI, K. Role of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 inhibition in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced intestinal damage in rats: relation to various pathogenic events. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 303, p.1248-1254, 2002.

TEPPERMAN, B.L.; WHITTLE, B.J. Endogenous nitric oxide and sensory neuropeptides interact in the modulation of the rat gastric microcirculation. **Br. J. Pharmacol.**, v.105, p. 171-175, 1992.

TEYSSEN, T.; SINGER M. V. Alcohol-related diseases of the oesophagus and stomach, Alcohol-related Gastrointestinal Disease. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 17, n. 4, p. 557-573, 2003.

UEDA, S.; YOSHIKAWA, T.; TAKAHASHI, S.; ICHIKAWA, H.; YASUDA, M.; OYAMADA, H.; TANIGAWA, T.; SUGINO, S.; KONDO, M. Role of free radicals and lipid peroxidation in gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 162, p. 55-58, 1989.

UEMURA, N.; OKAMOTO, S.; YAMAMOTO, S.; MATSUMURA, N.; YAMAGUCHI, S.; YAMAKIDO, M., TANIYAMA, K.; SASAKI, N.; SCHLEMPER, R. J. Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 345, p. 784–789, 2001.

VIALA, J.; CHAPUT, C.; BONECA, I.G.; CARDONA, A.; GIRARDIN, S.E.; MORAN, A.P.; ATHMAN, R.; MÉMET, S.; HUERRE, M.R.; COYLE, A.J.; DISTEFANO, P.S.; SANSONETTI, P.J.; LABIGNE, A.; BERTIN, J.; PHILPOTT, D.J.; FERRERO, R.L. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island. **Nat. Immunol.**, v.5, p. 1166-1174, 2004.

VIANA, G.S.; VALE, T.G.; PINHO, R.S.; MATOS, F.J. Antinociceptive effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 70, p. 323–327, 2000.

WALDRON, G.J.; COLE, W.C. Activation of vascular smooth muscle K⁺ channels by endothelium-derived relaxing factors. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 26, p. 180-184, 1999.

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

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

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

WALLACE, J.L.; MCKNIGHT, W.; REUTER, B.K.; VERGNOLLE, N. NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. **Gastroenterology**, v. 119, p. 706-714, 2000.

WERTHEIM, W.A.; KUNKEL, S.L.; STANDIFORD, T.J.; BURDICK, M.D.; BECKER, F.S.; WILKE, C.A.; GILBERT, A.R.; STRIETER, R.M.. Regulation of neutrophil-derived IL-8: the role of prostaglandin E2, dexamethasone, and IL-4. **J. Immunol.**, v. 151, p. 2166-2175, 1993.

WHITTLE, B.J. Neuronal and endothelium-derived mediators in the modulation of the gastric microcirculation: integrity in the balance. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, p. 3-17 1993.

WHITTLE, B.J.; BOUGHTON-SMITH, N.K.; MONCADA, S. Biosynthesis and role of the endothelium-derived vasodilator, nitric oxide, in the gastric mucosa. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 664, p. 126-139, 1992.

YOSHIDA, N.; TAKEMURA, T.; GRANGER, D.N.; ANDERSON, D.C.; WOLF, R.E.; MCINTIRE, L.V.; KVIETYS, P.R.. Molecular determinants of aspirin-induced neutrophil adherence to endothelial cells. **Gastroenterology**, v. 105, p. 715-724, 1993.

ZANNER, R.; GRATZL, M.; PRINZ, C. Circle of life of secretory vesicles in gastric enterochromaffin-like cells. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 971, p. 389, 2002.

ZENG, N.; ATHMANN, C.; KANG, T.; LYU, R. M.; WALSH, J. H.; OHNING, G. V.; SACHS, G.; PISEGNA, J. R. PACAP type 1 receptor activation regulates ECL cells and gastric acid secretion. **J. Clin. Invest.**, v. 104, p. 1383-1391, 1999.