



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

**LARICE DE CARVALHO VALE**

**EFEITO GASTROPROTETOR DA RIPARINA III EM CAMUNDONGOS  
SUBMETIDOS AO MODELO AGUDO DE LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR  
ETANOL E POSSÍVEIS MECANISMOS ENVOLVIDOS**

**FORTALEZA**

**2020**

LARICE DE CARVALHO VALE

EFEITO GASTROPROTETOR DA RIPARINA III EM CAMUNDONGOS  
SUBMETIDOS AO MODELO AGUDO DE LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR  
ETANOL E POSSÍVEIS MECANISMOS ENVOLVIDOS

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais.

Orientadora: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa  
Coorientadora: Dra. Alyne Mara Rodrigues de Carvalho

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

V243e Vale, Larice de Carvalho.  
EFEITO GASTROPROTETOR DA RIPARINA III EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO  
MODELO AGUDO DE LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL E POSSÍVEIS  
MECANISMOS ENVOLVIDOS / Larice de Carvalho Vale. – 2020.  
83 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2020.

Orientação: Profa. Dra. Francisca Clea Florenço de Sousa.

Coorientação: Profa. Dra. Alyne Mara Rodrigues de Carvalho.

1. Úlcera gástrica. 2. Etanol. 3. Inflamação. 4. Riparina. I. Título.

CDD 611

---

LARICE DE CARVALHO VALE

EFEITO GASTROPROTETOR DA RIPARINA III EM CAMUNDONGOS  
SUBMETIDOS AO MODELO AGUDO DE LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR  
ETANOL E POSSÍVEIS MECANISMOS ENVOLVIDOS

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais.

APROVADA EM \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

BANCA EXAMINADORA:

---

Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Raquell de Castro Chaves  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Emiliano Ricardo Vasconcelos Rios  
Centro Universitário UNINASSAU

FORTALEZA

2020

A Deus.

À minha mãe e irmãos que, com muito apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa.

## AGRADECIMENTOS

Só tenho a agradecer a todos que passaram pelo meu caminho e que, com certeza, deixaram um pouco de si. Os momentos de alegria serviram para me permitir acreditar na beleza da vida, e os de sofrimento, serviram para um crescimento pessoal único. É muito difícil transformar sentimentos em palavras, mas serei eternamente grata a vocês, pessoas imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Primeiramente, agradeço ao meu Deus, Pai Celestial, pela dádiva da vida. Por me permitir compreender Teus planos para minha vida. Obrigada por Seu infinito amor, pela Sua voz que não me permitiu desistir e principalmente por ter me escutado quando eu clamava por Ti.

À minha mãe Ireny Gonçalves, meus irmãos Leonardo Carvalho e Leticia Carvalho, e meu cunhado Josiel Sousa, por acreditarem em mim e pelo amor, apoio incondicional, força, incentivo, generosidade e paciência para suportar os dias que passei distante de casa.

Ao meu companheiro Anderson Santos, pela força diária que me repassa e por toda paciência, me trazendo paz na correria do dia-a-dia.

À minha amiga e irmã de coração Joana Carvalho, que mesmo distante, sempre exerceu o papel de “minha melhor”, me transmitindo palavras de incentivo, e até me fazendo rir em dias difíceis. Não há palavras que descrevam imensa gratidão a ti. ‘Você é minha pessoa’.

À minha companheira de moradia e de vida, Lucianny, pela ajuda, incentivo, força e pela tamanha paciência com minhas crises existenciais. Também não posso deixar de mencionar minha nova companheira de ap, Danielly, que em tão pouco tempo, já me faz um bem enorme e compreende minhas loucuras. Obrigadas amigas do “ap 05”.

À minha querida orientadora, Profa. Dra Francisca Cléa, por acreditar e confiar na minha capacidade e pela orientação. Só tenho a agradecer aos seus ensinamentos, orientações, palavras de incentivo, risadas, paciência e dedicação. E sem esquecer, por ter me tornado mais forte e dedicada em nossos primeiros contatos. Você é uma pessoa ímpar e tenho orgulho de dizer que sou sua orientanda.

Às duas pós-docs maravilhosas, Alyne (a qual não poderia existir coorientadora melhor) e Raquell, que estiveram comigo desde o começo, me

incentivando, me dando força, me auxiliando com meu trabalho, nas correções, nos experimentos, e nos desabafos diários. Acreditem, sem vocês teria sido muito mais difícil. Também não posso deixar de mencionar minha querida amiga e pós-doc do Departamento de Morfologia, Josy, por toda ajuda na realização do meu trabalho, pelas conversas, os cafés da tarde, os risos e as histórias. Vocês são muito especiais.

Ao Emiliano Rios que aceitou de prontidão fazer parte de minha banca. Seu conhecimento e sugestões irão, certamente, aprimorar meu trabalho.

À minha amiga Manoela Rebouças, a qual tive meu primeiro contato dentre os colegas do grupo de pesquisa, e me acolheu de uma forma admirável. Você esteve ao meu lado durante esses dois anos (incluindo finais de semana), e não mediu esforços para me ajudar, sempre com soluções para os meus problemas que pareciam ser gigantes, e puxões de orelha que me faziam acordar para a realidade. Agradeço também a minha amiga Evelline, que com sua sinceridade e companheirismo, se tornou muito importante para mim. Nossos momentos de distração me ajudaram muito a superar as dificuldades da vida de mestranda. Agradeço a Deus pela amizade de vocês.

Ao Delon, por ter me acolhido em sua humilde residência no momento que eu estava mais precisando de ajuda, mesmo sem me conhecer. Você, certamente, fez uma diferença enorme nesta trajetória que percorro.

À todos os professores da Universidade Federal do Ceará que, sem dúvida alguma, ajudaram constantemente na minha formação. Aos professores doutores que participaram da banca, aos quais tenho profunda admiração científica, por estarem à disposição para participar desse dia especial.

Ao Laboratório de Neurofarmacologia (LNF) e ao Núcleo de Estudos de Microscopia e Processamento de Imagens (NEMPI) por permitir a realização de meus experimentos com êxito.

Aos técnicos do NEMPI, Flávia e Junior, por terem me ajudado com o processamento das minhas lâminas para as análises histológicas.

À técnica do LNF, Mary, por estar de prontidão auxiliando em meus experimentos.

Agradeço aos amigos que fiz durante a pós-graduação, desde os que conheci no Departamento de morfologia, a citar Helder Bindá, Luciana, Danielle e Letícia, até os do meu grupo de pesquisa, especialmente Daniel, Tiago, Natália, Dulce e Andressa. Sempre lembrarei com muito carinho das palavras de incentivo, dos

momentos de troca de ideias e do enorme apoio em vários experimentos. Cada um que tive contato, certamente, me ajudou de alguma forma.

Aos estudantes de iniciação científica, de forma especial à Layla, Dila, Isabelle e Bárbara, pela disponibilidade, dedicação e seriedade na execução dos experimentos.

Aos colegas da turma de mestrado, pelas reflexões recebidas e sugestões compartilhadas.

Ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Paraíba, representado pelo professor e doutor José Maria Barbosa Filho e pelo doutor Stanley Juan Chavez Gutierrez, que nos cederam gentilmente a substância de objeto deste estudo e todas as informações que foram necessárias para sua concretização.

À Gabriele, Augusto, Wesley e Maurício do biotério, pela colaboração e disponibilidade. A ajuda de vocês foi imprescindível para meu trabalho.

Aos funcionários do biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Naiara, Alana, Seu Adalto, Seu Moreira e Haroldo por sempre estarem de prontidão quando eu precisei e, por sempre me acolherem com palavras de motivação.

Aos meus lindos e amados camundongos Swiss que, embora pareça estranho dizer, diminuíam meu estresse diário e me faziam bem. Graças a eles, consegui desenvolver meu trabalho.

À CAPES e ao CNPq, pelo suporte financeiro que foi de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho, minha eterna gratidão.

“Quando a vida bater forte e a sua alma sangrar. Quando esse mundo pesado lhe ferir, lhe esmagar. É hora do recomeço. RECOMECE A LUTAR.  
Quando tudo for escuro e nada iluminar. Quando tudo for incerto e você só duvidar. É hora do recomeço. RECOMECE A CAMINHAR.  
Quando o mal for evidente e o amor se ocultar. Quando o peito for vazio e o abraço faltar. É hora do recomeço. RECOMECE A AMAR.  
Quando você cair e ninguém lhe amparar. Quando a força do que é ruim conseguir lhe derrubar. É hora do recomeço. RECOMECE A LEVANTAR”.

(BRÁULIO BESSA)

## RESUMO

A úlcera gástrica ou úlcera péptica é uma doença inflamatória crônica do estômago e duodeno, que apresenta lesões na parte revestida do estômago, com características de inflamação, irritação e perda celular, podendo avançar para um câncer gástrico. Para o tratamento desta doença, existem alguns medicamentos, que embora apresentem bons resultados, causam alguns efeitos adversos, como cefaleia, tontura e distúrbios gastrointestinais. Nesse contexto, a busca por novas alternativas terapêuticas é de suma importância e tem havido grande interesse na pesquisa por produtos naturais. Diante disso, o foco do trabalho é o estudo da Riparina III (Rip III), substância inicialmente isolada do fruto verde de *Aniba riparia*, com potencial promissor, uma vez que já tem sido relatado propriedades importantes, como anti-inflamatória e antinociceptiva. Com base nessas considerações, objetivou-se avaliar o efeito da Rip III no modelo agudo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos e possíveis mecanismos envolvidos. Para isso, camundongos *swiss*, machos, pesando entre 25-30g, foram divididos em diferentes grupos com 6 animais cada. Para avaliação da indução da úlcera por etanol e o potencial efeito gastroprotetor da Rip III (50mg/kg), foi utilizado a dose de 0,2 mL/animal do etanol administrado via oral por gavagem após pré-tratamento com as drogas. Posteriormente, foram realizadas avaliações tanto macroscópicas (porcentagem de área ulcerada), como microscópicas através de parâmetros histopatológicos (perda de células epiteliais, edema, hemorragia, infiltrado inflamatório, e número de mastócitos). Para investigação dos mecanismos envolvidos, foram feitas as avaliações sobre a participação de Canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K^+_{ATP}$ ), Prostaglandinas (PGs), receptores vaniloides (TRPV-1) e Óxido nítrico (NO). Adicionalmente, os níveis de nitrito também foram mensurados para confirmar a participação do NO, além da expressão da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) através da técnica de imunohistoquímica. O envolvimento do estresse oxidativo, como glutathiona reduzida (GSH) e malondialdeído (MDA) também foram avaliados. Os resultados mostraram que a Rip III administrada previamente ao etanol exibiu um potente efeito gastroprotetor, demonstrado por meio de análise microscópica através da redução de perda de células epiteliais, edema, infiltrado inflamatório e número de mastócitos. Observou-se que os pré-tratamentos com L-NAME (inibidor de iNOS), e glibenclamida (bloqueador dos canais de potássio) reverteram o efeito gastroprotetor da Riparina III, indicando que esta substância atua, possivelmente, em tais vias. A Rip III restabeleceu os níveis de nitrito e seu efeito gastroprotetor não demonstra ter envolvimento das prostaglandinas nem dos receptores TRPV-1. Constatou-se também que a Rip III aumentou significativamente os níveis de GSH e reduziu a peroxidação lipídica neste modelo. Em conclusão, os resultados obtidos indicam que a Riparina III possui atividade gastroprotetora contra as lesões gástricas induzidas por etanol, e esta ação parece envolver a participação do óxido nítrico, de canais de potássio sensíveis ao ATP, além de seu potencial efeito de antioxidante.

**Palavras-chave:** Úlcera gástrica. Etanol. Inflamação. Riparina.

## ABSTRACT

Gastric ulcer or peptic ulcer is a chronic inflammatory disease of the stomach and duodenum, which presents lesions in the lined part of the stomach, with characteristics of inflammation, irritation and cell loss, which can progress to gastric cancer. For the treatment of this disease, there are some medications, which, although showing good results, cause some adverse effects, such as headache, dizziness and gastrointestinal disorders. In this context, the search for new therapeutic alternatives is of paramount importance and there has been great interest in the search for natural products. Therefore, the focus of the work is the study of Riparina III (Rip III), a substance initially isolated from the green fruit of *Aniba riparia*, with promising potential, since important properties such as anti-inflammatory and antinociceptive have already been reported. Based on these considerations, the objective was to evaluate the effect of Rip III in the acute model of gastric lesion induced by ethanol in mice and possible mechanisms involved. For that, male Swiss mice, weighing between 25-30g, were divided into different groups with 6 animals each. To assess ulcer induction by ethanol and the potential gastroprotective effect of Rip III (50mg / kg), a dose of 0.2 mL / animal of ethanol administered orally by gavage after pretreatment with the drugs was used. Subsequently, both macroscopic (percentage of ulcerated area) and microscopic evaluations were performed using histopathological parameters (loss of epithelial cells, edema, hemorrhage, inflammatory infiltrate, and number of mast cells). To investigate the mechanisms involved, evaluations were made on the participation of potassium channels sensitive to ATP (K<sup>+</sup> ATP), prostaglandins (PGs), vanilloid receptors (TRPV-1) and nitric oxide (NO). Additionally, nitrite levels were also measured to confirm the participation of NO, in addition to the expression of induced nitric oxide synthase (iNOS) through the immunohistochemistry technique. The involvement of oxidative stress, such as reduced glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) were also evaluated. The results showed that Rip III previously administered to ethanol exhibited a potent gastroprotective effect, demonstrated by microscopic analysis by reducing the loss of epithelial cells, edema, inflammatory infiltrate and number of mast cells. It was observed that pretreatments with L-NAME (iNOS inhibitor) and glibenclamide (potassium channel blocker) reversed the gastroprotective effect of Riparina III, indicating that this substance possibly acts in such pathways. Rip III restored nitrite levels and its gastroprotective effect does not show involvement of prostaglandins or TRPV-1 receptors. It was also found that Rip III significantly increased GSH levels and reduced lipid peroxidation in this model. In conclusion, the results obtained indicate that Riparina III has gastroprotective activity against gastric lesions induced by ethanol, and this action seems to involve the participation of nitric oxide, potassium channels sensitive to ATP, in addition to its potential antioxidant effect.

**Keywords:** Gastric ulcer. Ethanol. Inflammation. Riparina

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação anatômica e histológica do estômago. ....	18
Figura 2 – Modelo esquemático da regulação da secreção ácida pelas células parietais das glândulas do fundo gástrico.....	19
Figura 3 – Representação dos fatores protetores da mucosa gástrica .....	21
Figura 4 – Mecanismos de proteção e progressão da injúria gástrica.....	25
Figura 5 – Folha de <i>Aniba Riparia (Nees) Mez.</i> ....	30
Figura 6 – Estrutura Química da Riparina III. ....	33
Figura 7 – Esquema de indução e tratamento das lesões gástricas .....	40
Figura 8 – Efeito do tratamento com Riparina III em camundongos submetidos à lesão gástrica induzida por etanol.....	47
Figura 9 – Efeitos Macroscópicos e microscópicos da mucosa gástrica de camundongos submetidos à lesões gástricas induzidas por etanol e pré-tratados ou não com Riparina III. ....	49
Figura 10 – Efeito da Riparina III sobre o número de mastócitos na mucosa gástrica de camundongos submetidos às lesões gástricas induzidas por etanol .....	51
Figura 11 – Fotomicrografias da análise de mastócitos na mucosa gástrica de camundongos submetidos às lesões gástricas induzidas por etanol .....	52
Figura 12 – Participação dos canais de potássio ATP-dependentes (K+ATP) na gastroproteção da Riparina III no modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto em camundongos. ....	53
Figura 13 – Envolvimento da síntese de prostaglandinas no efeito gastroprotetor da Riparina III no modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto em camundongos.....	54
Figura 14 – Envolvimento do receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1 (TRPV 1) no efeito gastroprotetor da Riparina III no modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto em camundongos.....	55
Figura 15 – Envolvimento do óxido nítrico na gastroproteção da Riparina III em camundongos submetidos à lesão gástrica induzida pelo etanol.....	56
Figura 16 – Avaliação da concentração de nitrito/nitrato na mucosa gástrica de animais com lesão gástrica induzida por etanol .....	57

Figura 17 – Fotomicrografias de imunohistoquímica para iNOS de estômagos de camundongos.....	59
Figura 18 – Avaliação do envolvimento da glutathiona reduzida (GSH) no efeito gastroprotetor da Riparina III no modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto.....	60
Figura 19 – Avaliação dos níveis de MDA no efeito gastroprotetor da Riparina III no modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto.....	61
Figura 20 – Modelo hipotético da ação farmacológica da Riparina III na lesão gástrica induzida por etanol.....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AINES	Anti-inflamatórias não esteroides
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
CCK-2	Colecistocinina-2
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX	Ciclooxigenase
DFF	Departamento de Fisiologia e Farmacologia
DTNB	Ácido ditio bis-2-nitrobenzóico
DUP	Doença da úlcera péptica
ECL	Enterocromafins
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
E.P.M	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
GPX	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
HCl	Ácido clorídrico
H&E	Hematoxilina e eosina
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
i.p	Intraperitoneal
IGF-I	Fator de crescimento semelhante a insulina 1
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
K+ATP	Canais de potássio sensíveis ao ATP
KCl	Cloreto de potássio
L-NAME	N <sup><math>\omega</math></sup> -Nitro-L-arginina-metiléster
LNF	Laboratório de Neurofarmacologia

MDA	Malondialdeído
MPO	Mieloperoxidase
NAC	N-acetilcisteína
NaCl	Cloreto de sódio
NEED	N-1-naftilenodiamina
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa-B
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGEs	Prostaglandina E sintase
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
PGs	Prostaglandinas
Rip III	Riparina III
ROOH	Hidroperóxidos de lipídeos
s.c	Subcutânea
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TFFs	Peptídeos da Família do Fator Trifólio
TGF- $\alpha$	Fator de crescimento transformador alfa
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
TRH	Hormônio liberador de tireotrofina
TRPV-1	Transient Receptor Potential Vanilloid 1
UFC	Universidade Federal do Ceará
v.o	Via oral

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Aspectos anatômicos do estômago e fisiologia da secreção ácida .....	17
1.2	Mecanismos de defesa da mucosa gástrica.....	20
1.3	Úlcera gástrica .....	24
1.3.1	<i>Úlcera gástrica induzida por etanol</i> .....	26
1.4	Produtos de origens naturais na proteção gástrica .....	28
1.4.1	<i>Família Lauraceae</i> .....	29
1.4.1.1	<i>Aniba riparia (Nees) Mez e suas propriedades</i> .....	30
1.4.1.2	<i>N- (2,6 -di-hidroxibenzoil) tiramina (Riparina III)</i> .....	32
2	JUSTIFICATIVA .....	34
3	OBJETIVOS .....	36
3.1	Geral.....	36
3.2	Específicos.....	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1	Substâncias e reagentes .....	37
4.2	Obtenção da Riparina III .....	38
4.3	Animais.....	38
4.4	Aspectos éticos observados para a realização dos procedimentos experimentais em animais.....	38
4.5	Grupos experimentais .....	39
4.6	Avaliação da atividade gastroprotetora da Riparina III.....	39
4.6.1	<i>Lesões gástricas induzidas por etanol</i> .....	39
4.6.2	<i>Avaliação histopatológica da mucosa gástrica de camundongos</i> .....	40
4.6.3	<i>Contagem de mastócitos na mucosa gástrica</i> .....	41
4.7	Avaliação do mecanismo de ação gastroprotetor da Riparina III .....	41
4.7.1	<i>Determinação do efeito dos canais de potássio ATP-dependentes (<math>K_{ATP}</math>), no efeito gastroprotetor da Riparina III em modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.</i> .....	41
4.7.2	<i>Estudo do efeito das prostaglandinas (PGs) no efeito gastroprotetor da Riparina III em modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos</i> .....	42

<b>4.7.3</b>	<b><i>Papel do receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1 (TRPV-1) no efeito gastroprotetor da Riparina III em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos</i></b>	<b>42</b>
<b>4.7.4</b>	<b><i>Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor da Riparina III em modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.</i></b>	<b>43</b>
<b>4.8</b>	<b>Dosagem de nitrito/nitrato para confirmar o envolvimento do óxido nítrico na mucosa gástrica de animais com lesão gástrica induzida por etanol</b>	<b>43</b>
<b>4.9</b>	<b>Imunohistoquímica para iNOS</b>	<b>43</b>
<b>4.10</b>	<b>Avaliação da atividade antioxidante da Riparina III frente às lesões gástricas induzidas por etanol</b>	<b>44</b>
<b>4.10.1</b>	<b><i>Papel dos grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH) no efeito antioxidante e gastroprotetor da Riparina III em modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.</i></b>	<b>44</b>
<b>4.10.2</b>	<b><i>Papel da lipoperoxidação no efeito antioxidante e gastroprotetor da Riparina III em modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.</i></b>	<b>45</b>
<b>4.11</b>	<b>Análise estatística</b>	<b>45</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>47</b>
<b>5.1</b>	<b>Avaliação da atividade gastroprotetora da Riparina III</b>	<b>47</b>
<b>5.1.1</b>	<b><i>Efeito da Riparina III na lesão gástrica induzida por etanol</i></b>	<b>47</b>
<b>5.1.2</b>	<b><i>Efeito da Riparina III sobre as alterações histopatológicas em camundongos com lesão gástrica induzida por etanol</i></b>	<b>48</b>
<b>5.1.3</b>	<b><i>Efeito da Riparina III sobre o número de mastócitos na mucosa gástrica de camundongos submetidos às lesões gástricas induzida por etanol</i></b>	<b>51</b>
<b>5.2</b>	<b>Avaliação do mecanismo de ação gastroprotetor da Riparina III</b>	<b>53</b>
<b>5.2.1</b>	<b><i>Participação dos canais de K-ATP-dependentes (K<sub>ATP</sub>) no efeito gastroprotetor da Riparina III no modelo de lesão gástrica induzida por etanol</i></b>	<b>53</b>
<b>5.2.2</b>	<b><i>Envolvimento da síntese de prostaglandinas no efeito gastroprotetor da Riparina III no modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto</i></b>	<b>54</b>
<b>5.2.3</b>	<b><i>Envolvimento do receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1 (TRPV-1) no efeito gastroprotetor da Riparina III no modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto</i></b>	<b>55</b>

<b>5.2.4</b>	<b><i>Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor da Riparina III em modelo de lesão gástrica induzida por etanol</i></b> .....	<b>56</b>
<b>5.3</b>	<b>Dosagem de nitrito/nitrato para confirmar o envolvimento do óxido nítrico na mucosa gástrica de animais com lesão gástrica induzida por etanol</b> .....	<b>57</b>
<b>5.4</b>	<b>Avaliação da Imunomarcção para iNOS</b> .....	<b>58</b>
<b>5.5</b>	<b>Avaliação da atividade antioxidante da Riparina III frente às lesões gástricas induzidas por etanol</b> .....	<b>60</b>
<b>5.5.1</b>	<b><i>Envolvimento da glutathiona reduzida (GSH) no efeito gastroprotetor da Riparina III no modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto</i></b> .....	<b>60</b>
<b>5.5.2</b>	<b><i>Determinação dos níveis de malondialdeído no efeito gastroprotetor da Riparina III no modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto</i></b> .....	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>72</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>74</b>

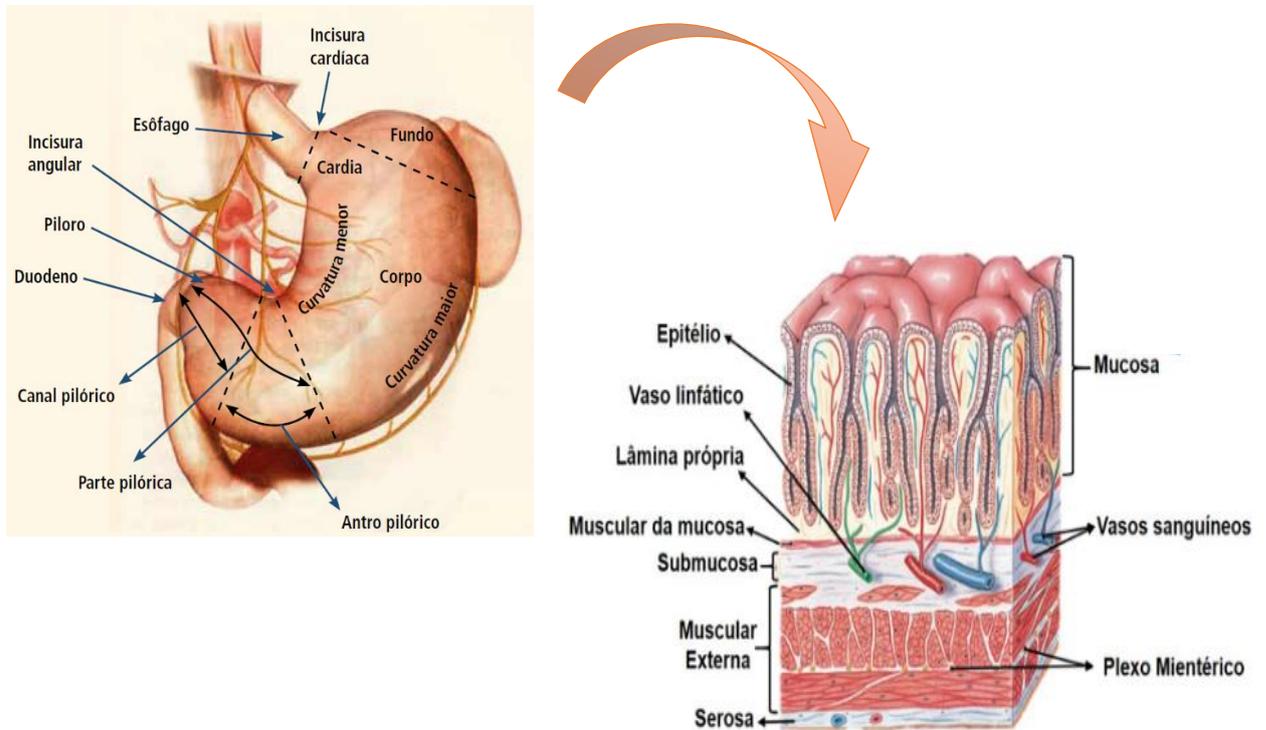
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos anatômicos do estômago e fisiologia da secreção ácida

O estômago é uma porção muscular caracterizado como um canal alimentar curval presente em todos os vertebrados que demandam armazenamento de alimentos ou digestão prévia em um ambiente ácido. O epitélio desse órgão origina-se do endoderma, tornando-se regionalizado ao longo do eixo proximal-distal durante o desenvolvimento, dando origem a regiões funcionais distintas (KIM; SHIVDASANI, 2016).

Anatomicamente, o estômago está localizado em grande parte na região hipocondríaca esquerda, sob a parte inferior da caixa torácica. As partes inferior e distal do estômago, no entanto, situam-se nas regiões epigástrica e umbilical superior do abdômen. Apresenta superfícies anterior e posterior, que são demarcadas umas das outras pelas curvaturas maiores e menores. A curvatura menor forma a borda superior direita do estômago, enquanto a curvatura maior forma a borda inferior esquerda. Possui duas incisuras ou orifícios. O proximal é denominado orifício cárdico através do qual o estômago se comunica com o esôfago. O orifício distal é o orifício pilórico através do qual o estômago se comunica com o duodeno (MAHADEVAN, 2017). O estômago humano é dividido em quatro partes: cárdia, fundo (parte superior), corpo (parte central), e antro (parte inferior), sendo limitado pelo esfíncter esofágiano (parte superior) e pelo esfíncter pilórico (parte inferior) que exercem as funções no corpo de forma delicada e precisa. Além disso, há a divisão do tecido estomacal em quatro camadas: mucosa, responsável pelo revestimento interno; submucosa; muscular externa e serosa (Figura 1). Nas regiões do corpo e do fundo gástrico, se localiza a mucosa gástrica secretora de ácido clorídrico, que realiza a secreção do suco gástrico, a formação das membranas mucosas, a contração do estômago e a absorção de nutrientes de forma ordenada (NI et al., 2019; SILVERTHORN, 2010).

**Figura 1** – Representação anatômica e histológica do estômago.



Fonte: SILVERTHORN, 2010, adaptado

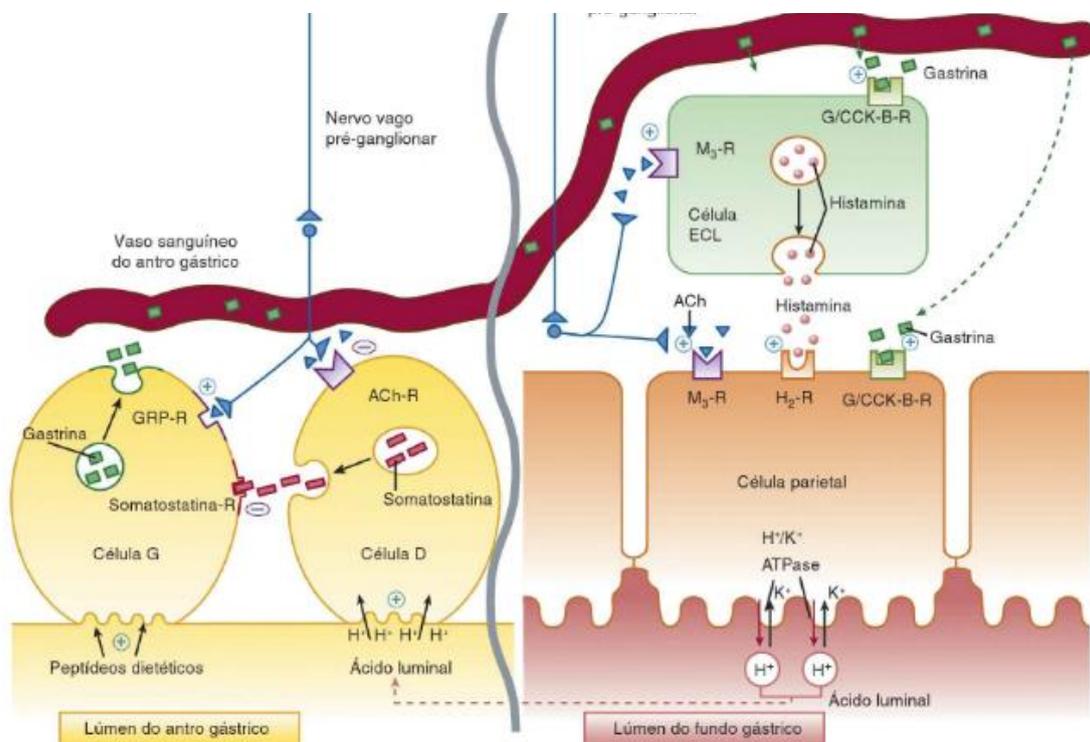
Durante a digestão, ocorre o estímulo de células parietais, especializadas para produzir e secretar grandes quantidades de ácido clorídrico, necessário para realizar a digestão mecânica e química dos alimentos. Nesse momento, os valores do pH do lúmen gástrico atingem de 1-2. Em contrapartida, o estômago é dotado de medidas de proteção que garantem que a mucosa não seja destruída pelo ácido. As células secretoras de gastrina (G), células do tipo enterocromafins (ECL) e as produtoras de somatostatina (D), por exemplo, atuam como uma rede reguladora controlando a secreção ácida por células parietais. Estas últimas inibem a secreção ácida por via endócrina, quando secretadas pelas células D do antro e por via parácrina quando secretadas por células D do corpo do estômago (ARIN et al., 2017).

O ácido gástrico é estimulado pelos componentes histamina, gastrina e a acetilcolina (ACh) ao nível da célula parietal, com algumas funcionalidades, dentre elas a de facilitar a digestão da proteína, a absorção de ferro, cálcio e vitamina B<sub>12</sub>. A histamina liberada pelas células ECL estimula a célula parietal diretamente através da ligação aos receptores H<sub>2</sub> presentes na membrana basolateral destas células (via

parácrina). Estes receptores são acoplados a proteína Gs, ativando a conversão do trifosfato de adenosina intracelular em adenosina monofosfato cíclico (AMPc), e consequentemente, fosforila proteínas envolvidas na ativação da bomba de prótons (DINIZ, 2016; RIBEIRO, 2017) (Figura 2).

Na região antral do estômago, estão localizadas as células G responsáveis pela secreção da gastrina, a qual estimula as células parietais a secretar ácido gástrico via receptor de colecistocinina-2 (CCK-2) encontrado nas células ECL. A acetilcolina liberada dos neurônios parassimpáticos pós-ganglionares estimula a secreção gástrica diretamente via receptores muscarínicos M3 na célula parietal e indiretamente via receptor M1 nas células ECL estimulando a secreção de histamina (via neuronal). Os receptores M2 e M4 também estimulam a secreção gástrica através da inibição da secreção de somatostatina (hormônio inibidor da secreção gástrica) (via neuronal) (RIBEIRO, 2017).

**Figura 2** – Modelo esquemático da regulação da secreção ácida pelas células parietais das glândulas do fundo gástrico



Fonte: Katzung, 2014.  $H^+$  : ácido; CCK-B: receptor de colecistocinina B; ACh: acetilcolina; Célula ECL: células do tipo enterocromafins; ATPase: bomba de prótons  $H^+/K^+$ -ATPase;  $M_3$ -R: receptor muscarínico; GRP-R: Receptor do peptídeo de liberação de gastrina.

Dessa forma, destaca-se que umas das funcionalidades importantes do estômago é fornecer um meio ácido, importante na destruição de microrganismos ingeridos, incluindo bactérias e vírus, evitando assim, o crescimento bacteriano excessivo, infecção entérica e peritonite bacteriana. Outras funções incluem a secreção de mucinas, hormônios e pró-peptidases ativadas por ácido (pepsinogênios) (SCHUBERT, 2014).

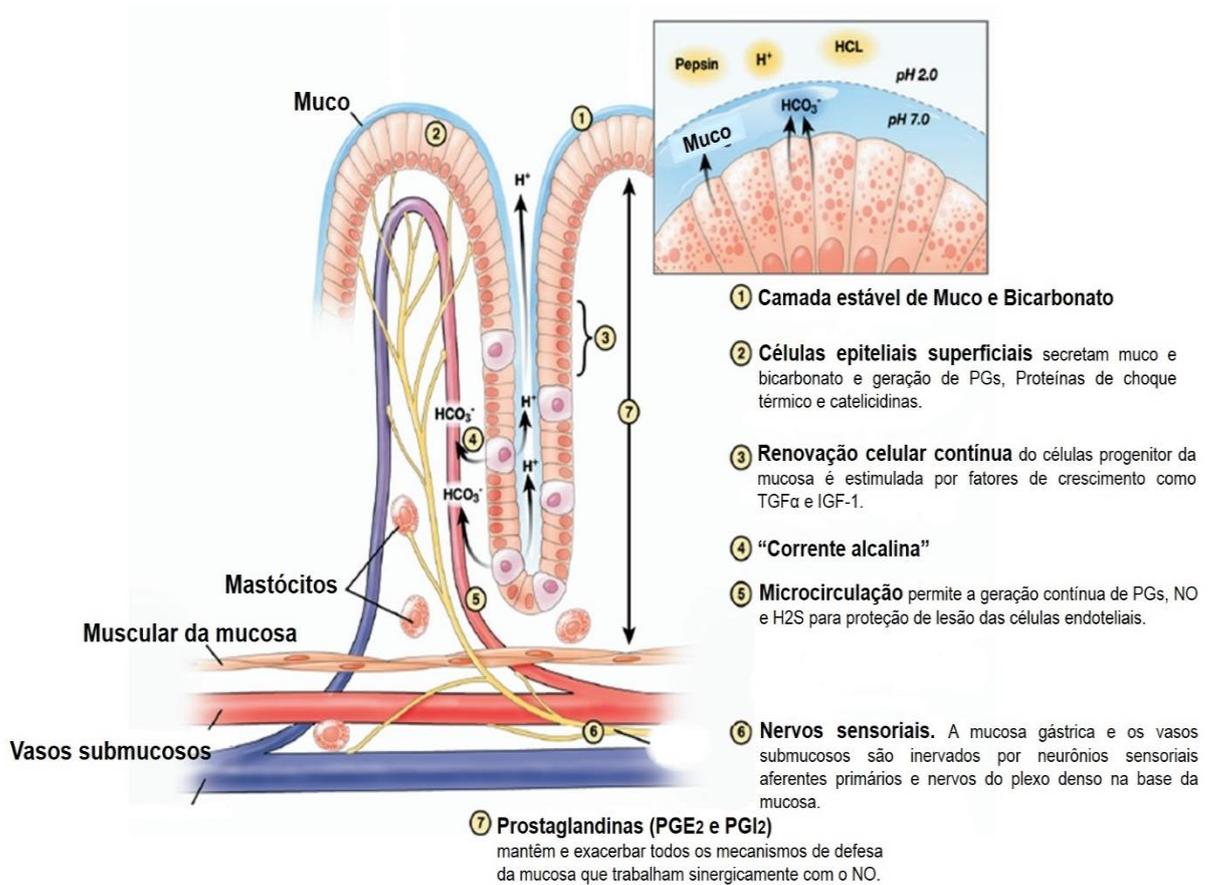
Em divergência a estas funções fisiológicas, a acidez do estômago pode contribuir para a morbidade humana em condições de desregulação das vias de sinalização que controlam o desenvolvimento do estômago. Além disso, associado com fatores ambientais, como o *Helicobacter pylori*, pode promover úlceras pépticas, refluxo esofágico e câncer gástrico (CASTRO et al., 2013; KIM; SHIVDASANI, 2016).

Nesse contexto, é fundamental manter a regulação fisiológica da secreção ácida, a fim de evitar possíveis problemas gástricos. Para isso, o organismo possui mecanismos que estimulam a proteção e preservam a integridade da mucosa gástrica.

## **1.2 Mecanismos de defesa da mucosa gástrica**

Apesar da exposição da mucosa gástrica a agentes nocivos, em condições normais, a mucosa utiliza mecanismos compensatórios, responsáveis pela integridade da mucosa gástrica. Estes são caracterizados como níveis de defesa e fatores defensivos, divididos em três fases: pré-epitelial, epitelial e sub-epitelial. A primeira é representada pela barreira muco-bicarbonato-fosfolípido, sendo a primeira linha de defesa; a segunda envolve a renovação das células progenitoras e produção de prostaglandinas. A última, fase sub-epitelial está relacionada ao contínuo fluxo sanguíneo através da vasculatura da mucosa, fornecendo assim, maior resistência da mucosa gástrica à exposição frequente de fatores, como oxigênio e nutrientes (DINIZ, 2016) (Figura 3). Esses mecanismos de defesa permitem uma ampla faixa de pH, osmolaridade e temperatura, por exemplo.

**Figura 3** – Representação dos fatores protetores da mucosa gástrica



Fonte: TARNAWSKI; AHLUWALIA; K. JONES, 2012, adaptado

A barreira muco-bicarbonato-fosfolípídeo é constituída por componentes protetores representadas pelo muco em forma de gel, bicarbonato e fosfolípídios surfactantes que se aderem firmemente às superfícies epiteliais, formando uma barreira na mucosa. A sua eficiência depende da estrutura do gel do muco, a qual proporciona proteção estrutural por meio de uma camada estável com tampões embutidos para suportar a neutralização da superfície do ácido. Além disso, também impede a difusão de moléculas de pepsina que atingem o epitélio subjacente (YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

O muco é composto por 95% de água e 5% de glicoproteína mucina e produtos dos genes da mucina (MUC). Essa rígida e estável camada retém o bicarbonato secretado pelas células epiteliais de superfície para manter um microambiente neutro (pH 7,0), impedindo assim, a penetração da pepsina e, assim, a digestão proteolítica do epitélio de superfície. Com isso, o papel dessa espessa

camada de gel mucoso é manter a neutralização da superfície ácida, além de atuar como uma barreira física protetora contra a pepsina luminal do epitélio subjacente, sendo regulada por diferentes mecanismos (ALLEN; FLEMSTRÖM, 2005).

Ordenadamente, a camada contínua de células epiteliais superficiais constitui outra importante linha de defesa da mucosa que se deve à secreção de muco e bicarbonato e, geração de Prostaglandinas (PGs), Proteínas de choque térmico, Peptídeos da Família do Fator Trifólio (TFFs) e Catelicidinas (TARNAWSKI; AHLUWALIA; K. JONES, 2012). Devido à presença de fosfolípidios em sua superfície, e por serem hidrofóbicas, estas células repelem agentes nocivos ácidos e solúveis em água (FORNAI et al., 2012). As proteínas de choque térmico (geradas em resposta ao estresse), as catelicidinas e as TFFs promovem, respectivamente, a proteção da mucosa através da prevenção da desnaturação proteica, atuação no sistema imune defensivo e aceleração da cicatrização de úlceras (YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

Outro mecanismo de defesa da mucosa gástrica inclui a renovação celular de células progenitoras da mucosa, que ocorrem por meio de fatores de crescimento – Fator de crescimento transformador alfa (TGF- $\alpha$ ) e Fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-I), os quais promovem a manutenção da integridade estrutural da mucosa. Dessa forma, o epitélio é continuamente renovado por um sistema bem coordenado e proliferação controlada de células progenitoras que permite a substituição da superfície epitelial danificada (TULASSAY; HERSZÉNYI, 2010).

Uma reação importante que ocorre no estômago é o processo de aumento do cálcio intracelular e do monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), aumentando assim, a secreção de bicarbonato. Essa reação inicial é realizada pela prostaglandina  $E_2$  (PGE $_2$ ) a partir da prostaglandina E sintase (PGEs). O bicarbonato é secretado de maneira simultânea ao ácido clorídrico no interstício da mucosa, formando a corrente alcalina (TARNAWSKI; AHLUWALIA; K. JONES, 2012). Além disso, a microcirculação também desempenha papel fundamental na defesa da mucosa.

A microcirculação da mucosa permite o fornecimento de oxigênio, nutrientes e agentes protetores como o óxido nítrico (NO) e a prostaciclina (PGI $_2$ ), que protegem a mucosa gástrica contra lesões e removem metabólitos tóxicos e lesivos da mucosa. Dessa forma, ela atua também na produção e secreção de muco e bicarbonato, auxiliando na manutenção da barreira mucosa, e dissipa e elimina íons de hidrogênio da mucosa por retrodifusão (YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

A Figura demonstra também, que os vasos sanguíneos da mucosa e submucosa são inervados por neurônios sensoriais aferentes e nervos, formando um plexo denso na base da mucosa. Quando ativados, estes neurônios exercem uma função protetora local na mucosa, de modo que eles sinalizam reações vasculares, secretoras e motoras visando a manutenção da integridade, motilidade, homeostase e reparo da mucosa gástrica. Esta função ocorre por meio da liberação de transmissores de neuropeptídeos, como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e as taquiquininas (substância P, neuroquinina A) que, após estimulação nociva dos neurônios sensoriais, é liberada de suas terminações periféricas no tecido por meio da vasodilatação mediada pelo NO. Por meio desse processo, a estimulação de terminações nervosas sensoriais aumenta o fluxo sanguíneo e a permeabilidade vascular. Esse processo é chamado de inflamação neurogênica, e acredita-se na sua capacidade de reparar o tecido lesado (HOLZER, 2015).

A definição de inflamação neurogênica conduziu à novos estudos que buscassem a possibilidade de mecanismos protetores semelhantes. Dessa forma, foi testada a capsaicina, uma substância ativa que excita agudamente os neurônios aferentes nociceptivos, atuando especificamente no canal de potencial cátion do receptor transiente do tipo 1 vaniloide (TRPV-1). Todavia, em doses crônicas provoca uma ablação funcional desses neurônios, prejudicando a resposta hiperêmica e, assim, torna a mucosa gástrica altamente vulnerável à lesão (HOLZER, 2015).

A manutenção da integridade da mucosa gástrica é decorrente também do papel importante das PGs, principalmente quando os mecanismos de defesa neuronal estão comprometidos. As PGs são biossintetizadas a partir do ácido araquidônico pelas duas isoformas da ciclooxigenase (COX), e estão presentes em todo o trato gastrointestinal. Dentre suas funções essencial na mucosa gástrica, incluem o controle da secreção ácida, secreção de bicarbonato, produção de muco, aumento do fluxo sanguíneo e cicatrização da mucosa; além da inibição da ativação de mastócitos e leucócitos. Estas funções são exercidas pelas PGE2 e PGI2, em conjunto com os quatro subtipos específicos de receptores acoplados à proteína G, EP1 a EP4 (TAKEUCHI; AMAGASE, 2018).

A liberação de PGs, juntamente com a ativação de nervos sensoriais são responsáveis pela ação protetora de vários neuropeptídeos e hormônios, como gastrina, hormônio liberador de tireotrofina (TRH), colecistocinina, leptina e grelina

contra danos induzidos por substâncias corrosivas, promovendo assim, a reparação da mucosa e cicatrização da úlcera (SILVA; SOUSA, 2012).

Assim, percebe-se que a relação entre os mecanismos de defesa da mucosa são fatores que merecem ser elucidados e compreendidos a fim de identificar possíveis alvos terapêuticos, e prevenir possíveis complicações na mucosa gástrica, incluindo a úlcera péptica.

### 1.3 Úlcera gástrica

A úlcera é definida como uma lesão que ocorre dentro da parte revestida do estômago (corpo e antro) e no intestino delgado. Identificada por inflamação, irritação e perda celular da mucosa gástrica, pode avançar para um câncer gástrico (ABDELFATTAH et al., 2019; YEO et al., 2018). A infecção por *Helicobacter pylori* e o uso excessivo de drogas anti-inflamatórias não esteroides (AINES) constituem causas comuns de úlcera péptica. Além disso, o aumento do estresse oxidativo e a inflamação também estão associados com a patogênese desta doença (YANG et al., 2017).

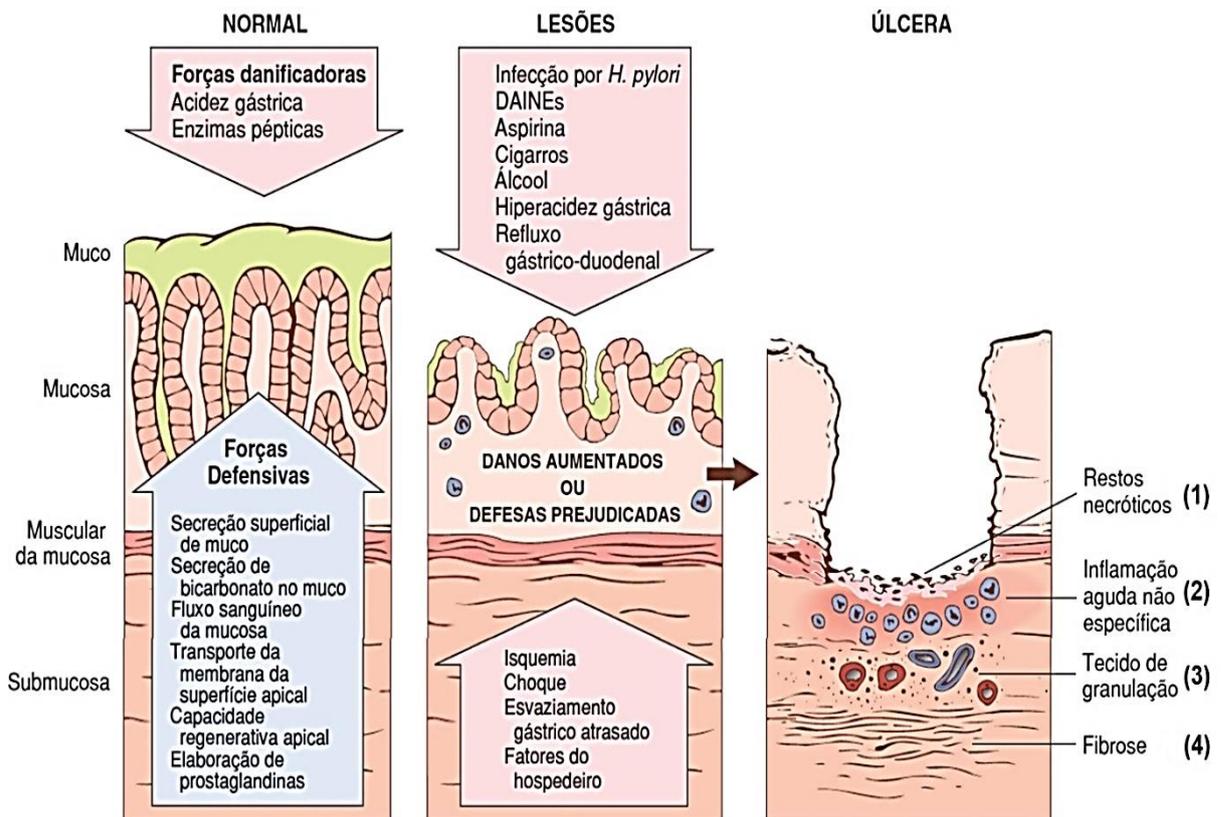
A úlcera gástrica ou péptica é uma doença invasiva que afeta 10% da população no mundo, dos quais 1% pode se deteriorar em câncer. É, portanto, extremamente prejudicial à saúde humana e é classificada como uma doença pré-cancerosa, de preocupação global, pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (LIU et al., 2017).

Ahmad et al. (2019) relata que, embora a infecção por *Helicobacter pylori* e o uso de AINES constituam fatores predominantes para o desenvolvimento da úlcera gástrica, outras condições estão incluídos (Figura 4), como a carência do suprimento de sangue para um órgão, doença de Crohn, doença pulmonar crônica, estresse, entre outros. O estilo de vida, como o estresse diário, bebidas alcoólicas e com alto teor de cafeína, tabaco também influenciam na patogenia da úlcera (AHMAD et al., 2019).

Dessa forma, observa-se na figura abaixo (Figura 4) que, associado com fatores que danificam a mucosa, encontram-se a diminuição dos mecanismos de proteção, sendo este desequilíbrio o principal mecanismo que favorece o desenvolvimento da úlcera. Os cofatores mais comuns incluem a irritação química direta pela supressão da síntese de prostaglandinas, necessárias para a proteção da

mucosa, decorrentes do uso crônico de AINES e corticosteroides; uso de cigarros, prejudicando o fluxo sanguíneo e a cicatrização; hiperacidez gástrica e refluxo gástrico-duodenal que pode ser causada pelo estresse ou por hipercalcemia (TURNER, 2010).

**Figura 4** – Mecanismos de proteção e progressão da injúria gástrica



Fonte: Turner, 2010.

Ao progredir a lesão, já na úlcera em atividade, há quatro camadas bem reconhecidas, embora nem sempre bem individualizadas: 1) tecido necrótico, geralmente do tipo fibrinoide, presente no fundo da lesão decorrente da digestão ácido péptica; 2) exsudato inflamatório com predomínio de neutrófilos; 3) camada constituída principalmente por tecido de granulação; e 4) tecido fibroso cicatricial (BRAGA et al., 2016).

O recrutamento de células inflamatórias e a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) na mucosa gástrica ocorre a partir da exposição a agentes estressores. Este último são produtos essenciais do metabolismo celular em condições normais, os quais são recrutados pelas enzimas superóxido dismutase

(SOD) e catalase (CAT), sequestradoras de radicais livres, evitando danos no organismo. Porém, quando há um desequilíbrio entre a produção de EROs e o sistema de defesa antioxidante, ocorre o estresse oxidativo. Como consequência, as EROs podem ativar o fator nuclear kappa-B (NF- $\kappa$ B), um fator de transcrição pro-inflamatório, que quando ativado, ativa outros mediadores pró-inflamatórios no núcleo, como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), a interleucina IL-6 e a IL-1 $\beta$  (BHATTACHARYYA et al., 2014; LI et al., 2016).

O aumento das citocinas pró-inflamatórias podem induzir a ativação de neutrófilos, bem como o acúmulo destes nos tecidos mucosos durante a ulceração gástrica, contribuindo bastante para a manutenção e regulação do dano da úlcera. A infiltração neutrofílica pode ser avaliada medindo a atividade da mieloperoxidase (MPO) (LI et al., 2017).

Geralmente, em úlceras pépticas não complicadas, o paciente apresenta sintomas de dor epigástrica, que ocorre com frequência após as refeições, com sensação de queimação, e menos comum, náuseas, vômitos e perda de peso, levando em consideração que alguns tipos, especialmente as induzidas por AINE são assintomáticas. Porém, os sintomas são poucos discriminatórios para o local da ulceração, e até mesmo se há presença de úlcera ou não (MAJUMDAR; BEBB, 2019).

Apesar do fato de que sinais e sintomas da úlcera péptica são pouco confiáveis, o seu diagnóstico encontra-se nas apresentações clínicas e testes definitivos. Assim, o teste padrão ouro usado na primeira linha de investigação é o teste esofagogastroduodenoscopia ou endoscopia digestiva alta, o qual fornece uma visualização direta e precisa para a ulceração gástrica. Além disso, permite o diagnóstico de outras células anormais no tecido, como esofagite e malignidade (AHMAD et al., 2019).

Com aumento da incidência e prevalência dessa doença, a úlcera gástrica induzida por etanol é considerada um grave problema, associado a lesões, ulceração e sangramento do trato gastrointestinal. Além disso, a patogênese desta doença envolve vários fatores, incluindo estresse oxidativo, apoptose de células epiteliais e inflamação da mucosa (ARAB et al., 2019).

### ***1.3.1 Úlcera gástrica induzida por etanol***

Dentre as drogas psicoativas consumidas, o álcool é a mais utilizada no mundo. Seu uso indiscriminado é considerado prejudicial, contribuindo significativamente para a carga global de morbidade. Mundialmente, 3 milhões de mortes por ano resultam do uso nocivo do álcool, representando 5,3% de todas as mortes. Além disso, o uso nocivo de álcool é um fator causal para mais de 200 doenças e lesões (GUERRA; VIEIRA, 2019; OPAS, 2019).

Nesse contexto, a ingestão aguda ou crônica de álcool pode resultar em lesões estruturais e funcionais no trato gastrointestinal, as quais são caracterizadas morfológicamente como erosões da mucosa gástrica e lesões das pequenas vilosidades intestinais (QIN; DEITCH, 2015).

O álcool é ressaltado como um componente de risco independente para a iniciação e complicações associadas à úlcera gástrica, uma vez que o trato gastrointestinal é um dos sistemas mais acometidos em indivíduos que exageram das bebidas alcoólicas, já que o contato direto do etanol com a mucosa induz alterações funcionais e metabólicas. A ulceração gástrica pelo consumo crônico de etanol decorre de fatores como a diminuição da produção de muco, proliferação celular e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, causando uma resposta inflamatória exagerada (LÍVERO et al., 2016).

A ativação do sistema imune inato causado pelo abuso de etanol afeta os níveis de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$  e IL-6, as quais facilitam o desenvolvimento de lesões agudas da mucosa gástrica. Estas citocinas já foram demonstradas em níveis aumentados no soro de camundongos com doenças inflamatórias, incluindo inflamação grave da mucosa (ZHANG et al., 2018). Amirshahrokhi; Khalili (2016) ressaltam que o etanol produz lesões hemorrágicas, edema e infiltração de células inflamatórias, semelhantes às lesões resultantes do abuso de álcool.

São conhecidos vários modelos animais de úlcera gástrica, incluindo úlcera induzida por AINEs, por ácido clorídrico (HCl) e por etanol. Dentre estes, o modelo mais utilizado é o induzido pelo etanol absoluto, uma vez que permite rápida indução e pode ser amplamente empregado para testar a eficácia de drogas potenciais independentes da secreção de ácido gástrico, além disso, se assemelha às úlceras agudas em humanos. Nesse contexto, esforços tem sido realizados a fim de identificar

agentes terapêuticos com efeitos colaterais reduzidos para o tratamento de úlceras gástricas em modelos animais (SONG et al., 2018)

#### **1.4 Produtos de origens naturais na proteção gástrica**

Há milhares de anos em muitas regiões do mundo, os medicamentos naturais têm sido amplamente utilizados para efeitos terapêuticos, caracterizando-os como confiáveis e de fácil acesso para as pessoas. Atualmente, ainda representam um importante agente para a o surgimento de novas drogas. Nesta visão, o Food and Drug Administration (FDA) havia aprovado, até o final de 2013, um total de 547 produtos naturais e seus derivados (RAO et al., 2019).

Devido às características de baixa toxicidade e alta eficiência, os produtos naturais apresentam grande atratividade como agentes terapêuticos alternativos pela sociedade (JIN et al., 2019). Segundo Newman; Cragg (2016), os produtos naturais derivados de plantas, animais, organismos marinhos e microrganismos, tem sido considerado uma fonte significativa para a descoberta de novas drogas.

Nesse contexto, vem surgindo, atualmente, um vasto número de estudos que incluem abordagens relacionadas com a prevenção da mucosa gástrica causada por lesões induzidas pelo álcool, como por exemplo, o trabalho de LI et al. (2016) que isolou a cavidina de *Corydalis impatiens* e o de Ribeiro (2017) que isolou a baicaleína da *Scutellaria baicalensis Georgi*, que demonstraram vários efeitos farmacológicos sobre a úlcera gástrica. Além disso, já foi demonstrado que o extrato aquoso da *Maytenus ilicifolia*, a espinheira-santa, é utilizada como anti-histamínico de ação inibitória sobre a secreção de ácidos, apresentando efeitos antiulcerogênicos em pacientes com úlcera péptica (CALOU et al., 2014). Assim, Amirshahrokhi; Khalili (2016) afirmam que o foco tem sido em compostos com atividade antioxidante e anti-inflamatório os quais podem atuar como gastroprotetores.

A busca por novos compostos que minimizem a úlcera gástrica decorre das limitações do tratamento convencional com os antiácidos e inibidores da bomba de prótons ou bloqueadores dos receptores da histamina tipo 2, os quais apresentam muitos efeitos adversos, como vertigem, sonolência, tontura e disfunções gastrointestinais. Assim, terapias alternativas que envolvem propriedades

antioxidantes tem sido estudadas para minimizar o risco de úlcera gástrica e câncer de estômago (ABDELFATTAH et al., 2019).

#### **1.4.1 Família Lauraceae**

O Brasil caracteriza-se por possuir uma grande biodiversidade de plantas, contendo a maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, o que indica que há uma quantidade considerável de produtos naturais a serem abordados pelos pesquisadores, despertando interesse nas mais variadas áreas de investigação como biológica, química, farmacêutica, médica e biomédicas, econômica, entre tantas outras (LIMA, 2017).

As plantas da família Lauraceae apresenta distribuição pantropical, incluindo América, Ásia, África e Austrália, sendo caracterizada como arbustos ou árvores, geralmente aromático. Possui folhas alternativas, simples, sem estípules, com bordas inteiras e geralmente resistentes. Tem um importante papel ecológico, uma vez que na Mata Atlântica é uma das famílias que tem mais representantes que leva a um aumento da riqueza de espécies deste bioma (GONÇALVES et al., 2018; QUINET; ANDREATA, 2002).

Os principais gêneros incluem *Cinnamomum* (250 spp.), *Ocotea* (300-400 spp.), *Persea* (150 spp.), *Litsea* (400 spp.), *Cryptocarya* (200-250 spp.), *Aniba* (40 spp.), *Neolitsea* (80 spp.), *Lindera* (100 spp.), *Laurus* (2 spp.) (EVANS, 1996). Algumas espécies têm sido utilizadas pelas indústrias para a fabricação de diversos produtos, porém, a maioria das espécies tem seu uso restrito às comunidades tradicionais que detêm o conhecimento empírico da utilização dessas plantas (MARQUES, 2001).

A família Lauraceae também se destaca por seus valores ecológicos e econômicos significativos, oferecendo especialmente recursos não-madeireiros como especiarias e seus óleos essenciais largamente aplicados nas indústrias de alimentos, medicamentos, perfumaria e cosméticos (REIS-AVILA; OLIVEIRA, 2017). Além disso, essa família é rica em alcaloides, principal metabólito biossintetizado, o qual pertence à via do ácido chiquímico e origina-se do aminoácido L-tirosina (SILVA et al., 2019).

#### 1.4.1.1 *Aniba riparia* (Nees) Mez e suas propriedades

No Brasil, a família Lauraceae, a qual pertence a *Aniba riparia*, é representada por 22 gêneros geralmente arbóreos, com características econômicas e ecológicas importantes. Muitas espécies desta família são usadas na medicina popular em lesões cutâneas, distúrbios gástricos, com atividade anti-inflamatória, e para problemas circulatórios, além de apresentarem propriedades hipoglicêmicas e ansiolíticas (SANTOS et al., 2011).

A espécie *Aniba riparia* (Nees) Mez, conhecida popularmente como “louro”, “louro-faia” ou “pau-rosa” no Brasil (Figura 5), apresenta folhas cartáceas, foscas em ambas as faces, reticulação aureolada, ramos de 3mm de espessura, marrons e lenticelados, pecíolo canaliculado, engrossado na base e gema terminal menor que 4mm (MARQUES, 2001).

**Figura 5** – Folha de *Aniba Riparia* (Nees) Mez.



Fonte: (OLIVEIRA, 2012)

Constituintes químicos distintos podem ser encontrados em algumas partes da *Aniba Riparia*. Na casca do caule, podem ser encontrados flavonoides,

benzilbenzoatos e benzaldeídos. Já em seu fruto verde, foram encontradas neolignananas, flavonoides, estirilpironas e alcaloides, principalmente alcanidas (BARBOSA-FILHO et al., 1987).

Os alcaloides possuem grande diversidade estrutural e estão presentes em mais de 33 famílias de plantas. Assim, compreendem a maior classe de metabólitos secundários de plantas, apresentando uma distinta variedade de atividades farmacológicas (BARBOSA-FILHO; et al., 2006). Sendo assim, as alcanidas naturais ou alquilamidas, compostos importantes dos alcaloides, merecem destaque devido à sua diversidade de atividades biológicas e farmacológicas. Estes são originados da condensação de um ácido graxo insaturado e uma amina, formando assim uma função amida restrita a poucos representantes da natureza (BOONEN et al., 2012).

Fazendo parte de uma classe especial de alcaloides e da família da Lauraceae, as Riparinas são alcanidas naturais originárias de frutos verdes do gênero *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae), uma planta típica da região amazônica que se destaca por suas propriedades medicinais. A partir dessa planta, foram sintetizadas três Riparinas naturais: n-benzoil- tiramina (Riparina I), n- (2-hidroxibenzoil) tiramina (Riparina II) e n- (2,6-di-hidroxibenzoil) tiramina (Riparina III) (ARAÚJO et al., 2018).

Nesse cenário, o potencial farmacológico das Riparinas naturais despertou o interesse de estudiosos em produzir e analisar seus derivados sintéticos, o qual possibilitou a implementação de estudos inovadores em química medicinal e permitiu garantir a sustentabilidade da espécie *Aniba riparia*. Dessa forma, algumas moléculas comprovaram a capacidade de atenuar a resposta inflamatória através da modulação da migração de neutrófilos e atividades antioxidantes e antitumorais in vitro (ARAÚJO et al., 2018).

Ensaio pré-clínicos realizados por Oliveira (2012) em modelos comportamentais de ansiedade, depressão, sono e convulsão, revelaram efeitos ansiolítico, anticonvulsivante e antidepressivo da Riparina I. Além disso, Araújo et al. (2009) também estudou os efeitos desta riparina em modelos cognitivos de dor e investigou o envolvimento da via do óxido nítrico, concluindo que tal substância apresenta atividade antinociceptiva que pode ser devido ao envolvimento de mecanismos periféricos (via do óxido nítrico) e centrais.

Trabalhos realizados com a Riparina II, mostraram atividade anti-inflamatória em modelos animais de inflamação utilizando o teste de edema de pata

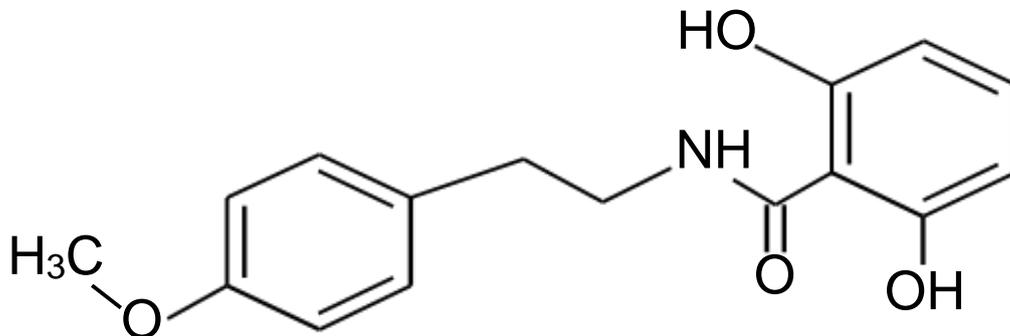
induzida por carragenina, dextrana, histamina ou serotonina, indicando que esta substância atuava inibindo direta ou indiretamente a liberação de mediadores pró-inflamatórios envolvidos na geração da dor (CARVALHO et al., 2013). Além disso, foi verificado que a riparina II possui uma atividade antinociceptiva envolvendo mecanismos moleculares dos canais  $K^{+}_{ATP}$ , TRPV1, TRPA1, TRPM8, ASIC, PKC, PKA, receptores de bradicinina, receptores  $\alpha_2$ - adrenérgico e receptores opioides (CARVALHO, 2016, 2018).

Outros estudos realizados pelo laboratório de neurofarmacologia (LNF) com a riparina III, em diversos modelos experimentais, concluíram que esta substância apresenta atividade ansiolítica, e antidepressiva com envolvimento das três monoaminas, além de propriedades antioxidantes, modulando a resposta ao estresse oxidativo neuronal (MELO, 2006, 2012; SOUSA et al., 2004). Além disso, também foi demonstrado efeito antinociceptivo da riparina III em camundongos submetidos a testes de nocicepção, os quais estão relacionados a modulação de mediadores intracelulares (PKA e PKC) e mecanismos moleculares dos canais de TRPV1, TRPM8, receptores glutamatérgicos, serotoninérgicos (síntese de 5-HT e 5-HT<sub>1A</sub>), muscarínicos, dopaminérgicos, opioide e sistema oxidonitrérgico VASCONCELOS (2015). Araújo et al., (2017) também descreveu as propriedades de análogos da Riparina como responsáveis por reduzir os níveis de mediadores inflamatórios como mieloperoxidase, fator de necrose tumoral- $\alpha$  e interleucina-1 $\beta$ .

#### 1.4.1.2 N- (2,6 -di-hidroxibenzoil) tiramina (Riparina III)

A Riparina III (Rip III), inicialmente isolada do fruto verde de *Aniba riparia* e posteriormente sintetizada por Barbosa-Filho; Silva; Bhattacharyya (1990) é uma alcaloide natural, que constitui uma classe especial de alcaloides, contendo uma função amida restrita a poucos representantes na natureza. Sendo formada da união da tiramina com o ácido benzoico, é considerada um composto bioativo. Além disso, possui duas substituições no anel do ácido benzoico (Figura 6), acrescentando duas hidroxilas. Apresenta também, um metil ligado ao oxigênio no anel da tiramina, formando uma função éter (CATÃO et al., 2005).

**Figura 6** – Estrutura Química da Riparina III.



Fonte: CATÃO (2005).

Apesar de haver poucos estudos com a Rip III, algumas propriedades farmacológicas já foram demonstradas, incluindo atividade antimicrobiana contra bactérias gram positivas e gram negativas, além de efeitos hipotensor e bradicárdico transitório (CATÃO et al., 2005). Além disso, estudos pré-clínicos realizados no LNF identificaram efeitos a nível de sistema nervoso central, com atividade ansiolítica e anticonvulsivante (MELO et al., 2006; OLIVEIRA, 2012), antinociceptiva e anti-inflamatória (VASCONCELOS, 2015), e antidepressiva (MELO, 2012; SOUSA et al., 2004).

## 2 JUSTIFICATIVA

Altas taxas de mortalidade e morbidade caracterizam a úlcera gástrica como uma doença de preocupação global, definida como uma lesão na camada muscular formando uma cavidade marcada por inflamação aguda e crônica, irritação e perda celular, podendo avançar para o câncer gástrico (YEO et al., 2018). As causas da úlcera gástrica incluem o desequilíbrio entre os fatores agressivos e defensivos e resistência da célula da mucosa. Entretanto, a infecção por *Helicobacter pylori* e o uso excessivo de anti-inflamatórios não esteroides (AINES) constituem os fatores predominantes, além dos maus hábitos alimentares, consumo de álcool, tabagismo e estresse (ABDELFATTAH et al., 2019; AHMAD et al., 2019).

O modelo experimental *in vivo* de úlcera gástrica pelo etanol é considerado útil para mimetizar a desordem humana, uma vez que a incidência e a prevalência desta doença, induzida pelo álcool, estão aumentando, considerado um problema sério, associado a lesões estomacais, ulceração e sangramento do trato gastrointestinal. Assim, é visto também como um modelo eficaz para explorar agentes com potencial gastroprotetor (ARAB et al., 2019).

Nessa esfera, destaca-se que a administração dos agentes antiulcerosos, incluindo os antiácidos e os inibidores da bomba de prótons, utilizados na terapia da úlcera, apresentam efeitos adversos, além da duração máxima de tratamento recomendada de 4 a 8 semanas. Diante disso, notavelmente percebe-se a necessidade de estudar novos compostos que minimizem o risco de úlcera gástrica (ARAB et al., 2019; HALABI et al., 2014).

As Riparinas, alcaloides naturais de uma classe especial de alcaloides contendo funções amidas, tem demonstrado potencial efeito farmacológico que permitiu garantir a sustentabilidade da espécie *Aniba riparia*. Nesse contexto, destaca-se que tais moléculas já demonstraram a atenuação da resposta inflamatória por meio da modulação da migração de neutrófilos e atividades antioxidante e antitumoral *in vitro*, além da capacidade em diminuir a produção de fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e de interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (ARAÚJO et al., 2018; SILVA et al., 2015). Análogos da Riparina também demonstraram papel fundamental na redução de citocinas pró-inflamatórias e do estresse oxidativo em um modelo de edema de pata induzido por carragenina (SILVA et al., 2015).

Considerando que as Riparinas constituem compostos com atividades anti-inflamatória e antioxidante, associando ao fato de que produtos naturais constituem uma alternativa terapêutica de custo relativamente baixo e utilizado, há milhares de anos pela população, o presente trabalho buscou investigar os efeitos da Riparina III no modelo experimental de úlcera gástrica, pretendendo fornecer evidências científicas através da elucidação de mecanismos envolvidos que assegurem seu uso racional pela população, indicando confiança em uma espécie de origem vegetal.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Avaliar a atividade gastroprotetora da Riparina III em modelo agudo de lesão gástrica induzida por etanol e possíveis mecanismos envolvidos.

#### 3.2 Específicos

- ✓ Avaliar os efeitos da Riparina III sobre a lesão gástrica induzida por etanol em camundongos;
- ✓ Demonstrar o efeito da Riparina III nas alterações histopatológicas na mucosa gástrica após a lesão promovida pelo etanol;
- ✓ Ilustrar o efeito da Riparina III na contagem de mastócitos teciduais induzidos pelo etanol no modelo de lesão gástrica;
- ✓ Analisar o envolvimento dos canais de potássio-ATP-dependentes, das prostaglandinas, dos neurônios aferentes sensíveis a capsaicina (Receptores TRPV-1) e do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor da Riparina III no modelo de lesão gástrica induzida por etanol;
- ✓ Constatar a participação do óxido nítrico na lesão gástrica induzida por etanol através da quantificação de nitrito e imunomarcação para a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) na mucosa gástrica de animais;
- ✓ Estudar o envolvimento de parâmetros de estresse oxidativo, como glutathiona reduzida (GSH) e peroxidação lipídica envolvidos no efeito da Riparina III no modelo de lesão gástrica induzida por etanol.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Substâncias e reagentes

O quadro 1 mostra as substâncias e reagentes utilizados na investigação laboratorial.

**Quadro 1** – Substâncias e reagentes utilizados durante os procedimentos experimentais.

Substâncias/Reagentes	Procedência	Dose	Via
Ácido ditio bis-2-nitrobenzóico (DTNB)	Sigma®	50 µL	-
Ácido o-Fosfórico	Vetec®	5%	-
Ácido tricloroacético (TCA)	Vetec®	50%	-
Azul de toluidine	Sigma®	-	-
Capsaicina	Sigma®	0,3mg/kg	v.o
Diazóxido	Sigma®	3mg/kg	i.p
Etanol P.A.	Sigma®	0,2 mL/animal	v.o
Formaldeído P.A.	Reagen®	10%	-
Fosfato de potássio dibásico	Vetec®	1,15g	-
Fosfato de potássio monobásico	Vetec®	0,2g	-
Glibenclamida	Biossintética®	5 mg/Kg	i.p
Indometacina	Sigma®	10 mg/Kg	v.o
L-Arginina	Sigma®	600 mg	i.p
L-NAME (N <sup>G</sup> -Nitro-L-arginina-metiléster)	Sigma®	20 mg/Kg	s.c
Misoprostol	Pharmacia LTDA®	70 µg/Kg	v.o.
N-1-naftilenodiamina (NEED)	Sigma®	0,1%	-
N-acetilcisteína	União química®	300 mg/kg	v.o
Riparina III	(UFPB)	50 mg	v.o
Vermelho de rutênio	Sigma®	3,5mg/kg	s.c
Polissorbato 80 (Tween ®)	Sigma®	1mL	-
Anticorpo primário de Coelho anti-iNOS	Sigma®	-	-

## 4.2 Obtenção da Riparina III

A planta *Aniba Riparia* (Nees) Mez foi identificada pelo botânico Klaus Kubtzky da Universidade de Hamburgo/Alemanha (BARBOSA-FILHO et al., 1987). As frutas verdes da *Aniba Riparia* foram coletadas pelo Dr. Hipólito F. Paulino-Filho (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”) na região de Humaiatá, estado do Amazonas, no Brasil (BARBOSA-FILHO et al., 1987). Estas foram cedidas ao Professor Dr. José Maria Barbosa Filho do grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, e a extração e o isolamento foram feitos pelo Prof. Dr. Stanley Juan Chavez Gutierrez da Universidade Federal do Piauí, conforme descrito abaixo.

A Riparina III foi isolada da *Aniba riparia*, purificada por cromatografia em camada delgada preparativa e a sua estrutura foi confirmada por ressonância magnética nuclear (RMN) e a pureza foi determinada por cromatografia em camada delgada analítica e cromatografia líquida de alta eficiência, determinado um grau de pureza de 99%.

## 4.3 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem *swiss*, adultos, machos, com peso entre 25-35g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará e mantidos no Biotério Professor Eduardo Torres (Setorial do DFF), onde foram realizados todos os experimentos. Para isso, os animais foram dispostos em caixas de polipropileno, em um ambiente com temperatura controlada ( $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), com ciclo claro/escuro de doze horas e recebendo água e comida à vontade (*ad libidum*). Os animais foram colocados em jejum de sólidos de 15-16 horas, antes da realização de cada experimento em que a via oral foi utilizada para a absorção do fármaco ou ação da droga.

## 4.4 Aspectos éticos observados para a realização dos procedimentos experimentais em animais

Os animais envolvidos no estudo foram acondicionados em número de 6 por gaiola (gaiolas em propileno nas medidas aproximadas de 45x35x15cm) mantidas em salas com o horário e temperatura controlados. Os animais permaneceram em salas climatizadas com exaustores de gases. As gaiolas foram lavadas e a maravalha substituída duas vezes na semana. Na mesma periodicidade, foram trocadas a água e a comida.

O protocolo experimental foi executado de acordo com as diretrizes aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, sob o número 6891/19 (Anexo A). Todos os esforços foram realizados no sentido de reduzir o número de animais utilizados, a dor, o sofrimento e o estresse dos mesmos.

#### **4.5 Grupos experimentais**

Todos os grupos experimentais possuíam 6 animais, sendo estes:

- Grupo sadio: Os animais receberam solução salina (soro fisiológico 0,9%, v.o) e não foram submetidos à lesão gástrica;
- Grupo controle (lesão gástrica): Os animais receberam solução salina, administrada por via oral através de gavagem, 60 minutos antes do agente agressor (etanol absoluto, 0,2 mL/animal, v.o).
- Grupo Riparina III (Rip III): Os animais receberam Rip III na dose de 50 mg/kg (diluída em água destilada e tween 80®), administrada por via oral através de gavagem, 60 minutos antes do agente agressor (etanol absoluto, 0,2 mL/animal, v.o).
- Grupo N-acetilcisteína (NAC): Os animais receberam N-acetilcisteína na dose de 300 mg/kg, administrada por via oral através de gavagem, 60 minutos antes do agente agressor (etanol absoluto, 0,2 mL/animal, v.o).

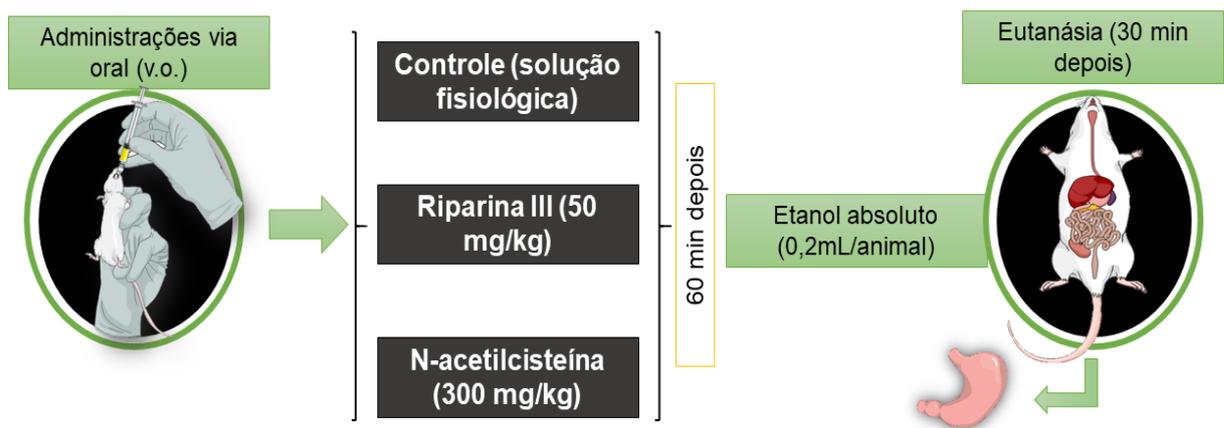
#### **4.6 Avaliação da atividade gastroprotetora da Riparina III**

##### **4.6.1 Lesões gástricas induzidas por etanol**

Para avaliar a atividade gastroprotetora da Riparina III, foi utilizado o modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto segundo o método de Robert

et al. (1979). Para isso, os camundongos foram tratados com solução fisiológica (0,9%, v.o.), Riparina III (50 mg/kg, v.o.) ou NAC (300 mg/kg, v.o.), utilizado como fármaco de referência, 60 minutos antes da administração oral através de gavagem de etanol absoluto (0,2 mL/animal) (Figura 7). Decorridos 30 minutos da administração do etanol, os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico (Cetamina 300mg/kg e Xilazina 30mg/kg, via intraperitoneal i.p.), os estômagos retirados, abertos pela grande curvatura, lavados em solução salina 0,9% e comprimidos entre dois vidros de relógio para uma melhor visualização. O percentual da face glandular gástrica lesionada foi determinado com o auxílio de um programa de planimetria computadorizado (ImageJ®). A área ulcerada foi expressa em termos de porcentagem em relação à área total do corpo gástrico.

**Figura 7** – Esquema de indução e tratamento das lesões gástricas



Fonte: Autoria própria

#### **4.6.2 Avaliação histopatológica da mucosa gástrica de camundongos**

Para a avaliação histopatológica, as amostras do estômago foram fixadas numa solução de formaldeído 10% tamponado, onde permaneceram por 24 horas. Em seguida, foram transferidas para uma solução de álcool 70%, permanecendo até a realização dos procedimentos histológicos. Para isso, o material biológico foi seccionado e embebido em parafina e, em seguida, foram feitos cortes de cinco micrômetros, colocados numa lâmina e corados com hematoxilina-eosina (Coloração H&E) para o estudo no microscópio óptico.

As amostras foram avaliadas de acordo com os critérios de Laine; Weinstein (1988), isto é, avaliação da perda de células epiteliais (escores de 0-3), edema na superfície da mucosa (escores de 0-4), hemorragia (escores de 0-4) e infiltração de células inflamatórias (escores de 0-3), com o escore máximo de 14. Toda a avaliação histopatológica foi realizada por um histologista em forma de estudo cego.

#### **4.6.3 Contagem de mastócitos na mucosa gástrica**

Para evidenciar a quantificação de mastócitos, os blocos de parafina com amostras de mucosa gástrica foram selecionados para a coloração com azul de toluidina, segundo Michalany (2008). As colorações foram realizadas após a desparafinização da lâmina com xilol, hidratação com álcool absoluto e uma série de álcool a 90%, álcool a 80%, álcool a 70%. Em seguida, as lâminas foram lavadas com água destilada, coradas com azul de toluidina por 8 minutos, lavadas e secas. Após a secagem, as lâminas clareadas com uma série de xilol foram montadas. Para a contagem de mastócitos presentes nas lâminas, com o auxílio de um microscópio óptico ao sistema de aquisição de imagens (LEICA), realizou-se a captura das imagens digitais, para contagem posterior de no mínimo 10 campos, com auxílio do software Image J®. Os resultados representam a média de 10 campos de cada grupo.

### **4.7 Avaliação do mecanismo de ação gastroprotetor da Riparina III**

#### **4.7.1 Determinação do efeito dos canais de potássio ATP-dependentes ( $K_{ATP}$ ), no efeito gastroprotetor da Riparina III em modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.**

Para avaliar a possível participação dos canais de  $K_{ATP}$  no efeito gastroprotetor da Riparina III, grupos de animais (n=6) foram pré-tratados com glibenclamida (5 mg/kg, i.p.), um bloqueador dos canais de potássio, ou soro fisiológico 0,9%. Decorridos 15 minutos, os animais receberam os tratamentos: solução salina 0,9%; Rip III (50 mg/Kg) ou diazóxido (3 mg/Kg, i.p.), um ativador dos canais de potássio. Após 60 minutos, receberam etanol (0,2 ml/animal) para induzir a lesão. Trinta minutos depois, os animais foram eutanasiados por sobredose de

anestésico, os estômagos retirados, abertos pela grande curvatura e, em seguida, realizou-se como descrito anteriormente no que concerne a análise do percentual de lesão gástrica.

#### ***4.7.2 Estudo do efeito das prostaglandinas (PGs) no efeito gastroprotetor da Riparina III em modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos***

Para avaliar a possível participação das prostaglandinas no efeito gastroprotetor da Riparina III, os animais (n=6) foram pré-tratados com indometacina (10 mg/Kg, v.o.), dose que inibe a síntese de prostaglandinas, ou soro fisiológico 0,9%. Após 2 horas, os animais receberam solução salina 0,9%; Rip III (50 mg/Kg) ou misoprostol (70 µg/Kg, v.o.), um análogo sintético da prostaglandina E1. O etanol foi administrado uma hora depois e realizou-se como descrito anteriormente no que concerne a análise do percentual de lesão gástrica.

#### ***4.7.3 Papel do receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1 (TRPV-1) no efeito gastroprotetor da Riparina III em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos***

Para avaliar a possível participação dos receptores TRPV-1 na gastroproteção da Riparina III, os animais (n=6) foram pré-tratados com soro fisiológico 0,9% e vermelho de rutênio (3,5mg/Kg, via subcutânea s.c.), um bloqueador dos receptores TRPV-1, dissolvido em água destilada e tween 80®. Após 30 min, os grupos receberam os tratamentos: solução salina 0,9%; capsaicina (0,3mg/kg v.o.), que se liga aos receptores TRPV-1 e promove gastroproteção, e Rip III (50 mg/kg). O etanol foi administrado uma hora depois e prosseguiu como descrito anteriormente em relação à análise do percentual de lesão gástrica.

#### **4.7.4 Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor da Riparina III em modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.**

Para avaliar o papel do óxido nítrico no efeito antiulcerogênico da Riparina, os animais (n=6) foram pré-tratados com soro fisiológico 0,9%, ou L-NAME (20 mg/Kg, s.c.), um inibidor da síntese de NO. Após 15 minutos, os animais receberam os seguintes tratamentos: solução salina; Rip III (50 mg/Kg, v.o.) ou L-arginina (600 mg/Kg, i.p.), precursora do óxido nítrico. O etanol foi administrado uma hora depois e realizou-se a porcentagem de área ulcerada como descrito anteriormente (CHANDRANATH; BASTAKI; SINGH, 2002).

#### **4.8 Dosagem de nitrito/nitrato para confirmar o envolvimento do óxido nítrico na mucosa gástrica de animais com lesão gástrica induzida por etanol**

O método é baseado na utilização do reagente de Griess que mostra a presença de nitrito na amostra por uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor rósea. O reagente é preparado utilizando partes iguais de Ácido fosfórico 5%, N-1-naftilenodiamina (NEED) 0,1%, Sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5% e Água destilada. Para realização do ensaio foi adicionado 100 µL do sobrenadante do homogenato a 10%, feito com tampão de fosfato de potássio, em 100 µL do reagente de Griess. Para o branco, foi adicionado 100 µL do reagente em 100 µL de tampão e para a obtenção da curva do padrão, foram feitas diluições em série (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56 µM) de nitrito. Todo o ensaio foi feito em uma placa de 96 poços e a leitura feita na faixa de absorbância de 560 nm (GREEN; TANNENBAUM; GOLDMAN, 1981).

#### **4.9 Imunohistoquímica para iNOS**

A Imunohistoquímica para iNOS foi realizada utilizando o método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE, 1981). Para isso, foi escolhido o segmento estomacal glandular do lado direito para a avaliação imunohistoquímica. As lâminas contendo os cortes do segmento foram desparafinizadas, por meio de incubação em estufa a 60°C *overnight* e de três banhos de xilol, durante 5 minutos

cada. Decorrido este tempo, os cortes foram hidratados em dois banhos em etanol absoluto, um banho em etanol (90%), um banho em etanol a 80% e um banho em etanol a 70%, durante três minutos cada. Na etapa seguinte, as lâminas contendo os cortes foram submersas a um banho de água destilada por 10 minutos e, em seguida, com tampão citrato (DAKO®, pH 7,0) em banho-maria (95°C) por 20 minutos, para a recuperação antigênica. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS), por 5 minutos, seguido do bloqueio da peroxidase endógena com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% (Abcam), durante 30 minutos. Posteriormente, os cortes foram lavados com PBS e, depois, incubados overnight (4°C) com anticorpo primário rabbit anti-iNOS. Para os controles negativos, os anticorpos primários foram omitidos. Após este período, os cortes foram lavados com PBS e incubados com o anticorpo secundário. 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, realizou-se a coloração com o cromógeno 3,3`diaminobenzidine-peróxido (DAB, DAKO®), seguida por contra-coloração com hematoxilina de Mayer, durante 8 minutos. Por fim, se realizou a desidratação das amostras e montagem das lâminas.

#### **4.10 Avaliação da atividade antioxidante da Riparina III frente às lesões gástricas induzidas por etanol**

##### ***4.10.1 Papel dos grupos sulfidrílicos não-proteicos (NP-SH) no efeito antioxidante e gastroprotetor da Riparina III em modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.***

Para realizar a quantificação dos grupos sulfidrílicos não-proteicos (NP-SH), a porção glandular de cada estômago foi removida, pesada e homogeneizada com EDTA 0,02 M gelado, para preparação do homogenato a 10%. Em seguida, foi adicionado, a uma alíquota de 1 mL do homogenato, 800 µL de água destilada e 200 µL de ácido tricloroacético (TCA 50% em solução aquosa) e então, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 min. Um volume de 1 mL foi então retirado do sobrenadante e adicionado 2 mL de tampão Tris 0,4 M, pH 8,9 e 50 µL de DTNB 0,01 M. A absorbância foi medida dentro de 5 min a 412 nm. A concentração de NP-SH foi

calculada através de uma curva padrão de glutathiona reduzida (GSH) e os resultados expressos em  $\mu\text{g}$  de NP-SH/g de tecido (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

#### ***4.10.2 Papel da lipoperoxidação no efeito antioxidante e gastroprotetor da Riparina III em modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos***

A taxa de lipoperoxidação da mucosa gástrica foi estimada pela determinação de malondialdeído (MDA), avaliada através da reação com o ácido tiobarbitúrico, denominado também teste das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (Thiobarbituric Acid-Reactive Substances – TBARS). Após a dissecação, os estômagos foram lavados com salina gelada para minimizar a interferência da hemoglobina com radicais livres e remover o sangue aderido à mucosa. As amostras foram então homogeneizadas a 10% com tampão fosfato de potássio, retirado uma alíquota de 250  $\mu\text{L}$  e posto em banho-maria a 37°C por 1 hora. Em seguida, foi adicionado 400  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico 35% e centrifugado a 14000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado e posto em contato com 400  $\mu\text{L}$  de ácido tiobarbitúrico 0,6% e a mistura foi incubada a 95-100°C por 1 hora. Após resfriar a mistura, a absorvância do sobrenadante foi lida a 532 nm. Uma curva padrão foi gerada usando 1,1,3,3-tetrametoxipropane. Os resultados foram expressos como nmol de MDA/mg de tecido (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

#### **4.11 Análise estatística**

A análise estatística dos dados foi realizada através do software GradPad Prism, versão 8.0, onde os dados foram, inicialmente, submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, para verificar a normalidade da amostra (paramétrico ou não paramétrico).

Os dados paramétricos foram analisados por meio do teste de análise de variância ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. Para os dados não paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando apresentaram o  $p < 0,05$ .

Todos os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M), exceto os scores histopatológicos que foram apresentados pelos valores de mediana  $\pm$  mínimo e máximo (variáveis sem distribuição normal), sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

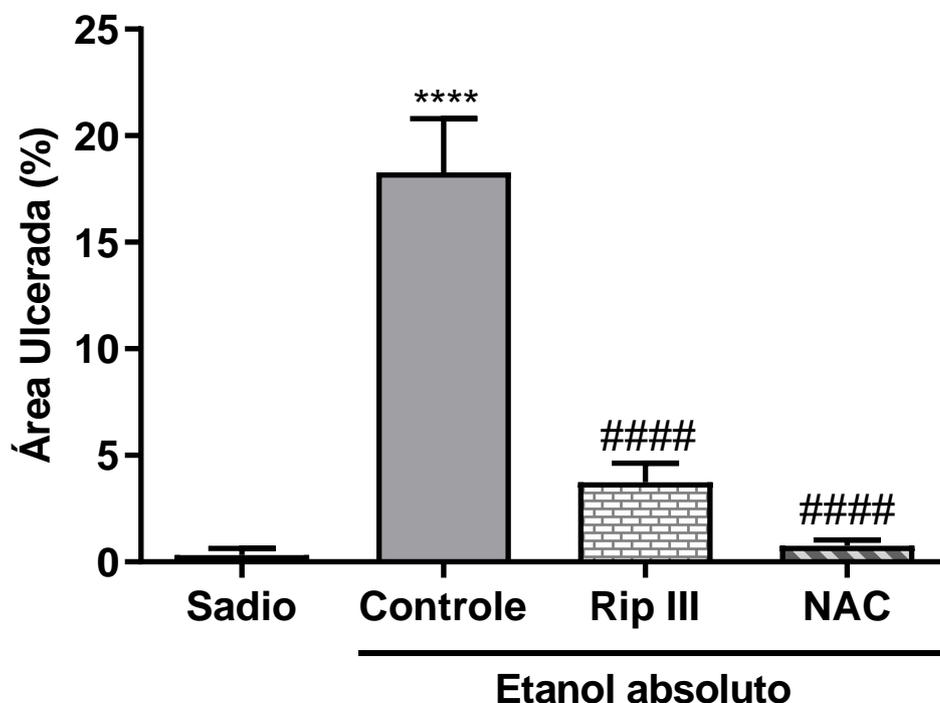
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da atividade gastroprotetora da Riparina III

#### 5.1.1 Efeito da Riparina III na lesão gástrica induzida por etanol

A administração de etanol absoluto produziu lesões significativas ( $18,27 \pm 2,52$ ) na mucosa gástrica quando comparado ao grupo sadio ( $0,32 \pm 0,32$ ). O pré-tratamento com a Riparina III na dose testada (50mg/kg) reduziu de forma estatisticamente significativa ( $3,73 \pm 0,89$ ) a área ulcerada causada pelo etanol. De forma semelhante, o pré-tratamento com o N-acetilcisteína (NAC, 300mg/kg), utilizado como fármaco de referência, também diminuiu significativamente a área lesionada ( $0,75 \pm 0,26$ ), quando comparado ao controle (Figura 8).

**Figura 8** – Efeito do tratamento com Riparina III em camundongos submetidos à lesão gástrica induzida por etanol.



Sadio (soro fisiológico 0,9%); Controle: Etanol absoluto (0,2mL/animal); Rip III (Riparina III 50mg/kg); NAC (N-acetilcisteína, 300mg/kg). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de área gástrica ulcerada. Para análise estatística, foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey, onde \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. Sadio; #### $p < 0,0001$  vs. Controle.

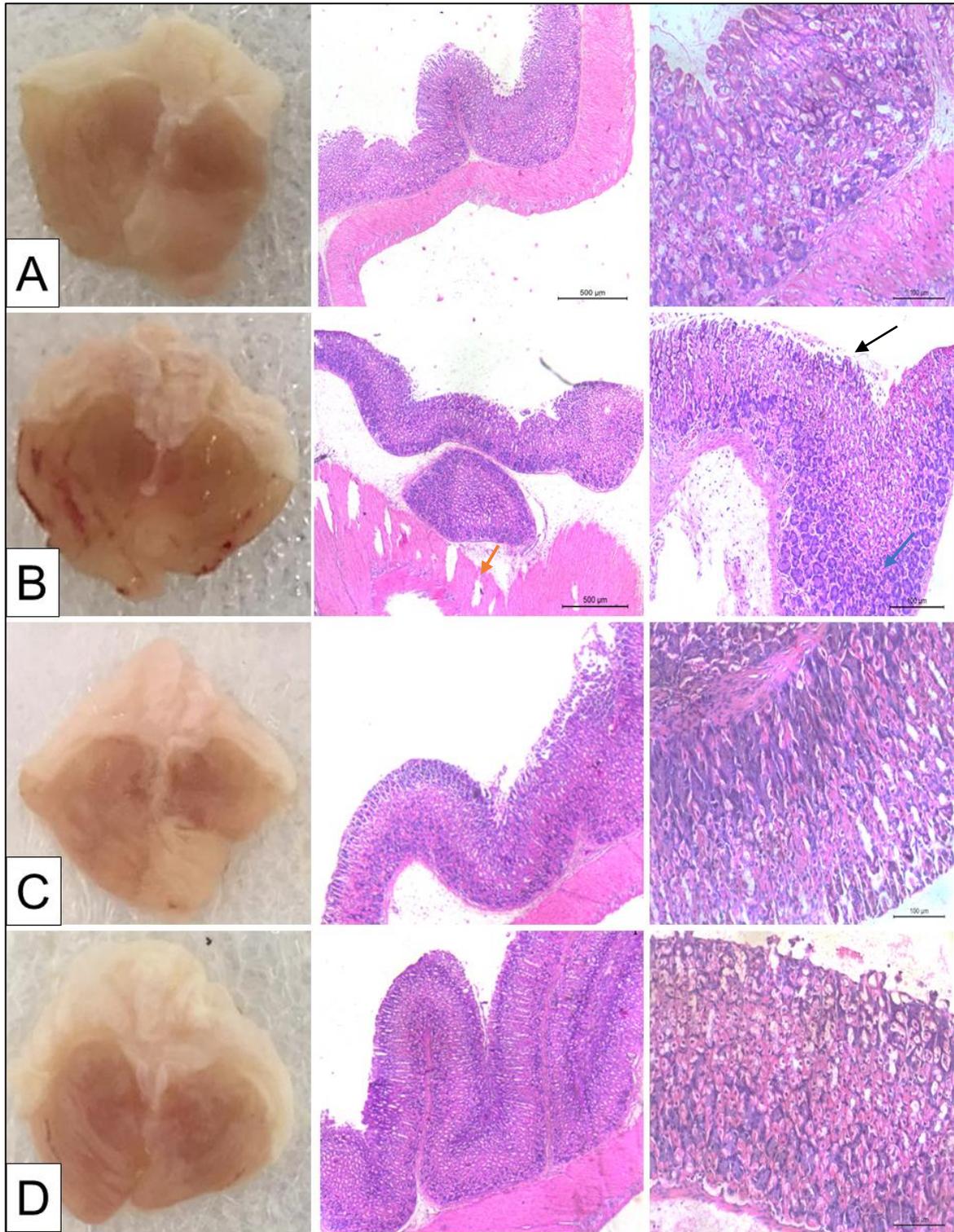
### **5.1.2 Efeito da Riparina III sobre as alterações histopatológicas em camundongos com lesão gástrica induzida por etanol**

Os resultados da análise histopatológica da mucosa gástrica estão demonstrados na Figura 9 e na Tabela 1. Foi possível observar que o grupo controle, tratado apenas com etanol (Figura 9B), demonstrou lesões graves caracterizadas por dano hemorrágico, edema, perda de células epiteliais e células inflamatórias, demonstrando diferença macroscópica e microscópica em relação aos animais sem lesão (Figura 9A).

O pré-tratamento com a Riparina III (Figura 9C) evidenciou uma redução das lesões promovidas pelo etanol, demonstrando características semelhantes ao grupo sadio. De igual forma, os animais pré-tratados com o NAC (Figura 9D) também apresentaram tais características.

Assim, o somatório dos escores dos parâmetros histopatológicos avaliados estão representados na tabela 1, onde verifica-se que a Rip III diminuiu de forma estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), os efeitos do etanol sobre tais parâmetros: perda de células epiteliais (escores de 0-3), edema (escores de 0-4) e infiltrado inflamatório (escores de 0-3), semelhante ao NAC.

**Figura 9** – Efeitos Macroscópicos e microscópicos da mucosa gástrica de camundongos submetidos à lesões gástricas induzidas por etanol e pré-tratados ou não com Riparina III.



Fotomicrografias dos estômagos abertos pela grande curvatura (A-D), seguido de análises microscópicas com aumento de 100x e 400x dos quatro grupos em estudo, onde A: grupo sadio (salina sem lesão); B: grupo controle (etanol 0,2mL/animal); C: Riparina (50mg/kg); D: N-acetilcisteína (300mg/kg), representados horizontalmente, e compostos por 3 fotos para cada grupo. Nota: perda de células epiteliais (seta preta); Edema (Seta laranja); Infiltrado inflamatório (seta azul).

**Tabela. 1** – Efeito da Riparina III em escores histopatológicos das lesões gástricas induzidas por etanol absoluto.

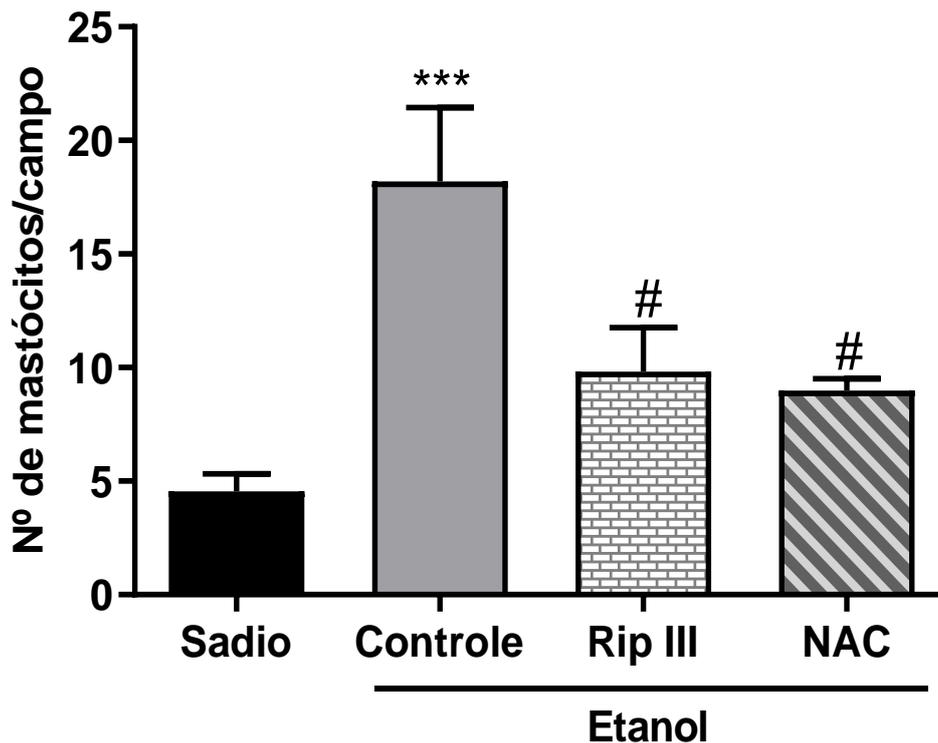
<b>Grupos Experimentais</b>	<b>Perda de células epiteliais (escore 0-3)</b>	<b>Edema (escore 0-4)</b>	<b>Hemorragia (escore 0-4)</b>	<b>Células inflamatórias (escore 0-3)</b>	<b>Total (escore 0-14)</b>
<b>Sadio</b>	0,0 (0-0)	0,3 (0-2)	0,3 (0-2)	0,1 (0-1)	0,7
<b>Controle</b>	3,0 (3-3)****	3,1 (3-4)***	3,0 (2-4)***	2,8 (2-3)***	11,9
<b>Rip III</b>	1,6 (1-3)##	1,0 (0-2)#	1,0 (0-2)	1,0 (0-2)#	4,6
<b>NAC</b>	1,0 (0-2)#####	1,3 (1-2)	1,0 (0-2)	1,3 (1-2)	4,6

Sadio (soro fisiológico 0,9%); Controle: Etanol absoluto (0,2mL); Rip III (Riparina III 50mg/kg); NAC (N-acetilcisteína, 300mg/kg). Os resultados são apresentados como mediana, com valores mínimos e máximos mostrados entre parênteses. Foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn's, onde \*\*\*p<0,001 vs. sadio; \*\*\*\*p<0,0001 vs. sadio; #p<0,05 vs. grupo controle; ##p<0,01 vs. Grupo controle; #####p<0,0001 vs. grupo controle.

### 5.1.3 Efeito da Riparina III sobre o número de mastócitos na mucosa gástrica de camundongos submetidos às lesões gástricas induzida por etanol

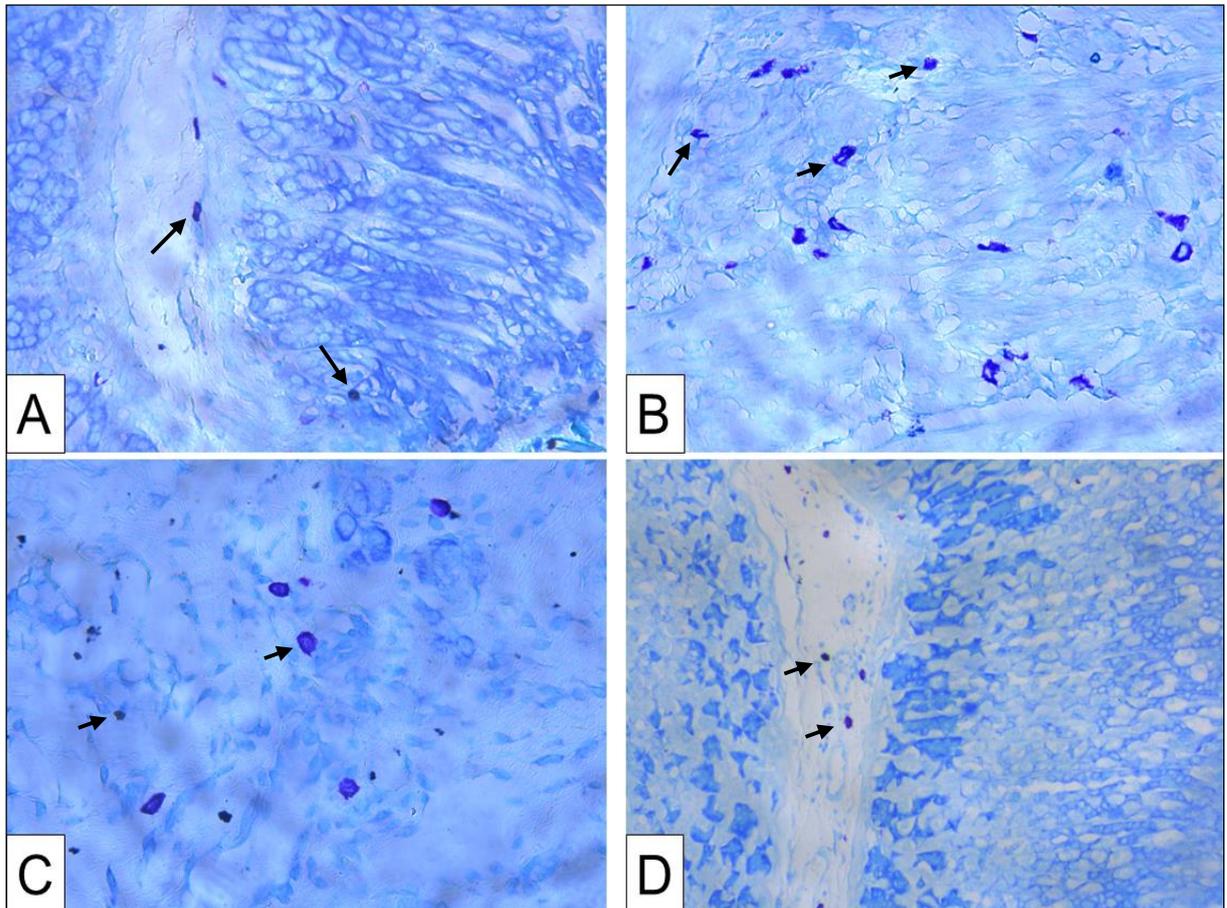
O grupo controle apresentou um aumento significativo no número de mastócitos na mucosa gástrica ( $18,20 \pm 3,25$ ) quando comparado ao grupo sadio ( $4,55 \pm 0,77$ ). Em contrapartida, a quantidade de mastócitos foi diminuída de forma estatisticamente significativa com a administração prévia de Riparina III ( $9,81 \pm 1,94$ ), semelhante ao NAC, utilizado como fármaco de referência ( $8,98 \pm 0,52$ ) (Figura 10 e 11).

**Figura 10** – Efeito da Riparina III sobre o número de mastócitos na mucosa gástrica de camundongos submetidos às lesões gástricas induzidas por etanol



Sadio (soro fisiológico 0,9%); Controle: Etanol absoluto (0,2mL/animal); Rip III (Riparina III 50mg/kg); NAC (N-acetilcisteína, 300mg/kg). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. de 10 campos. Para análise estatística, foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey, onde \*\*\* $p < 0,001$  vs. Sadio; # $p < 0,05$  vs. Controle.

**Figura 11** – Fotomicrografias da análise de mastócitos na mucosa gástrica de camundongos submetidos às lesões gástricas induzidas por etanol



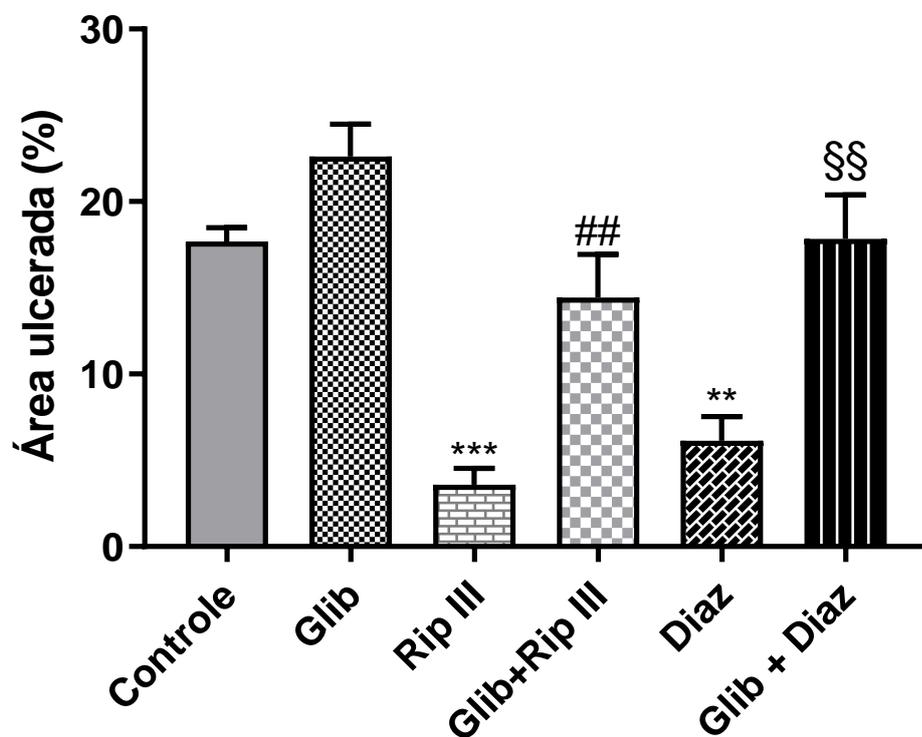
Os segmentos foram corados com Azul de Toluidina para a contagem de mastócitos. Setas pretas: indicação de mastócitos. A: Sadio (soro fisiológico 0,9%); B: etanol absoluto (0,2mL/animal); C: Rip III (Riparina III 50mg/kg); D: NAC (N-acetilcisteína, 300mg/kg). Os painéis foram obtidos na escala de 50  $\mu$ m (40x).

## 5.2 Avaliação do mecanismo de ação gastroprotetor da Riparina III

### 5.2.1 Participação dos canais de K-ATP-dependentes ( $K_{ATP}$ ) no efeito gastroprotetor da Riparina III no modelo de lesão gástrica induzida por etanol

A figura 12 demonstra que a administração de Riparina III ( $3,577 \pm 0,95$ ) e diazóxido ( $6,145 \pm 1,40$ ), um agonista dos canais de potássio, diminuiu de forma estatisticamente significativa a área ulcerada pelo etanol, quando comparado com o grupo controle ( $17,69 \pm 0,79$ ). A glibenclamida, antagonista dos canais de  $K_{ATP}$ , administrada previamente reverteu a gastroproteção da Riparina III ( $14,44 \pm 2,49$ ) e do diazóxido ( $17,84 \pm 2,54$ ).

**Figura 12** – Participação dos canais de potássio ATP-dependentes ( $K_{ATP}$ ) na gastroproteção da Riparina III no modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto em camundongos.

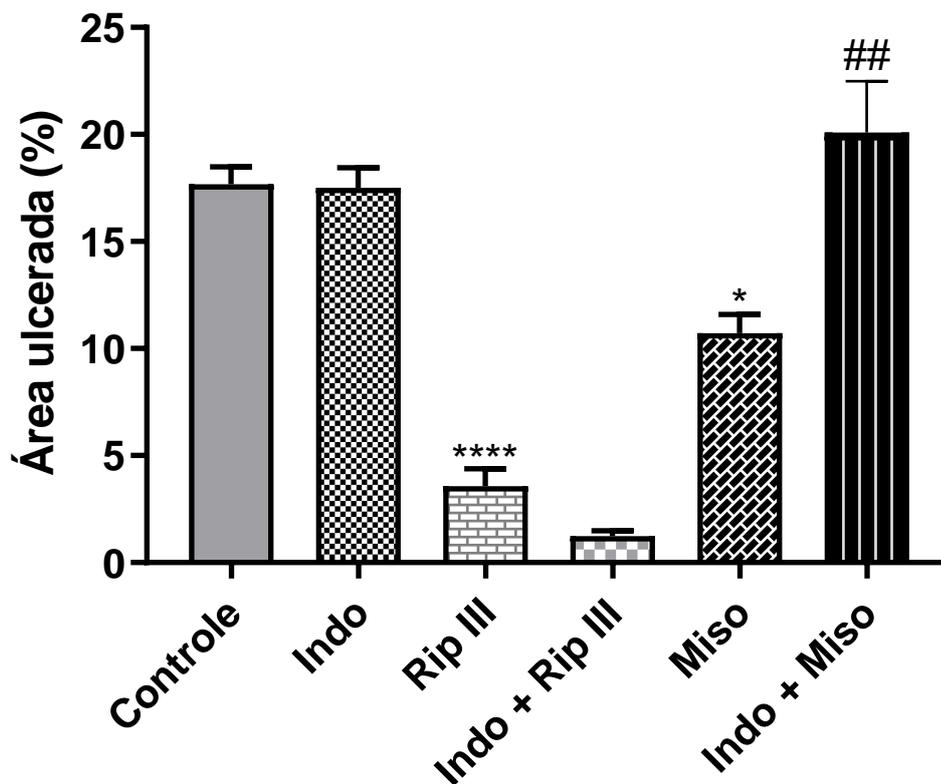


Controle: Etanol absoluto (0,2mL); Glib (Glibenclamida 5mg/kg); Rip III (Riparina III 50mg/kg); Glib + Rip III (Glibenclamida 5mg/kg + Riparina III 50mg/kg); Diaz (Diazóxido 3mg/kg); Glib + Diaz (Glibenclamida 5mg/kg + Diazóxido 3mg/kg). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de área gástrica ulcerada. Para análise estatística, foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey, onde \*\* $p < 0,01$  vs. controle; \*\*\* $p < 0,001$  vs. Controle; ## $p < 0,01$  vs. Rip III; §§ $p < 0,01$  vs. diazóxido.

### 5.2.2 Envolvimento da síntese de prostaglandinas no efeito gastroprotetor da Riparina III no modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto

A administração prévia de Riparina III ( $3,57 \pm 0,80$ ) e misoprostol ( $10,72 \pm 0,86$ ) diminuiu de forma estatisticamente significativa a área ulcerada pelo etanol, em comparação ao grupo controle ( $17,69 \pm 0,79$ ). A gastroproteção da Riparina III foi mantida ( $1,23 \pm 0,26$ ) mesmo com a administração prévia de Indometacina, um inibidor da síntese de prostaglandinas. Em contrapartida, houve um aumento da área ulcerada significativamente quando a indometacina foi administrada previamente ao misoprostol ( $20,10 \pm 2,38$ ) (Figura 13).

**Figura 13** – Envolvimento da síntese de prostaglandinas no efeito gastroprotetor da Riparina III no modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto em camundongos

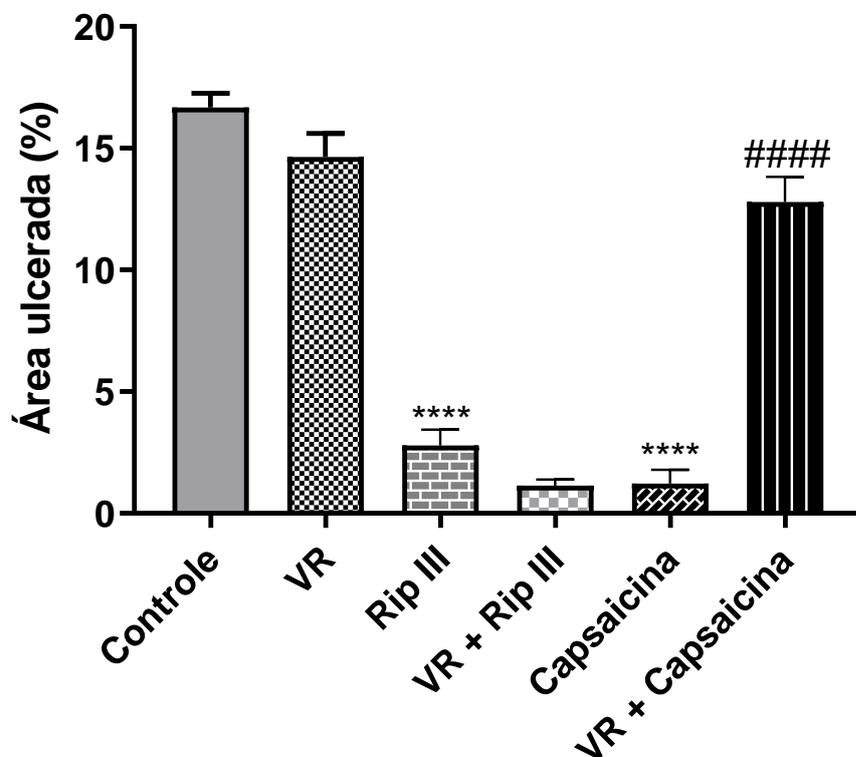


Controle: Etanol absoluto (0,2mL); Indo (Indometacina 10mg/kg); Rip III (Riparina III 50mg/kg); Indo + Rip III (Indometacina 10mg/kg + Riparina III 50mg/kg); Miso (misoprostol 70 µg/Kg); Indo + Miso (Indometacina 10mg/kg + misoprostol 70 µg/Kg). Os valores representam a média ± E.P.M. da porcentagem de área gástrica ulcerada. Para análise estatística, foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey, onde \* $p < 0,05$  vs. Controle; \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. Controle; ## $p < 0,01$  vs. misoprostol.

### 5.2.3 Envolvimento do receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1 (TRPV-1) no efeito gastroprotetor da Riparina III no modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto

Ao avaliar a participação dos receptores vaniloides na gastroproteção promovida pela Riparina III (Figura 14), observou-se que a administração prévia de Riparina III ( $2,78 \pm 0,65$ ) e capsaicina ( $1,22 \pm 0,56$ ) apresentou diminuição significativa da área ulcerada pelo etanol quando comparada ao grupo controle ( $16,68 \pm 0,57$ ). O pré-tratamento com vermelho de rutênio, um inibidor dos receptores TRPV-1, apresentou aumento da área ulcerada ( $14,64 \pm 0,96$ ), semelhante ao grupo controle, mas não reverteu os efeitos da Riparina III ( $1,13 \pm 0,25$ ). Em contrapartida, a capsaicina teve sua gastroproteção revertida pelo vermelho de rutênio ( $12,80 \pm 1,02$ ).

**Figura 14** – Envolvimento do receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1 (TRPV 1) no efeito gastroprotetor da Riparina III no modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto em camundongos.

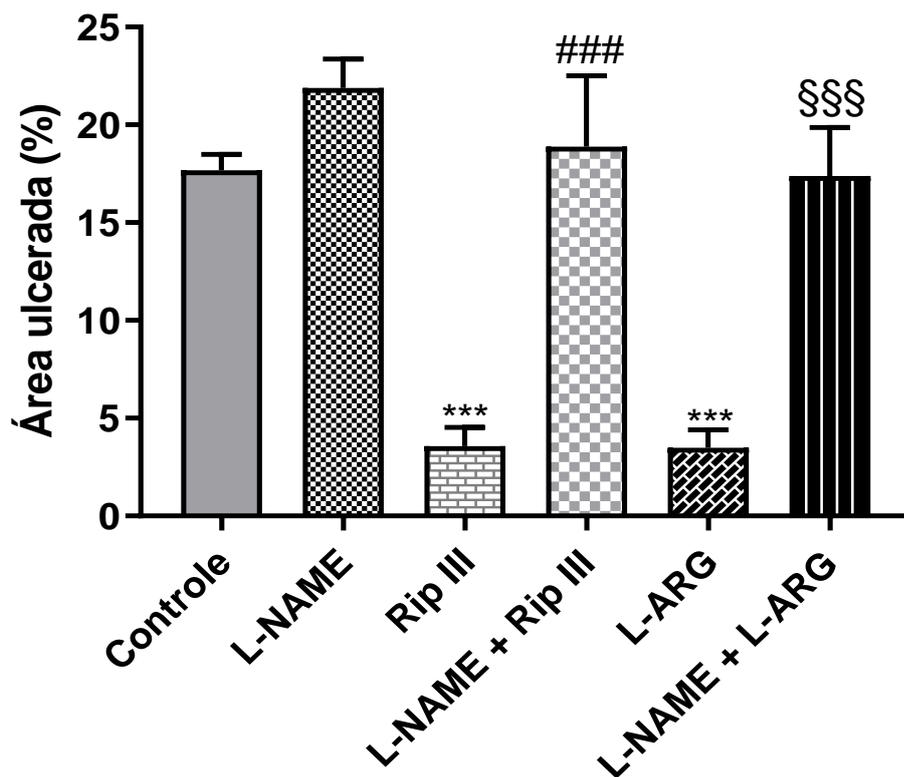


Controle: Etanol absoluto (0,2mL); VR (Vermelho de rutênio 3,6mg/kg); Rip III (Riparina III 50mg/kg); VR + Rip III (Vermelho de rutênio 3,6mg/kg + Riparina III 50mg/kg); VR + Capsaicina (Vermelho de rutênio 3,6mg/kg + Capsaicina 0,3mg/kg). Os valores representam a média ± E.P.M. da porcentagem de área gástrica ulcerada. Para análise estatística, foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey, onde \*\*\*\*p<0,0001 vs. Controle; ####p<0,0001 vs. capsaicina.

#### 5.2.4 Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor da Riparina III em modelo de lesão gástrica induzida por etanol

A Riparina III ( $3,57 \pm 0,95$ ) e a L-arginina ( $3,48 \pm 0,92$ ), administradas previamente, apresentaram diminuição significativa da área ulcerada pelo etanol quando comparada ao grupo controle ( $17,69 \pm 0,79$ ). A administração prévia de L-NAME interferiu na gastroproteção da Riparina III ( $18,89 \pm 3,57$ ) e da L-arginina ( $17,39 \pm 2,48$ ) em comparação ao grupo Riparina III e L-arginina respectivamente (Figura 15).

**Figura 15** – Envolvimento do óxido nítrico na gastroproteção da Riparina III em camundongos submetidos à lesão gástrica induzida pelo etanol.

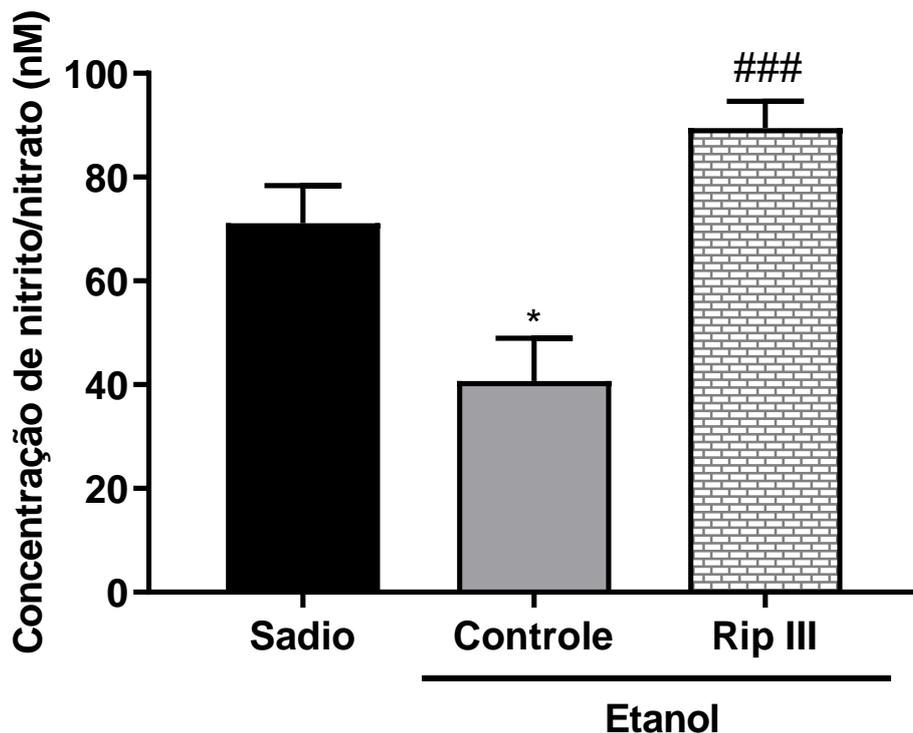


Controle: Etanol absoluto (0,2mL); L-NAME (L-NAME 10mg/kg); Rip III (Riparina III 50mg/kg); L-NAME + RIP III (L-NAME 10mg/kg + Riparina III 50mg/kg); L-ARG (L-ARGININA 600mg/kg); L-NAME + L-ARG (L-NAME 10mg/kg + L-arginina 600mg/kg). Os valores representam a média ± E.P.M. da porcentagem de área gástrica ulcerada. Para análise estatística, foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey, onde \*\*\*p < 0,001 vs. Controle; ###p < 0,001 vs. Rip III; §§§p < 0,001 vs. L-arginina.

### 5.3 Dosagem de nitrito/nitrato para confirmar o envolvimento do óxido nítrico na mucosa gástrica de animais com lesão gástrica induzida por etanol

A concentração de nitrito/nitrato nos homogenatos dos estômagos foi dosada para confirmar o entendimento da participação do óxido nítrico na gastroproteção promovida pela Riparina III (Figura 16). Corroborando com os achados do experimento anterior, o grupo pré-tratado com Riparina III mostrou níveis de nitrito bem maior ( $89,44 \pm 5,20$ ) que o grupo que recebeu o etanol tratado apenas com salina ( $40,74 \pm 8,20$ ). O grupo tratado apenas com salina ( $71,09 \pm 7,27$ ) também apresentou aumento de nitrito de forma estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle (Figura 16).

**Figura 16** – Avaliação da concentração de nitrito/nitrato na mucosa gástrica de animais com lesão gástrica induzida por etanol

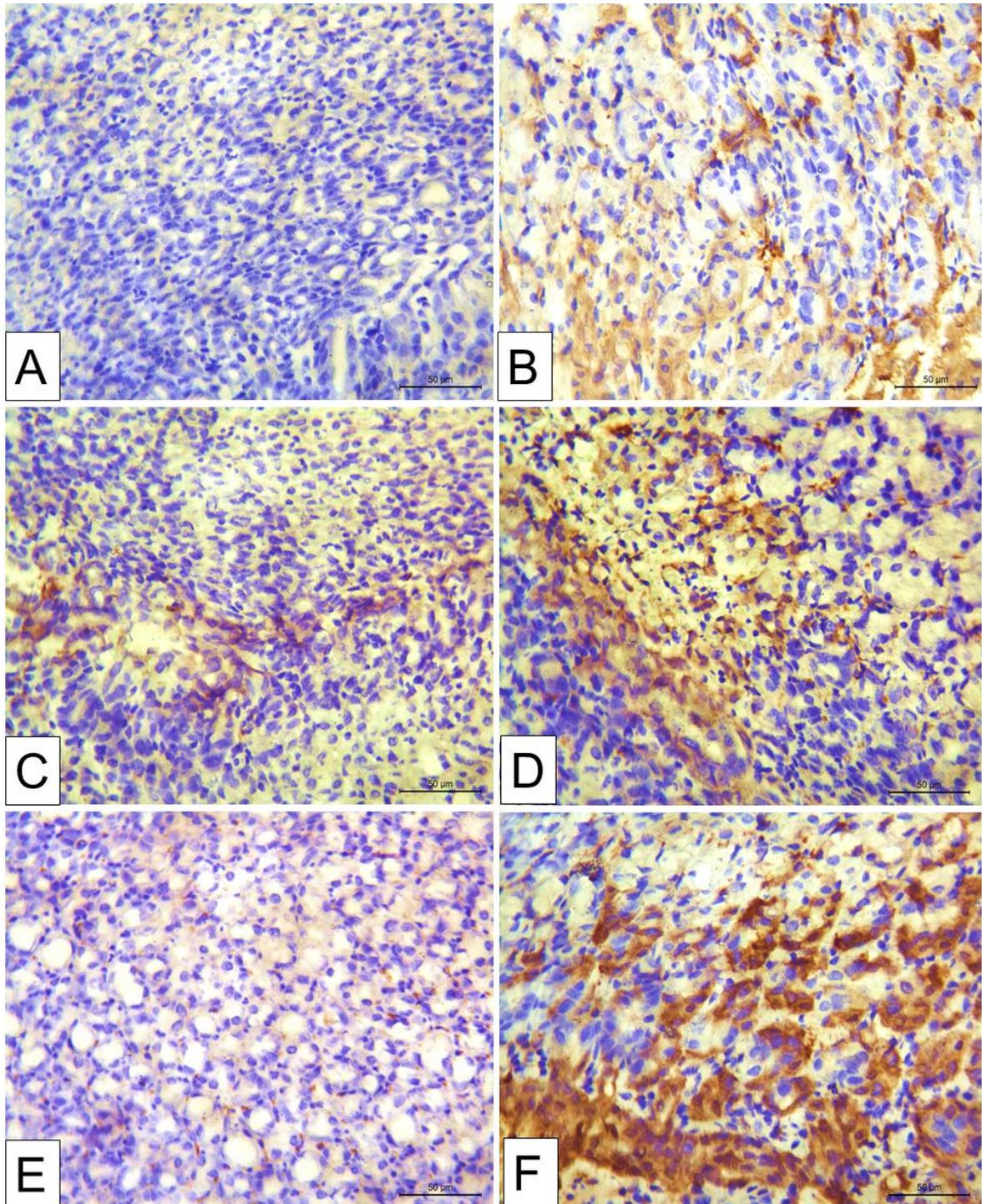


Sadio (soro fisiológico 0,9%); Controle (Etanol absoluto (0,2mL); Rip III (Riparina III 50mg/kg). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M., para a concentração de nitrito. Para a análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de Teste de Tukey, onde \* $p < 0,05$  vs. Sadio; ### $p < 0,001$  vs. Controle.

#### **5.4 Avaliação da Imunomarcção para iNOS**

A partir da fotomicrografia da imunomarcção para iNOS (Figura 17), pode-se observar que o grupo tratado com a Riparina III (painel D) apresentou um aumento da imunomarcção nas células das glândulas gástricas em relação àquela observada no grupo controle (com lesão gástrica induzida por etanol) (painel C), o qual demonstrou uma imunomarcção sutil para iNOS quando comparada ao grupo sadio (sem lesão e tratado somente com veículo) (painel B). Além disso, observou-se um aumento da área imunomarcada no grupo pré-tratado com L-arginina (painel F), em contrapartida com o grupo L-NAME, um bloqueador da síntese do óxido nítrico, onde demonstrou sua atividade, diminuindo a imunomarcção para iNOS (painel E).

**Figura 17** – Fotomicrografias de imunohistoquímica para iNOS de estômagos de camundongos



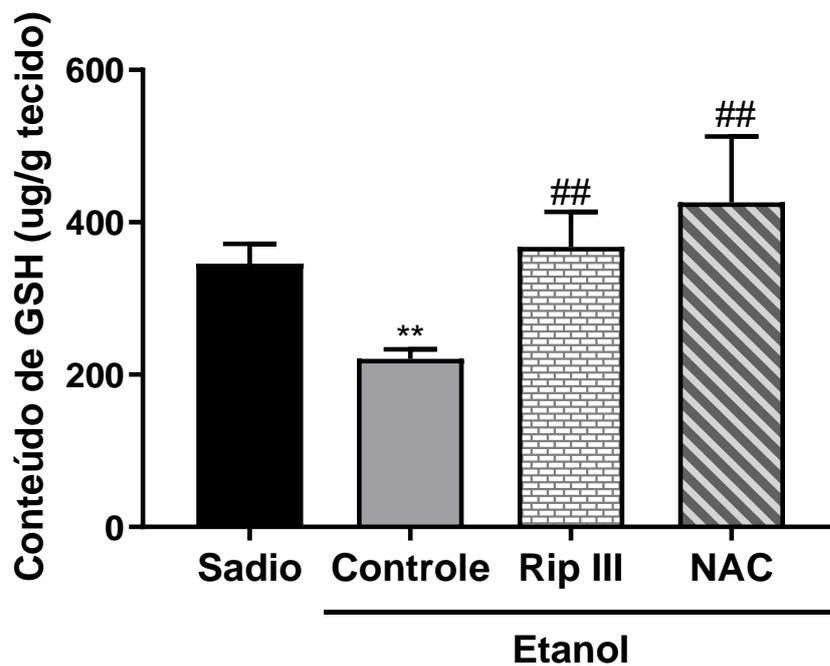
(A) Controle negativo; (B) Grupo sadio (soro fisiológico 0,9%, sem etanol); (C) Controle (animais submetidos à lesão gástrica pelo etanol); (D) Animais submetidos à lesão gástrica pelo etanol com pré-tratamento com Riparina III 50 mg/Kg; (E) Animais submetidos à lesão gástrica pelo etanol com pré-tratamento com L-NAME; (F) Animais submetidos à lesão gástrica pelo etanol com pré-tratamento com L-arginina (aumento de 100x). O controle negativo (A) representa uma amostra do estômago onde o anticorpo primário foi substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostra marcação para iNOS.

## 5.5 Avaliação da atividade antioxidante da Riparina III frente às lesões gástricas induzidas por etanol

### 5.5.1 Envolvimento da glutathiona reduzida (GSH) no efeito gastroprotetor da Riparina III no modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto

Os animais que receberam etanol sozinho (grupo controle) mostraram redução significativa nos níveis de GSH ( $220 \pm 12,24$ ) quando comparado com o grupo sadio (não ulcerado) ( $345,7 \pm 26,01$ ). O pré-tratamento com a Riparina III ( $367,9 \pm 45,91$ ) e NAC ( $426,2 \pm 86,42$ ) demonstraram elevação do conteúdo gástrico de GSH quando comparado com o grupo controle (Figura 18).

**Figura 18** – Avaliação do envolvimento da glutathiona reduzida (GSH) no efeito gastroprotetor da Riparina III no modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto.

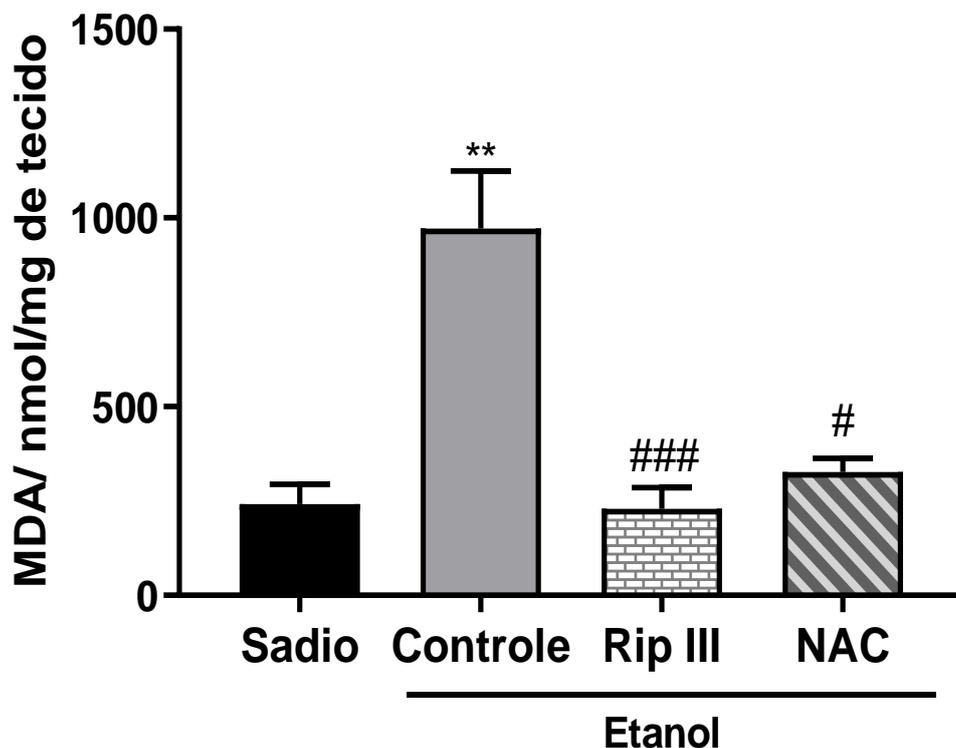


Sadio (soro fisiológico 0,9%); Controle (Etanol absoluto (0,2mL); Rip III (Riparina III 50mg/kg); NAC (N-acetilcisteína, 300mg/kg). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M., para a concentração de GSH. Para a análise estatística foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido do pós teste de Dunns. Valores considerados significativos quando  $p < 0,05$ , onde \*\* $p < 0,01$  vs sadio; ## $p < 0,01$  vs controle.

### 5.5.2 Determinação dos níveis de malondialdeído no efeito gastroprotetor da Riparina III no modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto

Os níveis de MDA nos estômagos ulcerados apresentaram níveis aumentados ( $972,0 \pm 152,2$ ) quando comparado com o grupo sadio ( $242,0 \pm 51,85$ ). No estômago dos animais pré-tratados com Riparina III ( $229,5 \pm 56,69$ ) e NAC ( $326,3 \pm 36,86$ ) houve diminuição significativa desses níveis quando comparado com o grupo controle (Figura 19).

**Figura 19** – Avaliação dos níveis de MDA no efeito gastroprotetor da Riparina III no modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto



Sadio (soro fisiológico 0,9%); Controle (Etanol absoluto (0,2mL); Rip III (Riparina III 50mg/kg); NAC (N-acetilcisteína, 300mg/kg). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M., para a concentração de MDA. Para a análise estatística foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido do pós teste de Dunn. Valores considerados significativos quando  $p < 0,05$ , onde \*\* $p < 0,01$  vs sadio; # $p < 0,05$  vs controle; ### $p < 0,01$  vs controle

## 6 DISCUSSÃO

As úlceras gástricas afetam cerca de 5 a 10% da população mundial e são identificadas como uma doença grave, causada por lesão da mucosa estomacal, proveniente de fatores associados, como tabagismo, estresse, ingestão crônica de álcool e de anti-inflamatórios não-esteroides (AINES). Além disso, também está envolvida com aumento da secreção de ácido gástrico e infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* (SONG et al., 2018).

Uma das principais causas da úlcera gástrica é o desequilíbrio entre fatores defensivos e agressivos e, nesse contexto, o álcool, utilizado como indutor de úlcera no presente trabalho, atua destruindo diretamente a camada protetora da mucosa pela depleção de muco e bicarbonato (KRON, 2008). Além disso, o dano irreversível ao tecido estomacal associado à inflamação severa, favorecem um maior risco de sangramento na parte gástrica superior, úlcera ou até câncer gástrico. Assim, é necessário a proteção do tecido gástrico contra lesões, a fim de prevenir o desenvolvimento de potenciais doenças relacionadas (ZHANG et al., 2019).

Existem vários modelos experimentais de lesão gástrica, embora não representem exatamente o mecanismo de todas as úlceras. Dentre eles, o modelo de úlcera por etanol é o mais utilizado, uma vez que permite uma indução rápida, pode ser amplamente utilizado para testar a eficácia de drogas potenciais, e as úlceras induzidas são semelhantes às úlceras agudas em humanos (SONG et al., 2018).

Atualmente, pesquisadores tem buscado por um tratamento eficaz e seguro da úlcera, porém mais acessível e com menos efeitos adversos quando comparados aos medicamentos disponíveis. Neste contexto, a pesquisa por produtos naturais como possíveis terapias complementares e alternativas tem crescido muito e se tornado muito promissora (BOUTEMINE et al., 2018).

Com base nestas considerações, no presente trabalho, investigou-se o potencial efeito gastroprotetor da Riparina III sobre às lesões gástricas induzidas pelo etanol absoluto em camundongos, justificando-se como base nos efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos apresentados por esta substância previamente (VASCONCELOS, 2015).

Inicialmente, foi demonstrado a eficiência do modelo, visto que o etanol causou alterações histopatológicas condizentes com a úlcera gástrica, de acordo com

os achados histopatológicos obtidos neste estudo. Corroborando com estes dados, já foi demonstrado que o etanol é um irritante exógeno que danifica as células mucosas gastrointestinais e induz úlceras gástricas por diferentes mecanismos moleculares. A patogênese desta doença inclui a produção de lesões hemorrágicas provenientes do etanol, bem como edema, destruição da mucosa e infiltrado de células inflamatórias (ABDELFATTAH et al., 2019; SAHIN et al., 2018), todos nitidamente observados em nossos resultados.

De forma interessante, a eficácia da Riparina III em reverter as alterações histopatológicas causadas pelo etanol no presente trabalho é corroborada com achados prévios, no qual é relatado que a família Lauraceae, a qual pertence a Riparina III, possui muitas espécies utilizadas popularmente como medicamentos para lesões cutâneas, distúrbios gástricos e como anti-inflamatórios (DOS SANTOS et al., 2011).

A mastocitose, ou seja, aumento da infiltração de mastócitos, ocorrida após a administração de etanol é bem descrita na literatura como capaz de gerar, no tecido inflamado, recrutamento de múltiplas células inflamatórias, que estão altamente associadas à percepção de antígenos pelo sistema imune. Neste contexto, sabe-se, que a lesão gástrica promove um processo inflamatório envolvendo os mastócitos, os quais, após serem ativados por diferentes estímulos, liberam de seus grânulos citoplasmáticos substâncias como histamina, leucotrienos e fator ativador de plaquetas (AL ASMARI et al., 2016). A histamina por exemplo, estimula a secreção gástrica via receptor H<sub>2</sub> na mucosa do estômago. Ela quando liberada dos mastócitos na submucosa estimula a produção de ácido adicional, podendo ocorrer infiltração celular, e conseqüentemente aumentar a interrupção da função da mucosa e diminuir a capacidade de cicatrização tecidual (STURGES, 2001).

Outros estudos que avaliaram o papel dos mastócitos na lesão gástrica também revelaram um aumento desse tipo de células, causados pela administração do etanol em comparação aos animais tratados apenas com salina, e provavelmente esse aumento está relacionado com a gravidade da inflamação e da úlcera (DINIZ et al., 2015; SAGUN et al., 2017; YANG et al., 2017).

Nitidamente, a reversão da mastocitose observada pela diminuição na contagem de mastócitos no segmento estomacal após o tratamento com a Riparina III, confirma sua potencial contribuição para diminuir a resposta inflamatória. De fato,

este efeito em diminuir o número de mastócitos neste trabalho, e conseqüentemente reduzir a inflamação, pode ser corroborado por alguns trabalhos realizados no nosso Laboratório de Neuropsicofarmacologia da Universidade Federal do Ceará. Vasconcelos (2015), por exemplo, demonstrou que a Riparina III reduz significativamente a resposta nociceptiva induzida no teste da formalina, indicando que o mecanismo de ação desta substância pode estar relacionado com a inibição de mediadores inflamatórios. Além disso, Carvalho et al. (2013) verificou, em um modelo de edema de pata induzida por dextrana, que a Riparina II, que diferencia-se da Riparina III apenas por ter um radical hidroxila a menos, apresentou atividade anti-inflamatória, observada pela redução do edema de pata, e que este efeito pode estar relacionado ao bloqueio dos receptores de histamina ou inibição de sua liberação pelos mastócitos.

Considerando os resultados promissores e inéditos apresentados pela Riparina III na gastroproteção, sequencialmente, decidimos caracterizar se esta ação estaria relacionada a mecanismos envolvendo a participação de canais de potássio ATP dependentes ( $K_{ATP}$ ), prostaglandinas, receptores de potencial transitório vaniloide tipo 1 (TRPV-1) e óxido nítrico (NO).

Vale a pena salientar que a investigação do envolvimento dos canais de  $K_{ATP}$  como alvos terapêuticos é importante já que agonistas e antagonistas destes estão sendo usados em testes clínicos, uma vez que esta via exerce um papel importante na regulação da motilidade gastrointestinal. Adicionalmente é relevante destacar que estes canais foram identificados inicialmente em miócitos cardíacos, mas também foram encontrados em vários tecidos, como células das ilhotas pancreáticas, neurônios, músculo vascular e músculo liso gastrointestinal (LI; LEI; CHEN, 2017).

Foi demonstrado no presente estudo que o grupo de animais pré-tratados com a riparina III, quando combinado com a glibenclamida tiveram seus efeitos protetores gástricos diminuídos, sugerindo que os canais de potássio sensíveis ao ATP estão envolvidos na atividade gastroprotetora da riparina III. De fato, já é descrito que a abertura destes canais participa da proteção da mucosa gástrica regulando a ativação de fibras aferentes, no relaxamento dos vasos que suprem a mucosa e na modulação da secreção de muco gástrico. Assim, o aumento do fluxo sanguíneo gástrico pela ativação dos nervos aferentes ocorre de forma concomitante à redução

da área gástrica lesionada, sendo esse efeito suprimido pela administração de glibenclamida, um bloqueador do canal de  $K_{ATP}$  (ARUNACHALAM et al., 2019; DE SALES et al., 2018; LI; LEI; CHEN, 2017). A ação da glibenclamida envolve a redução da permeabilidade das células ao  $K^+$ , causando despolarização e influxo de  $Ca^{2+}$ , induzindo uma vasoconstrição gástrica e diminuição do fluxo sanguíneo na região afetada, favorecendo, assim, a formação de úlceras (BENTO et al., 2016).

Outro trabalho corrobora com os nossos na reversão do efeito gastroprotetor pela glibenclamida (De Sales et al., 2018) onde este antagonista também diminuiu a proteção do tecido gástrico mediada pelo extrato etanólico de *Cissampelos sympodialis*, o qual é rico em substâncias como alcaloides, flavonoides e compostos fenólicos, que podem estar envolvidos no efeito observado.

Dando continuidade à investigação de mecanismos pelos quais a Riparina III exerce sua gastroproteção, destaca-se o papel das prostaglandinas (PGs) que desempenham papel fundamental na região estomacal, melhorando o fluxo sanguíneo e mantendo a integridade celular da mucosa. Além disso, são responsáveis por promover a secreção de muco e bicarbonato que fortalecem a resistência das células gástricas à efeitos lesivos (CHEN et al., 2019).

A indometacina, um inibidor da síntese de prostaglandinas, administrada previamente ao grupo de animais tratados com Riparina III, não foi capaz de reverter o efeito gastroprotetor observado, sugerindo que esta atividade parece não depender da síntese de prostaglandinas. Porém, vale destacar que estudos realizados previamente por Eguchi et al. (2007) demonstraram que algumas ações das prostaglandinas, como a vasodilatação, estão relacionadas à ativação de canais de  $K_{ATP}$  pela proteína quinase A (PKA), e este mecanismo atua, pelo menos em parte, como mediador na gastroproteção. Além disso, o efeito gastroprotetor promovido pelas prostaglandinas é inibido não apenas pela indometacina, mas também pela glibenclamida, um fármaco inibidor dos canais de  $K_{ATP}$  (PESKAR; EHRLICH; PESKAR, 2002). Diante disso, não podemos descartar a hipótese de que as prostaglandinas possam atuar indiretamente no mecanismo de gastroproteção da Riparina III por meio da ativação dos canais de  $K_{ATP}$ .

Foi analisado ainda o papel do receptor TRPV-1 ou simplesmente receptores vaniloides, no efeito gastroprotetor da Riparina III. Estes alvos são caracterizados como receptores de membrana e expressos por muitos neurônios

sensoriais nociceptivos. Quando ativados, atuam como um canal não-específico de cátions, permitindo o influxo de cálcio, e desencadeando sensações de dor. Alguns ativadores endógenos de TRPV-1 são o calor, baixo pH e certos metabólitos lipídicos. Como ativador exógeno mais conhecido, tem-se a capsaicina, responsável pelo ardor das pimentas (MCCARTY; DINICOLANTONIO; O'KEEFE, 2015).

A utilização de capsaicina no tratamento da dor é justificada pela sua ação em promover a excitação seletiva e posterior dessensibilização dos neurônios nociceptivos desencadeada pela ativação de receptores vaniloides, levando a uma elevação dos níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$ . Dependendo da concentração e da duração da exposição a vaniloides, o influxo de cálcio via TRPV-1 dessensibiliza os próprios canais, significando não apenas um mecanismo de *feedback* que protege a célula da sobrecarga tóxica de  $Ca^{2+}$ , como também contribui para os efeitos analgésicos da capsaicina (VYKLICKÝ et al., 2008).

No presente estudo, foi utilizado a capsaicina que age sobre os neurônios sensoriais estimulando os receptores de membrana, predominantemente receptores vaniloides. Há evidências de seu papel em acelerar a cicatrização de úlceras gástricas, inibindo a secreção de ácido gástrico, aumentando a secreção alcalina e de muco, estimulando a microcirculação gástrica e exercendo efeitos vasodilatadores, via óxido nítrico (SATYANARAYANA, 2006; SHARMA; VIJ; SHARMA, 2013).

Diante disso, nossos dados demonstraram que a Riparina III, de forma semelhante à capsaicina, reduziu significativamente o percentual da área ulcerada quando comparada com o grupo etanol. Além disso, essa ação gastroprotetora da Riparina não foi revertida pelo vermelho de rutênio, um antagonista do receptor TRPV-1, que embora não interfira com o sítio de ligação do receptor, bloqueia o canal iônico ativo (SANTOS et al., 2019), nos fornecendo evidências de que possivelmente não há participação dos receptores TRPV-1 no mecanismo de ação da Riparina III. Entretanto utilizando um modelo de nocicepção induzida por capsaicina (VASCONCELOS, 2015), demonstrou que a Riparina III inibiu, significativamente, a resposta induzida pela capsaicina, sugerindo a participação dos canais de TRPV.

Além dos mecanismos já discutidos anteriormente, no presente trabalho também procuramos avaliar o papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor da Riparina III frente à lesão gástrica induzida por etanol, considerando que esse mediador já está bem descrito como fator crucial na defesa da mucosa

gastrointestinal. Estes mecanismos de incluem a adesão de neutrófilos, secreção de muco e aumento do fluxo sanguíneo da mucosa, os quais podem ser mediados pelas prostaglandinas (RIOS et al., 2010).

Os dados obtidos na presente pesquisa sugerem que o NO parece ser um mediador chave na defesa da mucosa gástrica induzida pela Riparina III, uma vez que o pré-tratamento com L-NAME, um inibidor não seletivo da NO-sintase, conseguiu reverter sua gastroproteção contra a lesão induzida pelo etanol. Corroborando esses dados, Silva et al. (2014) afirma que o NO desempenha um papel crítico na integridade da mucosa, seja por ação direta, seja pela modulação dos efeitos de outras substâncias envolvidas em importantes funções fisiológicas, como a regulação do fluxo sanguíneo da mucosa e da geração de muco. Adicionalmente, trabalhos relatam que a gastroproteção é promovida por doadores de NO e L-arginina que aceleram a cicatrização de úlceras gástricas, enquanto a inibição do NO pelo L-NAME em modelos animais de úlcera gástrica agrava a lesão (HEEBA; HASSAN; AMIN, 2009; SILVA et al., 2014).

Considerando-se, que neurônios aferentes sensíveis à capsaicina contribuem para o aumento da formação de NO pela enzima óxido nítrico sintase, e que este tem sido relatado modular a integridade da mucosa gástrica, a secreção de muco e o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica, não se pode descartar a hipótese de uma possível atuação da Riparina III nos processos de vasodilatação ou microcirculação indiretamente via modulação do NO.

Para complementar a investigação do papel do NO na proteção gástrica da Riparina III na úlcera induzida por etanol, foram avaliados os níveis de nitrito ( $\text{NO}^{2-}$ ) e nitrato ( $\text{NO}^{3-}$ ) na mucosa gástrica, como uma estimativa da produção de NO, bem como também se avaliou a expressão de iNOS. Estes ânions inorgânicos são produtos do metabolismo endógeno do NO, o qual é oxidado no sangue e nos tecidos para formar estes compostos (SILVA et al., 2014).

Diante dessas informações, observou-se neste estudo uma redução dos níveis de nitrito e nitrato no tecido gástrico induzida por etanol, sendo tal efeito revertido pelo pré-tratamento com a Riparina III que elevou estes níveis para valores semelhantes aos observados nos grupos saudáveis, confirmando que esta substância pode realmente atuar na via do óxido nítrico. Além disso, o grupo tratado com a Riparina apresentou uma maior marcação imunohistoquímica para iNOS em

comparação aos animais controle, demonstrando assim que existe uma maior expressão desta enzima nos animais tratados com a Riparina III.

Visando caracterizar a propriedade gastroprotetora da Riparina III frente aos danos gástricos, avaliou-se o possível efeito antioxidante promovido pela substância em estudo, uma vez que o estresse oxidativo é considerado como um dos fatores mais importantes na fisiopatologia das úlceras gástricas induzidas por etanol. Este é gerado, juntamente com a peroxidação lipídica das células, pelo desequilíbrio entre a formação e neutralização de pró-oxidantes e antioxidantes, associado a um aumento dos radicais livres e das espécies reativas de oxigênio (EROs). Esta busca justifica-se por relatos da importância de compostos naturais com propriedades antioxidantes para reduzir complicações geradas pelo estresse oxidativo (ROY; CHENKUAL; GURUSUBRAMANIAN, 2016; SAGUN et al., 2017).

Nesse contexto, evidências crescentes têm sugerido que o etanol está relacionado à produção excessiva de EROs no tecido gástrico, perturbando conseqüentemente a integridade e a permeabilidade das membranas celulares, levando à morte celular e facilitando a formação de úlceras na mucosa gástrica (AMIRSHAHROKHI; KHALILI, 2017). Nas úlceras gástricas, o estresse oxidativo também é aumentado pela penetração de neutrófilos ativados, que produzem espécies reativas de oxigênio e dessa forma, desempenham um papel decisivo no desenvolvimento de inflamação e lesão da mucosa gástrica (SONG et al., 2018).

Assim, foi mensurado também a atividade do malondialdeído (MDA), que é um dos marcadores comuns do estresse oxidativo (SONG et al., 2018). Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que o processo de lipoperoxidação lipídica induzido pelo etanol foi reduzido pelo pré-tratamento da Riparina III. Esse achado indica uma possível propriedade antioxidante desta substância, e dessa forma, representa um importante mecanismo para impedir danos na mucosa gástrica.

Semelhante aos dados do presente estudo, dados anteriores também demonstraram o papel crítico do estresse oxidativo observado através de um aumento na peroxidação lipídica no modelo experimental de úlceras da mucosa gástrica, e uma redução dos níveis plasmáticos de MDA pela ação protetora das substâncias testadas (AMIRSHAHROKHI; KHALILI, 2017; LIU et al., 2016). Além disso, trabalhos realizados em nosso laboratório demonstraram que a Riparina III foi capaz de diminuir os níveis de MDA no hipocampo e no corpo estriado de animais submetidos a eventos

estressantes, sugerindo que seus efeitos podem ser mediados, pelo menos em parte, pela inibição da peroxidação lipídica (MELO, 2012).

Vale salientar que nos últimos 20 anos o MDA tem sido reconhecido como um importante indicador de peroxidação lipídica em estados patológicos, sendo mensurado por diferentes métodos químicos. Indivíduos afetados por várias doenças têm os níveis de MDA aumentados em amostras biológicas, avaliados através do teste da reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), denominado também teste das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (Thiobarbituric Acid-Reactive Substances – TBARS) (FRANÇA et al., 2013).

O aumento da peroxidação lipídica perturba a integridade, a fluidez e a permeabilidade das biomembranas, além de modificar lipoproteínas pró-inflamatórias, o que gera produtos potencialmente tóxicos, com propriedades mutagênicas e cancerígenas (PIECHOTA-POLANCZYK; FICHNA, 2014).

Um dos antioxidantes celulares mais importante na defesa intracelular contra os danos oxidativos induzidos por EROs, é o GSH, um tripeptídeo contendo tiol, produzido em altos níveis pela mucosa gástrica. É um potente eliminador de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos no citosol e mitocôndrias, e sua redução tornam as células mais susceptíveis a danos (AMIRSHAHROKHI; KHALILI, 2017).

A atuação da glutathiona reduzida (GSH) como fator vital nas funções metabólicas de proteção ou no sistema antioxidante, depende de sua regeneração através do ciclo catalítico, de atividade de três grupos de enzimas que se relacionam para exercer suas funções: glutathiona oxidase (GSH-O ou GO), glutathiona peroxidase (GSH-Px ou GPX) e glutathiona redutase (GSH-Rd ou GR). A GO e GPX catalisam a oxidação de GSH à glutathiona oxidada (GSSG). Esta última pode também reduzir hidroperóxidos, como  $H_2O_2$  a  $H_2O$  e hidroperóxidos de lipídeos (ROOH) para álcoois estáveis correspondentes. A GR é responsável pela regeneração de GSH, a partir de GSSG, na presença de NADPH (CHENG et al., 2017; HUBER; ALMEIDA; DE FÁTIMA, 2008).

Já foi demonstrado que o dano gástrico induzido pelo etanol está associado a uma diminuição significativa dos níveis de GSH no tecido gástrico (ANTONISAMY et al., 2014; VERMA; KUMAR, 2018). Estes dados são semelhantes ao encontrado em nosso trabalho, onde o pré-tratamento com a Riparina III inibiu a depleção de GSH em camundongos expostos ao etanol, demonstrando um efeito gastroprotetor contra

o estresse oxidativo. Além disso, essa ação antioxidante da Riparina III também foi previamente relatada no estudo de Melo (2012) onde esta substância aumentou os níveis de GSH no hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal nos animais após o estresse induzido pelo nado forçado.

O presente trabalho é promissor pois apresenta a Riparina III, uma substância inicialmente oriunda de produtos naturais, com uma importante atividade gastroprotetora. Esta área de pesquisa desperta bastante o interesse da indústria farmacêutica devido a diversidade de compostos bioativos da flora brasileira, importantes para o tratamento de diversas doenças.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados inéditos obtidos no presente trabalho e considerando o que foi discutido até o momento, pode-se concluir que:

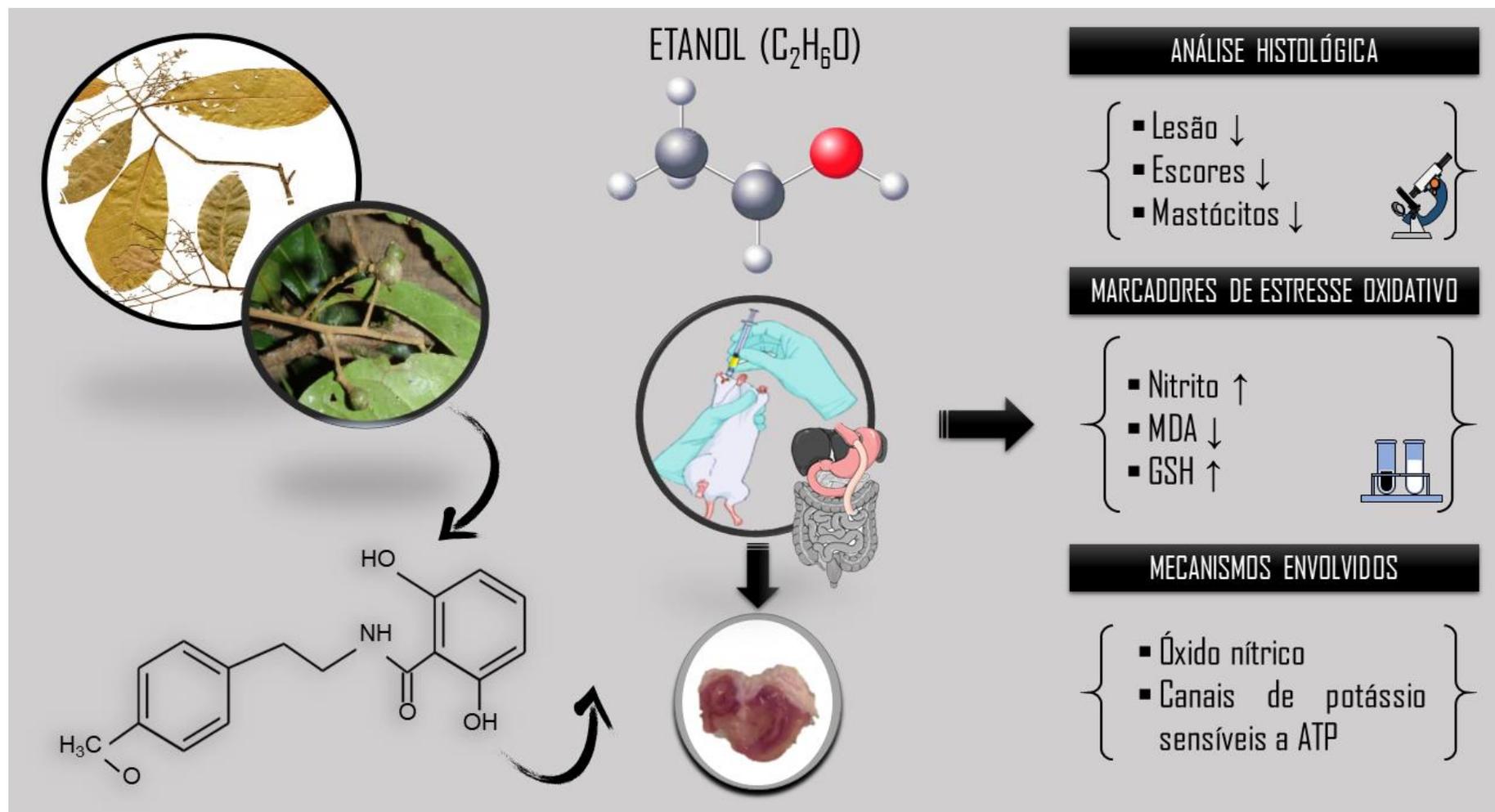
- A Riparina III apresenta atividade antiulcerogênica no modelo de lesão gástrica induzida por etanol, comprovada pela análise macroscópica e microscópica.
- A Riparina III promove a gastroproteção no modelo experimental de lesão gástrica induzida por etanol e o mecanismo gastroprotetor envolve a participação do óxido nítrico e dos canais de potássio sensíveis ao ATP.
- A Riparina III demonstrou potencial em aumentar os níveis de nitrito/nitrato e da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS).
- A ação gastroprotetora da Riparina III envolve uma atividade antioxidante, demonstrada por meio do reestabelecimento dos grupos sulfidrílicos-não proteicos (NP-SH/GSH) e diminuição da peroxidação lipídica.
- A Riparina III possui potencial em minimizar a resposta inflamatória, observado através da diminuição da contagem de mastócitos e reversão das alterações histopatológicas.

## 8 CONCLUSÃO

Este trabalho permitiu concluir que a Riparina III apresenta importante efeito protetor frente a úlcera gástrica induzida por etanol, e que este efeito está relacionado a mecanismos que envolvem a participação do óxido nítrico e dos canais de  $K^+$  ATP-dependentes, além de um potencial antioxidante, aumentando os níveis de GSH e diminuindo a peroxidação lipídica. Assim, podemos sugerir que a Riparina III constitui uma molécula promissora para o desenvolvimento de fármacos terapeuticamente úteis na lesão gástrica.

Com base nessas considerações, a Riparina III pode ser apontada como uma substância promissora para o tratamento da lesão gástrica induzida por etanol, efeito hipotético este ilustrado na Figura 20.

**Figura 20** – Modelo hipotético da ação farmacológica da Riparina III na lesão gástrica induzida por etanol.



Fonte: Autoria própria

## REFERÊNCIAS

- ABDELFATTAH, M. S. et al. Prodigiosins from a marine sponge-associated actinomycete attenuate HCl/ethanol-induced gastric lesion via antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. **PLoS ONE**, v. 14, n. 6, p. 1–20, 2019.
- AHMAD, A. A. et al. Peptic ulcer: Current prospects of diagnostic and nanobiotechnological trends on pathogenicity. **Process Biochemistry**, n. June, p. 0–1, 2019.
- AL ASMARI, A. et al. Vanillin abrogates ethanol induced gastric injury in rats via modulation of gastric secretion, oxidative stress and inflammation. **Toxicology Reports**, v. 3, p. 105–113, 31 jan. 2016.
- ALLEN, A.; FLEMSTRÖM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 288, n. 1, p. C1–C19, 2005.
- AMIRSHAHROKHI, K.; KHALILI, A. R. Gastroprotective effect of 2-mercaptoethane sulfonate against acute gastric mucosal damage induced by ethanol. **International Immunopharmacology**, v. 34, p. 183–188, 2016.
- AMIRSHAHROKHI, K.; KHALILI, A. R. Methylsulfonylmethane is effective against gastric mucosal injury. **European Journal of Pharmacology**, v. 811, n. March, p. 240–248, 2017.
- ANTONISAMY, P. et al. Gastroprotective effect of nymphayol isolated from *Nymphaea stellata* (Willd.) flowers: Contribution of antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic activities. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 157–163, 2014.
- ARAB, H. H. et al. Targeting MAPKs, NF- $\kappa$ B, and PI3K/AKT pathways by methyl palmitate ameliorates ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. **Journal of Cellular Physiology**, n. April, p. jcp.28807, 2019.
- ARAÚJO, É. J. F. DE et al. Synthesis, characterization and cytotoxic evaluation of inclusion complexes between Riparin A and  $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Molecular Structure**, v. 1142, p. 84–91, 2017.
- ARAÚJO, É. J. F. DE et al. Pathophysiological investigations, anxiolytic effects and interaction of a semisynthetic riparin with benzodiazepine receptors. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 103, n. April, p. 973–981, 2018.
- ARAÚJO, F. L. O. et al. Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyl tyramine (riparin I) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 380, n. 4, p. 337–344, 2009.
- ARIN, R. M. et al. Adenosine: Direct and indirect actions on gastric acid secretion. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. SEP, p. 1–16, 2017.
- ARUNACHALAM, K. et al. *Cochlospermum regium* (Mart. ex Schrank) Pilg.: Evaluation of chemical profile, gastroprotective activity and mechanism of action of hydroethanolic extract of its xylopodium in acute and chronic experimental models.

**Journal of Ethnopharmacology**, v. 233, n. 2367, p. 101–114, 2019.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Hepatocellular carcinoma in Central, Eastern, and Southern Europe. What Future after the SHARP Trial? **Central European Journal of Medicine**, v. 4, n. 1, p. 138–139, 2006.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2615–2617, 1987.

BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, E. C. DA; BHATTACHARYYA, J. Synthesis of several new phenylethylamides of substituted benzoic acids. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 332–334, 1990.

BENTO, E. B. et al. Antiulcerogenic activity of the hydroalcoholic extract of leaves of *Annona muricata* Linnaeus in mice. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 4, p. 609–621, 2016.

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

BOONEN, J. et al. Alkamid database: Chemistry, occurrence and functionality of plant N-alkylamides. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 3, p. 563–590, 2012.

BOUTEMINE, I. M. et al. Gastro-protective, therapeutic and anti-inflammatory activities of *Pistacia lentiscus* L. fatty oil against ethanol-induced gastric ulcers in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 224, n. January, p. 273–282, 2018.

BRAGA, L. L. B. C. Fundamentos da fisiopatologia da úlcera péptica e do câncer gástrico. In: In: ORIÁ, R. B.; BRITO, G. A. C. **Sistema digestório: integração básico-clínica**. São Paulo: Blucher, 2016.

CALOU, I. B. F. et al. A atividade gastroprotetora da *maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolium*. **REVISTA SAÚDE E CIÊNCIA**, v. 3, n. 2, p. 33–42, 2014.

CARVALHO, A.M.R. Estudo do mecanismo de ação da atividade antinociceptiva da Riparina II de *Aniba Riparia* em camundongos, 2016. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

CARVALHO, A. M. R. et al. Evaluation of the anti-inflammatory activity of riparin II (O-methyl-N-2-hidroxi-benzoyl tyramine) in animal models. **Chemico-Biological Interactions**, p.165-172, 2013.

CARVALHO, A. M. et al. Antinociceptive activity of Riparin II from *Aniba riparia*: Further elucidation of the possible mechanisms. **Chemico-Biological Interactions**, v. 287, n. April, p. 49–56, 2018.

CASTRO, L. F. C. et al. Recurrent gene loss correlates with the evolution of stomach phenotypes in gnathostome history. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1775, p. 20132669–20132669, 2013.

CATÃO, R. M. R. et al. Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Riparinas sobre Cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* Multirresistentes \*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 37, n. 4, p. 247–249, 2005.

CHANDRANATH, S. I.; BASTAKI, S. M. A.; SINGH, J. A comparative study on the activity of lansoprazole, omeprazole and PD-136450 on acidified ethanol- and indomethacin-induced gastric lesions in the rat. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 29, n. 3, p. 173–80, mar. 2002.

CHEN, H. et al. Protective effects of  $\beta$ -glucan isolated from highland barley on ethanol-induced gastric damage in rats and its benefits to mice gut conditions. **Food Research International**, v. 122, n. April, p. 157–166, 2019.

CHENG, S. BIN et al. Changes of oxidative stress, glutathione, and its dependent antioxidant enzyme activities in patients with hepatocellular carcinoma before and after tumor resection. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, 1 jan. 2017.

DE SALES, I. R. P. et al. Cytoprotective, antioxidant and anti-inflammatory mechanism related to antiulcer activity of *Cissampelos sympodialis* Eichl. in animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 222, n. November 2017, p. 190–200, 2018.

DINIZ, P. B. F. et al. Possible mechanisms of action of *Caesalpinia pyramidalis* against ethanol-induced gastric damage. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 168, p. 79–86, 20 jun. 2015.

DINIZ, P. B. F. Efeitos gastroprotetores do timol em úlceras agudas e crônicas em ratos: evidências do envolvimento das prostaglandinas, canais para potássio sensíveis a ATP e. 2016.

EGUCHI, S. et al. Effects of prostaglandin E1 on vascular ATP-sensitive potassium channels. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 50, n. 6, p. 686–691, dez. 2007.

FORNAI, M. et al. Pathophysiology of Gastric Ulcer Development and Healing: Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Options. **Peptic Ulcer Disease**, 2012.

FRANÇA, B. K. et al. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **GE Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 20, n. 5, p. 199–206, set. 2013.

GONÇALVES, R. D. A. et al. Anatomical characters and chemical profile of leaves of three species in lauraceae family. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 28, n. 1, p. 1–8, 2018.

GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, n. 4490, p. 56–58, 1981.

GUERRA, I. B. R.; VIEIRA, M. L. R t c c e p. **Revista Terra & Cultura: Cadernos de Ensino e Pesquisa**, p. 84–94, 2019.

HALABI, M. F. et al. Gastroprotective activity of ethyl-4-[(3,5-di-tert-butyl-2-hydroxybenzylidene) amino]benzoate against ethanol-induced gastric mucosal ulcer in rats. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 14–16, 2014.

HEEBA, G. H.; HASSAN, M. K. A.; AMIN, R. S. Gastroprotective effect of simvastatin against indomethacin-induced gastric ulcer in rats: Role of nitric oxide and prostaglandins. **European Journal of Pharmacology**, v. 607, n. 1–3, p. 188–193, 2009.

HOLZER, P. Europe PMC Funders Group Efferent-like roles of afferent neurons in the gut : blood flow regulation and tissue protection. v. 125, n. 0, p. 70–75, 2015.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; DE FÁTIMA, Â. **Glutaciona e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos** Química Nova Sociedade Brasileira de Química, , 2008.

JIN, X. et al. Natural products as a potential modulator of microglial polarization in neurodegenerative diseases. **Pharmacological Research**, v. 145, n. 77, 2019.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

KIM, T.-H.; SHIVDASANI, R. A. Stomach development, stem cells and disease. **Development**, v. 143, n. 4, p. 554–565, 2016.

KRON, J. Peptic ulcer disease. **Journal of Complementary Medicine**, v. 7, n. 1, p. 12–19, ago. 2008.

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

LI, S.; LEI, Y.; CHEN, J. D. Z. Roles of ATP sensitive potassium channel in modulating gastric tone and accommodation in dogs. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 52, n. 5, p. 515–522, 2017.

LI, W. et al. Anti-ulcerogenic effect of cavidine against ethanol-induced acute gastric ulcer in mice and possible underlying mechanism. **International Immunopharmacology**, v. 38, p. 450–459, 2016.

LI, W. et al. The gastroprotective effect of nobiletin against ethanol-induced acute gastric lesions in mice: impact on oxidative stress and inflammation. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 39, n. 6, p. 354–363, 2017.

LIMA, L. S. **Avaliação do efeito do composto (O-Metil)-N-(2,6-Diidroxibenzoil)-tiramina (Riparina III) da planta *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) sobre a morfogênese do sistema nervoso central em embrião de *Gallus gallus***. n. 2017. Dissertação (Mestrado em Morfotecnologia) - Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, 2017.

LIU, J. et al. Protective effect of butyrate against ethanol-induced gastric ulcers in mice by promoting the anti-inflammatory, anti-oxidant and mucosal defense mechanisms. **International Immunopharmacology**, v. 30, p. 179–187, jan. 2016.

LIU, Y. et al. Transformation of patchouli alcohol to  $\beta$ -patchoulene by gastric juice:  $\beta$ -patchoulene is more effective in preventing ethanol-induced gastric injury. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

LÍVERO, F. A. R. et al. Hydroethanolic extract of *Baccharis trimera* promotes gastroprotection and healing of acute and chronic gastric ulcers induced by ethanol and acetic acid. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 389, n. 9,

p. 985–998, 2016.

MAHADEVAN, V. Anatomy of the stomach. **Surgery (United Kingdom)**, v. 35, n. 11, p. 608–611, 2017.

MAJUMDAR, D.; BEBB, J. Helicobacter pylori infection and peptic ulcers. **Medicine (United Kingdom)**, v. 47, n. 5, p. 292–300, 2019.

MCCARTY, M. F.; DINICOLANTONIO, J. J.; O'KEEFE, J. H. Capsaicin may have important potential for promoting vascular and metabolic health: Table 1. **Open Heart**, v. 2, n. 1, p. e000262, 2015.

MELO, C. T. V. **Investigação do efeito antidepressivo da Riparina III: alterações comportamentais, neuroquímicas e avaliação do estresse oxidativo**. 2012. 228 f. 2012. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

MELO, C. T. V. DE et al. Anxiolytic-Like Effects of (O-Methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (Riparin III) from *Aniba riparia* (NEES) MEZ (Lauraceae) in Mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 3, p. 451–454, 2006.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

NI, X. et al. A region-resolved mucosa proteome of the human stomach. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2019.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, 1979.

OLIVEIRA, I. C. M. Efeitos centrais da riparina I de aniba riparia (Ness) Mez (Lauraceae) em modelos comportamentais de ansiedade, depressão, sono e convulsão em camundongos. 2012. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

PESKAR, B. M.; EHRLICH, K.; PESKAR, B. A. Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in the rat. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 301, n. 3, p. 969–74, jun. 2002.

PIECHOTA-POLANCZYK, A.; FICHNA, J. Review article: the role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 387, n. 7, p. 605–20, jul. 2014.

QIN, X.; DEITCH, E. A. Dissolution of lipids from mucus: A possible mechanism for prompt disruption of gut barrier function by alcohol. **Toxicology Letters**, v. 232, n. 2, p. 356–362, 2015.

QUINET, A.; ANDREATA, R. H. P. Lauraceae jussieu na reserva ecológica de Macaé de Cima, Município de Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguesia**, v. 53, n. 82, p. 59–121, 2002.

RAO, T. et al. The pharmacogenetics of natural products: A pharmacokinetic and pharmacodynamic perspective. **Pharmacological Research**, v. 146, n. 87, p. 104283, 2019.

- REIS-AVILA, G.; OLIVEIRA, J. M. Lauraceae: A promising family for the advance of neotropical dendrochronology. **Dendrochronologia**, v. 44, p. 103–116, 1 jun. 2017.
- RIBEIRO, A. R. S. Efeito gastroprotetor da baicaleína na mucosa gástrica de camundongos. 2017. 66 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - **Universidade Federal de Sergipe – UFS Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa**, Sergipe, 2017.
- RIOS, E. R. V. et al. Mechanisms involved in the gastroprotective activity of esculin on acute gastric lesions in mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, n. 1, p. 246–254, 2010.
- ROBERT, A.; NEZAMIS, J.E.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A.J. et al. **Cytoprotection by Prostaglandins in Rats Prevention of Gastric Necrosis Produced by Alcohol, HCl, NaOH, Hypertonic NaCl, and Thermal Injury. Gastroenterology**, v.77, p.433-443, 1979.
- ROY, V. K.; CHENKUAL, L.; GURUSUBRAMANIAN, G. Mallotus roxburghianus modulates antioxidant responses in pancreas of diabetic rats. **Acta Histochemica**, v. 118, n. 2, p. 152–163, 1 mar. 2016.
- SAGUN, K. et al. Antioxidant potential, anti-inflammatory activity and gastroprotective mechanisms of Mallotus roxburghianus (Muell.) against ethanol-induced gastric ulcers in Wistar albino rats. **Journal of Functional Foods**, v. 36, p. 448–458, 1 set. 2017.
- SAHIN, H. H. et al. The effect of 1,25 dihydroxyvitamin D3 on HCl/Ethanol-induced gastric injury in rats. **Tissue and Cell**, v. 51, n. February, p. 68–76, 2018.
- SANTOS, S. G. et al. Blood matrix effects for male and female Wistar rats, in simultaneous HPLC-UV determination of riparin I and III from Aniba riparia (Nees) Mez. (Lauraceae). **Talanta**, v. 86, n. 1, p. 233–240, 2011.
- SANTOS, R. DE C. DOS et al. Byrsonima intermedia A. Juss partitions promote gastroprotection against peptic ulcers and improve healing through antioxidant and anti-inflammatory activities. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 111, n. December 2018, p. 1112–1123, 2019.
- SATYANARAYANA, M. N. Capsaicin and gastric ulcers. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, n. 4, p. 275–328, 2006.
- SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 30, n. 6, p. 578–582, 2014.
- SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, n. C, p. 192–205, 1968.
- SHARMA, S. K.; VIJ, A. S.; SHARMA, M. Mechanisms and clinical uses of capsaicin. **European Journal of Pharmacology**, v. 720, n. 1–3, p. 55–62, 2013.
- SILVA, M. I. G.; SOUSA, F. C. F. Gastric Ulcer Etiology. **Peptic Ulcer Disease**, 2012.
- SILVA, R. O. et al. Alendronate induces gastric damage by reducing nitric oxide

synthase expression and NO/cGMP/KATP signaling pathway. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 40, p. 22–30, 2014.

SILVA, R. O. et al. Riparin A, a compound from *Aniba riparia*, attenuate the inflammatory response by modulation of neutrophil migration. **Chemico-Biological Interactions**, v. 229, p. 55–63, 2015.

SILVA, M. M. R. T. et al. Alkaloids of the Lauraceae. **Alkaloids: Chemistry and Biology**, v. 82, p. 147–304, 2019.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana: Uma abordagem integrada**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

SONG, S. H. et al. Anti-ulcer effect of Gallarhois extract with anti-oxidant activity in an ICR model of ethanol/hydrochloride acid-induced gastric injury. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, p. 1–11, 2018.

SOUSA, F. C. F. et al. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 78, n. 1, p. 27–33, 2004.

TAKEUCHI, K.; AMAGASE, K. Roles of Cyclooxygenase, Prostaglandin E2 and EP Receptors in Mucosal Protection and Ulcer Healing in the Gastrointestinal Tract. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 18, p. 2002–2011, 2018.

TARNAWSKI, A.; AHLUWALIA, A.; K. JONES, M. Gastric Cytoprotection Beyond Prostaglandins: Cellular and Molecular Mechanisms of Gastroprotective and Ulcer Healing Actions of Antacids. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 1, p. 126–132, 2012.

TULASSAY, Z.; HERSZÉNYI, L. Gastric mucosal defense and cytoprotection. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, v. 24, n. 2, p. 99–108, 2010.

TURNER, J. R. O Trato Gastrointestinal. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. Robbins & Cotran: **Bases patológicas das doenças**. 8. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

VASCONCELOS, L.F. Efeito antinociceptivo da Riparina III (n-2,6-dihidroxibenzoil o-metil-tiramina) em camundongos: possíveis mecanismos farmacológicos. 2015. 98 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Biotecnologia em Saúde, Fortaleza, 2015.

VERMA, S.; KUMAR, V. L. Artesunate affords protection against aspirin-induced gastric injury by targeting oxidative stress and proinflammatory signaling. **Pharmacological Reports**, v. 70, n. 2, p. 390–397, 1 abr. 2018.

VYKLIČKÝ, L. et al. Calcium-dependent desensitization of vanilloid receptor TRPV1: a mechanism possibly involved in analgesia induced by topical application of capsaicin. **Physiological research**, v. 57 Suppl 3, p. S59-68, 2008.

YANDRAPU, H.; SAROSIEK, J. Protective Factors of the Gastric and Duodenal Mucosa: An Overview. **Current Gastroenterology Reports**, v. 17, n. 6, p. 1–8, 2015.

YANG, H. J. et al. Gastroprotective actions of *Taraxacum coreanum* Nakai water

extracts in ethanol-induced rat models of acute and chronic gastritis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 208, p. 84–93, 2017.

YEO, D. et al. The aqueous extract from *Artemisia capillaris* inhibits acute gastric mucosal injury by inhibition of ROS and NF- $\kappa$ B. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 99, n. January, p. 681–687, 2018.

ZHANG, C. et al. Chemical characterization and gastroprotective effect of an isolated polysaccharide fraction from *Bletilla striata* against ethanol-induced acute gastric ulcer. **Food and Chemical Toxicology**, v. 131, n. May, p. 110539, 2019.

ZHANG, Y. et al. Protective effects of polysaccharide from *Dendrobium nobile* against ethanol-induced gastric damage in rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, n. PartA, p. 230–235, 2018.

## ANEXO A – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS (CEUA)



UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito da Riparina III em camundongos submetidos ao modelo agudo de lesão gástrica induzida por etanol e possíveis mecanismos envolvidos", protocolada sob o CEUA nº 6891250719 (ID 001250), sob a responsabilidade de **Francisca Cléa Florenço de Sousa e equipe; Larice de Carvalho Vale; Andressa Alexandre de Oliveira; Manoela de Oliveira Rebouças** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 10/09/2019.

We certify that the proposal "Evaluation of the effect of Riparina III in mice submitted to the acute model of gastric injury induced by ethanol and possible mechanisms involved", utilizing 108 Heterogenics mice (108 males), protocol number CEUA 6891250719 (ID 001250), under the responsibility of **Francisca Cléa Florenço de Sousa and team; Larice de Carvalho Vale; Andressa Alexandre de Oliveira; Manoela de Oliveira Rebouças** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 09/10/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **09/2019 a 07/2020**

Área: **Departamento de Fisiologia E Farmacologia**

Origem: **Biotério Prof. Eduardo Torres (setorial FAMED)**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **3 a 5 semanas**

N: **108**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **25 a 35 g**

Local do experimento: A manutenção e alojamento dos animais serão realizadas no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF) localizado na Rua Coronel Nunes de Melo, 1127 - Rodolfo Teófilo, Fortaleza -CE. O protocolo experimental será realizado em salas de experimentação adequadas para o manuseio de animais, sem ruídos e devidamente higienizadas, mantendo as condições de temperatura e ciclo claro/escuro anteriormente descritos. A eutanásia será executada em sala separada, isolada do ambiente de alojamento dos animais, impedindo a passagem de ruídos e odores provenientes da referida sala.

Fortaleza, 12 de setembro de 2019

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Camila Ferreira Roncari  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Ceará