



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

LYARA BARBOSA NOGUEIRA FREITAS

**EFEITO PROTETOR DO SESQUITERPENÓIDE β -IONONA NA LESÃO
GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL EM CAMUNDONGOS:
ENVOLVIMENTO DA VIA NO/GMP_c/K_{ATP} E DA GLUTATIONA.**

FORTALEZA

2013

LYARA BARBOSA NOGUEIRA FREITAS

**EFEITO PROTETOR DO SESQUITERPENÓIDE β -IONONA NA LESÃO
GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL EM CAMUNDONGOS:
ENVOLVIMENTO DA VIA NO/GMP_c/K_{ATP} E DA GLUTATIONA.**

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

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

FORTALEZA

2013

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

F936e Freitas, Lyara Barbosa Nogueira.
Efeito protetor do sesquiterpenóide β -ionona na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos: envolvimento da via $no/gmpc/k_{atp}$ e da glutational/ Lyara Barbosa Nogueira Freitas. – 2013.
80 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2013.
Orientação: Prof^a. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar.

1. Terpenos. 2. Úlcera gástrica. 3. Etanol. I.Título.

CDD 615.32

LYARA BARBOSA NOGUEIRA FREITAS

**EFEITO PROTETOR DO SESQUITERPENÓIDE β -IONONA NA LESÃO
GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL EM CAMUNDONGOS:
ENVOLVIMENTO DA VIA NO/GMP_c/K_{ATP} E DA GLUTATIONA.**

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

Aprovada em: 18/04/2013

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a. Vilma de Lima
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^a. Dr^a. Flávia Almeida Santos
Universidade Federal do Ceará - UFC

Dedico...

À Deus, por ter me promovido saúde, força e coragem para a realização deste trabalho.

À minha família, pelo carinho, dedicação e incentivo nos meus estudos.

Ao meu namorado, pelo incansável incentivo, amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pela saúde que me foi dada, me iluminando nos momentos difíceis e me fazendo ultrapassar os obstáculos, pelos momentos de paz e felicidade.

Aos meus pais, **Maria Luzia Nogueira de Freitas e Francisco de Assis de Freitas**, pelo amor incondicional e pelo exemplo de dignidade, respeito e educação. Pelo valioso apoio, pelas palavras de incentivo e motivação que foram fundamentais nos momentos de desistência. Não tenho palavras para expressar tudo que vocês representam na minha vida.

Às minhas irmãs, **Larissa Barbosa Nogueira Freitas e Yannara Barbosa Nogueira Freitas**, que, apesar de não morarem comigo, sei que, mesmo de longe, torcem pelo meu sucesso.

À **Thiago Alberione Diógenes Melo**, por todo o amor e companheirismo a mim dedicados. Obrigada por sempre acreditar em mim, me apoiar e incentivar em todos os meus sonhos. Te amo!

À minha orientadora, Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar, por todos os inestimáveis ensinamentos, pela dedicação e por acreditar e confiar em mim. Obrigada por aperfeiçoar o meu trabalho com sua experiência e sabedoria.

Ao Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa (Universidade Federal de Sergipe), pela confiança em nos conceder a β -ionona.

À Patrícia Luz, Rachel Sindeaux e Larisse Marques pela ajuda constante em todos os momentos da realização deste trabalho, pelo convívio maravilhoso, por estarem sempre disponíveis em todos os dias de experimento, seja feriado ou fim de semana, pelas palavras de amizade quando sempre precisei e por termos o privilégio de compartilharmos de uma grande amizade.

Aos meus queridos colegas do laboratório, César, Luana, Tamires, Flávio, Ingrid, Carol, Alana e Tiago. Obrigada, por tornarem tão agradável a convivência no laboratório.

Às Profas. Dras. Flávia Almeida Santos e Vilma de Lima por aceitarem fazer parte da banca examinadora. Obrigada pela grande contribuição para que

este trabalho fosse melhor qualificado, com suas pertinentes observações e críticas construtivas.

A todos os professores da Pós-graduação, pelos conhecimentos cedidos e pelos ensinamentos que contribuíram para meu crescimento intelectual e pessoal.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço à Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade, e à CAPES pelo auxílio financeiro.

Muito Obrigada!

RESUMO

A β -ionona (4-[2,6,6-trimetill-1-ciclohexeno]-3-buten-2-ona) é um sesquiterpeno (terpenoide degradado - C13) presente na estrutura molecular do retinol, β -caroteno e ácido retinóico, sendo formado a partir da via do mevalonato em diferentes tipos de plantas. As pesquisas sobre as atividades biológicas da β -ionona ainda são incipientes e poucos resultados com este composto são encontrados na literatura. Este estudo visa investigar a atividade da β -ionona no modelo de lesão gástrica induzida por etanol. A manipulação dos animais e os protocolos experimentais foram registrados na Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) sob o número 87/2011. Camundongos Swiss (n = 8), em jejum de 18 h, receberam, por gavagem, BI nas doses de 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 mg/kg. Após 60 min da administração de BI os animais receberam 0,2 ml de etanol absoluto por gavagem. Decorridos 60 min dessa administração, os animais foram sacrificados, os estômagos removidos e analisados para determinação do índice de lesão. A avaliação histopatológica do estômago foi realizada atribuindo escores aos parâmetros de edema, hemorragia, perda de células epiteliais e infiltrado inflamatório. Para investigar o envolvimento de mediadores no efeito de BI, os animais receberam indometacina (10 mg/kg; v.o.), L-NAME (20 mg/kg; i.p.), ODQ (10 mg/kg; i.p.), glibenclamida (5 mg/kg; i.p.) e capsazepina (5 mg/kg; i.p) antes do tratamento com BI (12,5 mg/kg; v.o.). Misoprostol (50 μ g/kg v.o), L-arginina (600 mg/kg; i.p.), diazóxido (3 mg/kg; i.p.) e capsaicina (0,3 mg/kg; v.o.) foram utilizados padrão positivo. Os níveis de nitrito e glutathione foram dosados na mucosa do estômago para investigar o efeito da BI sobre os níveis de NO e seu efeito antioxidante, respectivamente. O tratamento dos animais com a BI (12,5; 25; 50 e 100 mg/kg), reduziu significativamente e de forma dose-dependente, a área da lesão gástrica induzida pelo etanol para (11,41 \pm 2,0; 7,92 \pm 1,8*; 6,32 \pm 2,0 e 1,43 \pm 0,42 % respectivamente). Entretanto, a BI na menor dose avaliada (6,25 mg/kg), não apresentou redução significativa da área ulcerada (21,97 \pm 1,8%). A administração de BI reduziu os escores de hemorragia, edema e a perda de células epiteliais. A Indometacina e capsazepina não foram capazes de reverter o efeito protetor da BI. O pré-tratamento dos animais com L-NAME, ODQ e Glibenclamida reverteu o efeito gastroprotetora da BI, mostrando o

envolvimento do NO e canais K_{ATP} no seu mecanismo de ação. O grupo pré-tratado com BI (12,5 mg/kg v.o.) mostrou uma maior concentração de nitrito (24,18 mM) quando comparado ao grupo controle (17,68 mM). O pré tratamento com BI foi efetivo em proteger contra o dano oxidativo ($346,4 \pm 60,32 \mu\text{g/g}$ de tecido), evitando a depleção nos níveis de GSH no tecido. Estes resultados indicam que a β -ionona possui efeito gastroprotetor no modelo de Lesão Gástrica induzida por Etanol mediado pela via $\text{NO} \backslash \text{GMPc} \backslash K_{ATP}$ e através da mediação do terpeno na depleção dos níveis de GSH provocado pelo etanol.

Palavras chave: β -ionona. Terpeno. Úlcera Gástrica. Etanol.

ABSTRACT

The β -ionone (4-[2,6,6-cyclohexene-1-trimethyl]-3-butene-2-one) is a sesquiterpene (degraded terpenoid - C₁₃) present in the molecular structure of retinol and β -carotene acid retinoic being formed from the mevalonate pathway in different types of plants. Research on the biological activities of β -ionone are still incipient and limited results with this compound are found in the literature. This study aims to investigate the activity of β -ionone in the model of ethanol-induced gastric injury. Handling of animals and experimental protocols were recorded by the Ethics Committee on Animal Research (CEPA) under number 87/2011. Swiss mice (n = 8), fasted 18 hours, were orally treated with BI at doses of 6.25, 12.5, 25, 50 and 100mg/kg. After 60 min of administration BI animals received 0.2 ml of absolute ethanol po. After 60 min this administration, the animals were sacrificed, the stomachs removed and analyzed to determine the rate of injury. Histologic examination of the stomach was performed by assigning scores to the parameters of edema, hemorrhage, loss of epithelial cells and inflammatory infiltrate. To investigate the role of mediators in BI effect, animals received indomethacin (10 mg / kg, po), L-NAME (20 mg / kg, ip) ODQ (10 mg / kg, ip), glibenclamide (5 mg / kg, ip) and capsazepine (5 mg / kg, ip) before treatment with BI (12.5 mg / kg, po). Misoprostol (50 mg / kg po), L-arginine (600 mg / kg, ip), diazoxide (3 mg / kg, ip) and capsaicin (0.3 mg / kg, po) was used positive pattern. The levels of nitrite and glutathione were measured in the stomach mucosa to investigate the effect of BI on the levels of NO and its antioxidant effect, respectively. Treatment of animals with the BI (12.5, 25, 50 and 100 mg / kg) reduced significantly and dose-dependent manner, the area of ethanol-induced gastric lesion to (11.41 ± 2.0 , 7.92 ± 1.8 , 6.32 ± 2.0 and $1.43 \pm 0.42\%$ respectively). However, the BI lowest tested dose (6.25 mg / kg) showed no significant reduction of the ulcerated area ($21.97 \pm 1.8\%$). The administration of BI scores decreased hemorrhage, edema and loss of epithelial cells. The capsazepine and indomethacin were not able to reverse the protective effect of BI. Pretreatment of animals with L-NAME, ODQ and glibenclamide reversed the gastroprotective effect of BI, showing the involvement of NO and KATP channels in its mechanism of action. The group pretreated with BI (12.5 mg / kg po) showed a higher concentration of nitrite

(24.18 mM) compared to the control group (17.68 mM). The pretreatment BI was effective in protecting against oxidative damage (346.4 ± 60.32 mg / g of tissue), preventing depletion of GSH levels in tissue. These results indicate that the β -ionone has gastroprotective effect in the model of ethanol-induced gastric injury mediated by the NO \ cGMP \ K ATP and terpene through the mediation of the GSH depletion induced by ethanol.

Key-Words: β -ionone. Terpene. Gastric Ulcer. Ethanol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Regiões anatômicas do estômago.	20
Figura 2 -	Regulação fisiológica das secreções gástricas.	22
Figura 3 -	Ação das enzimas antioxidantes.	27
Figura 4 -	Estrutura química do isopreno.	33
Figura 5 -	Estrutura química da β -ionona.	36
Figura 6 -	Modelo experimental utilizado na avaliação do efeito gastroprotetor da β -ionona.	45
Figura 7 -	Efeito protetor da β -ionona no modelo de lesão gástrica induzida por etanol.	52
Figura 8 -	Análise macro e microscópica do efeito do pré-tratamento com BI em estômagos de camundongos submetidos ao modelo de lesão gástrica induzida por etanol.	54
Figura 9 -	Pré-tratamento com indometacina não inibe a proteção gástrica da β -ionona no modelo de Lesão Gástrica Induzida por Etanol.	56
Figura 10 -	Pré-tratamento com L-NAME abole o efeito gastroprotetor da da β -ionona no modelo de lesão gástrica induzida por etanol.	57
Figura 11 -	O pré-tratamento com β -ionona induz aumento dos níveis de nitrito na mucosa gástrica com lesões por etanol.	58
Figura 12 -	Envolvimento do GMPc no efeito gastroprotetor da β -ionona no modelo de lesão gástrica induzida por etanol.	59
Figura 13 -	Envolvimento dos canais K_{ATP} no efeito gastroprotetor da β -ionona no modelo de lesão gástrica induzida por etanol.	60
Figura 14 -	Pré-tratamento com capsazepina não inibe a proteção gástrica da β -ionona no modelo de Lesão Gástrica Induzida por Etanol.	61

Figura 15 - Efeito da BI sobre a glutathione reduzida da mucosa gástrica agredida por etanol.	62
Figura 16 - Efeito da BI sobre a glutathione reduzida da mucosa gástrica sem lesão induzida por etanol.	62
Figura 17 - Mecanismo hipotético do efeito gastroprotetor da β -ionona.	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Efeito protetor da β -ionona no modelo de lesão gástrica induzida por etanol.	51
Tabela 2 -	Efeito da β -ionona sobre a análise histopatológica da lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.	53

LISTA DE SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromol
abs	Absoluto
ACh	Acetilcolina
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
ALT	Alanina aminotransferase
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
ANOVA	Análise de Variância
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
BI	β-ionona
Ca ²⁺	Íon Cálcio
CAT	Catalase
CCVP	Canais de Cálcio Voltagem Dependentes
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
CEPA	Comissão de Ética Institucional
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX	Ciclooxigenase
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico
EP ₁	Receptor de Prostaglandina tipo 1
EP ₂	Receptor de Prostaglandina tipo 2
EPM	Erro Padrão da Média
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
g	Gramma
GCs	Guanilato Ciclase Solúvel
GMPc	Guanosina Monofosfato Cíclico
GPx	Glutationa Peroxidase
GR	Glutationa Redutase
GS	Glutationa Sintase

GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Disulfeto Glutathiona
h	Hora
H ⁺	Íon Hidrogênio
H ⁺ /K ⁺ /ATPase	Bomba de Prótons
HCl	Ácido Clorídrico
HCO ₃ ⁻	Bicarbonato
HDC	Histidina Descarboxilase
IBPs	Inibidores da Bomba de Prótons
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
IL	Interleucina
IP	Receptor de Prostaglandina
IP ₃	Inositol Trifosfato
K _{ATP}	Canais de Potássio sensíveis a ATP
KCl	Cloreto de Potássio
kg	Kilograma
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potássio Monobásico
L-NAME	N ^G -Nitro-L-arginina-metiléster
M	Molar
M ₃	Receptor colinérgico muscarínico tipo 3
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
NAC	N-acetilcisteína
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaNO ₂	Nitrito de Sódio
NEED	N-(1-naftil)-etilenodiamina
nm	Nanômetro
NO	Óxido Nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
NOS	Óxido Nítrico Sintetase

eNOS	NOS endotelial
nNOS	NOS neuronal
iNOS	NOS induzível
NP-SH	Grupos Sulfidrílicos Não-Proteicos
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	Nível de significância
PLC	Fosfolipase C
PG	Prostaglandina
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF ₂	Prostaglandina F ₂
PGI ₂	Prostaciclina I ₂
pH	Potencial Hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto
s.c.	Subcutâneo
SOD	Superóxido Dismutase
SST ₂	Receptor de Somatostatina Tipo 2
TCA	Ácido Tricloroacético
TGI	Trato Gastrointestinal
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRPV1	Receptor de potencial transiente vaniloide 1
UFC	Universidade Federal do Ceará
VIP	Peptídeo Intestinal Vasoativo
v.o.	Via Oral
vs	Versus

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
1.1.	Fisiologia Gástrica	20
1.1.1.	Fisiologia da secreção ácida	21
1.1.2.	Mecanismos de proteção da mucosa gástrica	23
1.2.	Úlceras Gástricas	28
1.2.1.	Indução de lesão gástrica por etanol	29
1.2.2.	Abordagens terapêuticas na úlcera gástrica	30
1.3.	Terpenos	32
1.3.1.	Compostos Terpênicos na Proteção Gástrica	35
1.3.2.	β-Ionona	35
2.	JUSTIFICATIVA	40
3.	OBJETIVOS	41
3.1.	Objetivo Geral	41
3.2.	Objetivos Específicos	41
4.	MATERIAIS	42
4.1.	Animais experimentais	42
4.2.	Fármacos e Reagentes	42
4.3.	Preparo das substâncias	43
4.4.	Equipamentos	43
5.	MÉTODOS	44
5.1.	Modelo Experimental	44
5.2.	Abordagens Experimentais	45
5.2.1.	Efeito da β-ionona na lesão gástrica induzida por etanol: curva dose-resposta	45
5.2.2.	Avaliação histopatológica	45
5.2.3.	Investigação do mecanismo de ação da β-ionona no modelo de lesão gástrica induzida por etanol	46
5.2.3.1.	Investigação do papel das prostaglandinas (PG's)	46
5.2.3.2.	Estudo do envolvimento do óxido nítrico (NO)	46
5.2.3.3.	Investigação do papel da guanosina monofosfato cíclico (GMPc)	47

5.2.3.4.	Investigação do papel dos canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP})	48
5.2.3.5.	Avaliação do envolvimento dos Receptores Vaniloides TRPV1.	48
5.2.3.6.	Investigação do Envolvimento da glutathiona reduzida (GSH)	49
5.3.	Análise estatística	49
6.	RESULTADOS	51
6.1.	A β -ionona previne de forma dose-dependente as lesões gástricas induzidas por etanol	51
6.2.	β -ionona reduz os escores dos parâmetros histopatológicos de lesão gástrica induzida por etanol	52
6.3.	Investigação dos mecanismos gastroprotetores da β -ionona no modelo de lesão gástrica induzida por etanol	55
6.3.1.	Efeito gastroprotetor da β -ionona no modelo de lesão gástrica induzida por etanol é independente da atividade da enzima Ciclooxygenase.	55
6.3.2.	Efeito gastroprotetor da β -ionona no modelo de lesão gástrica induzida por etanol é revertido pelo pré-tratamento dos animais com L-NAME.	56
6.3.3.	A β -ionona induz aumento dos níveis de óxido nítrico na mucosa gástrica com lesões por etanol.	57
6.3.4.	Efeito gastroprotetor da β -ionona no modelo de lesão gástrica induzida por etanol é dependente da atividade da enzima Guanilato-Ciclase.	58
6.3.5.	Efeito gastroprotetor da β -ionona no modelo de lesão gástrica induzida por etanol é dependente da abertura dos canais K_{ATP} .	59

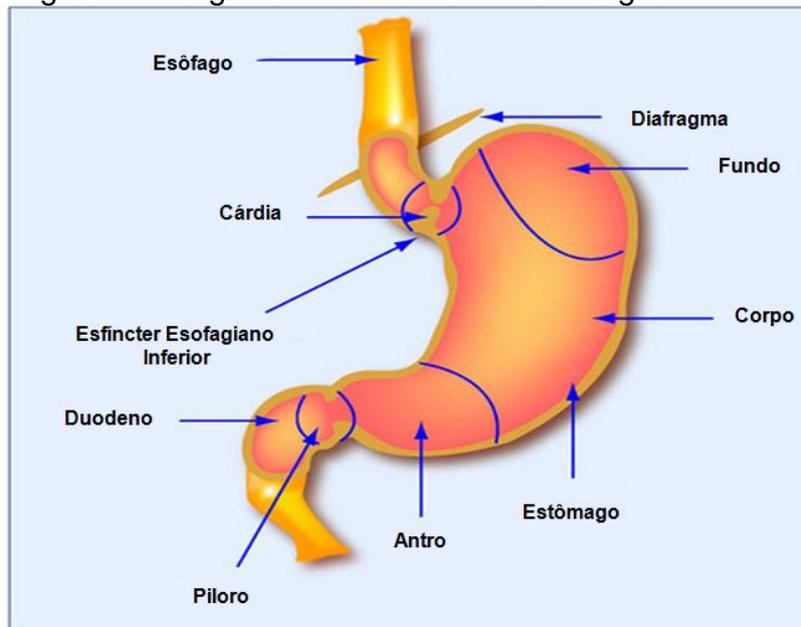
6.3.6.	O efeito gastroprotetor da β-ionona no modelo de lesão gástrica induzida por etanol é independente da ativação dos receptores TRPV1 nos neurônios aferentes.	60
6.3.7.	A β-ionona inibe a redução dos níveis de glutathione reduzida (GSH) na mucosa gástrica de camundongos com lesão induzida por etanol.	61
7.	DISCUSSÃO	63
8.	CONCLUSÃO	69

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fisiologia Gástrica

O estômago é dividido anatomicamente em quatro regiões: a cárdia, o fundo, o corpo e o antro. O esfíncter esofágiano limita a porção superior do estomago, enquanto o esfíncter pilórico limita a interface entre o estômago e o duodeno (Figura 1) (CONTRAN *et al.*, 2010). As características estruturais das regiões do fundo e do corpo são idênticas, por isso, são consideradas apenas três regiões na divisão histológica. (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008; KUMMAR *et al.*, 2010).

Figura 1 – Regiões anatômicas do estômago.



Fonte: adaptado de CONTRAN (2010).

A parede estomacal é constituída por quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa (KONTUREK, 1990). A mucosa gástrica é composta principalmente pelas glândulas oxíntica e pilórica. As glândulas oxínticas secretam ácido clorídrico (HCl), pepsinogênio, fator intrínseco e muco, enquanto as glândulas pilóricas secretam, sobretudo, muco e também os hormônios gastrina e somatostatina pelas células G e células D, respectivamente (JASS, 2001).

No arranjo estrutural da glândula oxíntica existem três tipos de células: as células epiteliais, que secretam muco; as células parietais, que secretam

HCl e fator intrínseco e as células principais, que secretam pepsinogênio (JASS, 2001).

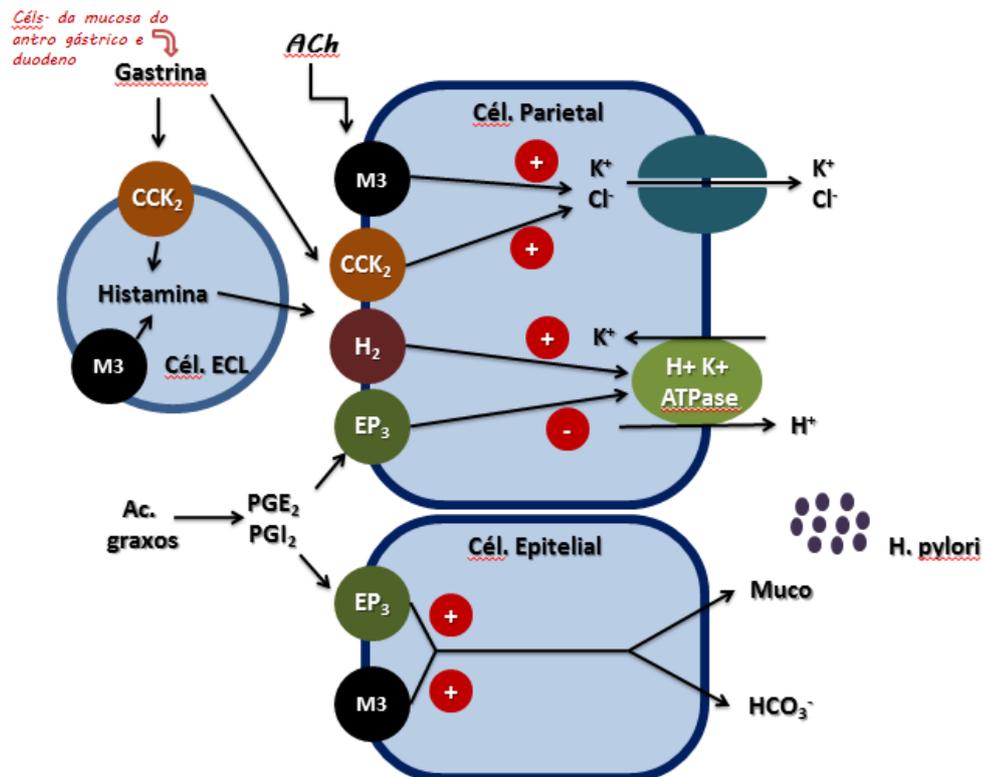
Abaixo da camada mucosa está a submucosa, composta por colágeno, elastina, glândulas e vasos sanguíneos que irrigam o aparelho gastrointestinal. É nesta porção que se localiza o plexo submucoso (plexo de Meissner), componente essencial do sistema nervoso entérico. Em seguida, está a camada muscular, a responsável pela motilidade do trato gastrointestinal (TGI). O plexo mioentérico (plexo de Auerbach) se situa entre os músculos circular e longitudinal (COSTANZO, 2004; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

As fibras nervosas presentes no interior dos plexos constituem o sistema nervoso entérico e são responsáveis pela secreção de diversos mediadores, como a acetilcolina (ACh), noradrenalina, purinas e óxido nítrico. Tais mediadores estão envolvidos na regulação dos fenômenos fisiológicos do TGI, regulando vários processos, tais como a secreção ácida e a motilidade gastrointestinal. Esses plexos também contêm neurônios sensitivos primários responsivos a estímulos químicos e mecânicos (BRUNTON, 2012; COSTANZO, 2004).

1.1.1. Fisiologia da secreção ácida

A secreção de ácido pelo estômago é um processo que envolve a interação de múltiplos fatores, com envolvimento de vias centrais e periféricas. A intercomunicação dessas vias culmina na secreção de H^+ pelas células parietais localizadas no corpo e no fundo gástrico. Inúmeros mediadores fisiológicos estão envolvidos no processo de secreção ácida, dentre eles estão os fatores neuronais (ACh), parácrinos (histamina) e endócrinos (gastrina) (Figura 2) (BRUNTON, 2012.).

Figura 2 – Regulação fisiológica das secreções gástricas.



Fonte: Adaptado de BRUNTON (2012). A gastrina, liberada pelas células da mucosa do antro gástrico e duodeno, ativa os receptores CCK₂, estimulando a liberação de histamina pelas células enterocromafins (ECL). A histamina atua nos receptores H₂ nas células parietais, estimulando a secreção ácida. As prostaglandinas (PGE₂ e PGI₂) diminuem a secreção ácida e aumentam a secreção de muco e bicarbonato através da ativação dos receptores EP₃. Os receptores muscarínicos M₃ são os responsáveis por desencadear as repostas fisiológicas geradas pela acetilcolina (ACh).

A histamina se liga aos receptores H₂, desencadeando uma resposta através do aumento do AMPc intracelular e consequente fosforilação de proteínas efetoras. A ACh e a gastrina se ligam aos receptores M₃ e CCK₂, respectivamente, causando o aumento da concentração do Ca²⁺ citosólico. A ativação dessas vias por seus respectivos mediadores culmina na ativação da H⁺ K⁺-ATPase (bomba de prótons) (SABESIN, 1993.).

A ACh, liberada por fibras vagais pós-ganglionares, pode estimular a secreção ácida por duas vias: atuando diretamente nas células parietais por meio do receptor muscarínico M₃ ou indiretamente através da estimulação da liberação de histamina, pelas células enterocromafins (ECL) do fundo gástrico, e gastrina, pelas células G do antro gástrico (COSTANZO, 2004).

As células enterocromafins localizam-se próximas às células parietais, de modo que a histamina liberada nessas células atua de forma parácrina nas

células parietais, estimulando a secreção de ácido. O envolvimento da histamina na secreção ácida foi comprovado através do uso de antagonistas do receptores H₂ para inibir a secreção ácida (SABESIN, 1993.).

A liberação de gastrina pelas células G do antro gástrico é regulada por diversos fatores, entre eles a ativação neural central, distensão local e componentes químicos do conteúdo gástrico. O mecanismo principal pelo qual a gastrina estimula a liberação de ácido é mediado pela liberação de histamina nas células ECL. Há também um efeito direto menos pronunciado da gastrina sobre as células parietais (COSTANZO, 2004).

As células D presentes no antro gástrico liberam somatostatina, um mediador que protege a mucosa gástrica ao inibir a liberação de gastrina e diminuir a secreção ácida. A diminuição das células D no estômago de pacientes infectados por *Helicobacter pylori* contribui para a produção excessiva de gastrina, aumentando a secreção ácida nesses pacientes (BRUNTON, 2012.).

Apesar das altas concentrações de ácido clorídrico, as células estomacais não sofrem lesões e isso se deve a inúmeros fatores protetores da mucosa gástrica. Fisiologicamente, há um equilíbrio entre os fatores agressores da mucosa, HCl e pepsina, e os fatores protetores, como muco, bicarbonato, proliferação celular, prostaglandinas, mediadores gasosos (óxido nítrico e sulfeto de hidrogênio) e 1 neuropeptídeos (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina – CGRP) (WALLACE, 2008).

1.1.2. Mecanismos de proteção da mucosa gástrica

A primeira linha de defesa da mucosa gástrica trata-se de uma barreira protetora formada por muco, bicarbonato e fosfolipídios. Tal barreira proporciona uma proteção física ao impedir que a pepsina alcance as células da mucosa gástrica e cause proteólise. Além disso, essa barreira retém os íons de bicarbonato secretados, mantendo o pH na superfície das células mais neutro, proporcionando um micro-ambiente estável frente ao ácido gástrico (ALLEN & FLEMSTRO, 2005).

O muco é formado por polímeros de mucina, que conferem aderência às células epiteliais, e fosfolipídios, que torna a camada hidrofóbica (ALLEN &

FLEMSTRO, 2005). O bicarbonato (HCO_3^-) é secretado pela mucosa gástrica frente a vários estímulos fisiológicos, dentre eles destacam-se as prostaglandinas e a ACh que estimulam a sua liberação para o espaço extracelular (ALLEN & FLEMSTRO, 2005; BRUNTON, 2012).

Várias pesquisas vêm demonstrando a relevância da manutenção do fluxo sanguíneo na proteção gástrica. O aumento do fluxo sanguíneo protege a mucosa frente a estímulos nocivos, enquanto que a redução do fluxo provoca a exacerbação das lesões causadas por agentes ulcerogênicos. Inúmeros mediadores estão envolvidos na regulação do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica, dentre eles estão as prostaglandinas, o óxido nítrico e os canais de potássio sensíveis ao ATP (canais de K_{ATP}) (ABDEL-SALAM *et al.*, 2001; WALLACE & MILLER, 2000).

As prostaglandinas (PGs) possuem papel fundamental na proteção da mucosa gástrica. Tais mediadores são sintetizadas a partir do ácido araquidônico pelas enzimas ciclooxigenases (COXs). Existem três isoformas da COX, no entanto apenas duas são expressas no estômago: a COX-1, constitutiva, responsável pela liberação de prostaglandinas em condições fisiológicas, e a COX-2, induzível, que sintetiza prostaglandinas nos processos de inflamação e cicatrização da mucosa (WALLACE, 2003). As principais prostaglandinas envolvidas na gastroproteção são as prostaglandinas E_2 (PGE_2) e I_2 (PGI_2), as quais podem ativar os receptores EP_3 das células parietais e das células epiteliais, causando a diminuição da secreção de ácido e aumento da secreção de muco, respectivamente. Também aumentam o fluxo sanguíneo e a secreção de bicarbonato através da ativação dos receptores EP_1 (AIHARA *et al.*, 2007.).

A gastroproteção mediada pelas PGs também envolve a ativação dos canais de K_{ATP} , os quais estão envolvidos em diversos outros processos fisiológicos do aparelho gastrointestinal, tais como a regulação do fluxo sanguíneo, secreção de ácido e contratilidade do estômago (GARCIA *et al.*, 1997; PESKAR *et al.*, 2002).

Os canais de K_{ATP} recebem este nome por serem responsivos às concentrações de ATP intracelular. São alvos farmacológicos de inúmeros fármacos, dentre eles as sulfoniluréias, como a glibenclamida e glimepirida, que bloqueiam esses canais. Existem também fármacos que provocam a

abertura dos canais de K_{ATP} , como o pinacidil e cromakalim (QUAYLE, NELSON, STANDEN, 1997).

A abertura dos canais de K_{ATP} presentes nas células endoteliais provoca uma vasodilatação que ajuda na proteção da mucosa gástrica contra agentes ulcerogênicos. A abertura desses canais aumenta a entrada de potássio para o interior celular, alterando o potencial elétrico de ação da membrana da célula, o que provoca a diminuição da entrada de cálcio através dos Canais de Cálcio Voltagem Dependentes (VGCC), levando à vasodilatação (QUAYLE, NELSON, STANDEN, 1997; NILIUS & DROOGMANS, 2001).

Várias pesquisas vêm demonstrando que estes canais podem ser ativados pela proteína quinase dependente de GMP cíclico (GMPc), o que poderia explicar a atividade vasodilatadora de mediadores endógenos como o óxido nítrico, adenosina e CGRP. Dessa forma, o bloqueio desses canais por mediadores como a adrenalina, vasopressina, endotelina e angiotensina II provoca uma vasoconstrição. Isto se dá através da ativação da proteinoquinase C e o aumento da concentração de cálcio intracelular (JACKSON, 1993; NELSON & QUAYLE, 1995; PESKAR *et al.*, 2002).

O Óxido Nítrico (NO) é um mediador endógeno envolvido em diversas funções no Trato Gastrointestinal (TGI), regulando a manutenção do tônus da musculatura lisa, peristaltismo intestinal, esvaziamento gástrico, produção de muco e bicarbonato, manutenção do fluxo sanguíneo e citoproteção adaptativa, juntamente com as PGs (MARTÍN, JIMÉNEZ & MOTILVA, 2001).

O NO é sintetizado a partir do aminoácido arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual existe em três isoformas: e-NOS (óxido nítrico sintase endotelial), n-NOS (óxido nítrico sintase neuronal) e a i-NOS (óxido nítrico sintase induzível) (BRUNTON, 2012.). O NO liberado em baixas concentrações pelas enzimas constitutivas, e-NOS e n-NOS, possui um papel gastroprotetor da mucosa, no entanto, excessivas quantidades desse mediador, liberadas pela i-NOS, podem lesionar os tecidos alterando a homeostase do TGI (WALLACE, MARK & MILLER, 2000).

O NO é capaz de ativar a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), promovendo a formação de GMPc que, por sua vez, ativa proteínas quinases G (PKG), desencadeando uma cascata de fosforilação para obter a função efetora de vasodilatação (DENNINGER & MARLETTA, 1999). O NO também

pode regular diretamente a função de canais iônicos e enzimas através da nitrosilação de grupamentos tióis do resíduo de cisteína presentes nas proteínas (JAFFREY *et al.*, 2001).

O TGI possui sua própria rede neural integrativa, sistema nervoso entérico, que controla músculos lisos, vasos sanguíneos e glândulas. Nesse sistema, há fibras nervosas parassimpáticas que funcionam, na maioria das vezes, de forma inibitória e fibras nervosas simpáticas que, quando ativas, inibem a secreção de ACh (BRUNTON, 2012.).

Os receptores adrenérgicos α_2 medeiam várias respostas no TGI. Eles estão envolvidos na regulação da secreção ácida, embora o mecanismo exato pelo qual isso ocorra ainda permaneça desconhecido (GYIRES, 1999). Gyires *et al.* (1996) demonstraram que a administração do agonista adrenérgico α_2 , clonidina, diminuiu as lesões na mucosa gástrica induzida por antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), demonstrando a participação desses receptores na gastroproteção.

Há também uma subpopulação de neurônios aferentes primários no TGI onde estão presentes os receptores vaniloides TRPV-1 (SZOLCSANYI & BARTHO, 2001). Estes receptores podem ser ativados pela capsaicina, uma substância extraída de pimentas vermelhas, que, em pequenas doses, apresenta efeitos gastroprotetores, aumentando o fluxo sanguíneo e a secreção de muco e bicarbonato. Os terminais periféricos dos neurônios aferentes primários também liberam diversos neuropeptídeos vasodilatadores, como a substância P (SP), as neurocininas (taquicininas) e o CGRP (WARZECHA *et al.*, 2011.).

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas constantemente durante alguns processos fisiológicos, como a fosforilação mitocondrial da cadeia transportadora de elétrons, no entanto, em condições patológicas, os EROs são produzidos em grandes quantidades, superando a capacidade das enzimas antioxidantes. Os EROs são altamente reativos e interagem com macromoléculas essenciais, como o DNA, proteínas e lipídeos, causando desordens celulares (CNUBBEN *et al.*, 2001). Há enzimas oxidases no TGI que produzem grandes quantidades de EROs em suas reações, tais como a xantina oxidase, mieloperoxidase (MPO) e NADPH oxidase, encontrada em

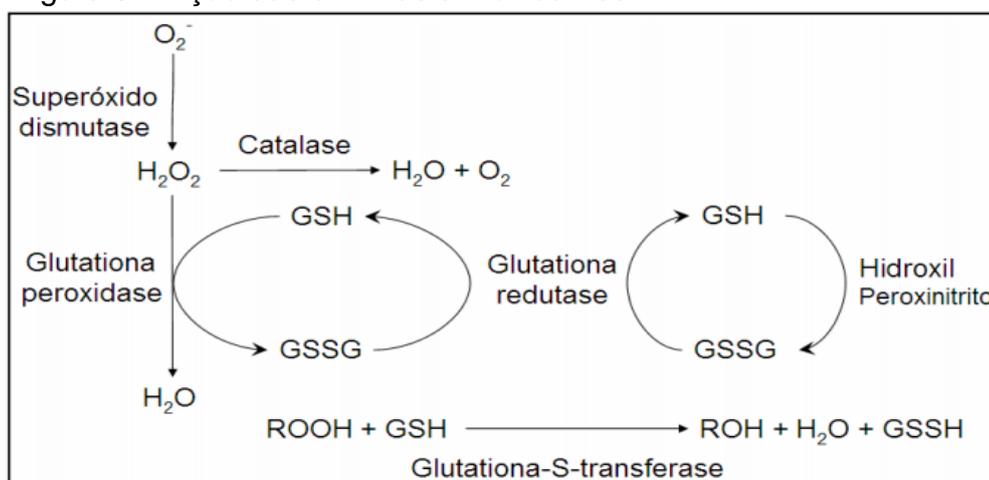
leucócitos residentes (macrófagos, neutrófilos e eosinófilos) da lâmina própria (DONG e KAUNITZ, 2006).

A primeira linha de defesa contra os EROs são enzimas antioxidantes que incluem a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GSH-px). Pequenas moléculas como glutaciona, vitamina C, terpenos e carotenoides fornecem uma segunda linha de defesa antioxidante (CNUBBEN *et al*, 2001).

A glutaciona (GSH) reduzida é um tripeptídeo que atua como co-fator da GSH-px, otimizando a redução de peróxido de hidrogênio em água, com formação simultânea de dissulfeto glutaciona (GSSG – glutaciona oxidada) (CNUBBEN *et al.*, 2001). A GSH também reage de forma não-enzimática com o radical hidroxila, N_2O_3 e peroxinitrito, revelando uma atividade antioxidante própria (GRIFFITH, 1999).

Os níveis celulares de GSH são controlados por diversos sistemas enzimáticos: glutamil-transpeptidase (GT), transportador de aminoácidos, glutaciona sintase (GS), glutaciona peroxidase (GSH-px) e glutaciona redutase (GR) (ISHIKAWA *et al.*, 1997). Em condições fisiológicas, a GR reduz o GSSG à GSH na presença do NADPH, formando o ciclo redox (LU, 2000). Em condições de estresse oxidativo, para manter o balanço redox, o GSSG é exportado da célula por proteínas transportadoras dependentes de ATP, resultando na depleção dos níveis de GSH (LEIER *et al.*, 1996).

Figura 3 – Ação das enzimas antioxidantes.



Fonte: Moura Rocha (2009.). Superóxido dismutase, Catalase, Glutaciona peroxidase, glutaciona -s-transferase e glutaciona redutase. GSH, glutaciona reduzida. GSSG, Glutaciona oxidada. ROOH radicais peroxil.

1.2. Úlceras Gástricas

O desequilíbrio entre os fatores protetores e os fatores agressores da mucosa está envolvido na formação da úlcera gástrica. A úlcera é uma doença comum do TGI e pode ser definida como uma lesão profunda na mucosa, com destruição de componentes dos tecidos epitelial e conjuntivo, incluindo miofibroblastos subepiteliais, células musculares lisas, vasos e nervos (MILANI & CALABRO, 2001). É uma doença de origem multifatorial que atinge um considerável número de pessoas em todo o mundo e cujos fatores etiológicos incluem estresse emocional, dieta inadequada, fatores genéticos, uso contínuo ou indiscriminado de AINEs e infecção por *Helicobacter pylori* (JAIN *et al.*, 2007; MUSUMBA *et al.*, 2009).

Os antiinflamatórios não-esteroidais contribuem para a patogênese da úlcera gastrintestinal e representam um importante fator etiológico, uma vez que estão entre os agentes farmacológicos mais utilizados na prática clínica (Wallace, 2001). Fármacos desta classe terapêutica, como indometacina e piroxicam, inibem as isoformas das enzimas ciclooxigenases (COX) resultando em distúrbios na microcirculação sanguínea, aumento da migração e adesão de polimorfonucleares, indução da formação de radicais livres, redução da secreção de muco alcalino e alterações na motilidade gastrintestinal (NYLANDER, 2011).

A sintomatologia da úlcera gástrica é caracterizada por dor epigástrica, tipo queimação, que surge em horários relacionados aos hábitos alimentares, ocorrendo 2 a 3 horas após a alimentação ou à noite. A dor costuma diminuir com a ingestão de alimentos ou substâncias alcalinas (PETERSEN *et al.*, 1988).

Quando não há um tratamento efetivo, as complicações podem ocorrer em até 30% dos pacientes e incluem a hemorragia digestiva alta (20%), hematêmese, perda de sangue oculto nas fezes, perfuração (6%) e a obstrução piloro-duodenal (4%) (COELHO, 1998).

1.2.1. Indução de lesão gástrica por etanol

O álcool é a substância psicoativa mais popular do planeta devido à grande disponibilidade e ao baixo custo. O seu consumo excessivo está relacionado a vários problemas sociais, econômicos e de saúde enfrentados pelos homens. O peso global dos problemas de saúde relacionados ao álcool foi equivalente a 4% de toda a morbidade e mortalidade ocorrida no planeta no ano de 2000, com uma tendência de ascensão. No Brasil, o consumo excessivo de álcool está entre os principais problemas de saúde pública, posto ser este o fator determinante de mais de 10% de toda a morbidade e mortalidade ocorrida no nosso país (MELONI & LARANJEIRA, 2004).

O etanol é uma substância necrosante e o seu consumo excessivo pode causar lesões gástricas em humanos caracterizadas por edema na mucosa, hemorragias subepiteliais, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias. O mecanismo pelo qual isso ocorre é complexo e envolve diversos mediadores (GUSLANDI, 1987).

Em altas concentrações, o etanol é capaz de romper a barreira de muco, quebrando a hidrofobicidade e o efeito tampão do bicarbonato, expondo as células da mucosa aos efeitos do ácido. O etanol também possui um efeito irritante próprio, que aumenta proporcionalmente à sua concentração (DAVENPORT, 1969).

O etanol é capaz de reduzir o fluxo sanguíneo na submucosa através da congestão capilar e vasoconstrição dos microvasos, efeito este provocado pela liberação de mediadores como a endotelina. Outros mediadores podem estar envolvidos na alteração do fluxo sanguíneo, dentre eles estão as lipoxigenases, leucotrienos, citocinas pró-inflamatórias, tromboxanos e espécies reativas de oxigênio (EROs). Além disso, o etanol também é capaz de alterar a atividade da musculatura lisa promovendo uma estase gástrica. O somatório desses efeitos aumenta os riscos de hemorragias e ulcerações, associados às injúrias macroscópicas e histológicas na mucosa (OATES & HAKKINEN, 1988.)

Esses mediadores são formados devido a capacidade do etanol em ativar fatores de transcrição envolvidos na regulação de genes que induzem a síntese de proteínas inflamatórias, como o AP-1 e NF-kB. Isto induz a formação da enzima COX-2, que ao contrário da COX-1, favorece a lesão gástrica. O

etanol também ativa as enzimas iNOS, causando a liberação de grandes quantidades de NO que intensifica a lesão na mucosa gástrica (KISHORE *et al.*, 2002; NANJI *et al.*, 2003).

A isquemia gerada pela redução do fluxo sanguíneo na mucosa desencadeia processos celulares que culminam na formação de EROs, que se acumulam nas células. Este aumento na produção de EROs provoca a depleção dos fatores antioxidantes da mucosa, levando ao estresse oxidativo, onde o excesso de EROs é capaz de promover alterações celulares que podem causar a morte celular (RAO *et al.*, 2004).

Modelos animais representam uma ferramenta importante para se investigar as doenças relacionadas ao álcool, permitindo a utilização de métodos inviáveis na pesquisa clínica (SIEGMUND *et al.*, 2002). Para investigar as alterações provocadas pelo álcool na mucosa gástrica de humanos, utiliza-se o modelo animal onde as lesões gástricas são produzidas pela administração intragástrica de quantidades variáveis de etanol concentrado. Dependendo da quantidade de etanol dado, entre 10% e 40% da porção glandular do estômago de ratos e camundongos torna-se coberto de erosões hemorrágicas e úlceras quando examinados 1 a 2 horas após a administração do etanol (SZABO & SZELENYI, 1987).

1.2.2. Abordagens terapêuticas na úlcera gástrica

A terapia da úlcera gástrica visa à diminuição da secreção ácida e à neutralização do ácido secretado através do uso de inibidores da bomba de prótons, antagonistas dos receptores H_2 , antiácidos e citoprotetores (BRUNTON, 2012.).

Os inibidores da bomba de prótons (IBPs) reduzem as secreções de ácido gástrico basal e estimuladas por alimentos. Tratam-se de pró-fármacos que são ativados dos canalículos secretores de ácido da célula parietal. A sua forma ativa, sulfenamida cíclica, liga-se covalentemente a H^+,K^+ -ATPase, inativando-a irreversivelmente. Os fármacos componentes desse grupo são: omeprazol, pantoprazol, esomeprazol, lansoprazol e rabeprazol (BRUNTON, 2012.).

Os IBPs apresentam como efeitos adversos a cefaleia, diarreia e rashes. O uso crônico de IBPs foi associado a um aumento do risco de fraturas ósseas e à maior susceptibilidade a certas infecções, como pneumonia e colite pseudomembranosa. Pode ocorrer também o aumento de gastrina, responsável pela hipersecreção rebote de ácido gástrico após a interrupção do tratamento com IBPs. A hipersecreção de gastrina também tem sido associada ao crescimento de tumores gastrointestinais (COTE & HOWDEN, 2008).

Os antagonistas dos receptores H_2 competem com a histamina, de modo reversível, pela ligação nos receptores H_2 presentes nas células parietais. Ao diminuir essa ligação da histamina, tais fármacos diminuem a secreção de ácido, predominantemente, a secreção ácida basal, o que explica a sua eficácia na supressão da secreção ácida noturna. Os fármacos que compõem esse grupo são: ranitidina, cimetidina, famotidina e nizatidina (FACKLER, 2002).

Os efeitos adversos desta classe de antagonista podem ser exemplificados por: diarreia, tonturas, rashes transitórios e hipergastrinemia. O uso crônico desses fármacos, principalmente a cimetidina, diminui a ligação da testosterona ao receptor androgênico e inibe as enzimas hepáticas responsáveis pela metabolização do estradiol. Tais efeitos podem causar galactorreia nas mulheres e ginecomastia, redução na contagem de espermatozoides e impotência nos homens. Há também muitas interações farmacológicas entre os fármacos desse grupo e diversos outros medicamentos, uma vez que esses antagonistas inibem enzimas citocromo P450 responsáveis pela metabolização de xenobióticos (BRUNTON, 2012.).

Os antiácidos atuam pela neutralização direta do ácido gástrico, causando a diminuição das dores provocadas pela diminuição excessiva do pH. Por terem eficácia limitada, são usados comumente para casos esporádicos de dores epigástricas. Dentre os fármacos mais utilizados dessa classe estão o hidróxido de magnésio, hidróxido de alumínio, carbonato de cálcio de bicarbonato de sódio (KATZUNG, 2005).

O bicarbonato de sódio provoca uma neutralização ácida de início rápido, porém passageira. O sódio e bicarbonato são rapidamente absorvidos, podendo representar um risco para pacientes hipertensos ou com doenças renais. A reação de neutralização do carbonato de cálcio com o H^+ gera dióxido

de carbono que provoca distensão abdominal e flatulências. O cálcio também pode induzir uma secreção ácida rebote. Os sais de magnésio causam diarreia e os sais de alumínio causam constipação, de modo que as misturas contendo os dois sais prometem preservar a função normal do intestino, no entanto, esse equilíbrio nem sempre é obtido na prática (KATZUNG, 2005; BRUNTON, 2012).

Outro fármaco usado no tratamento de úlceras gástricas é o misoprostol, análogo estável da prostaglandina E₁. Esse medicamento exibe atividades semelhantes às prostaglandinas endógenas, diminuindo a secreção ácida, estimulando a secreção de mucina e bicarbonato, além de aumentar o fluxo sanguíneo local. O uso do misoprostol é restrito a ambientes hospitalares, uma vez que o uso desse fármaco aumenta as contrações uterinas, podendo causar aborto. Outros efeitos adversos incluem diarreia e cólicas abdominais (BRUNTON, 2012).

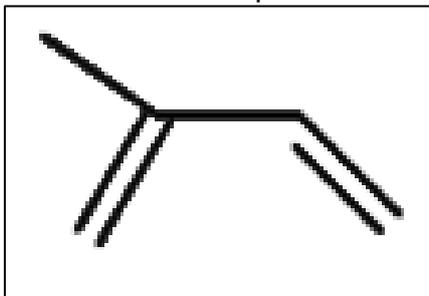
Dentre os fármacos citoprotetores da mucosa gastrintestinal, estão os compostos de bismuto e o sucralfato. Os compostos de bismuto são um complexo coloidal do sal amônio potássico de oxidrocitratobismutato III que se deposita sobre as lesões gastrintestinais facilitando a cicatrização por estimular secreção de muco e a síntese de PGs. De forma semelhante, o sucralfato é constituído de sacarose sulfatada e hidróxido de alumínio formando um gel viscoso sobre a mucosa gástrica que evita a ação de agentes lesivos, além de estimular a secreção de muco e síntese de PGs. No entanto, tais fármacos apresentam efeitos colaterais, a exemplo da diarreia, constipação, náuseas, vômitos e hipergastrinemia. Além disso, não impedem a recorrência das lesões (BRUNTON *et al.*, 2006).

1.3. Terpenos

Terpenos, terpenoides ou isoprenoides são três denominações utilizadas para designar uma extensa e numerosa família de produtos naturais. O termo isoprenoide indica que estes compostos possuem a estrutura do isopreno (2-metil-butadieno, figura 4) ligadas entre si. O termo terpeno refere-se apenas aos hidrocarbonetos insaturados (alcenos), no entanto, pode ocorrer a adição do oxigênio na molécula terpênica, e, se esta preservar a estrutura das

unidades isoprênicas, tal composto passa a ser chamado de terpenoide. Embora haja essa divisão, os três termos são frequentemente usados alternadamente para descrever os mesmos compostos (GIRAL, 1956; SIMÕES, 2001).

Figura 4 - Estrutura química do isopreno.



Fonte: SIMÕES, 2001.

Os terpenos podem ser classificados de acordo com o número de átomos de carbono, ou seja, de unidade isoprênicas. As classes são: hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos e politerpenos (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Os hemiterpenos (C5) é o menor grupo dos terpenos, sendo o próprio isopreno o representante do grupo mais conhecido e estudado. Tal composto é volátil, sendo liberado de tecidos fotossinteticamente ativos (CROTEAU *et al.*, 2000).

Os monoterpenos (C10) são compostos por duas unidades de isopreno. Devido a sua baixa massa molecular, estes costumam ser voláteis, atuando na atração de polinizadores. Os monoterpenos podem ser isolados através de destilação ou extração. O primeiro monoterpeno a ser isolado foi a “turpentina” (C10H16) na década de 1850 na Alemanha. Atualmente são conhecidos mais de 1.000 monoterpenos naturais e alguns têm sido empregados nas indústrias de perfumes e fragrâncias, produção de especiarias, culinária, indústria de alimentos e condimentos (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Os monoterpenos podem ocorrer em pêlos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas e em canais oleíferos. Eles podem estar estocados em flores, como as de laranjeira, folhas, como no capim-limão, nas

cascas dos caules, como na canela, na madeira, como no sândalo ou no pau-rosa, e em frutos como nos de erva-doce (PERES, 2004).

Os sesquiterpenos (C15) são encontrados nos óleos essenciais e em hormônios vegetais, constituindo a maior classe de terpenos (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Como exemplo desta classe, temos a β -ionona que é um sesquiterpenoide degradado no carbono 13 presente naturalmente no tabaco (SALT *et al.*, 1986), maracujá, damasco, na framboesa, cenoura, carambola, cereja e manga (WINTHERHALTER; ROUSEFF, 2002). Nas plantas, possui a função de afastar herbívoros, atrair agentes polinizadores, além de possuir atividade fungicida (WEEKS, 1986).

Os diterpenos (C20) compreendem um grande grupo de compostos que exercem funções como hormônios, ácidos resínicos e agentes anticancerígenos (ROBBERS *et al.*, 1997; CROTEAU *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Os triterpenos (C30) formam os componentes das resinas, látex, ceras e cutícula das plantas. Entre os triterpenos, está uma importante classe de substâncias, os esteroides, os quais são componentes dos lipídios de membrana e precursores de hormônios esteroides. Uma outra classe importante de triterpenos são as saponinas. Como o próprio nome indica, as saponinas são prontamente reconhecidas pela formação de espuma em certos extratos vegetais. Essas substâncias são semelhantes ao sabão porque possuem uma parte hidrossolúvel (glicose) e outra lipossolúvel (triterpeno). Nas plantas, as saponinas desempenham um importante papel na defesa contra insetos e microorganismos (PERES, 2004).

Os tetraterpenoides (C40) são carotenoides, pigmentos responsáveis pela coloração amarela, laranja, vermelha e púrpura dos vegetais, apresentando função essencial na fotossíntese e, especialmente, na pigmentação de flores e frutos (ROBBERS *et al.*, 1997).

Os politerpenoides são aqueles com mais de oito unidades de isopreno, ou seja, com mais de 40 carbonos na sua estrutura, como os longos polímeros encontrados na borracha (ROBBERS *et al.*, 1997; CROTEAU *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

1.3.1. Compostos Terpênicos na Proteção Gástrica

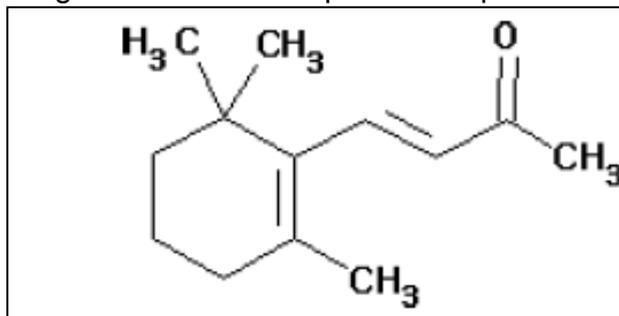
Os terpenos despertam grande interesse farmacológico devido a ampla variedade de efeitos apresentados por este grupo, tais como atividade anticancerígena (CARNESECCHI *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2012; IWAMOTO *et al.*, 2001; JIA-REN *et al.*, 2004) antinociceptiva (AHMAD *et al.*, 2005; GUEDES *et al.*, 2002; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2006), , antifúngica (SHARMA *et al.*, 2012), anti-inflamatória (KANG *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 1996), dentre outras.

Vários terpenos presentes em óleos essenciais mostraram atividade gastroprotetora, inibindo lesões gástricas induzidas por diferentes agentes, como, por exemplo, o monoterpene terpinenol e o sesquiterpeno elemol isolados do óleo essencial de *Cryptomeria japonica* (MATSUNAGA *et al.* 2000). O terpeno β -eudesmol e hinesol mostraram-se como inibidores da secreção gástrica (NOGAMI *et al.*1986) e terpeno isopulegol apresentou atividade gastroprotetora mediada por prostaglandinas, canais de K_{ATP} e sistema antioxidante (SILVA *et al.*, 2009).

1.3.2. β -Ionona

A β -ionona (4-[2,6,6-trimetill-1-ciclohexeno]-3-buten-2-ona) é um sesquiterpenoide degradado - C13 presente na estrutura molecular do retinol, β -caroteno e ácido retinóico (STERMER *et al.*, 1994). Foi sintetizada em 1893, por Tiemann e Kinger, em uma tentativa de esclarecer a estrutura de um composto de aroma de impacto do óleo obtido de *Iris florentina*, as chamadas ironas (NAVES, 1971).

A β -ionona (figura 5) já foi identificada em diferentes tipos de plantas, tais como *Cerastium candidissimum* (LAZARI *et al.*, 2000), *Cistus monspeliensis* (ANGELOPOULOU *et al.*, 2001), *Lepidium meyenii* (TELLEZ *et al.*, 2002), *Medicago marina* (FLAMINI *et al.*, 2003), *Osmanthus fragrans* (ÔMURA *et al.*, 2000), *Thymus serpyllum* (PURI *et al.*, 1985) e na *Boronia megastigma* (MACTAVISH; MENARY, 1997), da qual foi isolada desta pela primeira vez em 1929 (ROBERTS; MENARY, 1994).

Figura 5 - Estrutura química da β -ionona.

Fonte: JANAKIRAM *et al.*, 2008.

Um estudo realizado por Jeong *et al.* (1998), verificou o efeito da β -ionona sobre as enzimas do citocromo P450 e do NADPH-P450 redutase, enzimas responsáveis pela metabolização de diversos compostos exógenos. A β -ionona foi administrada por via subcutânea em ratos na dose de 300, 600 e 1200mg/kg nas 48 e 72 horas que antecederam o sacrifício. Mostrou-se claramente que a β -ionona tem potencial indutor frente às enzimas do citocromo P450 1A1/2,2C e do NADPH-P450 redutase nas três doses analisadas. Isso implica em interação farmacodinâmica deste terpeno com diversos medicamentos metabolizados por esta via hepática. Um exemplo desse fenômeno foi mostrado em um estudo realizado por Parke e Rahman (1969), no qual a administração da β -ionona reduziu o tempo de sono provocado pelo hexobarbital, através da indução do metabolismo hepático deste.

Um estudo realizado em coelhos determinou os principais metabólitos formados após a administração da β -ionona por gavagem na dose de 1g/kg/dia durante 7 dias. A urina foi coletada diariamente durante o período de administração e durante 4 dias após a última administração. A β -ionona foi identificada inalterada na urina dos coelhos, além dos compostos 3-oxo- β -ionona, 3-oxo- β -ionol, diidro-3-oxo- β -ionol e 3-hidroxi- β -ionol que se apresentavam no estado livre, sendo que o 3-oxo- β -ionol e 3-hidroxi- β -ionol foram detectados também na forma conjugada com o ácido glicurônico. Com este estudo pode-se concluir também que a β -ionona é absorvida por via oral, uma vez que esta foi a única forma de administração nos animais (IDE; TOKI, 1970).

Estudos recentes apontam propriedades anticancerígenas da β -ionona. Foi demonstrado que esse terpeno inibiu de maneira dose-dependente a

invasão, migração e adesão de células de hepatocarcinoma humano SK-Hep-1, por inibição da expressão das metaloproteinases 2 e 9. Dessa forma, mostrou-se, em experimentos *in vitro*, que a β -ionona poderia ser eficiente em reduzir a metástase no hepatocarcinoma, fenômeno frequente nesse tipo de câncer (HUANG *et al.*, 2012a). Além disso, a β -ionona apresentou efeitos sinérgicos quando administrada juntamente com o sorafenid, medicamento anticancerígeno aprovado recentemente para tratamento de câncer renal. Ambos os compostos inibiram a invasão celular e migração das células SK-Hep-1 quando administrados isoladamente, no entanto, quando administrados concomitantemente, apresentaram uma potencialização dos efeitos, o que permitiu que ambos fossem administrados em menores doses. Isso representa uma vantagem terapêutica, uma vez que menores doses desses compostos causariam menos reações indesejadas às células saudáveis (HUANG *et al.*, 2012b)

A β -ionona foi eficiente no tratamento de camundongos com câncer de pulmão induzido por benzopireno, ao inibir a proliferação das células cancerígenas e aumentar os níveis de enzimas anti-oxidantes. Os animais tratados apenas com benzopireno mostraram uma depleção dos níveis de enzimas antioxidantes no tecido pulmonar, como a superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase e glutathione redutase. Tanto o pré-tratamento como o pós-tratamento com β -ionona foi capaz de reestabelecer os níveis das enzimas anti-oxidantes, mostrando o potencial efeito citoprotetor desse isoprenoide (ASOKKUMAR *et al.*, 2012).

Estudo realizado por Jia-Ren *et al.* (2004) com células SGC-7901 de adenocarcinoma gástrico humano demonstrou a inibição do crescimento e indução da apoptose dessas células após tratamento com β -ionona, de forma dose-dependente. Posteriormente, Qian Liu *et al.* (2013) demonstrou que o possível mecanismo pelo qual essa indução da apoptose ocorre seria através ativação da caspase 3 pela β -ionona. Tal fenômeno resultaria na clivagem de proteínas, dos elementos do citoesqueleto e das proteínas de reparo do DNA, resultando em morte celular. Este trabalho também demonstrou um aumento na relação bax/bcl-2 nas células cancerígenas. O bax é uma proteína pró-apoptótica que provoca alterações intracelulares, além de inibir a proteína bcl-2, uma proteína anti-apoptótica.

Um estudo feito *in vitro* com de células de hepatocarcinoma Hep3B, de carcinoma de cólon e de leucemia U937, demonstrou que o tratamento com β -ionona pode potencializar o efeito pró-apoptótico do ligando indutor da apoptose relacionado com o TNF (TRAIL). O tratamento dessas células com ambos os compostos foi mais eficiente em induzir a apoptose celular quando comparado ao tratamento isolado. O mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não está claro, porém estima-se que se deva à inibição da ativação do NF- κ B, acarretando em morte celular por indução da proteína Bax, inibição de fatores anti-apoptóticos e ativação das caspases (KIM *et al.*, 2010).

A atividade anticancerígena da β -ionona foi testada *in vivo* através do modelo de carcinoma de cólon em ratos. A análise histopatológica do cólon de ratos com câncer apresentou uma melhora considerável quando os animais foram tratados com o terpeno, com diminuição significativa do tumor. Para avaliar o mecanismo pelo qual isso ocorreu, foram usadas células de câncer de cólon humanas HCT116 em ensaios *in vitro*. A β -ionona causou a supressão do crescimento dessas células, além de induzir a apoptose, explicando a regressão do tamanho do tumor no modelo *in vivo* (JANAKIRAM *et al.*, 2008).

A β -ionona demonstrou suprimir a proliferação de células B16 de melanoma e células MCF-7 e MDA-MB-231 mamárias em estudos *in vitro* (YU *et al.*, 1995; HE *et al.*, 1997; MO; ELSON,1999). Esta inibição foi atribuída tanto à supressão da divisão celular como ao estímulo da apoptose. (MO; ELSON,1999).

Foram evidenciados efeitos citotóxicos da β -ionona em células humanas de osteossarcoma (U2os), embora estes efeitos tenham sido menos pronunciados que os mencionados anteriormente (JIANG *et al.*, 2009).

A atividade anti-inflamatória da β -ionona foi demonstrada por Kang *et al.* (2013) em um trabalho realizado com células BV2 da microglia. O pré-tratamento dessas células com a β -ionona foi capaz de diminuir a expressão de iNOS e COX-2, reduzindo os níveis de NO e prostaglandina E₂ liberados quando as células eram desafiadas com lipopolissacarídeo (LPS). A secreção de TNF- α também diminuiu nas células tratadas com β -ionona. Ficou claro que a β -ionona impediu a ativação do NF- κ B causada pelo LPS, o que explica a redução da expressão dessas enzimas pró-inflamatórias.

Sharma *et al.* (2012) mostraram atividade antibacteriana e antifúngica de derivados da β -ionona utilizando o ensaio de difusão em disco. Alguns derivados apresentaram-se ativos contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Candida albicans*.

A avaliação toxicológica da β -ionona vem sendo realizada pelo Laboratório de Farmacologia e Bioquímica do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Nos estudos realizados até o presente momento, a β -ionona tem se mostrado segura na dose de 200mg/kg, não apresentando diferenças significativas quando comparada ao grupo controle negativo (dados não publicados).

Embora haja relatos de estudos farmacológicos com a β -ionona desde o ano de 1970, a base de dados sobre esta substância ainda é incipiente, o que incita pesquisas com esse composto. Devido à forte correlação dos terpenos com mecanismos gastroprotetores, a β -ionona foi selecionada para ser usada no modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos pelo Laboratório de Farmacologia e Bioquímica do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

2. JUSTIFICATIVA

A cada ano a úlcera péptica afeta quatro milhões de pessoas ao redor do mundo (ZELICKSON *et al.*, 2011). As complicações ocorrem em 10% a 20% dos casos, podendo ocorrer perfuração do estômago em 2-14% dos pacientes, com risco de morte que varia de 0% a 40% (BERTLEFF & LANGE, 2010; LAU *et al.*, 2011; SVANES, 2000; THORSEN *et al.*, 2011). Por tais motivos, as úlceras pépticas representam um problema social e clínico de importância econômica global (SÁNCHEZ-MENDOZA *et al.*, 2011).

Os fármacos usados comumente para tratar a úlcera gástrica são os inibidores da bomba de prótons, antagonistas dos receptores H₂ e antiácidos, no entanto, esses fármacos apresentam inúmeros efeitos indesejáveis, tais como efeito rebote após a interrupção do tratamento, risco aumentado de câncer gástrico, galactorreia, ginecomastia, diarreia e impotência (COTE & HOWDEN, 2008; FACKLER, 2002; BRUNTON, 2012.). Além disso, no Brasil, o tratamento de úlceras gástricas é bastante caro, não sendo acessível a grande parte da população (HIRUMA-LIMA *et al.*, 2006).

Dessa forma, o tratamento das úlceras pépticas ainda constitui um grande desafio, tornando necessário o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos mais eficazes, menos tóxicos e de baixo custo. Assim, o estudo de substâncias naturais que possam interferir neste complexo processo biológico é de extrema relevância, uma vez que a maioria destas substâncias são geralmente de baixo custo e fácil obtenção. Adicionalmente, diversos produtos naturais obtidos de diferentes espécies vegetais têm apresentado atividade gastroprotetora além de contribuir no conhecimento das complexas vias relacionadas com os distúrbios ácido-pépticos.

Pesquisas sobre a atividade farmacológica da β -ionona é algo novo, e poucos resultados com este composto são encontrados na literatura. Assim, este estudo pode sugerir uma aplicabilidade biotecnológica da β -ionona como uma substância útil na compreensão do processo ulcerativo e na construção de medicamentos alternativos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade protetora da β -ionona e seus possíveis mecanismos de ação farmacológica na úlcera gástrica induzida por etanol em camundongos.

3.2. Objetivos Específicos

-
- ✓ Investigar a dependência do efeito farmacológico da β -ionona em relação a dose administrada por via oral aos animais: curva dose-resposta
 - ✓ Avaliar as alterações histopatológicas na mucosa gástrica após a lesão promovida pelo etanol.
 - ✓ Avaliar o mecanismo gastroprotetor da β -ionona no modelo de úlcera induzido por etanol, através da investigação do envolvimento do óxido nítrico, canais de potássio sensíveis ao ATP, prostaglandinas e receptores TRPV1.
 - ✓ Avaliar o efeito da β -ionona sobre os níveis de glutathiona na mucosa gástrica induzida por etanol.
-
-

4. MATERIAIS

4.1. Animais experimentais

No presente trabalho, foram utilizados camundongos Swiss fêmeas, pesando entre 25 e 30 gramas. Os animais foram colocados em caixas, em um ambiente com temperatura de 26 ± 2 °C e ciclo de 12h luz/12h escuro. Os animais foram privados de alimento por 18 horas antes do experimentos, mas tiveram acesso livre a água. Os grupos experimentais consistiram de 6-8 animais por grupo. Os camundongos foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará – UFC e foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC. Os protocolos experimentais estão de acordo com os padrões de uso de animais experimentais e o projeto foi aprovado pelo Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (87/2011).

4.2. Fármacos e Reagentes

A β -ionona foi cedida pelo professor Dr. Damião Pergentino de Sousa da Universidade Federal de Sergipe.

Produtos:

- N-acetilcisteína (EMS, Brasil)
- Polissorbato 80
- Etanol absoluto (Merck, Alemanha)
- Glibenclamida (Sigma, EUA)
- Diazóxido (Sigma, EUA)
- L-NAME (Sigma, EUA)
- L – Arginina (Sigma, EUA)
- Indometacina (Sigma, EUA)
- Misoprostol (Biolab Searle, Brasil)
- ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona) (Sigma, EUA)
- Capsaicina (Sigma, EUA)
- Capsazepina (Sigma, EUA)
- Carboximetilcelulose
- Kits de análise bioquímica (Labtest, Brasil)

4.3. Preparo das substâncias

Imediatamente antes da administração, as drogas foram dissolvidas e diluídas. A β -ionona foi dissolvida em veículo de polissorbato 80 a 1% (1mg de

polissorbato 80/ 1 ml de água). As substâncias L-arginina, L-NAME e misoprostol foram dissolvidos e diluídos em água destilada. Diazóxido, glibenclamida e ODQ foram dissolvidos em DMSO 5%. Capsaicina, capsazepina e indometacina foram dissolvidos em etanol puro, metanol e carboximetilcelulose, respectivamente, e diluídos em água destilada.

4.4. Equipamentos

<u>Equipamentos</u>	<u>Origem</u>
Balança para animais (mod. MF-6)	Filizola, Brasil
Balança analítica (mod. AX-200)	Shimadzu, Japão
Câmera Fotográfica	Sony, China
Leitora de Microplacas	ASYS, Áustria
Microscópio óptico	Quimis, EUA
Banho-maria	Fanen, Brasil
Homogeneizador de tecidos	Ultra Stirrer
Centrífuga refrigerada (modelo Marathon 26KMR)	Fisher Scientific, EUA

5. MÉTODOS

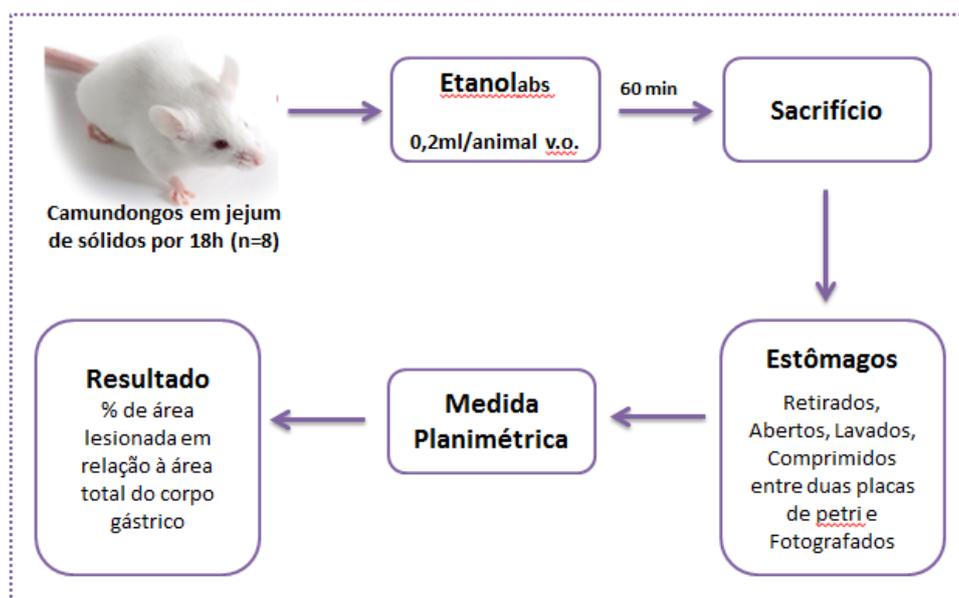
5.1. Modelo Animal

O modelo utilizado foi baseado no modelo de **Lesão Gástrica Induzida por Etanol** previamente descrito por Robert *et al* (1979).

Os camundongos ficaram sob jejum de sólidos por 18h antes do procedimento. A lesão gástrica foi induzida nos camundongos pela administração de etanol 98% (etanol) (0,2 mL/animal, gavagem). Decorridos 60 minutos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e seus estômagos retirados, abertos ao longo da curvatura maior, lavados com solução salina 0,9% e comprimidos entre duas placas de Petri para captura digital da imagem através da câmera fotográfica. A área de lesão gástrica glandular foi determinada com o auxílio de um programa de planimetria gráfica e os dados expressos em termos de porcentagem de área lesada em relação à área total do corpo gástrico (Figura 6).

A substância utilizada como padrão positivo nas abordagens experimentais foi a N-acetilcisteína, composto antioxidante que apresenta atividade gastroprotetora em modelos de lesão gástrica induzida por diversos agentes ulcerogênicos, tais como o etanol e indometacina (HENAGAN *et al.*, 1986; REZIN *et al.*, 2010).

Figura 6 - Modelo experimental utilizado na avaliação do efeito gastroprotetor da β -ionona.



Fonte: elaborada pela autora

5.2. Abordagens Experimentais

5.2.1. Efeito da β -ionona na lesão gástrica induzida por etanol: curva dose-resposta

Para avaliar o efeito de diferentes doses de β -ionona (BI) na lesão gástrica por etanol, inicialmente, a mesma foi administrada nas doses de 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 mg/kg v.o. Como controles foram usados animais tratados com o veículo (solução de Polisorbato 80 1%; 0,2ml v.o.) ou N-acetilcisteína (NAC; 750 mg/kg, v.o.). Decorridos 60 minutos, a lesão gástrica por etanol (0,2 mL/animal, v.o.) foi induzida, os estômagos retirados e o percentual de lesão medido conforme descrito anteriormente no item 5.1. Amostras dos estômagos foram retiradas, fixadas em formol a 10% e, 24 horas após, colocadas em álcool etílico a 70% para posterior avaliação histopatológica.

5.2.2. Avaliação histopatológica

Após a indução das lesões gástricas e pré-tratamento com a β -ionona como descrito nos item 5.1 e 5.2.1, os estômagos foram então preparados para fixação e corte para a confecção de laminas para avaliação microscópica. O critério para a avaliação histológica foi o de Laine & Weinstein (1998), que

atribui escores aos parâmetros edema (0-4), hemorragia (0-4), perda de células epiteliais (0-3) e infiltrado inflamatório (0-3), totalizando um máximo de 14 escores. As análises foram levadas como estudo cego.

5.2.3. Investigação do mecanismo de ação da β -ionona no modelo de lesão gástrica induzida por etanol

5.2.3.1 Investigação do papel das prostaglandinas (PG's)

Os animais receberam o veículo (solução de Polisorbato 80 1%; 0,2ml v.o.), BI (12,5 mg/kg, v.o.) ou misoprostol, análogo de prostaglandina E1, (50 μ g/kg, v.o.) 60 minutos antes da administração do etanol (0,2mL/animal, v.o.). A participação das prostaglandinas foi avaliada através da administração de indometacina, inibidor inespecífico das ciclooxigenases, (10 mg/kg, v.o.) 60 minutos antes de misoprostol (50 μ g/kg, v.o.) ou BI (12,5 mg/kg, v.o.). Após 60 minutos da administração do misoprostol e da BI, os animais receberam etanol (0,2 mL/animal, v.o.). Decorridos 60 minutos da administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados e o percentual de lesão gástrica medido conforme descrito anteriormente no item 5.1.

5.2.3.2. Estudo do envolvimento do óxido nítrico (NO)

Modulação Farmacológica com L-NAME

Os animais recebem o veículo (solução de Polisorbato 80 1%; 0,2ml v.o.), BI (12,5 mg/kg, v.o.) 60 min antes ou L-arginina (substrato para formação de óxido nítrico) (600 mg/kg i.p.) 30 minutos antes da administração do etanol (0,2 mL/animal, v.o.). A participação do óxido nítrico foi avaliada através da administração de L-NAME (N-nitro-L-arginina-metilester, um inibidor inespecífico de Óxido Nítrico Sintase - NOS) (20 mg/kg i.p.) 30 minutos antes de L-arginina (600 mg/kg i.p.) ou BI (12,5 mg/kg, v.o.). Após 30 minutos da administração de L-arginina e 60min depois da administração da BI, os animais receberam o etanol (0,2 mL/animal, v.o.). Decorridos 60 minutos da administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados

e o percentual de lesão gástrica medido conforme descrito anteriormente no item 5.1.

Dosagem dos níveis de nitrito na mucosa gástrica

Os animais receberam veículo (solução de Polisorbato 80 1%; 0,2ml v.o.), BI (12,5 mg/kg, v.o.) 60 min antes ou L-arginina (substrato para formação de óxido nítrico) (600 mg/kg i.p.) 30 minutos antes da administração do etanol (0,2 mL/animal, v.o.). Após a formação das lesões, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos retirados para realização da dosagem. A porção glandular do estômago foi separada, pesada e homogeneizada em solução resfriada de tampão fosfato (homogenato a 10%), com auxílio de um homogeneizador de tecidos, e centrifugadas (1500 x g; 15 minutos) para obtenção do sobrenadante. O sobrenadante do macerado foi plaqueado (placas de 96 poços) em duplicata (80 µL de cada amostra) e incubado em uma solução (0,04 mL de nitrato redutase, NADPH, KH₂PO₄ e água destilada) por 12 horas para que o NO₃⁻ (nitrato) das amostras fosse convertido em NO₂⁻ (nitrito). No dia subsequente, uma curva-padrão de referência de NO₂⁻ foi preparada e plaqueada. Foram adicionados 80 µL da solução de Griess (1% de sufamilamida em 1% H₃PO₄/ 0,1% de N-1-naftil-etilenodiamina dihidroclorato/água destilada/1:1:1:1) em cada poço. A coloração púrpura/magenta foi medida em leitor de ELISA com filtro de 540 nm. Os valores obtidos para as amostras experimentais foram plotados com curva padrão e expressos em µM de NO₂⁻.

5.2.3.3. Investigação do papel da guanosina monofosfato cíclico (GMPc)

Para avaliar o papel do GMPc (guanosina 3',5'-monofosfato cíclico) intracelular no efeito protetor da BI, o ODQ (inibidor da enzima guanilato ciclase) (10 mg/kg i.p.) foi administrado 30 minutos antes da BI (12,5 mg/kg, v.o.). Após 30 minutos da administração de ODQ e 60 min depois da administração da BI, o etanol (0,2 mL/animal, v.o.) foi administrado para indução da lesão gástrica. Decorridos 60 minutos da administração do etanol,

os animais foram sacrificados, os estômagos retirados e o percentual de lesão gástrica medido conforme descrito anteriormente no item 5.1.

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

Os animais receberam o veículo (solução de Polisorbato 80 1%; 0,2 ml v.o.), BI (12,5 mg/kg, v.o.) 60 min antes ou diazóxido (ativador dos canais K_{ATP}) (3mg/kg i.p.) 30 minutos antes da administração do etanol (0,2 mL/animal, v.o.). A participação dos canais K_{ATP} foi avaliada através da administração de glibenclamida (bloqueador dos canais K_{ATP}) (5 mg/kg i.p.) 30 minutos antes de diazóxido (3 mg/kg i.p.) ou BI (12,5 mg/kg, v.o.). Após 30 minutos da administração de diazóxido e 60 min depois da administração da BI, os animais receberam etanol (0,2 mL/animal, v.o.). Decorridos 60 minutos da administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados e o percentual de lesão gástrica medido conforme descrito anteriormente no item 5.1.

5.2.3.5. Avaliação do envolvimento dos Receptores Vaniloides TRPV1.

A participação dos neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina foi avaliada através do envolvimento dos receptores TRPV1 (Receptor de Potencial Transiente Vaniloide 1).

Os animais foram tratados com veículo (solução de Polisorbato 80 1%; 0,2 ml v.o.), BI (12,5 mg/kg, v.o.) ou capsaicina (agonista dos receptores TRPV1) (0,3 mg/kg, v.o.) 60 minutos antes da administração do etanol (0,2 mL/animal, v.o.). Para avaliação do papel dos receptores TRPV1 no efeito gastroprotetor da BI, foi administrada capsazepina (antagonista dos receptores TRPV1) (5 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes de capsaicina (0,3 mg/kg, v.o.) ou BI (12,5 mg/kg, v.o.). Após 60 minutos da administração da BI e capsaicina, os animais receberam etanol (0,2 mL/animal, v.o.). Decorridos 60 minutos da administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados

e o percentual de lesão gástrica medido conforme descrito anteriormente no item 5.1.

5.2.3.6. Investigação do Envolvimento da glutathiona reduzida (GSH)

Objetivando-se investigar uma possível atividade antioxidante no mecanismo de ação da β -ionona, foram utilizadas duas abordagens: os animais foram divididos em grupos e tratados com BI (12,5 mg/kg, v.o.) e veículo (solução de Polisorbato 80 1%; 0,2 ml v.o.) antes da indução das lesões por etanol. Outros três grupos receberam veículo (solução de Polisorbato 80 1%; 0,2ml v.o.), BI (12,5 mg/kg, v.o.) e NAC (750 mg/kg, v.o.), mas não foram induzidas lesões. Após a formação das lesões e dos tratamentos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as porções glandulares dos estômagos retiradas para realização do homogeneizado com solução gelada de EDTA 0,02M a 10%. Alíquotas de 400 μ l do homogeneizado foram misturadas com 320 μ l de água destilada e 80 μ l de ácido tricloroacético (50%) em eppendorfs e centrifugadas a 4000 RPM por 15 min. Subsequentemente, o sobrenadante (400 μ l) foi misturado com 800 μ l de solução tampão Tris-HCL (0,4 M, pH 8,9) e 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB; 0,01 M). Depois de agitada a mistura reacional por 3 minutos, foi medida a absorvância em 412 nm (SEDLAK e LINDSAY, 1968). A concentração de GSH foi calculada através de uma curva padrão de glutathiona reduzida (GSH) e os resultados expressos em μ g de GSH/g de tecido.

5.3. Análise estatística

Os resultados do teste de lesão gástrica induzida por etanol foram expressos como média das percentagens das áreas ulceradas \pm o Erro Padrão da Média (EPM). Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos foi realizada Análise de Variância (ANOVA) utilizando o teste de Newman-Keuls. Os dados não paramétricos resultantes da avaliação histopatológica foram reportados como medianas, valor máximo e mínimo, sendo aplicado os

testes estatísticos de Kruskal-Wallis e teste de Dunn. Para todas as análises foi considerado significativo $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. A β -ionona previne de forma dose-dependente as lesões gástricas induzidas por etanol

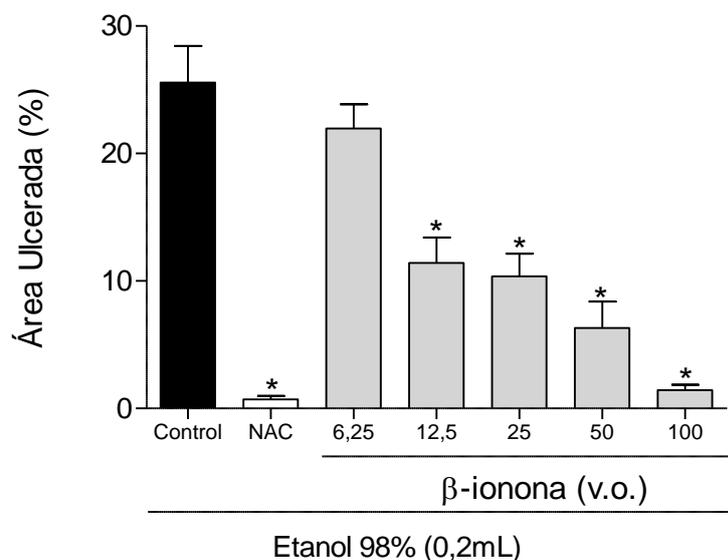
Os resultados das avaliações macroscópicas realizadas nas mucosas gástricas para investigação do efeito gastroprotetor da BI podem ser visualizados na tabela 1 e figura 7. A administração do etanol promoveu dano à mucosa gástrica no grupo de animais que recebeu somente veículo (controle). A área lesionada, expressa como percentual em relação à área total do corpo gástrico no grupo controle foi de $25,57 \pm 2,86\%$. O tratamento dos animais com a BI, nas doses de 12,5; 25; 50 e 100mg/kg v.o., reduziu significativamente e de forma dose-dependente, a área da lesão gástrica induzida pelo etanol para ($11,41 \pm 2,0$; $7,92 \pm 1,8^*$; $6,32 \pm 2,0$ e $1,43 \pm 0,42 \%$, respectivamente). Entretanto, a BI na menor dose avaliada (6,25 mg/kg), não apresentou redução significativa da área ulcerada ($21,97 \pm 1,8\%$). A N-acetilcisteína (NAC; 750 mg/kg, v.o.), fármaco antioxidante, reduziu significativamente as lesões gástricas ($0,71 \pm 0,28$), o que corresponde a uma redução de 94,64%. É importante ressaltar que o efeito promovido pela BI nas doses de 50 e 100mg/kg não foi estatisticamente diferente do promovido pela NAC.

Tabela 1 - Efeito protetor da β -ionona no modelo de lesão gástrica induzida por etanol.

Grupos	Doses (mg/kg)	Área Ulcerada (%)	% de inibição
Controle negativo	0,2 ml	$25,57 \pm 2,8$	
NAC	750	$0,71 \pm 0,2^*$	94,60
β – IONONA	6,25	$21,97 \pm 1,8$	14,07
β – IONONA	12,5	$11,41 \pm 2,0^*$	55,37
β – IONONA	25	$7,92 \pm 1,8^*$	69,01
β – IONONA	50	$6,32 \pm 2,0^*$	75,28
β – IONONA	100	$1,43 \pm 0,4^*$	94,40

Os valores representam a média \pm E.P.M. do percentual da área lesionada do estômago, após 60 min da indução da lesão. Grupos de oito animais foram tratados com Veículo (Controle); N-acetilcisteína (NAC, 750 mg/kg, v.o.) e BI (6,25; 12,5; 25; 50 e 100mg/kg, v.o.) * $p < 0,001$ representam significância em relação ao grupo controle (ANOVA e Teste de Newman-Keuls).

Figura 7 - Efeito protetor da β -ionona no modelo de lesão gástrica induzida por etanol.



As barras representam a média \pm E.P.M. do percentual da área lesionada do estômago, após 60 min. da indução da lesão. Grupos de oito animais foram tratados com Veículo (Controle); N-acetilcisteína (NAC, 750 mg/kg, v.o.) e BI (6,25; 12,5; 25; 50 e 100 mg/kg, v.o.) * $p < 0.001$ representam significância em relação ao grupo controle (ANOVA e Teste de Newman-Keuls).

6.2. β -ionona reduz os escores dos parâmetros histopatológicos de lesão gástrica induzida por etanol

O efeito gastroprotetor da BI foi analisado microscopicamente e está representado na Figura 8. Os parâmetros de hemorragia, perda de células epiteliais e infiltrado de células inflamatórias foram analisados de forma semi-quantitativa e estão dispostos na Tabela 2.

O parâmetro de hemorragia não foi evidenciado em animais do grupo salina. Pode-se observar que animais do grupo controle apresentaram extensa área lesionada associada à hemorragia. Este parâmetro ocorreu de forma intensa com mediana e variações de 4 (4-4) e, de forma significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo salina. De forma semelhante ao grupo salina, não foi observada hemorragia em animais pré-tratados com NAC. O pré-tratamento com BI (12,5 mg/kg v.o.) reduziu a hemorragia de forma significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao controle, apresentando mediana e variações de 0,5 (0-1). A perda de células epiteliais não foi observada em animais do grupo salina. Observou-se no grupo controle um número reduzido de células mucoides, principais e parietais. Desta forma, a perda de células epiteliais ocorreu de

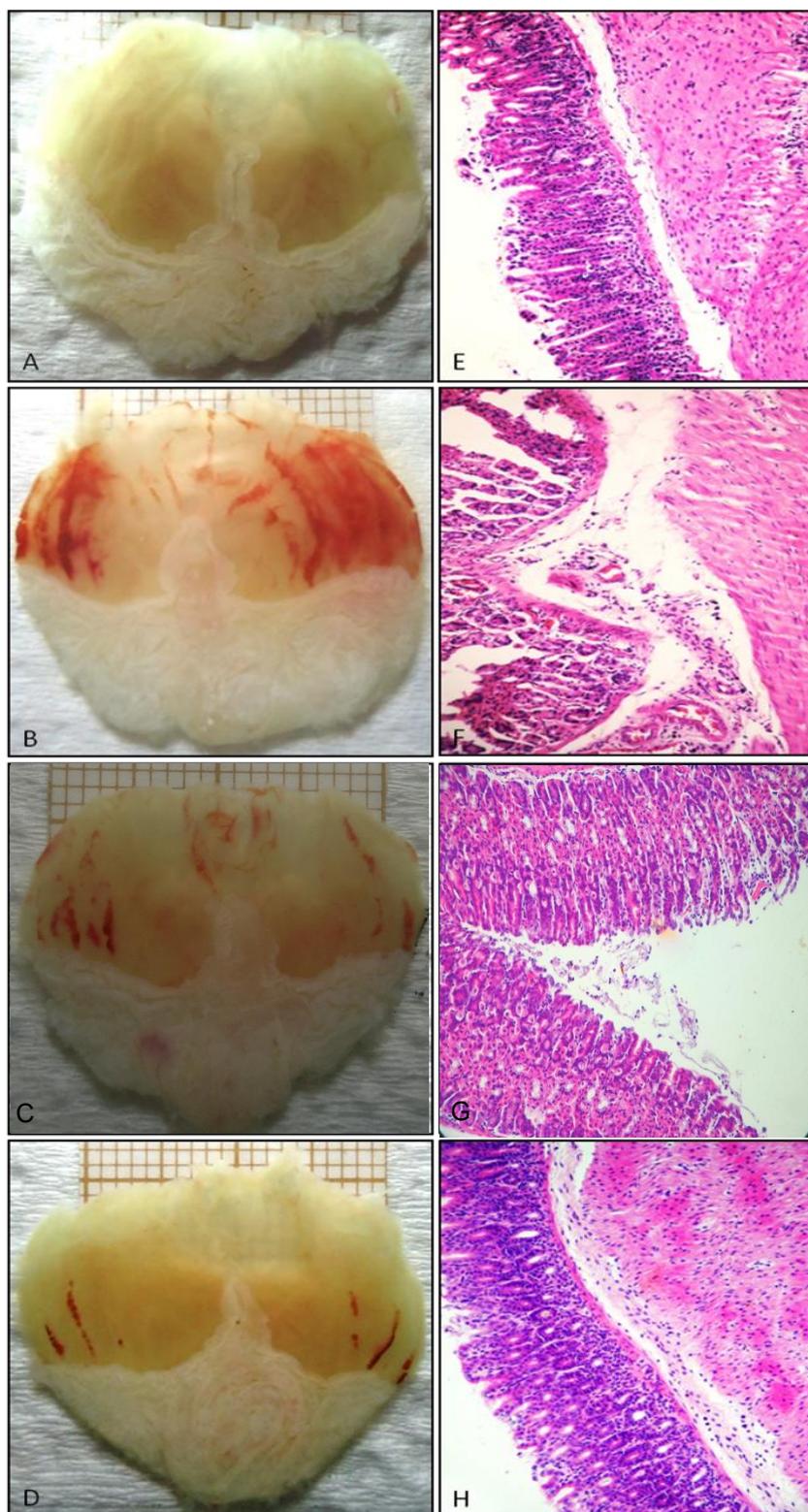
forma intensa, com mediana e variações de 3 (2-3). As diferenças foram significativas ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo salina. O pré-tratamento com NAC (750 mg/kg; v.o.) ou BI (12,5 mg/kg v.o.) preveniu a perda epitelial, apresentando mediana e variações de 1 (1-1). As diferenças foram significativas ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle. O infiltrado de células inflamatórias foi raramente observado nos grupos controle e experimental, não havendo diferença significativa.

Tabela 2 - Efeito da β -ionona sobre a análise histopatológica da lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.

Grupos	Doses (mg/kg)	Escore				Somatório dos escores
		Hemorragia (0-4)	Edema (0-4)	Perda de células epiteliais (0-3)	Células Inflamatórias (0-3)	
Veículo		0	0	0	0	0
Controle	0,2 ml	4(4-4)*	3(2-4)*	3(2-3)*	1(0-1)	11
NAC	750	0 [#]	0 [#]	1(1-1) [#]	0(0-1)	1
β - IONONA	12,5	0.5(0-1) [#]	0.5(0-1) [#]	1(1-1) [#]	1(0-1)	3

Os valores representam a mediana (mínimo – máximo) dos escores de lesão gástrica do estômago mensurados de acordo com os critérios de Laine & Weinstein (1998). Os animais foram tratados com veículo (controle); NAC (750 mg/kg; v.o.); β -ionona (12,5mg/kg) e em seguida 0,2 ml de Etanol 99,8% v.o Como parâmetro de comparação, foram utilizados animais saudáveis que receberam apenas salina 0,9%. * $p < 0.05$ representa significância em relação ao grupo Salina e [#] em relação ao grupo controle (Kruskall-Wallis e teste de Dunn).

FIGURA 8 – Fotografias (A, B, C e D) e fotomicrografias (E, F, G e H) de estômagos de camundongos submetidos à lesão induzida por etanol.



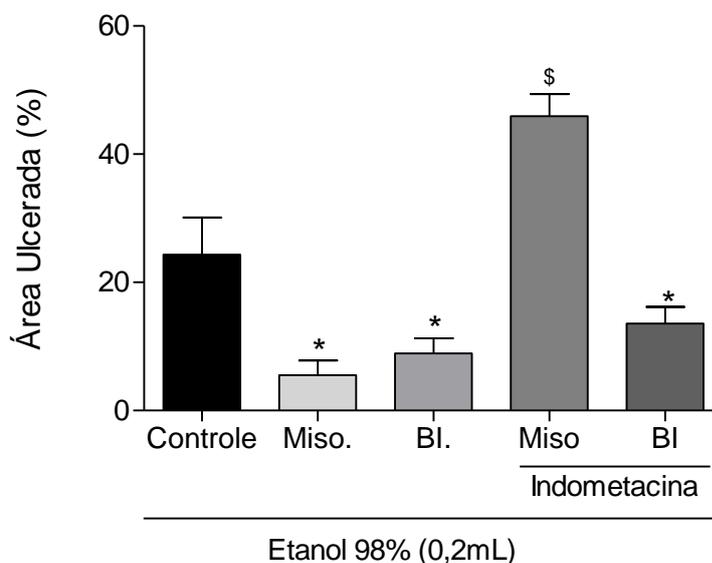
Fonte: Elaborada pela autora. As mucosas gástricas dos animais foram removidas e utilizadas para confecção de lâminas histológicas pelo método de H&E. Fotografias e fotomicrografias das mucosas gástricas foram obtidas de animais do grupo salina (A e E), control e (B e F), BI (12,5 mg/kg v.o.) (C e G) e NAC (750 mg/kg v.o.) (D e H), aumento de 200x.

6.3. Investigação dos mecanismos gastroprotetores da β -ionona no modelo de lesão gástrica induzida por etanol

6.3.1. Efeito gastroprotetor da β -ionona no modelo de lesão gástrica induzida por etanol é independente da atividade da enzima Ciclooxigenase.

O pré-tratamento com BI (12,5 mg/kg, v.o.) foi capaz de promover uma inibição significativa do percentual de área lesionada ($8,92 \pm 2,3\%$) em comparação ao grupo tratado com veículo ($24,32 \pm 5,7\%$), correspondente a percentual de inibição de 63,32%. Misoprostol (50 μ g/kg, i.p.), um análogo da PGE_1 , foi capaz de reduzir significativamente a área lesionada, quando comparado ao grupo controle veículo ($5,54 \pm 2,2\%$, 77,22% inibição). O pré-tratamento com Indometacina (10 mg/kg, v.o.), antiinflamatório não esteroideal (AINE) inibidor não seletivo da COX, foi capaz de reverter a ação protetora do grupo Misoprostol ($45,91 \pm 3,4\%$), mas não alterou de forma significativa a ação da BI nas lesões ($13,58 \pm 2,5\%$; 44,16% inibição) quando comparados ao grupos que não receberam Indometacina (Figura 9).

Figura 9 - Pré-tratamento com indometacina não inibe a proteção gástrica da β -ionona no modelo de Lesão Gástrica Induzida por Etanol.

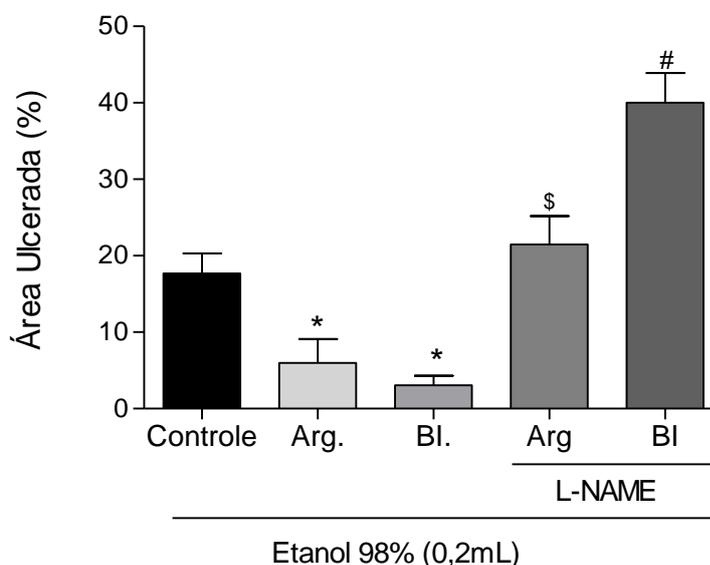


Os valores representam a média \pm E.P.M. do percentual da área lesionada do estômago, após 60 minutos da indução da lesão. Grupos de oito animais foram tratados com Veículo (controle); BI (12,5 mg/kg, v.o.); Misoprostol (50 μ g/kg, v.o.); Indometacina (10 mg/kg, v.o.) + BI (12,5 mg/kg, v.o.) ou Indometacina (10 mg/kg, v.o.) + Misoprostol (50 μ g/kg, v.o.). * $p < 0.05$ vs grupo controle; § $p < 0.05$ vs grupo tratado somente com misoprostol. (ANOVA e Teste de Newman-Keuls).

6.3.2. Efeito gastroprotetor da β -ionona no modelo de lesão gástrica induzida por etanol é revertido pelo pré-tratamento dos animais com L-NAME.

O tratamento dos animais com BI (12,5 mg/kg, v.o.) promoveu uma inibição significativa do percentual de área lesionada ($3,07 \pm 1,2\%$) em comparação ao grupo controle ($17,67 \pm 2,6\%$), correspondente a percentual de inibição de 82,62%. L-Arginina (600 mg/kg, i.p.), um aminoácido que é usado como substrato para a síntese de NO, também foi capaz de reduzir a área lesionada ($5,60 \pm 3,1\%$), quando comparado ao grupo controle veículo ($68,30\%$ inibição). Entretanto, o pré-tratamento com L-NAME (20 mg/kg, i.p.), um inibidor não seletivo das isoformas da NOS, foi capaz de reverter a ação protetora da BI ($40,02 \pm 3,8\%$) e do grupo L-Arginina ($21,47 \pm 3,7\%$) de forma significativa ($p < 0.05$) quando comparados aos grupos que receberam apenas BI ou L-arginina (Figura 10).

Figura 10 – Pré-tratamento com L-NAME abole o efeito gastroprotetor da da β -ionona no modelo de lesão gástrica induzida por etanol.

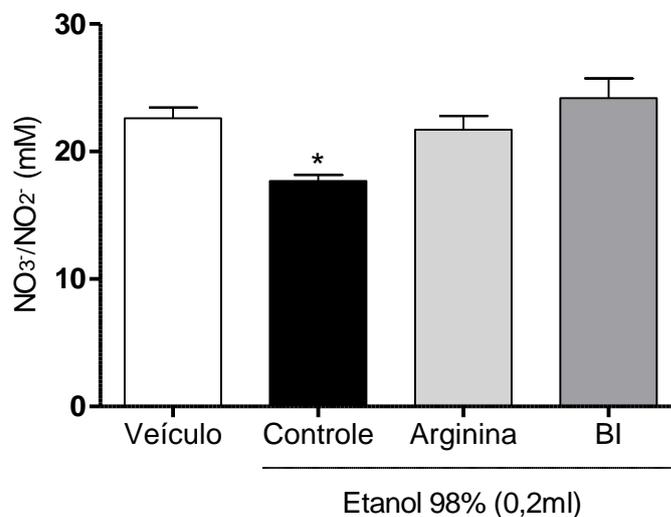


As barras representam a média \pm E.P.M. do percentual da área lesionada do estômago, após 60 minutos da indução da lesão. Foram utilizados grupos de oito animais, os quais foram tratados com Veículo (controle); BI (12.5 mg/kg, v.o.); L-arginina (600 mg/kg, i.p.); L-NAME (20 mg/kg, i.p.) + BI (12.5 mg/kg, v.o.) e L-NAME (20 mg/kg, i.p.) + L-arginina (600 mg/kg, i.p.) sendo L-NAME 30 min antes da BI e da L-arginina. * $p < 0.05$ vs. Grupo tratado com veículo; # $p < 0.05$ vs. Grupo tratado somente com BI; \$ $p < 0.05$ vs. Grupo tratado somente com L-arginina. (ANOVA e Teste de Newman-Keuls).

6.3.3. A β -ionona induz aumento dos níveis de óxido nítrico na mucosa gástrica com lesões por etanol.

Para complementar o entendimento da participação do NO na gastroproteção promovida pela BI, foi dosado a concentração de nitrato/nitrito na mucosa gástrica. Corroborando com os achados anteriores, o grupo pré-tratado com BI (12,5 mg/kg v.o.) mostrou uma maior concentração de nitrito (24,18 mM) que o grupo pré-tratado com veículo (17,68 mM). A L-arginina foi usada como padrão positivo por ser precursora na biossíntese do NO, e, como tal, aumentou os níveis de nitrito que podem ser traduzidos como o aumento de NO (21,71 mM). Como parâmetro de comparação, foram utilizados animais saudáveis que receberam apenas veículo (20,51 mM). Vale ressaltar que o grupo BI, Arginina e Veículo não apresentaram diferença estatística.

Figura 11 – O pré-tratamento com β -ionona induz aumento dos níveis de nitrito na mucosa gástrica com lesões por etanol.

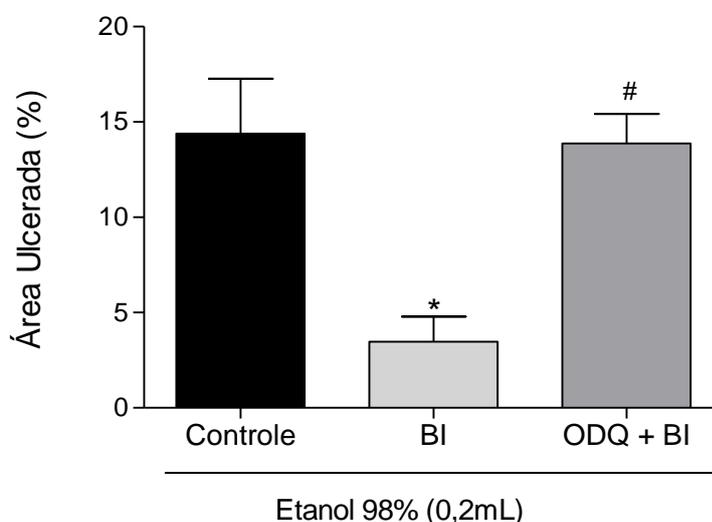


As barras representam a média \pm E.P.M. do percentual da área lesionada do estômago, após 60 minutos da indução da lesão. Foram utilizados grupos de oito animais, os quais foram pré-tratados com Veículo (controle); BI (12,5 mg/kg, v.o.); L-arginina (600 mg/kg, i.p.) antes da administração do etanol. Como padrão, um grupo foi tratado apenas com o veículo (Veículo). * $p < 0.05$ vs. Grupo veículo. (ANOVA e Teste de Newman-Keuls).

6.3.4. Efeito gastroprotetor da β -ionona no modelo de lesão gástrica induzida por etanol é dependente da atividade da enzima Guanilato-Ciclase.

O grupo tratado com BI (12,5 mg/kg, v.o.) apresentou uma inibição significativa do percentual de área lesionada ($3,48 \pm 1,3\%$) em comparação ao grupo veículo ($14,39 \pm 2,87\%$), correspondente a um percentual de inibição de 75,81%. O grupo pré-tratado com ODQ, um inibidor seletivo da guanilato ciclase, inibiu a ação protetora da β -ionona ($13,88 \pm 1,5\%$) de forma significativa ($p < 0.05$) quando comparado com o grupo que foi tratado somente com BI (Figura 12).

Figura 12 – Envolvimento do GMPc no efeito gastroprotetor da β -ionona no modelo de lesão gástrica induzida por etanol.

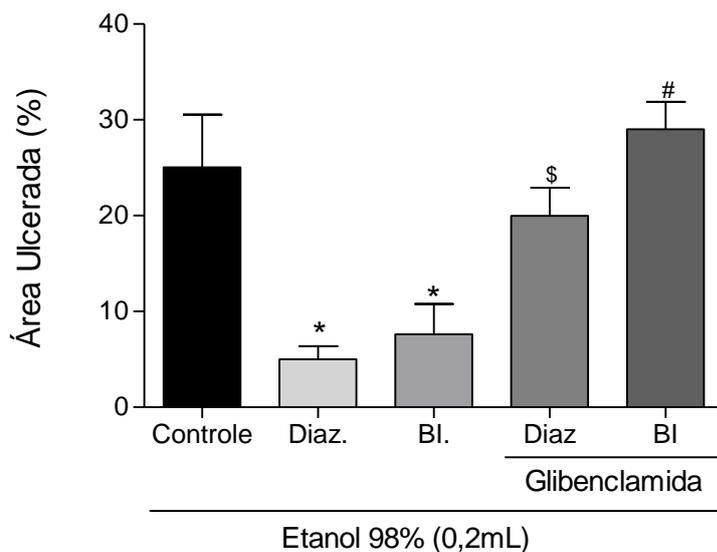


As barras representam a média \pm E.P.M. do percentual da área lesionada do estômago, após 60 min. da indução da lesão. Grupos de oito animais foram tratados com Veículo (controle); BI (12,5 mg/kg, v.o.) ou ODQ (10 mg/kg, i.p.) + BI (12,5 mg/kg, v.o.) * $p < 0.05$ vs grupo controle; # $p < 0.05$ vs grupo tratado somente com BI (ANOVA e Teste de Newman-Keuls).

6.3.5. Efeito gastroprotetor da β -ionona no modelo de lesão gástrica induzida por etanol é dependente da abertura dos canais K_{ATP} .

O tratamento dos animais com BI (12,5 mg/kg, v.o.) promoveu uma inibição significativa do percentual de área lesionada ($7,61 \pm 3,1$ %) em comparação ao grupo controle ($25,05 \pm 5,49\%$), correspondente a percentual de inibição de 69,62%. O tratamento dos animais com Diazóxido (450 mg/kg, i.p.), um vasodilatador que atua abrindo canais K_{ATP} , também foi capaz de reduzir a área lesionada ($5,02 \pm 1,34\%$), quando comparado ao grupo controle (79,96% de inibição). O pré-tratamento com Glibenclamida (20 mg/kg, i.p.), um bloqueador dos canais K_{ATP} , foi capaz de reverter a ação protetora da β -ionona ($29,0 \pm 2,86\%$) e do grupo Diazóxido ($19,97 \pm 2,9\%$) de forma significativa ($p < 0.05$) quando comparados aos grupos que não receberam Glibenclamida (Figura 13).

Figura 13 - Envolvimento dos canais K_{ATP} no efeito gastroprotetor da β -ionona no modelo de lesão gástrica induzida por etanol.

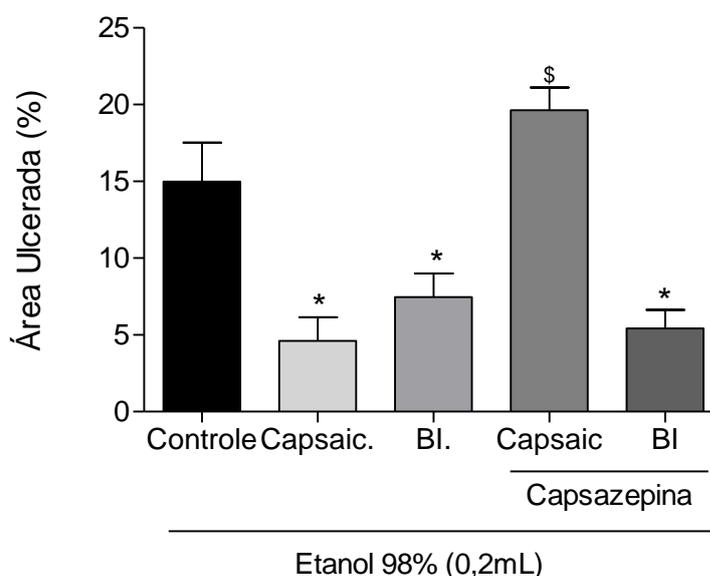


As barras representam a média \pm E.P.M. do percentual da área lesionada do estômago após 60 minutos da indução da lesão. Grupos de oito animais foram tratados com Veículo (controle); BI (12.5 mg/kg, v.o.); diazóxido (3 mg/kg, i.p.); Glibenclamida (5 mg/kg, i.p.) + BI (12.5 mg/kg, v.o.) ou Glibenclamida (5 mg/kg, i.p.) + diazóxido (3 mg/kg, i.p.). * $p < 0.05$ vs grupo controle; # $p < 0.05$ vs grupo tratado somente com BI; § $p < 0.05$ vs grupo tratado somente com diazóxido. (ANOVA e Teste de Newman-Keuls).

6.3.6. O efeito gastroprotetor da β -ionona no modelo de lesão gástrica induzida por etanol é independente da ativação dos receptores TRPV1 nos neurônios aferentes.

O grupo tratado com BI (12,5 mg/kg, v.o.) apresentou uma inibição significativa do percentual de área lesionada ($7,46 \pm 1,5\%$) em comparação ao grupo tratado somente com veículo ($14,99 \pm 2,5\%$), que correspondente a uma inibição percentual de 50,23%. Capsaicina (0,3 mg/kg, v.o.), um agonista dos receptores TRPV1, foi capaz de reduzir significativamente a área lesionada, quando comparado ao grupo controle veículo ($4,61 \pm 1,5\%$, 69,24% inibição). O pré-tratamento com capsazepina (5 mg/kg, i.p.), um bloqueador seletivo dos receptores TRPV1, foi capaz de reverter a ação protetora da capsaicina ($19,63 \pm 1,4\%$) de forma significativa, porém não foi capaz de inibir a atividade protetora da BI de forma significativa ($5,42 \pm 1,2\%$, 63,97 inibição), quando comparados ao grupos que não receberam capsazepina (Figura 14).

Figura 14 – Pré-tratamento com capsazepina não inibe a proteção gástrica da β -ionona no modelo de Lesão Gástrica Induzida por Etanol.



As barras representam a média \pm E.P.M. do percentual da área lesionada do estômago, após 60 min. da indução da lesão. Grupos de oito animais foram tratados com Veículo (Controle); BI (12.5 mg/kg, v.o.); Capsaicina (0.3 mg/kg, v.o.); Capsazepina (5 mg/kg, i.p.) + BI (12.5 mg/kg, v.o.) ou Capsazepina (5 mg/kg, i.p.) + Capsaicina (0.3 mg/kg, v.o.). * $p < 0.05$ vs grupo controle; § $p < 0.05$ vs grupo tratado somente com capsaicina. (ANOVA e Teste de Newman-Keuls).

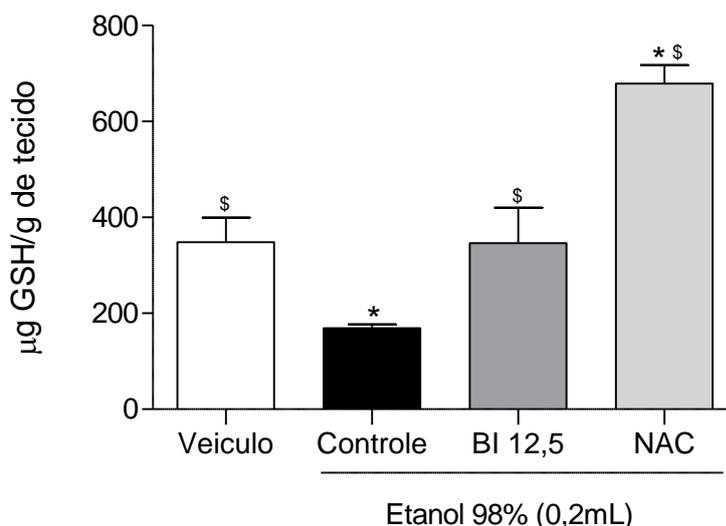
6.3.7. A β -ionona inibe a redução dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) na mucosa gástrica de camundongos com lesão induzida por etanol.

A concentração de GSH das amostras foi calculada a partir da leitura das absorbâncias após a reação com o DNTB, através de uma curva padrão de GSH. As médias dos valores calculados estão expressas nas figuras 15 e 16. Na primeira abordagem, figura 15, o grupo que recebeu somente o veículo antes do etanol (grupo controle) mostra significativa redução na concentração de GSH do tecido ($168,8 \pm 8,34 \mu\text{g/g}$ de tecido), quando comparado com o grupo que recebeu apenas o veículo ($348,4 \pm 51,43 \mu\text{g/g}$ de tecido). O pré tratamento com BI foi efetivo em proteger contra o dano oxidativo ($346,4 \pm 60,32 \mu\text{g/g}$ de tecido), evitando a depleção nos níveis de GSH no tecido. Como esperado, o NAC, composto antioxidante, também foi eficiente em evitar a depleção dos níveis de GSH ($679,3 \pm 38,61 \mu\text{g/g}$ de tecido).

Na segunda abordagem, figura 16, o efeito da BI sobre a GSH gástrica foi avaliada em animais sem lesão. Observou-se que a BI não aumenta os

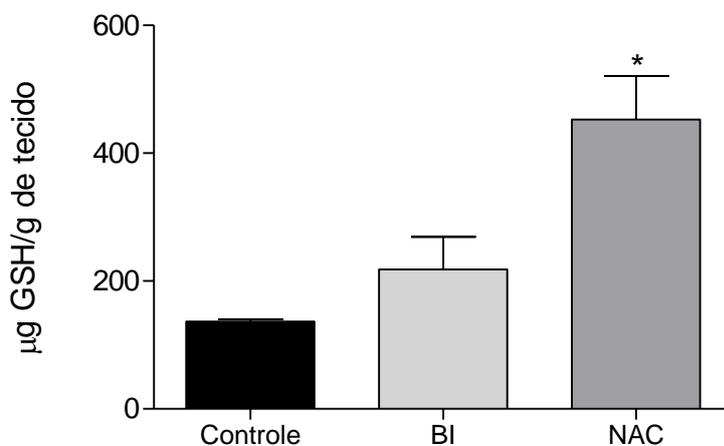
níveis de glutathiona ($218,1 \pm 44,9 \mu\text{g/g}$ de tecido) quando comparado ao grupo controle ($136,7 \pm 3,34 \mu\text{g/g}$ de tecido), porém o grupo tratado com NAC apresentou um aumento nos níveis de GSH ($452,9 \pm 57,2 \mu\text{g/g}$ de tecido) quando comparado ao controle.

Figura 15 – Efeito da BI sobre a glutathiona reduzida da mucosa gástrica agredida por etanol.



As barras representam a média \pm E.P.M. da concentração de GSH nos homogenatos de estômago após 60 min. da indução da lesão, grupos de oito animais foram tratados com Veículo (solução de Polisorbato 80 1%) sem pós-tratamento com etanol; BI (12.5 mg/kg, v.o.); Veículo (solução de Polisorbato 80 0,1%) com pós-tratamento com etanol e N-acetilcisteína (NAC, 750 mg/kg, v.o.). * $p < 0.05$ representa significância em relação ao grupo veículo. \$ representa significância em relação ao grupo controle. (ANOVA e Teste de Newman-Keuls).

Figura 16 – Efeito da BI sobre a glutathiona reduzida da mucosa gástrica sem lesão induzida por etanol.



As barras representam a média \pm E.P.M. da concentração de GSH nos homogenatos de estômago 60 min após os tratamentos, grupos de oito animais foram tratados com veículo (grupo controle); BI (12.5 mg/kg, v.o.); ou NAC (750 mg/kg v.o.). * $p < 0.05$ representa significância em relação ao grupo controle (ANOVA e Teste de Newman-Keuls).

7. DISCUSSÃO

A busca por substâncias naturais que possam impedir o surgimento da úlcera gástrica ou que auxiliem a sua cicatrização vem sendo objeto de inúmeras pesquisas ao longo dos últimos anos. Alguns terpenos presentes em óleos essenciais derivados de plantas têm demonstrado eficácia nos modelos de lesão gástrica induzida por diversos agentes (SILVA *et al.*, 2009). Por esse motivo, objetivou-se investigar a atividade da β -ionona, um sesquiterpenoide presente na estrutura molecular do retinol, β -caroteno e ácido retinóico (STERMER *et al.*, 1994), no modelo de lesão gástrica induzida por etanol e verificar os possíveis mecanismos envolvidos nesta ação. O presente estudo demonstra, pela primeira vez, a atividade antiulcerogênica da β -ionona em camundongos.

Em uma análise inicial, verificou-se que a β -ionona promoveu um efeito gastroprotetor de maneira dose-dependente, no qual o efeito máximo foi alcançado na dose de 100 mg/kg. Trabalhos como os de Huang *et al.* (2012) e Liu *et al.* (2013) também demonstraram haver uma relação entre a dose e atividade deste terpeno em ensaios *in vitro*, enquanto Janakiram *et al.* (2008) demonstraram a clara relação entre a dose de β -ionona administrada e seu efeito *in vivo*. Para investigação do possível mecanismo de ação, foi escolhida a menor dose com efeito farmacológico (12,5 mg/kg), uma vez que uma alta dose do terpeno poderia vencer o bloqueio causado pelos antagonistas usados nos ensaios.

Os resultados obtidos na análise histopatológica mostraram que a administração de etanol causou lesões na mucosa gástrica caracterizadas por hemorragia, edema da mucosa e perda de células epiteliais, em conformidade com vários estudos anteriormente descritos (YU *et al.*, 2004;. YEO *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2009). Tais lesões são provocadas por efeitos diretos do etanol e também por mediadores liberados, tais como citocinas, radicais livres e outras substâncias capazes de provocar inflamação, induzir à apoptose e reduzir o fluxo sanguíneo gástrico (GOTTFRIED *et al.*, 1978; LEE *et al.*, 2005; SZABO *et al.*, 1985). O pré-tratamento com β -ionona foi capaz de inibir tais alterações, mostrando uma forte correlação entre as análises macro e microscópicas. Kim *et al.* (2010) e Kang *et al.* (2013) demonstraram que a β -ionona regula a

expressão de genes pró-inflamatórios através da inibição da atividade de NF- κ B. O NF- κ B está presente no citoplasma ligado à proteína inibitória I κ B e, quando ativado, sofre uma translocação para o núcleo, onde ativa a transcrição de proteínas inflamatórias. Esta diminuição na síntese de mediadores pró-inflamatórios poderia explicar, pelo menos em parte, a melhora significativa dos parâmetros histopatológicos pela β -ionona.

O papel das prostaglandinas endógenas no efeito protetor de diferentes terpenos naturais ou semissintéticos tem sido relatado em inúmeros trabalhos (MATSUDA *et al* 2002; SÁNCHEZ *et al.* 2006.). As prostaglandinas estimulam a secreção de muco e bicarbonato, aumentam o fluxo sanguíneo, inibem a secreção de ácido, além de auxiliar na reparação da mucosa lesionada (RAINSFORD, 1978). Seu efeito gastroprotetor é visualizado clinicamente através da utilização do medicamento misoprostol, análogo da PGE, que oferece proteção contra vários agentes agressores. No entanto, este medicamento não possui uma ampla disseminação devido o seu efeito abortivo (ROBERT *et al* 1979; KUNIKATA *et al.*, 2001). A fim de investigar o papel das prostaglandinas na gastroproteção oferecida pela β -ionona, os animais foram pré-tratados com indometacina, um inibidor não seletivo das ciclooxigenases, antes da administração da β -ionona. Nossos resultados mostraram que o tratamento prévio com indometacina não alterou a gastroproteção conferida pela β -ionona, mostrando que as prostaglandinas não estão envolvidas no mecanismo gastroprotetor da β -ionona.

O NO é um importante mediador nos processos de homeostase da mucosa gástrica e, se produzido em pequenas quantidades, protege as células da mucosa contra os danos causados pelo etanol (MUSCARA & WALLACE, 1999; YANAKA *et al.*, 1995). O NO regula o fluxo sanguíneo, favorece a cicatrização de úlceras e estimula a secreção de muco (LI *et al.*, 2000). Para estudar a influência deste mediador gasoso, foi feita uma modulação farmacológica com NG-Nitro-L-arginina-metiléster (L-NAME), que é um bloqueador inespecífico NOS. O L-NAME é um análogo do substrato da NOS e compete com a L-arginina pelo seu sítio de ligação (KNOWLES & MONCADA, 1994).

Ao administrarmos a β -ionona juntamente com o bloqueador L-NAME, observamos que o efeito citoprotetor do terpeno foi suprimido. De forma

semelhante, observamos que a L-Arginina reduziu o percentual de área gástrica ulcerada, em comparação com o grupo controle, e esse efeito também foi revertido com o pré-tratamento com L-NAME. Trabalhos anteriores descrevem a atividade gastroprotetora da L-arginina ao diminuir a quantidade e a intensidade das lesões provocadas por álcool no estômago de ratos e por estimular a cicatrização da úlcera gástrica estimulando fatores envolvidos na microcirculação e angiogênese (KONTUREK *et al.*, 1993; NAHAVANDI *et al.*, 1999).

Com este resultado podemos sugerir uma possível participação do NO no efeito gastroprotetor da β -ionona. Através da análise do trabalho realizado por Kang *et al.* (2013), o qual demonstrou que a β -ionona reduz a expressão da iNOS em células da microglia desafiadas com LPS, podemos inferir que este terpeno possivelmente atua de modo a facilitar um maior fornecimento de NO, talvez por induzir um aumento na expressão das NOS constitutivas, ou até mesmo aumentar a eficiência de suas ações catalíticas. Trabalhos anteriores mostram que drogas que aumentam a liberação de NO pela NOS constitutiva protegem a mucosa gástrica dos efeitos lesivos dos AINES (CALATAYUD *et al.*, 1999; ELLIOTT *et al.*, 1995).

Para confirmar a participação do NO no mecanismo de ação da β -ionona, foram estabelecidas as concentrações de nitrito na porção glandular do estômago. O nitrito é obtido durante o ensaio *in vitro* a partir do nitrato gerado *in vivo* proveniente do metabolismo do NO. Logo, esta é uma forma indireta de avaliar a quantidade de NO nos tecidos. Os resultados mostraram que a administração da β -ionona impede a diminuição dos níveis de NO causado pelo etanol, tornando claro o envolvimento desse mediador no mecanismo gastroprotetor da β -ionona.

O NO causa vasodilatação através da ativação da enzima guanilato ciclase, que aumenta a concentração de GMPc intracelular. Este, por sua vez, ativa canais iônicos e proteino-quinases dependentes de GMPc que atuam diminuindo a concentração intracelular de Ca^{2+} , provocando assim relaxamento do músculo liso com conseqüente vasodilatação (DENNINGER *et al.*, 2001). No intuito de verificar se o efeito gastroprotetor da β -ionona mediado pelo NO é através da vasodilatação dependente da ativação da guanilato-ciclase, utilizamos um inibidor desta enzima, o ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-

a]quinoxalin-1-ona). O ODQ se liga irreversivelmente ao grupamento HEME da guanilato ciclase, bloqueando, competitivamente, a ligação do NO ao seu sítio de ligação (SCHRAMMEL *et al.*, 1996). Os animais que foram tratados com ODQ antes da administração da β -ionona apresentaram altos índices de ulceração, demonstrando a dependência da ativação da guanilato ciclase solúvel pelo NO para a manutenção do efeito protetor do terpeno.

O GMPc, gerado a partir da ativação da guanilato ciclase, pode ativar diferentes alvos moleculares, entre eles estão os canais K_{ATP} (ARCHER *et al.*, 1994; BOLOTINA *et al.*, 1994; CARRIERS *et al.*, 1997.). A ativação dos canais K_{ATP} aumenta a entrada de K^+ para o interior celular, alterando o potencial de membrana da célula que provoca o fechamento dos canais de cálcio voltagem dependente (VGCC). O fechamento destes canais nas células endoteliais bloqueia a entrada de cálcio na célula, levando à vasodilatação (STANDEN & QUAYLE, 1998). A glibenclamida e o diazóxido são comumente utilizados em ensaios para investigar o envolvimento dos canais K_{ATP} em eventos biológicos (STANDEN *et al.*, 1998). Nossos achados revelam que a glibenclamida, ao bloquear os canais K_{ATP} , reverte o efeito protetor da β -ionona, mostrando o envolvimento desses canais no seu mecanismo de ação.

Os canais K_{ATP} estão envolvidos no mecanismo gastroprotetor de vários compostos naturais, como ocorre no mecanismo de ação do terpeno isopulegol (SILVA *et al.*, 2009). Gomes *et al.* (2006) demonstraram que o LPS protege a gastropatia induzida por indometacina, em parte devido à abertura dos canais K_{ATP} . Akar *et al.* (1999) mostraram que a glibenclamida reverteu o efeito protetor do diazóxido contra a lesão gástrica induzida por indometacina em ratos.

A capsaicina ativa os receptores vaniloides TRPV1 presentes nos neurônios sensoriais aferentes estimulando a liberação de neuropeptídeos, tais como a substância P e o CGRP. Em pequenas doses, a capsaicina apresenta efeitos gastroprotetores, estimulando a microcirculação gástrica, no entanto, em altas doses, este composto destrói terminações neuronais das fibras C, culminando na interrupção dos processos neurais nos quais estas fibras estão envolvidas (SZOLCSANYI; BARTHO, 2001; EVANGELHISTA, 2006).

Trabalhos relatam que a ativação dos neurônios aferentes pela capsaicina apresenta efeito protetor contra lesões induzidas por etanol, e que

esse mecanismo se deve, provavelmente, às prostaglandinas, ao aumento da microcirculação na mucosa gástrica via NO e ao aumento da secreção de muco e bicarbonato (PARK *et al.*, 2000; BRZOZOWSKI *et al.*, 2005).

Com base no exposto acima, investigamos o papel dos receptores TRPV1 no mecanismo de ação da β -ionona utilizando a capsazepina, um antagonista do receptor TRPV1, para verificar se há a reversão do efeito gastroprotetor da β -ionona. Os resultados mostraram que os receptores TRPV1 não estão envolvidos no mecanismo de ação da β -ionona, uma vez que o pré-tratamento com capsazepina não reverteu o efeito citoprotetor da β -ionona.

Vários autores têm mostrado a capacidade de alguns terpenos em reforçar os fatores de defesa da mucosa gástrica ou em inibir os fatores agressivos, como a secreção de ácido (SÁNCHEZ *et al.* 2006; RODRÍGUEZ *et al.* 2005). A produção excessiva de radicais livres está envolvida na patogênese da úlcera gástrica induzida pelo etanol, causando a depleção dos níveis de glutathiona (GSH), um importante fator de defesa da mucosa que funciona como antioxidante. Este desequilíbrio entre os fatores oxidantes e os antioxidantes gera um estado de estresse oxidativo prejudicial às células (MUTOH *et al.*, 1990; DEMIR *et al.*, 2003).

O papel protetor de níveis adequados de GSH na mucosa gástrica foi demonstrado por alguns pesquisadores (NAGY; NAGATA; SZABO, 2007). Pesquisadores observaram que a administração em ratos de compostos sulfidrílicos, tais como L-cisteína, N-acetilcisteína, penicilamina e GSH, protege a mucosa gástrica contra lesões induzidas pelo etanol (STRUBELT & HOPPENKAMPS, 1983; SZABO, 1984). Por outro lado, a administração de N-etilmaleimida, bloqueador de grupamentos sulfidrílicos, reverte os efeitos protetores de compostos tióis e PGs (SZABO, 1987). Tais trabalhos mostram que o aumento na concentração de compostos sulfidrílicos e formação de GSH constituem mecanismos de defesa contra as lesões induzidas por etanol.

De acordo com isso, investigamos a ação da β -ionona sobre os níveis de GSH através de duas abordagens. Primeiramente, dosamos a concentração de GSH na porção glandular do estômago dos animais que foram tratados com o terpeno antes da administração do etanol. Verificamos que a β -ionona protegeu a mucosa contra a depleção dos níveis de GSH provocado pelo etanol. Em uma segunda abordagem, dosamos os níveis de GSH na mucosa do estômago

de animais que receberam apenas β -ionona. Aqui, nós avaliamos se o efeito protetor seria por aumentar os níveis de GSH ou por evitar sua depleção na mucosa gástrica. Através dos resultados podemos concluir que a atividade protetora da β -ionona foi evitar a depleção dos níveis de GSH provocada pelo etanol e não por aumentar diretamente os seus níveis na mucosa gástrica. Resultados semelhantes foram encontrados por Asokkumar *et al.* (2012) que demonstraram que a administração de β -ionona previne a redução dos níveis de GSH no tecido do pulmão de camundongos swiss desafiados com o composto cancerígeno benzopireno. A administração do terpeno isoladamente também não alterou os níveis de GSH dosados no pulmão quando comparados ao grupo controle. Esses dados sugerem uma possível atividade antioxidante própria da β -ionona, que diminui os níveis de radicais livres, prevenindo a depleção dos fatores antioxidantes intrínsecos da mucosa gástrica.

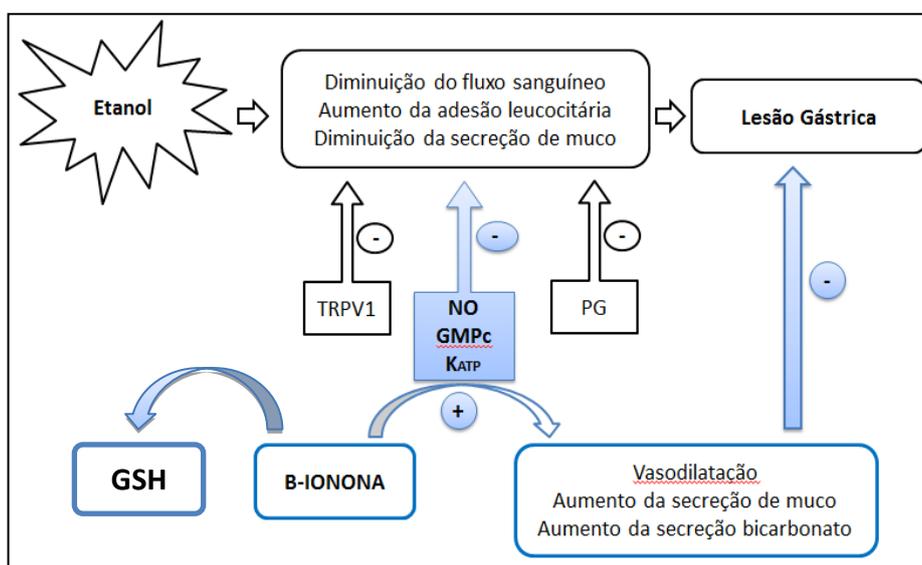
Finalmente, este trabalho demonstra, pela primeira vez, a atividade protetora da β -ionona no modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos. Os resultados aqui demonstrados poderão ser somados a estudos complementares utilizando abordagens experimentais que possam aprofundar o mecanismo de ação gastroprotetora β -ionona, inclusive utilizando outros modelos experimentais que permitam avaliar outros parâmetros envolvidos na gastroproteção.

8. CONCLUSÃO

Neste trabalho demonstramos que a β -ionona possui efeito gastroprotetor no modelo de Lesão Gástrica induzida por Etanol em camundongos. O efeito gastroprotetor é mediado pela via NO\GMPc\K_{ATP} e através da mediação da β -ionona na depleção dos níveis de GSH provocado pelo etanol.

Podemos dessa forma sugerir um possível mecanismo de ação para o efeito gastroprotetor da β -ionona visualizado na figura 17.

Figura 17 – Mecanismo hipotético do efeito gastroprotetor da β -ionona.



Fonte: elaborada pela própria autora. A β -ionona causa o aumento dos níveis de NO, o qual se liga à enzima guanilato ciclase, causando aumento dos níveis celulares de GMPc. Este, por sua vez, ativa os canais K_{ATP} alterando o potencial de membrana das células endoteliais que provoca o fechamento dos canais VGCC, impedindo a entrada de cálcio. Estes eventos levam à vasodilatação, ao aumento da secreção de muco e bicarbonato que auxiliam na proteção da mucosa gástrica.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-SALAM, M.E *et al.* Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. **Journal of Physiology-Paris**, v. 95, p. 105-127, 2001.
- AHMAD, V.U.; HUSSAIN, H.; BURKHARI, I.A.; HUSSAIN, J.; JASSBI, A.R.; DAR, A. Antinociceptive diterpene from *Euphorbia decipiens*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 230-232, 2005.
- AIHARA, E.; NOMURA, Y.; SASAKI, Y.; ISE, F.; KITA, K.; TAKEUCHI, K. Involvement of prostaglandin E receptor EP3 subtype in duodenal bicarbonate secretion in rats. **Life sciences**, v. 80, p. 2446–2453, 2007.
- AKAR, F.; UYDES-DOGAN, B. S.; BUHARALIOGLU, C.K.; ABAN, G.; HEINEMANN, A.; HOLZER, P.; VAN DE VOORDE, J. Protective effect of cromokalim and diazóxido, and proulcerogenic effect of glibenclamida on indomethacin-induced gastric injury. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 374, n. 3, p. 461-470, 1999.
- ALLEN, A. FLEMSTRO, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v.288, n.1, p.C1-C19, 2005.
- ANGELOPOULOU, D.; DEMETZOS, C.; DIMAS, C.; PERDETZOGLU, D.; LOUKIS, A. Essential oils and hexane extracts from leaves and fruits of *Cistus monspeliensis* – cytotoxic activity of ent-13-epi-manoyl oxide and its isomers, **Planta Med.**, v. 67, p. 168-171, 2001.
- ARCHER SL, HUANG JM, HAMPL V, NELSON DP, SHULTZ PJ, WEIR EK. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 91, p. 7583–7587, 1994.
- ASOKKUMAR, S.; NAVEENKUMAR, C.; RAGHUNANDHAKUMAR, S.; KAMARAJ, S.; ANANDAKUMAR, P.; JAGAN, S.; DEVAKI, T. Antiproliferative and antioxidant potential of beta-ionone against benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. **Mol Cell Biochem.** v. 363, p. 335–345, 2012.
- ATUMA, C., STRUGALA, V., ALLEN, A., HOLM, L. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. **American Journal of Physiology- Gastrointestinal and Liver Physiology.** v. 280, G922–G929, 2001.
- BERTLEFF, M.J., LANGE, J.F. Perforated peptic ulcer disease: a review of history and treatment. **Dig Surg.** v. 27, p.161-169., 2010.
- BOLOTINA, V.M., NAJIBI S, PALACINO, J.J., PAGANO, P.J., COHEN, R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, p 850–853, 1994.

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

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 12ª Edição. United States of America: Mc Graw-Hill Companies, Inc., 2012.

CARNESECCHI, S.; BRAS-GONÇALVES, R.; BRADAIA, A.; ZEISEL, M; GOSSE, F.; POUPON, M.F.; RAUL, F. Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA syntesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. **Cancer Lett.**, v. 215, p. 53-59, 2004.

CARRIERS, G.O., FUCHS LC, WINECOFF, A.P., GIULUMIAN, A.D., WHITE, R.E. Nitrovasodilators relax mesenteric microvessels by cGMP-induced stimulation of Ca²⁺-activated K⁺ channels. **Am J Physiol.** v. 273, p. H76–H84, 1997.

CARVALHO, J.C.T.; SILVA, M.F.C.; MACIEL, M.A.M. Investigation of antiinflammatory and antinociceptive activities of trans-dehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. Part. 1. **Planta Méd.**, v. 62, p. 402-404, 1996.

CNUBBEN, N.H.P. et al. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology.** v. 10, p. 141-152, 2001.

CNUBBEN, N.H.P.; RIETJENS, I.M.C.M.; WORTELBOER, H.; ZANDEN, J.; BLADEREN, P.J. The interplay of glutathione-released process in antioxidant pillory, 2001.

COELHO LGV. Úlcera péptica gastro-duodenal. In: Dani R, editor. Gastroenterologia essencial. 1a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998.p.132-46.

COTE, G.A.; HOWDEN, C.W. Potential adverse effects os próton pump inhibitors. **Curr Gastroenterol Rep.** v. 10, p. 208-214, 2008.

CONTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Patologia estrutural e funcional. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

COSTANZO, L.S. Fisiologia. 2 ed. Rio de Janeiro : Elsevier, 2004.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants.** Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250-1318.

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

DEMIR S, YILMAZ, M., KÖSEOĞLU, M. Role of free radicals in peptic ulcer and gastritis. **Turk J Gastroenterol**, v. 14(1), p. 39–43, 2003.

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

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

DONG, M.H.; KAUNITZ, J.D. Gastroduodenal mucosal defense. *Current Opinion in Gastroenterology*.v.22.,n.6, p.599-606,2006.

DO VALE, T. G.; FURTADO, E. C.; SANTOS, J. G.; VIANA, G. S. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill) n.e. **Brwn. Phytomedicine**, v. 9, p. 709-714, 2002.

EASTWOOD, G.L. Is smoking still important in the pathogenesis of peptic ulcer disease? *J. Clin. Gastroenterol.*, v. 25, Suppl. 1, p.1-7, 1997.

EVANGELHISTA, S. Role of sensory neurons in restitution and healing of gastric ulcers. **Curr Pharm Des.**; v. 12, p. 2977-84, 2006.

FACKLER, W.K.; OURS, T.M.; VAEZI, M.F.; RICHTER, J.E. Long-term effect of H2RA therapy on nocturnal gastric acid breakthrough. **Gastroenterology**, v. 122, p. 625-632, 2002.

FISHER, A.A., LE COUTEUR, D.G. Nephrotoxicity and hepatotoxicity of histamine H2 receptor antagonists. **Drug Safety** v. 24, p. 39-57, 2001.

FLAMINI, G.; CIONI, P. L.; MORELLI, I.; CECCARINI, L.; ANDOLFI, L.; MACCHIA, M. Composition of the essential oil of *Medicago marina* L. from the coastal dunes of Tuscany, Italy. **Flav. Fragr. J.**, v. 18, p. 460-462, 2003.

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

GARCIA, M.L., HANNER, M., KNAUS, H.G. *et al.* Pharmacology of potassium channels. **Adv Pharmacol**. v. 39, p. 425–471, 1997.

GIRAL, F. **Produtos químicos e farmacêuticos**. México: Atribute, 1956.

GOMES, A.S., LIMA, L.M., SANTOS, C.L., CUNHA, F.Q., RIBEIRO, R.A., SOUZA, M.H. LPS from *Escherichia coli* protects against indomethacin-induced gastropathy in rats—role of ATP-sensitive potassium channels. **Eur J Pharmacol**. v. 547, p. 136–142, 2006.

GONZALEZ, P., SORIANO, V., LOPEZ, P., NIVEIRO, E. Anaphylaxis to proton pump inhibitors. **Allergol Immunopathol**. v. 30, p. 342-343, 2002.

GOTTFRIED, E.D. KORSTEN, M.A. LIEBER, C.S. Alcohol-induced gastric and duodenal lesions in man. **Am. J. Gastroenterol.**, v.70, p.587-592, 1978.

- GUEDES, M. M.; CUNHA, A. N.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. N. Antinociceptive and gastroprotective effects of diterpenes from the flower buds of *Egletes viscosa*. **Planta Med.**, v. 68, p. 1044-1046, 2002.
- GUSLANDI, M. Effect of ethanol on the gastric mucosa. **Dig. Disg.**, v. 5, p. 21-32, 1987.
- HE, L.; MO, H.; HADISUSILO, S.; QURESHI, A.; ELSON, C.E. Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas in vitro and in vivo. **J. Nutr.**, v. 127, p. 668-674, 1997.
- HENAGAN, J.M.; SMITH, G.S.; SCHMIDT, K.L.; MILLER, T.A. N-Acetyl-Cysteine and Prostaglandin. Comparable Protection Against Experimental Ethanol Injury in the Stomach Independent of Mucus Thickness. **Ann Surg.** v. 204. p. 698-704. 1986.
- HIRUMA-LIMA, C.A., CALVO, T.R., RODRIGUES, C.M., ANDRADE, F.D.P., VILEGAS, W., SOUZA BRITO, A.R.M. Antiulcerogenic activity of *Alchornea castaneaefolia*: effects on somatostatin, gastrin and prostaglandin. **J Ethnopharmacol.** v. 104, p. 215-224, 2006.
- HOGBEN, C.A.M.; KENT, T.H.; WOODWARD, P.A.; SILL, A.J. Quantitative histology of gastric mucosa: Man, dog, cat, guinea pig, and frog. **Gastroenterology**, v. 67, p. 1143-1154, 1974.
- HOOGERWERF, W.A. & PASRICHA, P.J. Gastric acid pharmacotherapy's, peptic ulcer and gastroesophageal reflux disease. In; BRUNTON, L.L.
- HUANG, C.S.; LYU, S.C.; CHEN, J.Y.; HU, M.L. The anti-metastatic efficacy of b-ionone and the possible mechanisms of action in human hepatocarcinoma SK-Hep-1 cells. **British Journal of Nutrition.** v. 107, p. 631–638, 2012.
- HUANG, C.S.; LYU, S.C.; HU, M.L. Synergistic effects of the combination of β -ionone and sorafenib on metastasis of human hepatoma SK-Hep-1 cells. **Invest New Drugs.** v. 30, p. 1449–1459, 2012.
- IDE, H.; TOKI, S. Metabolism of beta-ionone. Isolation, characterization and identification of the metabolites in the urine of rabbits. **Biochem. J.**, v. 119, p. 281-287, 1970.
- ISHIZAKA, H.; KUO, L. Endothelial ATP-sensitive potassium channels mediate coronary microvascular dilation to hyperosmolarity. **Am J Physiol**, v. 273, p. H104–H112, 1997.
- ISHIKAWA, T. et al. The GS-X Pump in Plant, Yeast, and Animal Cells: Structure, Function, and Gene Expression. **Bioscience Reports.** v. 17, p. 189–207, 1997.
- IWAMOTO, M.; OHTSU, H.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; MATSUNAGA, S.; TANAKA, R. Anti-tumor promoting diterpenes from the stem bark of *Thuya standishii* (Cupressaceae). **Bioorg. Med. Chem.**, v.9, p. 1911-1921, 2001.

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

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

JANAKIRAM, N.B.; COOMA, I.; MOHAMMED, A.; STEELE, V.E.; RAO, C.V. B-lonone inhibits colonic aberrant crypt foci formation in rats, suppresses cell growth, and induces retinoid X receptor-A in human colon cancer cells. **Mol Cancer Ther.** v. 7, p. 181-190, 2008.

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

JASZEWSKI R, GRAHAM DY, STROMATT, S.C. Treatment of nonsteroidal antiinflammatory drug-induced gastric ulcers with misoprostol. **Dig Dis Sci** v. 37(12), p.1820–1824, 1992.

JEONG, T. C.; GU, H. K.; CHUN, Y. J.; YUN, C. H.; HAN, S. S.; ROH, J. K. Effects of beta-ionone on the expression of cytochrome P450s and NADPH-cytochrome P450 reductase in Sprague-Dawley rats. **Chem. Biol. Interactions**, v. 114, n. 1/2, p. 97-107, 1998.

JIA-REN, LIU.; BAO-FENG, Y.; BING-QING, C.; YAN-MEI, Y.; HONG-WEI, D.; YOU-QIANG, S. Inhibition of b-ionone on SGC-7901 cell proliferation and upregulation of metalloproteinases-1 and -2 expression. **World J. Gastroenterol.**, v. 10, n. 2, p.167-171, 2004.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 11 ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2008.

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

KANG, C.H.; JAYASOORIYA, R.G.P.T.; CHOI, Y.H.; MOON, S.K.; KIM, W.J., KIM, G.Y. b-Ionone attenuates LPS-induced pro-inflammatory mediators such as NO, PGE2 and TNF- α in BV2 microglial cells via suppression of the NF- κ B and MAPK pathway. **Toxicology in Vitro.** v. 27, p. 782–787, 2013.

KATZUNG, B.G. *Farmacologia Básica e Clínica*. 9 ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2005.

KIM, M.O.; MOON, D.O.; KANG, C.H.; KWON, T.K.; CHOI, Y.H.; KIM, G.Y. β -lonone Enhances TRAIL-Induced Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Cells through Sp1-Dependent Upregulation of DR5 and Downregulation of NF- κ B Activity. **Mol Cancer Ther.** v. 9, p. 833-843, 2010.

KISHORE, R.; MCMULLEN, M.R.; NAGY, L.E. Stabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA by chronic ethanol: role of A + U-rich elements and p38

mitogen-activated protein kinase signaling pathway. **J Biol Chem.** v. 9, p. 276, 2001.

KISHORE, R.; HILL, J.R.; MCMULLEN, M.R.; FRENKEL, J.; NEGY, L.E. ERK1/2 and Erg-1 contribute to increased TNF-alpha productions in rat Kupffer cells after chronic ethanol feeding. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v.282, p. 6-15, 2002.

KNOWLES R.G.; MONCADA S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem J.** v. 298, p. 249-58, 1994.

KONTUREK, S.J. Mechanisms of gastroprotection. **Scandinavian Journal of Gastroenterology Supplementum**, Oslo, v.174, p.15-28, 1990.

KONTUREK SJ, PAWLIK W. Physiology and pharmacology of prostaglandins. **Dig Dis Sci.**, v. 31(2 Suppl), p. 6S-19S, 1986.

KUNIKATA, T., ARAKI, H., TAKEEDA, M. et al Prostaglandin E prevents indomethacin-induced gastric and intestinal damage through different EP receptor subtypes. **J Physiol Paris.** v. 95(1-6), p. 157-163, 2001.

KUMMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; ASTER, J.C. Robbins & Cotran, Bases Patológicas das Doenças. 8 ed. Rio de Janeiro : Elsevier, 2010.

KÜPELI, E.; ERDEMOGLU, N.; YESILADA, E.; SENER, B. Antiinflammatory and antinociceptive activity of taxoids and lignans from the heartwood of *Taxus baccata* L. **J. Ethnopharmacol.**, v. 89, p. 265-270, 2003.

LAINE, L. WEINSTEIN, W.M. Histology os alcoholic hemorrhagic gastritis: a prospective evaluation. **Gastroenterology**, v.94, p.1254-1262, 1988.

LAINE, L. The gastrointestinal effects of nonselective NSAIDs and COX-2-selective nhibitors. **Seminars in Arthritis and Rheumatism.** v. 32, n. 03, p. 25-32, 2002.

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

LAZARI, D. M.; SKAL TSA, H. D.; CONSTANTINIDIS, T., Volatile constituents of *Cerastium candidissimum*, a Greek endemic species. **Flav. Fragr. J.**, v. 15, p. 174-176, 2000.

LEE, J.S.; OH, T.Y.; KIM, Y.K.; BAIK, J.H.; SO, S.; HAHM, K.B.; SURH, Y.J. Protective effects os green tea polyphenol extracts against ethanol-induced gastric mucosal damages in rats: Stress-responsive transcription factors and MAP kinases as pontetial targets. **Mutation Research**, v. 579, n.1/2, p. 214-224, 2005.

LEIER, I.; JEDLITSCHKY, G.; BUCHHOLZ, U.; CENTER, M.; COLE, S.P.; DEELEY, R.G.; KEPPLER, D. ATP-dependent glutathione disulphide transport

mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump. **Biochemical Journal**, v. 314, p. 433 – 437, 1996.

LIEBGOTT, T.; MIOLLAN, M.; BERCHADSKY, Y.; DRIEU, K.; CULCASI, M.; PIETRI, S. Complementary cardioprotective effects of flavonoid metabolites and terpenoid constituents of Ginkgo biloba extract (EGb 761) during ischemia and reperfusion. **Basic Res. Cardiol.**, v. 95, p. 368-377, 2000.

LIMA-JUNIOR, R. C.; OLIVEIRA, F. A.; GURGEL, L. A.; CAVALCANTE, I. J.; SANTOS, K. A.; CAMPOS, D. A.; VALE, C. A.; SILVA, R. M.; CHAVES, M. H.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. Attenuation of visceral nociception by alpha- and beta-amyrin, a triterpenoid mixture isolated from the resin of Protium heptaphyllum, in mice. **Planta Med.**, v. 72, n. 1, p. 34-39, Jan. 2006.

LIU, Q.; DONG, H.W.; SUN, W.G.; LIU, M. IBLA, J.C.; LIU, L.X.; PARRY, J.W.; HAN, X.H.; LI, M.S.; LIU, J.R. Apoptosis initiation of b-ionone in SGC-7901 gastric carcinoma cancer cells via a PI3K-AKT pathway. **Arch Toxicol.** v. 87, p. 481–490, 2013.

LU, S.C. Regulation of glutathione synthesis. **Curr Topics Cell Regulation.**; v. 36, p. 95 - 116, 2000.

MAIA, J. L.; LIMA-JUNIOR, R. C.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Oleanolic Acid, a pentacyclic triterpene attenuates the mustard oil-induced colonic nociception in mice. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29, n. 1, p. 82-85, 2006.

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

MARTÍN, M.J., JIMÉNEZ, M. D., MOTILVA, V. New Issues about Nitric Oxide and its Effects on the Gastrointestinal Tract. **Current Pharmaceutical Design.** V. 7, 881-908.2001

MATSUDA, H., PONGPIRIYADACHA, Y., MORIKAWA, T. et al Protective effects of polygodial and related compounds on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats: structural requirements and mode of action. **Bioorg Med Chem Lett.** v. 12(3), p. 477–482, 2002.

MOURA ROCHA, N. F.; VENÂNCIO, E. T.; MOURA, B. A.; GOMES SILVA, M. I.; AQUINO NETO, M. R.; VASCONCELOS RIOS, E. R.; DE SOUSA, D. P.; MENDES VASCONCELOS, S. M.; DE FRANÇA FONTELES, M. M.; DE SOUSA, F. C. Gastroprotection of (-)-alpha-bisabolol on acute gastric mucosal lesions in mice: the possible involved pharmacological mechanisms. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, Aug. 2009. [Epub ahead of print].

MO, H.; ELSON, C.E. Apoptosis and cell-cycle arrest in human and murine tumor cells are initiated by isoprenoids. **J. Nutr.**, v. 129, p. 804-813, 1999.

MUTOH, H., HIRAISHI, H., OTA, S. et al Role of oxygen radicals in ethanol-induced damage to cultured gastric mucosal cells. **Am J Physiol.** v. 258, p. 603–60, 1990.

MUSCARA, M.N., WALLACE, J.L. Nitric oxide. V. Therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. **Am J Physiol.** v. 276, p. 1313–1316, 1999.

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

NAVES, Y. R. Some developments in the chemistry of ionones and their derivatives—a subject review, **J. Soc. Cosmet. Chem.**, v. 22, p. 439–456, 1971.

MACTAVISH, H. S.; MENARY, R. C. Volatiles in different floral organs, and effect of floral characteristics on yield of extract from *Boronia megastigma* (Nees). **Ann. Bot.**, v. 80, p. 305-311, 1997.

MADUREIRA, A. M.; ASCENSO, J. R.; VALDEIRA, L.; DUARTE, A.; FRADE, J. P.; FREITAS, G.; FERREIRA, M. J. Evaluation of the antiviral and antimicrobial activities of triterpenes isolated from *Euphorbia segetalis*. **Nat. Prod. Res.**, v. 17, p. 375-380, 2003.

MELONI, J.N.; LARANJEIRA, R. Custo social e de saúde do consumo do álcool. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v.26, suppl. 1, p. 26-32, 2004.

NAGY, L.; NAGATA, M.; SZABO, S. Protein and non-protein sulfhydryls and disulfides in gastric mucosa and liver after gastrotoxic chemicals and sucralfate: possible new targets os pharmacologic agentes. **World J. Gastroenterol.**, v. 13, n. 14, p. 2053-2060, 2007.

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

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

OLIVEIRA, R. B.; GODOY, S. A. P.; COSTA, F. B. **Plantas tóxicas: conhecimento e prevenção de acidentes.** Ribeirão Preto: Editora Holos, 2003.

OLIVEIRA, F. A.; LIMA-JUNIOR, R. C.; CORDEIRO, W. M.; VIEIRA-JUNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Pentacyclic triterpenoids, alpha,beta-amyrins, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 78, p. 719-725, 2004.

OLIVEIRA, F. A.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; FLORÊNCIO, M. G.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Gastroprotective and antiinflammatory effects of resin from

Protium heptaphyllum in mice and rats. **Pharmacol. Res.**, v. 49, p. 105-111, 2004.

OLIVEIRA, F. A.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R.; LIMA-JÚNIOR, R. C.; SILVA, R. M.; MAIA, J. L.; BRITO, G. A.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Protective effect of alpha- and beta-amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 98, p. 103-108, 2005.

ÔMURA, H.; HONDA, K.; HAYASHI, N. Floral scent of *Osmanthus fragrans* discourages foraging behavior of cabbage butterfly, *Pieris rapae*. **J. Chem. Ecol.**, v. 26, p. 655-666, 2000.

PARK, J.S.; CHOI, M.A.; KIM, B.S.; HAN, I.S.; KURATA, T.; YU, R.. Capsaicin protects against ethanol-induced oxidative injury in the gastric mucosa of rats. *Life Sci.*, v. 67, p. 3087-3093, 2000.

PARKE, D. V.; RAHMAN, H. The effects of some terpenoids and other dietary nutrients on hepatic drug-metabolizing enzymes. **Biochem. J.**, v. 113, 1969.

PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.

PESKAR, B.M., EHRLICH, K., PESKAR, B.A. Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in the rat. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 301, p. 969–974, 2002.

PETERSEN, H., JOHANNESSEN, T., KLEVELAND, P.M., FJOSNE, U., DYBDAHL, J.H., WALDUM, H.L. Dowe need to listen to the patient? The predictive value of symptoms. **Scand J Gastroenterol Suppl** v. 155, p. 30-6, 1988.

PONGPIRIYADACHA, Y., MATSUDA, H., MORIKAWA, T. et al Protective effects of polygodial on gastric mucosal lesions induced by necrotizing agents in rats and the possible mechanisms of action. **Biol Pharm Bull.** v. 26(5), p. 651–657, 2003.

PURI, H. S.; SIDDIQUI, M. S.; AKHILA, A.; NAQVI, A. Essential oil of *Thymus serpyllum*: a source of thymol in India. **Parfümerie und Kosmetik**, v. 66, p. 606-609, 1985.

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

RA, A., TOBE, S.W. Acute interstitial nephritis due to pantoprazole. **Ann Pharmacother.** v. 38, p. 41-45, 2004.

RAINSFORD, K.D. Structure-activity relationships of non-steroid anti-inflammatory drug gastric ulcerogenic activity. *Agents Actions.* v. 8(6), p.587–605, 1978.

RAINSFORD, K.D. The effect of 5-lipoxygenase inhibitors and leukotriene antagonists on the development of gastric lesions induced by nonsteroidal antiinflammatory drugs in mice. **Agents Action**. v. 21, p. 316–319, 1987.

RAJIC, A.; KWEFIO-OKAI, G.; MACRIDES, T.; SANDEMAN, R. M.; CHANDLER, D. S.; POLYA, G. M. Inhibition of serine proteases by anti-inflammatory triterpenoids. **Planta Méd.**, v. 66, p. 206-210, 2000.

RAMAKRISHNAN, K.; SALINAS, R.C. Peptic ulcer disease. **American Family Physician** v. 76, p. 1005–1012, 2007.

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., MOORE, P.K. *Farmacologia*. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.419-433, 2004.

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

REFFELMANN, T., KLONER, R.A. Therapeutic potential of phosphodiesterase 5 inhibition for cardiovascular disease. **Circulation** v. 108, p. 239–244, 2003.

REZIN, G.T.; PETRONILHO, F.C.; ARAUJO, J.H.; GONÇALVES, C.L.; DAUFENBACH, J.F.; CARDOSO, M.R.; ROESLER, R.; SCHWARTSMANN, G.; DAL-PIZZOL, F.; STRECK, E.L. Gastrin-Releasing Peptide Receptor antagonist or N-acetylcysteine combined with Omeprazol Protect against Mitochondrial Complex II Inhibition in a Rat Model of Gastritis. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. v. 108, p. 214-219, 2010.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia**. São Paulo: Premier, 1997.

ROBERTS, N. J.; MENARY, R. C. Effect of nitrogen on growth, flower yield, oil composition, and yield in *Boronia megastima* Nees. **J. Plant Nutrit.**, v. 17, p. 2035-2052, 1994.

ROBERT, A., NEZAMIS, J.E., LANCASTER, C. et al Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. **Gastroenterology** v. 77(3), p. 433–443, 1979.

RODRÍGUEZ, J.A., THEODULOZ, C., SÁNCHEZ, M. et al Gastroprotective activity of a new semisynthetic solidagenone derivative in mice. **J Pharm Pharmacol** v. 57(2), p. 265–271, 2005.

SABESIN, S.M. Safety issues relating to long-term treatment with histamine H₂-receptor antagonists. **Aliment Pharmacol Ther.** v. 7, p. 35-40, 1993.

SALT, S. D.; TUZUN, S.; KUC, J. Effects of β -ionone and abscisic acid on the growth of tobacco and resistance to blue mold. Micry of effects of stem infection by *Peronospora tabacina*. **Adam. Physiol. Molecul. Plant Pathol.**, v. 28, p. 287-297, 1986.

SÁNCHEZ, M., THEODULOZ, C., SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. et al Gastroprotective and ulcer-healing activity of oleanolic acid derivatives: in vitro–in vivo relationships. **Life Sci** v. 79, p. 1349–1356, 2006.

SÁNCHEZ-MENDOZA, M.E.; REYES-RAMÍREZ, A.; CRUZ ANTONIO, L.; MARTÍNEZ JIMÉNEZ, L.; RODRÍGUEZ-SILVERIO, J.; ARRIETA, J. Bioassay-guided isolation of an antiulcer compound, Tagitinin C, from *Tithonia diversifolia*: role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. **Molecules** v. 16, p. 665–674, 2011.

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

SHARMA, V.; SINGH, G.; KAUR, H.; SAXENA, A.K.; ISHAR, M.P.S. Synthesis of b-ionone derived chalcones as potent antimicrobial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 22, p. 6343–6346, 2012.

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

SIEGMUND, S.; TEYSSEN, S.; SINGER, M.V. Alkoholassozierte Organscha"den. Gesundheitliche Folgen durch moderaten Alkoholkonsum. **Internist**, v. 43, p. 287-293, 2002.

SILEN, W. Gastric mucosal defense and repair, in: Johnson L.R. (Ed.), **Physiology of the Gastrointestinal Tract**, 2a ed., Raven Press, New York, pp. 1055–1069, 1987.

SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; RAO, V. S. N. Effects of trans- dehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara* on experimental hypertriglyceridaemia and hypercholesterolaemia induced by Triton WR 1339 (Tyloxapol) in mice. **Planta Med.**, v. 67, p. 1-3, 2001.

SILVA, M.I.G.; MOURA, B.A.; NETO, M.R.A.; TOME, A.R.; ROCHA, N.F.M.; CARVALHO, A.M.R.; MACEDO, D.S.; VASCONCELOS, S.M.M., SOUSA, D.P.; VIANA, G.S.B.; SOUSA, F.C.F.; Gastroprotective activity of isopulegol on experimentally induced gastric lesions in mice: investigation of possible mechanisms of action. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol**. v. 380, p. 233–245, 2008.

SIMÕES, O. C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: Editora da UFSC; Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS, 2001.

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

- STERMER, B. A.; BIANCHINI, G. M.; KORTH, K. L. Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. **J. Lipid. Res.**, v. 35, p.1133-1140, 1994.
- STRUBELT, O.; HOPPENKAMPS, R. Relations between gastric glutathione and the ulcerogenic action of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v. 262, p. 268-278, 2009.
- SVANES, C. Trends in perforated peptic ulcer: incidence, etiology, treatment, and prognosis. **World J Surg.** v. 24, p. 277-283, 2000.
- SZABO, S.; SZELENYI, I. 'Cytoprotection' in gastrointestinal pharmacology. **TIPS.** v. 8, p. 149-154, 1987.
- SZOLCSANYI, J.; BARTHO, L. Capsaicin-sensitive afferents and their role in gastroprotection: an update. **J. Physiol.**, v. 95, n. 1/6, p. 191-188, 2001.
- TELLEZ, M.; KHAN, I. A.; KOBASISY, M.; SCHRADER, K. K.; DAYAN, F. E.; OSBRINK, W. Composition of the essential oil of *Lepidium meyenii* (Walp.). **Phytochemistry**, v. 61, p. 149-155, 2002.
- THORSEN, K., GLOMSAKER, T.B., VON MEER, A., SØREIDE, K., SØREIDE, J.A. Trends in diagnosis and surgical management of patients with perforated peptic ulcer. **J Gastrointest Surg.** v. 15, p. 1329-1335, 2011.
- WEEKS, W. W In: PARLIAMENT, T. H.; CROTEAU, R. (Ed.). **Biogeneration of aromas.** Washington, D. C.: American Chemical Society, 1986. cap. 12
- WINTHERHALTER, P.; ROUSEFF, R. In: WINTHERHALTER, P.; ROUSEFF, R. (Ed.). **Carotenoid-Derived Aroma Compounds.** Washington, D. C.: American Chemical Society, 2002. cap. 1.
- YANAKA, A., MUTO, H., FUKUTOMI, H., ITO, S., SILEN, W. Role of nitric oxide in restitution of injured guinea pig gastric mucosa in vitro. **Am J Physiol.** v. 268, p. 933–942, 1995.
- YEO, M., KIM, D.K., CHO, S.W. et al Ginseng, the root of *Panax ginseng* C.A. Meyer, protects ethanol-induced gastric damages in rat through the induction of cytoprotective heat-shock protein 27. **Dig Dis Sci.** v. 53, p. 606–613, 2008.
- YU, S. G.; ANDERSON, P. J.; ELSON, C. E. Efficacy of beta-ionone in the chemoprevention of rat mammary carcinogenesis. **J. Agric. Food Chem.**, v. 43, p. 2144-2147, 1995.
- YU, K., JIANG, S.F., LIN, M.F. et al Extraction and purification of biologically active intestinal trefoil factor from human meconium. **Lab Invest.** v. 84, p. 390–392, 2004.
- WALLACE, J.L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? **Physiol Rev.** v. 88, p. 1547-1565, 2008.

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

WALLACE, J. L., MILLER, J. S. M. Nitric Oxide in Mucosal Defense: A Little Goes a Long Way. **Gastroenterology**, v. 119. p. 512–520. 2000.

WANG, G. J.; WU, X. C.; LIN, Y. L.; REN, J.; SHUM, A. Y.; WU, Y. Y.; CHEN, C. F. Ca²⁺ channel blocking effect of iso-S-pentasin in rat aortic smooth muscle cells. **Eur.J. Pharmacol.**, v. 445, p. 239-245, 2000.

WARZECHA, Z.; DEMBINSKI, A.; CERANOWICZ, P.; DEMBINSKI, M.; CIESZKOWSKI, J.; KOWNACKI, P.; KONTUREK, P.C. Role of sensory nerves in gastroprotective effect of anandamide in rats. **J Physiol Pharmacol.**, v. 62(2), p. 207-17, 2011.

ZELICKSON, M.S., BRONDER, C.M., JOHNSON, B.L., CAMUNAS, J.A., SMITH, D.E., RAWLINSON, D., VON, S., STONE, H.H., TAYLOR, S.M. Helicobacter pylori is not the predominant etiology for peptic ulcers requiring operation. **Am Surg**. v. 77, p. 1054-1060, 2011.

ZHANG, C. F.; WANG, D. S.; LING, X. Z. Diacetylamethystoidin A protects isolated working rat heart against myocard reperfusion injury. **Zhongguo Yao li Xue Bao**, v. 17, p. 245-248, 1996.

ZLABEK, J.A., ANDERSON, C.G. Lansoprazole-induced thrombocytopenia. **Ann Pharmacother**. v. 36, p. 809-811, 2002.

ZHAO, W., ZHU, F., SHEN, W. et al Protective effects of DIDS against ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. **Acta Biochim Biophys Sin** v. 41(4), p. 301–308, 2009.

