



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

FRANCISCO RAFAEL OLIVEIRA DA SILVA

ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA E MECANISMO DE AÇÃO DA
TROXERRUTINA: UM FLAVONÓIDE SEMISSINTÉTICO DA RUTINA

FORTALEZA

2023

FRANCISCO RAFAEL OLIVEIRA DA SILVA

**ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA E MECANISMO DE AÇÃO DA
TROXERRUTINA: UM FLAVONÓIDE SEMISSINTÉTICO DA RUTINA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Francisca Cléa
Florenço de Sousa
Coorientador: João Antônio Leal de Miranda

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

Silva, Francisco Rafael Oliveira da.

Atividade antiulcerogênica e mecanismo de ação da troxerrutina: um flavonóide semissintético da rutina / Francisco Rafael Oliveira da Silva. – 2023.

63 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Francisca Cléa Florenço de Sousa .

Coorientação: Prof. Dr. João Antônio Leal de Miranda.

1. Úlcera gástrica. 2. Etanol. 3. Inflamação. 4. Estresse oxidativo . 5. Troxerrutina. I.
Título.

CDD 611

FRANCISCO RAFAEL OLIVEIRA DA SILVA

**ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA E MECANISMO DE AÇÃO DA
TROXERRUTINA: UM FLAVONÓIDE SEMISSINTÉTICO DA RUTINA**

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

APROVADA EM ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

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

Dra. João Antônio Leal de Miranda (Coorientador)
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Dr. Jalles Dantas de Lucena
Centro Universitário Santa Maria - UNIFSM

Dr. Carlos Eduardo da Silva Monteiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Maria Luana Gaudencio dos Santos Morais
Faculdade de Ensino e Cultura do Ceará (FAECE)

Deus,

Eu dedico esta conquista a Ti, que é o autor de todo conhecimento e sabedoria. Sou grato pelo dom da inteligência que tu me deste, e pela força e orientação que me proporcionaste ao longo desta jornada acadêmica.

Eu reconheço que sem a Tua ajuda, eu jamais teria conseguido chegar a este ponto. A Tua Graça e misericórdia têm me sustentado durante todo este processo, e eu sou profundamente grato por isso.

Que este trabalho possa ser uma contribuição útil para a sociedade e possa trazer Glória ao Teu Nome. Que Tu possas me usar como um instrumento para fazer a Tua vontade neste mundo, e que eu possa continuar aprendendo e crescendo em Ti.

Mais uma vez, obrigado por me capacitar a alcançar esta conquista, e por estar sempre comigo em cada passo da minha jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser o meu Guia, Torre Forte e hoje, ser a pessoa que rege a minha vida, se cheguei até aqui foi porque Ele assim permitiu.

Aos meus pais, Francisco Fernando da Silva e Francisca Aparecida de Oliveira, por terem sido os meus maiores exemplos de vida.

Aos meus irmãos, Daniel, Kelcy e Kelry, por serem a certeza da presença amiga e do apoio mútuo que sempre posso contar.

A todos os amigos que fiz na UFC ao longo desse doutorado e em especial ao amigo mais chegado que irmão, Jalles Dantas por todo apoio, parceria e torcida para o término dessa minha jornada.

À minha orientadora, Profa. Dra. Cléa Florêncio, por ser a todo tempo um exemplo de professora e pesquisadora, por ser cobrança e compreensão na medida certa, por toda dedicação, paciência e ensinamentos ao me orientar durante todos esses anos de doutorado.

Ao meu coorientador Prof. Dr. João Leal, pelas críticas construtivas que me fizeram amadurecer como pesquisadora e por todo o seu apoio e colaboração na orientação desde trabalho.

À professora Dra. Antoniella Gomes, pela análise histológica e por todo auxílio e contribuições para realização desta pesquisa.

Aos meus amigos e amigas pós-doutorando, Carlos Monteiro do LEFFAG, por todo auxílio e contribuições para realização desta pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, por todos os ensinamentos transmitidos nesses anos e em especial ao Prof. Pedro Gomes por ter me ajudado em tudo o que precisei para conclusão dos meus experimentos em seu laboratório LEFFAG.

À Universidade Federal do Ceará, por intermédio do seu Magnífico Reitor Professor Dr. Cândido Albuquerque; à Faculdade de Medicina (FAMED), por meio do seu diretor Prof. Dr. João Macedo; ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais

na pessoa da sua coordenadora Profa. Dra. Antoniella Gomes Duarte, pela oportunidade de fazer parte desse programa e por todos os ensinamentos adquiridos.

Ao Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagens – NEMPI da Universidade Federal do Ceará, por meio da professora Doutora Gerly Anne de Castro Brito, pelo apoio técnico para a concretização deste trabalho.

Ao Laboratório de Polímeros e Inovação de Materiais (LabPIM) da Universidade Federal do Ceará por meio da Professora Doutora Profa. Dra. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro e pelo doutorando João Francisco Câmara Neto, por ter disponibilizado a Troxerrutina e ajudado com os experimentos.

Aos queridos servidores técnicos do laboratório NEMPI, Júnior e Ludimila, pelos serviços prestados com destreza e competência.

Às pós-doutoras do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Dra. Conceição da Silva Martins e a Dra. Maria Luana Gaudencio dos Santos Moraes, pela competência e disponibilidade em me ajudar auxiliar.

A minha esposa Débora Viana, por sempre acreditar em mim e em tudo o que me proponho a fazer. Obrigado por ter sido uma ponte nesse meu caminho até aqui, e por ser a mãe dos nossos dois lindos filhos, Isaac e Benjamim. Ter você em minha vida, sem dúvida, é uma das minhas maiores conquistas. Te amo!

Aos meus filhos Isaac Viana e Benjamim Viana, minha fonte de expiração e força para continuar. Sempre os amarei!

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para minha caminhada no doutorado e conclusão deste trabalho, o meu muito obrigada!

Esta é a confiança que temos ao nos aproximarmos de Deus se pedimos alguma coisa de acordo com a vontade de Deus, Ele nos ouvirá. E, se sabemos que Ele nos ouve em tudo o que pedimos, sabemos que temos o que dele pedimos (1 João 5:14-15)

RESUMO

A úlcera gástrica representa um distúrbio gastrointestinal ulcerativo e inflamatório que figura como um grave problema de saúde pública mundial. O surgimento desta condição é resultado do desbalanço entre agentes agressores e protetores da mucosa gástrica, dentre eles exacerbação do consumo de álcool. Flavonoides como a troxerrutina (TRX) cabe destaque no meio farmacológico, pelas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e citoprotetora. presente estudo objetivou determinar o efeito gastroprotetor da TRX na úlcera gástrica induzida por etanol em camundongos, e seu papel nos mecanismos antioxidantes e anti-inflamatórios. Após a indução de lesões gástricas por etanol, realizou o tratamento com TRX (100 mg/kg., p.o), N- acetilcisteína (NAC). Para determinação do efeito gastroprotetor da TRX na lesão gástrica utilizou-se as seguintes avaliações: percentual de área ulcerada, análise histopatológica, dosagem glutationa (GSH), malondialdeído (MDA), mieloperoxidase (MPO), imunohistoquímica para TNF- α e iNOS, e docagem molecular para iNOS. Nossos resultados demonstraram que a Troxerrutina na dose 100mg/kg administrada antes do etanol foi eficaz na gastroproteção, demonstrado por meio de análise macroscópica e microscópica onde evidenciamos a regressão da perda das células do epitélio, do edema, de infiltrado inflamatório, e diminuição do número de mastócitos. Observamos também que (iNOS e Indometacina) foram capazes de reverter o efeito gastroprotetor da troxerrutina na dose 100mg/kg, mostrando que estas substâncias atuam nas vias citadas. Nossos achados sugerem que a Troxerrutina tem a capacidade de suprimir a liberação da citocina pró-inflamatória TNF- α e iNOS, através da imunomarcção do fator de necrose tumoral (TNF- α) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Evidenciamos em nossos estudos que a troxerrutina aumentou significativamente os níveis de GSH e reduziu os níveis de Malonaldeído (MDA), e reduziu a atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO). Nossos resultados demonstram que a troxerrutina na dose 100mg/kg possui atividade gastroprotetora contra lesão gástrica induzida por álcool absoluto, e esta ação aparentemente envolve a participação do óxido nítrico e prostaglandinas, além de termos evidenciado o potencial efeito antioxidante da Troxerrutina.

Palavras-chave: Úlcera gástrica, Etanol, Inflamação, Estresse oxidativo e Troxerrutina.

ABSTRACT

Gastric ulcer represents an ulcerative and inflammatory gastrointestinal disorder that appears as a serious public health problem worldwide. The appearance of this condition is the result of an imbalance between aggressive and protective agents of the gastric mucosa, including exacerbation of alcohol consumption. Flavonoids such as troxerutin (TRX) are highlighted in the pharmacological environment, due to their antioxidant, anti-inflammatory and cytoprotective properties. The present study aimed to determine the gastroprotective effect of TRX on ethanol-induced gastric ulcer in mice, and its role in antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. After the induction of gastric lesions by ethanol, treatment with TRX (100 mg/kg., p.o.), N-acetylcysteine (NAC) was performed. To determine the gastroprotective effect of TRX in the gastric lesion, the following evaluations were used: percentage of ulcerated area, histopathological analysis, glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO), immunohistochemistry for TNF- α and iNOS, and Molecular docking for iNOS. Our results showed that Troxerutin at a dose of 100mg/kg administered before ethanol was effective in gastroprotection, demonstrated through macroscopic and microscopic analysis where we evidenced the regression of the loss of epithelial cells, edema, inflammatory infiltrate, and decrease in the number of mast cells. We observed that (iNOS and Indomethacin) were able to reverse the gastroprotective effect of troxerutin at a dose of 100mg/kg, showing that these substances act in the mentioned pathways. Our findings suggest that Troxerutin can suppress the release of the pro-inflammatory cytokine TNF- α and iNOS, through immunostaining of tumor necrosis factor (TNF- α) and inducible nitric oxide synthase (iNOS). We showed in our studies that troxerutin significantly increased GSH levels and reduced Malondialdehyde (MDA) levels, and reduced myeloperoxidase (MPO) enzymatic activity. Our results demonstrate that troxerutin at a dose of 100mg/kg has gastroprotective activity against ethanol-induced gastric injury, and this action apparently involves the participation of nitric oxide and prostaglandins, in addition to the potential antioxidant effect of troxerutin.

Keywords: Gastric ulcer, Ethanol, Inflammation, Oxidative stress, and Troxerutin.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	12
1.1 Anatomia e fisiologia da secreção ácida	12
1.2 Etiologia e Epidemiologia da Úlcera Gástrica	14
1.3 Defesa da Mucosa Gástrica.....	17
1.4 Tratamento da úlcera gástrica induzida por etanol	20
1.5. Produtos naturais.....	21
1.6 Troxerrutina	23
2 PROPOSIÇÃO	25
2.1 Objetivo Geral	25
2.2 Objetivos Específicos	25
3. CAPÍTULO	26
4. CONCLUSÃO GERAL	52
REFERÊNCIAS.....	53
APÊNDICE A-.....	62
ANEXO A	63

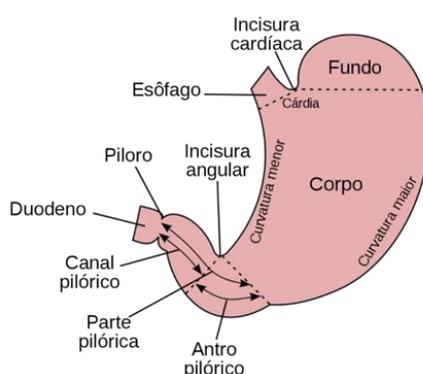
1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Anatomia e fisiologia da secreção ácida

O estômago é um órgão muscular localizado na região superior do abdome, entre o esôfago e o intestino delgado. Ele é responsável por armazenar e digerir alimentos. A anatomia do estômago é dividida em quatro camadas: a mucosa, a submucosa, a camada muscular e a serosa. A camada mucosa é a camada interna do estômago e é composta por células glandulares que produzem muco e enzimas digestivas, como a pepsina e tripsina. A camada submucosa é composta por tecido conjuntivo e vasos sanguíneos e linfáticos. A camada muscular é composta por fibras musculares lisas que permitem que o estômago se contraia e misture os alimentos com os sucos digestivos.

A camada serosa é a camada externa do estômago e é composta por tecido conjuntivo e uma camada fina de tecido epitelial. O estômago é uma parte importante do sistema digestivo, localizada entre o esôfago e o intestino delgado. Ele é dividido em quatro regiões anatômicas: cárdia, fundo, corpo e antro. (BORM *et al.*, 2018). A cárdia é a região que se conecta com o esôfago e contém as válvulas cardíacas que impedem o refluxo gástrico. O fundo é a região superior do estômago que se projeta para cima (Figura 1). O corpo é a região central e maior, onde ocorre a maioria da digestão e mistura dos alimentos. O antro é a região inferior que se conecta com o duodeno. O estômago é revestido por uma camada de muco, que protege a parede gástrica dos gases gástricos. Ele também contém glândulas gástricas que produzem enzimas digestivas e ácido clorídrico. O estômago também contém músculos lisos que permitem a mistura e a propulsão dos alimentos para o intestino delgado. (BELL *et al.*, 2018; PEMBERTON *et al.*, 2018).

Figura 1: Representação anatômica do estômago.

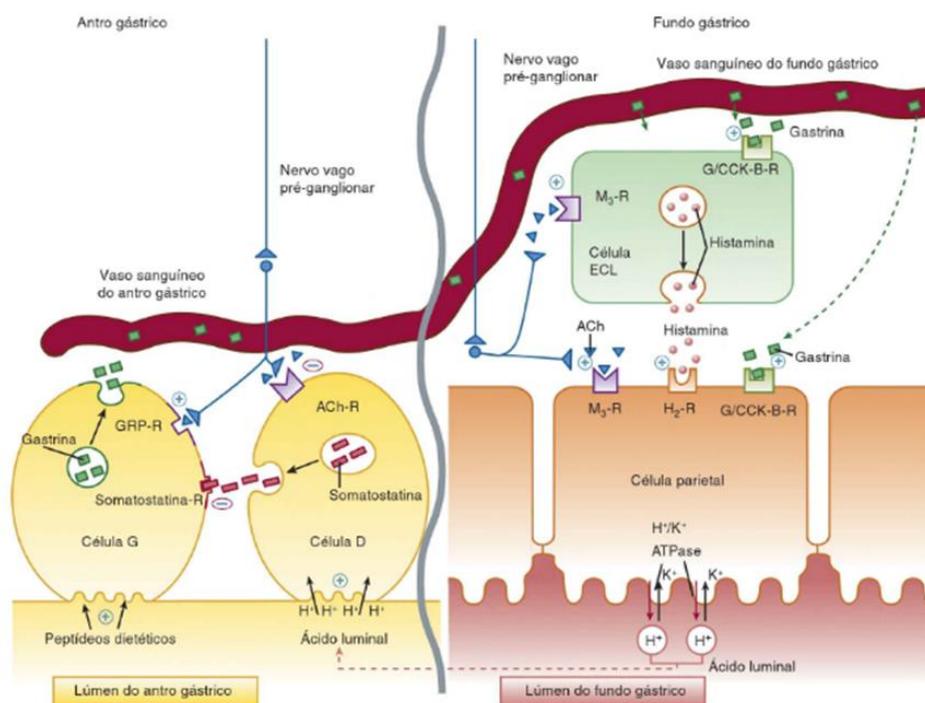


Fonte: TORTORA, Gerard. J.; DERRICKSON, Bryan. Princípios de Anatomia e fisiologia. 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

A secreção ácida do estômago é um processo complexo que envolve a ativação de vários mecanismos neuroendócrinos e celulares. Essa secreção ácida é iniciada pela liberação de histamina, grelina e acetilcolina pelas células parietais do estômago. A histamina ativa os receptores H₂ nas células parietais, aumentando a produção de ácido clorídrico. A grelina ativa os receptores na musculatura lisa do estômago, aumentando a motilidade gástrica e a secreção ácida. O ácido clorídrico é produzido pelas células parietais do estômago e é secretado na luz gástrica através de canais de cloreto de hidrogênio (H⁺/Cl⁻). O ácido clorídrico é importante para a digestão dos alimentos, pois ajuda a inativar bactérias e a desnaturar as proteínas. Além disso, o ácido clorídrico também atua como um agente de defesa contra a entrada de microrganismos no trato gastrointestinal. Além dos mecanismos mencionados anteriormente, a secreção ácida do estômago também é controlada por outras substâncias como o pepsinogênio, a gastrina e a somatostatina (MARTINSEN *et al.*, 2019; ENGEVIK *et al.*, 2020).

O pepsinogênio é produzido pelas células parietais do estômago e é convertido em pepsina, uma enzima responsável pela digestão das proteínas. A gastrina é um hormônio produzido pelas células G do estômago e estômago antro, que estimula a produção de ácido clorídrico e a motilidade gástrica. A somatostatina é produzida pelas células D do pâncreas e do estômago e inibe a secreção ácida e a motilidade gástrica. Além disso, vários estudos recentes têm identificado a importância do sistema nervoso entérico (SNE) na regulação da secreção ácida gástrica. O SNE é composto por neurônios entéricos e nervos que controlam a motilidade e a secreção gástrica através da liberação de neurotransmissores como a acetilcolina e a serotonina. Em resumo, a secreção ácida gástrica é regulada por uma variedade de mecanismos neuroendócrinos e celulares, incluindo a liberação de histamina, grelina, acetilcolina, pepsinogênio, gastrina e somatostatina, além do SNE (SMOUT *et al.*, 2017; GEBHART *et al.*, 2018).

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



Fonte: BERNE, Robert M.; LEVY, Matthew N. (Ed.). Fisiologia. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

1.2 Etiologia e Epidemiologia da Úlcera Gástrica

A etiologia das doenças do trato gastrointestinal é diversa e de ordem mundial (WU *et al.*, 2018). Em 2010, 60 a 70 milhões de pessoas nos Estados Unidos sofriam de alguma doença digestiva (AVRAMIDOU *et al.*, 2018). No Brasil, a prevalência de doenças do diagnosticada na população adulta no ano de 2018 chega a 19% (STATISTA, 2019). Dentre algumas doenças do TGI, podemos citar a úlcera gástrica. Doença comumente relatada por uma significativa parcela da população brasileira e de grande importância clínica que chega a afetar de 10-15% da população mundial (SELMÍ *et al.*, 2017). Nos Estados Unidos aproximadamente 10% da população sofre ou já sofreram com úlcera gástrica ao longo da vida (WAN *et al.*, 2020) e já na Arabia Saudita esse percentual sobe para 16,2% (ALBAQAWI *et al.*, 2017).

De acordo com um estudo publicado por Curado *et al* (2019) a prevalência de infecção por *H. pylori* na América Latina varia de país para país, mas geralmente é elevada. Ainda de acordo com Curado *et al* (2019) na Argentina, cerca de 50% da população é infectada com *H. pylori*, enquanto na Colômbia, a taxa de infecção é de aproximadamente 80%. É importante notar que esses dados podem variar significativamente entre diferentes regiões e países da América Latina, e podem ser afetados por vários fatores, como acesso ao tratamento e níveis de infecção por *H. pylori*.

A úlcera gástrica trata-se de uma afecção heterogênea e multifatorial, geralmente causada por agentes etiológicos como infecção pelo *H. pylori*, uso crônico de álcool, anti-inflamatórios não esteroides (AINES) e estilo de vida, entre outros (LI *et al.*, 2017). Promovem isquemia, retardo no trânsito gastrointestinal, diminuição na microcirculação local e tem como característica um processo inflamatório bem estabelecido. Também é caracterizada pelo aumento da secreção de ácido gástrico e/ou a redução da defesa da mucosa, além da redução do fluxo sanguíneo, infiltração de neutrófilos, aumento de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 e fator de necrose tumoral (TNF), o aumento desses mediadores acarretam o aumento da produção de proteínas de fase aguda, alteram a permeabilidade vascular, e lesão tecidual e promovem indução de estresse oxidativo (TOURANI *et al.*, 2018; ZHAO., 2015).

A manifestação clínica em paciente com úlcera gástrica é caracterizada por dor epigástrica que piora com a ingestão de alimentos e está relacionada ao surgimento de náuseas leves e saciedade precoce. Os pacientes acometidos por essa doença geralmente descrevem a dor como um tipo de dor aguda ou queimação que normalmente é local e que não irradia podendo surgir até mesmo sangramento. Um exame físico se faz necessário para o diagnóstico da úlcera gástrica, sendo a sensibilidade epigástrica o achado mais comum. O profissional médico deve perguntar ao paciente se ele está tendo fezes pretas, hematêmese, vômito com sangue e se tem excretado sangue vermelho vivo pelo reto. É importante salientar que até 15% dos pacientes que apresentam sangramento retal vermelho vivo apresentam sangramento epigástrico também.

Um exame como uma endoscopia também se faz necessário para o diagnóstico preciso da úlcera gástrica. As úlceras gástricas são graduadas usando o esquema de

classificação de Forrest, com o intuito de fornecer o risco estimado de sangramento da úlcera e ajudar a distinguir quais úlceras precisam como terapia de injeção, cauterização ou colocação de metal ou clipe absorvível (BARCHI *et al.*, 2018):

Classificação dos níveis de úlcera gástrica por Forrest:

Ia - Sangramento arterial a jato com risco de ressangramento de 90%

Ib – Sangue escorrendo com risco de ressangramento de 50%

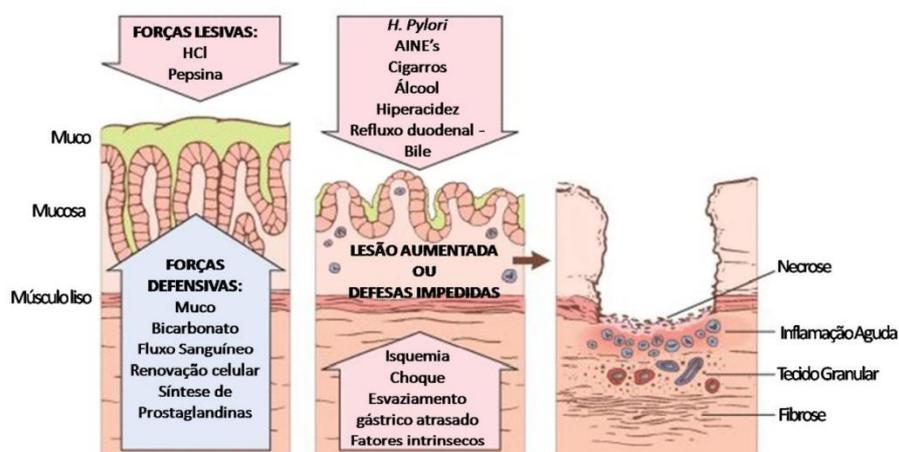
IIa – Coágulo visível com risco de sangramento de 25 a 30%

IIb- Coágulo aderente, risco de ressangramento de 10 a 20%

IIc- Mancha preta na úlcera, risco de ressangramento de 7 a 10%

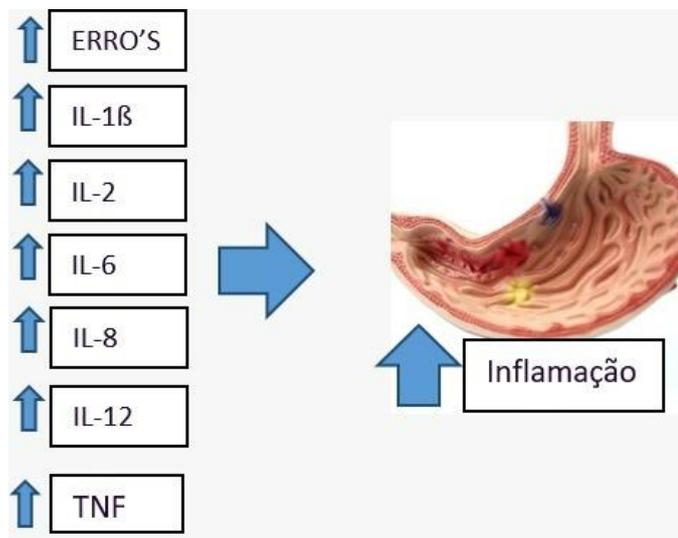
III- base limpa, risco de ressangramento de 3 a 5%

Figura 3: Esquema da úlcera gástrica



Fonte: RIOS *et al.*, 2010

Figura 4: Marcadores inflamatórios expressos na úlcera gástrica



Fonte: Elaborado pelo autor.

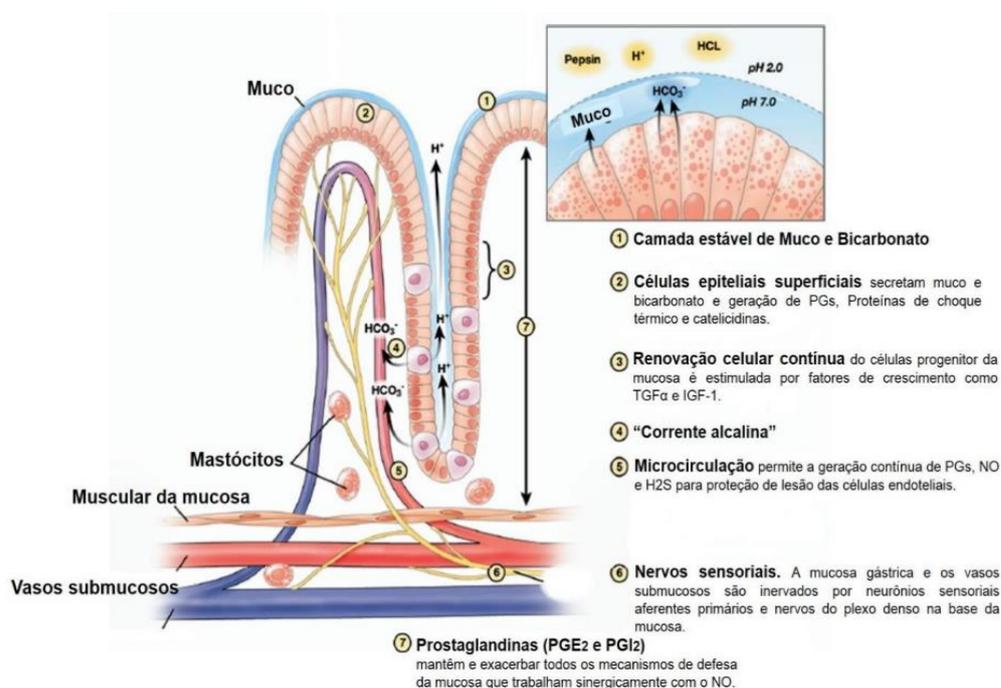
1.3 Defesa da Mucosa Gástrica

Para entender como surgem as úlceras pépticas, primeiro é importante entender os inúmeros mecanismos de defesa e reparo gástrico que devem ser ultrapassados por agentes ulcerogênicos e patógenos. Os mecanismos de defesa da mucosa gástrica favorecem a uma maior resistência a uma gama de condições degradantes da estrutura estomacal. Dentre essas condições deletérias podemos citar por exemplo alterações no pH, na osmolaridade, variações de temperatura e a infiltrados bacterianos capazes de gerar infecção local e ou sistêmica. Essas defesas são divididas em 3 fases, compreendidas por pré-epitelial, onde é formado uma barreira muco-bicarbonato-fosfolipídica que promove um aumento da secreção de bicarbonato gerando uma proteção estrutural que ocorre concomitantemente a liberação do ácido clorídrico, neutralizando assim o ácido por intermédio de uma corrente alcalina que é formada (FORSSELL *et al.*, 1988).

A proteção gerada pela fase epitelial tem a ver diretamente com a produção das prostaglandinas, que por sua vez estão relacionadas com os fatores defensivos da mucosa gástrica aumentando a secreção de bicarbonato e a citoproteção. A secreção destes compostos ocorre pelas células epiteliais superficiais, que por serem hidrossolúveis e conterem fosfolipídios em sua superfície, repelem agentes nocivos. A terceira fase e não menos importante, tem relação direta com a microcirculação

local, que por sua vez promove um melhor transporte e absorção de oxigênio e nutrientes, assim bem como, aumenta o fluxo sanguíneo para remoção de substâncias tóxicas geradas pelo processo inflamatório local (SÁENZ *et al.*, 2018; GUZMÁN-GOMEZ *et al.*, 2023)

Figura 5: Representação dos fatores protetores da mucosa gástrica



Fonte: TARNAWSKI; AHLUWALIA; JONES, 2012, adaptado

A linha de frente da defesa contra agressores gástricos é uma camada semelhante a um gel constituída principalmente de água (aproximadamente 95%), mas também glicoproteínas mucinas, ânions bicarbonato e fosfolipídios surfactantes, todos secretados pelas células epiteliais superficiais. A superfície luminal do gel de muco tem uma camada hidrofóbica de fosfolipídios tensoativos, tornando o gel de muco praticamente imiscível com o fluido gástrico luminal (YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

A barreira muco-bicarbonato-fosfolipídio formada é uma camada protetora encontrada na superfície de muitos tecidos corporais, incluindo o trato respiratório, gastrointestinal e geniturinário (ALLEN; FLEMSTRÖM, 2005). Ela é composta de uma camada de muco, que é produzido pelas células epiteliais, e uma camada de

bicarbonato, que é produzido pelas células calciformes (FAHMI *et al.*, 2019). Essas duas camadas juntas formam uma barreira física e química contra a entrada de microorganismos e outros agentes estranhos (HILL *et al.*, 2022). Ela é formada por íons de bicarbonato e cloreto que são secretados pelas células, esses íons formam um pH alcalino na superfície, que é inóspito para muitos microorganismos patogênicos, impedindo sua proliferação e aderência (CHOI *et al.*, 2009). Por fim, a barreira também contém uma camada de fosfolipídios, que é uma camada lipídica que cobre a superfície da célula. Essa camada é composta principalmente de fosfatidilcolina e esfingomiélna, que são tipos de gordura que ajudam a proteger a célula contra a perda de água e a entrada de substâncias estranhas. Em resumo, a barreira muco-bicarbonato-fosfolipídio é uma estrutura complexa que desempenha um papel importante na defesa do organismo contra microorganismos e outros agentes estranhos, mantendo a superfície dos tecidos hidratada e inóspita para patógenos. (ZOU *et al.*, 2021).

A barreira epitelial é a segunda linha de defesa, renovada constantemente por células progenitoras da mucosa e capaz de ser completamente substituída em um período de 3 a 7 dias (LAINE *et al.*, 2008) (Figura 5). A camada consistente de células epiteliais externas é outra importante medida protetora da mucosa devido à produção de muco e bicarbonato, além da geração de Prostaglandinas (PGs), Proteínas de choque térmico, Peptídeos da Família do Fator Trifólio (TFFs) e Catelicidinas (CORNICK *et al.*, 2015). As células possuem fosfolipídios em sua superfície, o que as torna hidrofóbicas, ou seja, repelem substâncias ácidas e solúveis em água que possam causar danos. As proteínas geradas em resposta ao estresse térmico, as catelicidinas e as TFFs, respectivamente, promovem a proteção da mucosa através da prevenção da desnaturação das proteínas, atuam no sistema de defesa imune e aceleram a cicatrização (MALEKI *et al.*, 2016).

As arteríolas na submucosa se diferenciam em capilares que permeiam a lâmina própria, transportando os metabólitos resultantes da alimentação e fornecendo às células mucosas os nutrientes essenciais e oxigênio requeridos (Figura 5). O estresse gerado na mucosa é identificado por neurônios sensoriais aferentes, resultando em dilatação dos vasos sanguíneos da mucosa devido à liberação de PGI₂ e NO pelas células vasculares do endométrio. Isso promove o aumento da perfusão

sanguínea na mucosa para efetuar a eliminação oportuna de agentes patogênicos e diluir o ácido gástrico retrodifundido (HOLZER *et al.*, 2012)

Os gases endógenos NO e H₂S são mediadores com propriedades anti-apoptóticas/antinecroticas e pro-angiogênicas. Eles impedem a aderência de células brancas à parede dos vasos sanguíneos, evitando danos causados pela falta de circulação sanguínea durante lesões na mucosa gástrica, graças a sua ação inibidora, assim como a do PGI₂. (YANDRAPU, *et al.*, 2015).

As funções gástricas são fortemente reguladas pelo sistema nervoso central (SNC) e SNE. A liberação central e periférica do fator liberador de corticotropina (CRF), após estresse agudo, causa inibição da motilidade e esvaziamento gástrico e efeitos antiapoptóticos mediados pelo receptor CRF-21 tipo 2 em células epiteliais gástricas (CZIMMER *et al.*, 2017). Vários outros peptídeos hormonais estimulados por nervos aferentes sensoriais ou NO fornecem gastroproteção aumentando os níveis de PGE₂ (hormônio liberador de tiotropina), sangue da mucosa gástrica.

1.4 Tratamento da úlcera gástrica induzida por etanol

A úlcera péptica é vista como uma das afecções digestivas mais frequentes na era atual (KARAMPOUR *et al.*, 2019). Para o tratamento das úlceras causadas pela ingestão de etanol são utilizadas drogas antagonistas da histamina (H₂), como a ranitidina por exemplo. A droga bloqueia competitivamente o receptor H₂ de histamina diminuindo as secreções ácidas. Drogas antagonistas da histamina (H₂) podem levar a um aumento da acidez após um curto período de administração causando recidiva da úlcera, baixa tolerância ao tratamento e efeitos colaterais adversos (DINIZ, 2016; KHAYYAL *et al.* 2006). Os sintomas mais comuns em pacientes com úlcera gástrica incluem a perda de peso não intencional, náuseas, vômitos e sangramento, geralmente a manifestação clínica desses sintomas se dá em indivíduos com idade acima de 50 ano.

Não podemos deixar de falar que o tratamento da úlcera gástrica pode se valer de dois ou mais fármacos de classes diferentes como os inibidores de bomba de prótons por exemplo, com o intuito de tratar a lesão por vários mecanismos da doença e que por conta dessa pluralidade de fármacos, os possíveis efeitos adversos são também uma realidade na vida de quem faz uso dessas substâncias farmacológicas para tratar a úlcera gástrica (TUSKEY; PEURA, 2013; FOX; MUNIRAJ, 2016;

GRAHAM *et al.* 2019). Com base no exposto acima, pesquisadores têm concentrado seus esforços para investigar novos medicamentos antiulcerogênicos mais seguros e com maior eficácia e buscam também fontes naturais a partir das plantas medicinais com potencial terapêutico expressivo no tratamento da úlcera gástrica (KHAYYAL *et al.* 2006; MOTAWI *et al.* 2012; ABD-ALLA *et al.* 2016; FAHMI *et al.* 2019).

1.5. Produtos naturais

Os produtos naturais são uma fonte importante para a prevenção e tratamento da úlcera gástrica (KARAMPOURET *al.*, 2019). Investigações arqueológicas apontaram para a utilização de plantas como recursos terapêuticos por parte da humanidade há aproximadamente 50.000 anos, durante o período Paleolítico, estes achados sugeriram uma compreensão sobre o uso medicinal das plantas naquela época (HARDY, 2019). Aproximadamente, setenta por cento das comunidades rurais em países em crescimento econômico recorrem às plantas medicinais ancestrais para atender suas principais demandas de saúde (WALI *et al.*, 2022).

Com o advento da produção dos medicamentos, uma grande variedade de compostos, oriundos das plantas medicinais foram descobertos e estudados com o intuito de se desenvolver novos fármacos e ou melhorar os medicamentos já existentes. A ingestão alimentar de legumes e frutas demonstraram ter efeitos benéficos para a saúde humana por conta da presença de compostos naturais bioativos com várias ações farmacológicas já estudadas, como por exemplo a ação antioxidante, antiinflamatória, antitumoral, antidiabético a antiobesidade. Um excelente exemplo de como os produtos naturais têm se destacado no cenário do tratamento dos distúrbios gastrointestinais é o relatado por Sistani Karampour N, e colaboradores 2019, onde, foi demonstrado que o gengibre (*Zingiber officinale*) teve efeito gastroprotetor em modelo experimental de úlcera gástrica induzida por etanol. Por sua vez, os flavonoides dietéticos compreendem um vaso (GHOSH *et al.*, 2014; JOSE *et al.*, 2014).

Oriundos do metabolismo secundário das plantas medicinais os flavonóides compreendem muitos compostos bioativos polifenólicos encontrados exclusivamente em frutas, vegetais, grãos, ervas e frutos (ERDMAN *et al.*, 2007). Os flavonóides tem em comum uma estrutura benzopirona comum que são sintetizadas em resposta à

infecção microbiana através da via fenilpropanóide (MAHOMOODALLY *et al.*, 2005). Sabe-se por intermédio de relatos científicos que o consumo de flavonóides como por exemplo a Rutina acontece em uma faixa de 20 a 1.000 mg/dia e que sua biodisponibilidade é diferente de indivíduos para indivíduos. Estudos mecanísticos mostraram que a quercetina foi eficaz na redução da produção de espécies reativas de oxigênio, diminuindo a atividade da mieloperoxidase e aumentando GPx (glutathione peroxidase). Também foi observado neste estudo que a quercetina foi eficaz na redução da lesão da mucosa gástrica induzida por HCl mais etanol e na redução das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico na mucosa lesada em ratos (ZHANG *et al.*, 2020). A absorção dos flavonóides acontece no intestino delgado e sabe-se que uma grande parcela desses compostos está exposta na microbiota intestinal. Para uma melhor compreensão, o microbioma intestinal digere os flavonoides convertendo-os em ácidos fenólicos e aromáticos para facilitar sua absorção (SCALBERT, 2020; WILLIAMSON, 2010).

Os flavonoides foram isolados pela primeira vez na década de 1930, são uma família grande e diversificada de compostos que ocorrem naturalmente em uma variedade de plantas. Formulações à base de flavonoides, como a troxerutina, tem demonstrado eficácia na cicatrização de úlceras venosas (SCALLON *et al.*, 2013). Com pouca toxicidade e alta eficácia se usados de forma correta, os compostos bioativos obtidos dos produtos naturais tem despertado na comunidade científica um grande interesse como agentes terapêuticos que podem ser utilizados pela sociedade de forma complementar ou integrativa (JIN *et al.*, 2019). As moléculas farmacologicamente ativas oriundas dos produtos naturais que por sua vez são derivados das plantas medicinais já são consideradas fontes expressivas para a descoberta de novos fármacos (NEWMAN; CRAGG, *et al.*, 2016).

Com isso, ensaios clínicos realizados em pacientes com úlcera gástrica submetidos a utilização de determinadas plantas medicinais, demonstraram ter tido excelentes resultados quando avaliado a ação antioxidante, antiinflamatória e anti-histamínica de ação inibitória (CALOU *et al.*, 2014). Assim, pesquisadores afirmam que uma grande parcela dos trabalhos científicos em modelo de úlcera gástrica tem tido como objetivo investigar as possíveis ações farmacológicas dos produtos naturais com o foco na ação gastroprotetora desses compostos observando parâmetros antioxidantes e antiinflamatórios por exemplo (AMIRSHAHROKHI *et al.*, 2016).

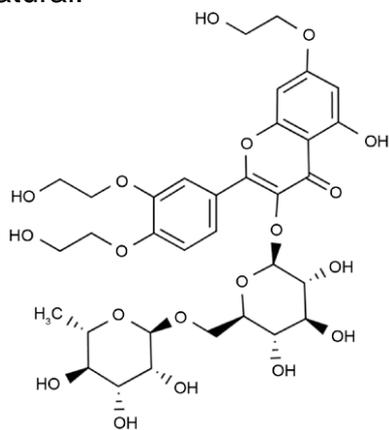
1.6 Troxerrutina

A Troxerrutina (TRX), é um flavonóide oriundo da rutina, e denominada de vitamina P4. A rutina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona-3-rutinosídeo) um glicosídeo flavonóide não tóxico oriundo de alimentos comuns na mesa da maioria da população brasileira como por exemplo em tomates, nas frutas cítricas como a exemplo à laranja, em cenouras, na batata doce, em chá preto e na casca de maçã, mas, também, é extraída da *Dimorphandra gardneriana*, conhecida popularmente como Fava d'anta, Favela, Fava de arara, Falso-barbatimão ou faveira encontrados no cerrado dos estados do MA, PI, CE e BA (FABJAN *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2003; PANAT *et al.*, 2016; BAYANDOR *et al.*, 2018; BIANCHI *et al.*, 2018).

A TRX é composta por uma mistura de mono, di, tri e tetrahidroxietil-rutosídeos, onde 80% de sua composição é trihidroxietilado da rutina, um flavonóide oriundo do metabolismo secundários das plantas medicinais (MURI *et al.*, 2010; AZARFARIN *et al.*, 2018) (Figura 6). A TRX tem alta solubilidade em água, boa absorção pelo sistema gastrointestinal e ações importantes como anti-inflamatória e antioxidante (MATHESIUS, 2018; PANCHE *et al.*, 2016). Outras propriedades biológicas têm sido reportadas a troxerrutina como por exemplo, antioxidante, anti-inflamatória (SHAN *et al.*, 2018), antiapoptótica (GEETHA *et al.*, 2017; BALUCHNEJADMOJARAD *et al.*, 2017), antiedematogênico (NGEOW *et al.*, 2008; MURI *et al.*, 2010) e potente agente terapêutico para dor neuropática (GUI *et al.*, 2015).

A troxerrutina obteve efeito satisfatório em modelo experimental de colite ulcerativa em camundongos, evidenciando sua promissora ação anti-inflamatória (WANG *et al.*, 2021) Já em outro estudo realizado com o objetivo de inibir a inflamação na síndrome do ovário policístico (SOP) em modelo animal, demonstrou que a TRX foi eficiente em diminuir o processo inflamatório instalado nessa síndrome conforme GAO *et al.*, 2020). Além disso, a administração de troxerrutina em um modelo de lesão renal verificou-se que houve diminuição do nível de citocinas inflamatórias como IL-10, TNF- α e IL-6 (YARIBEYGI *et al.*, 2019).

Figura 6. Estrutura química da Troxerrutina e a *Dimorphandra gardneriana* no habitat natural.



Fonte: Azarfarin *et al.*, 2018.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito gastroprotetor da Troxerrutina em modelo agudo experimental de lesão gástrica induzida por etanol.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar as alterações histopatológicas na mucosa gástrica após lesão gástrica promovida por etanol;
- Averiguar o efeito da Troxerrutina no estresse oxidativo induzidos por etanol na úlcera gástrica através da mensuração dos níveis de MDA e GSH;
- Avaliar o efeito da Troxerrutina na atividade da enzima da mieloperoxidase;
- Mensurar o efeito da Troxerrutina na contagem de mastócitos teciduais na úlcera gástrica;
- Investigar o efeito protetor da Troxerrutina na úlcera gástrica, por meio de imunohistoquímica para marcadores inflamatórios como o iNOS e TNF- α ;
- Investigar o envolvimento das prostaglandinas, óxido nítrico e GMPc no efeito gastroprotetor da Troxerrutina no modelo de lesão gástrica.

3. CAPÍTULO

REGIMENTO INTERNO

Por se tratar de pesquisa envolvendo animais, o projeto de pesquisa referente a esta tese foi submetido à apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, tendo sido aprovado sob número de protocolo 2349251021/2022. (Anexo A). Esta Tese de Doutorado baseia-se no Artigo 37º do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e teses de Doutorado. Os resultados obtidos estão apresentados na forma de 1 artigo científico, redigidos de acordo com as normas da revista científica escolhida para publicação. (European Journal of Pharmacology; ISSN: 0014-2999; Fator de impacto: 5.195; A1).

Potential anti-ulcerogenic effect of troxerutin in ethanol-induced gastric lesions in mice: anti-inflammatory and antioxidant mechanisms and possible action pathways.

Francisco Rafael Oliveira da Silva ^a, Conceição da Silva Martins ^a, Paulo Victor de Souza Pimentel ^a, João Francisco Câmara Neto ^b, Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro ^b, Nágila Maria Pontes Silva Ricardo ^b, Matheus da Silva Campelo ^b, Ícaro Gusmão Pinto Vieira ^c, Carlos Eduardo S. Monteiro ^{a,d}, Pedro Marcos Gomes Soares ^{a,d}, Maria Luana Gaudêncio dos Santos Moraes, Cassio Silva Sousa ^e, Jefferson Almeida Rocha ^e, Gilberto Santos Cerqueira ^a, Gerly Anne de Castro Brito ^a, João Antônio Leal de Miranda ^{a,f*}, Francisca Cléa Lourenço de Sousa

Resumo

A úlcera gástrica representa um distúrbio gastrointestinal ulcerativo e inflamatório que é um grave problema de saúde pública mundial. O surgimento dessa condição é resultado de um desequilíbrio entre agentes agressores e protetores da mucosa gástrica, dentre eles a exacerbação do consumo de álcool. Os flavonoides como a troxerutina (TRX) destacam-se no campo farmacológico por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e citoprotetoras. O presente estudo teve como objetivo determinar o efeito gastroprotetor do TRX na úlcera gástrica induzida por etanol em camundongos e seu papel nas vias de ação do óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGs) e mecanismos antioxidantes e anti-inflamatórios. Após induzir lesões gástricas com etanol, o tratamento foi realizado com TRX (100 mg/kg, p.o), N-acetilcisteína, L-Arginina, L-NAME [N(G)-nitro-L-arginina], indometacina e misoprostol (MISO). Para determinar o efeito gastroprotetor do TRX nas lesões gástricas, foram utilizadas as seguintes avaliações: porcentagem de área ulcerada, análise histopatológica, dosagem de glutathiona (GSH), malondialdeído (MDA), mieloperoxidase (MPO), imunohistoquímica para TNF- α e iNOS, e medição molecular. Evidenciou-se que o TRX tem efeito gastroprotetor na concentração de 100mg/kg, e foram determinados os possíveis mecanismos de ação envolvidos para esse efeito protetor.

Palavras-chave: Flavonóide. Rutina. Citoproteção. Inflamação. Gastrite.

1 Introdução

O trato gastrointestinal (GI) humano é crítico para a digestão e absorção de alimentos e a eliminação de produtos residuais, e devido sua importância funcional, lesões em sua mucosa tecidual correspondem a distúrbios gastrointestinais de grande relevância clínica e epidemiológica. A úlcera gástrica, por exemplo, trata-se de um distúrbio gastrointestinal mundial cujo surgimento é resultado da sobreposição de agentes agressores da mucosa gástrica como ácido, drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINES), infecções por *Helicobacter pylori* e álcool, à agentes protetores da mucosa como muco, secreção de bicarbonato, prostaglandinas, óxido nítrico, fluxo sanguíneo e capacidade antioxidante (MINAIYAN *et al.*, 2021). As úlceras gástricas, representam uma condição médica séria devido grau de comprometimento à saúde

humana, bem seu grau de acometimento na população mundial, que gira em torno de 10-15% (SELMÍ *et al.*, 2017).

O consumo excessivo de álcool é um dos principais desencadeadores de lesão gástrica, por sua vez, precedida pela redução da produção de muco e circulação sanguínea na mucosa, geração de estresse oxidativo, exacerbação resposta inflamatória evidenciado pela infiltração leucocitária (neutrofilia e mastocitose), e diminuição da proliferação celular, que levam à ulcerogênese e por fim, culmina na desregulação da barreira epitelial do trato gastrointestinal (FAHMI, *et al.*, 2018, MONTEIRO *et al.*, 2019; SHAMS; ELISSA, 2022).

Por outro lado, o processo de regeneração tecidual na úlcera gástrica inclui vários eventos (proliferação, migração, reepitelização, angiogênese e interações entre várias células e a matriz, e remodelação tecidual). E diversos são os agentes envolvidos na regeneração tecidual, como citocinas, fatores de crescimento, prostaglandinas e agentes antioxidantes (SHAMS; ELISSA, 2022). Drogas antiulcerosas sintéticas podem causar graus variáveis de efeitos colaterais e, portanto, a busca por estratégias terapêuticas com boa compatibilidade e baixa toxicidade ainda se fazem necessário. Neste contexto, pesquisas com compostos bioativos oriundos de plantas medicinais podem fornecer drogas eficazes no tratamento de lesão gástrica. Flavonoides, como a troxerrutina (TRX), um flavonoide trihidroxietilado da rutina cabe destaque no meio farmacológico, por ser um composto com grande abordagem terapêutica (MURI *et al.*, 2010; AZARFARIN *et al.*, 2018). Para este flavonoide semissintético oriundo da rutina há relatos de propriedade farmacológicas como antioxidantes, anti-inflamatórias (SHAN *et al.*, 2018), antiapoptóticas (GEETHA *et al.*, 2017; BALUCHNEJADMOJARAD *et al.*, 2017), antiedematogênico (NGEOW *et al.*, 2008) e potente protetor na mucosite intestinal (DE MIRANDA *et al.*, 2020). Portanto, o presente estudo objetivou determinar o efeito gastroprotetor da troxerrutina na úlcera gástrica induzida por etanol em camundongos, e seu papel nas vias de ação do óxido nítrico (NO), prostaglandina (PGs), mecanismos antioxidante e anti-inflamatórios.

2 Materiais e métodos

2.1. Substância químicas

A rotina utilizada na semi-síntese do TRX foi cedida pelo Parque de Desenvolvimento Tecnológico (PADETEC). A síntese de TRX foi realizada de acordo com métodos previamente descritos com algumas modificações (COURBAT *et al.*, 1966), conforme relacionado em De Miranda *et al.* (2020). A troxerrutina foi emulsionada com solução fisiológica (NaCl a 0,09%) antes da administração. Para indução das lesões gástricas foi utilizado etanol absoluto (Dinâmica®, São Paulo, SP, Brasil). L-Arginina, um substrato para enzima óxido nítrico sintase, L-NAME [N(G)-nitro-L-arginina éster metílico], um inibidor não seletivo de sintase de óxido nítrico, foram obtidos da Millipore Sigma (St Louis, MO, EUA). Já o N-acetilcisteína (NAC), agente mucolítico e potente agente oxidante, foram obtidos da EMS® (São Paulo, SP, Brasil) e, Indometacina e Misoprostol, um análogo de prostagladina E1, foram obtidos da Aspen® (São Paulo, SP, Brasil) e Hebron® (São Paulo, SP, Brasil) respectivamente.

2.2. Animais

De acordo com o protocolo experimental, foram utilizados camundongos Swiss machos pesando entre 25 e 35g, os quais foram divididos em grupos de seis animais (n=6), com luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), com livre acesso à ração e água antes de cada experimento. Os camundongos foram colocados em gaiolas de polipropileno, forradas com maravalha, que eram trocadas duas vezes por semana. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em ambiente com temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ em ciclo de 12h claro/12h escuro, com livre acesso a água e ração padrão. Antes da realização dos experimentos, os animais foram distribuídos aleatoriamente em gaiolas metabólicas em grupos de n=6 e foram submetidos a jejum sólido de 15 a 16 horas.

2.3. Design Experimental

Os experimentos foram conduzidos em quatro série de estudos experimentais, todos realizados através de modelo experimental de lesão gástrica induzido por etanol determinado por Robert *et al.*, (1979) com adaptações de Câmara Neto *et al.* (2022). A primeira série foi realizada para determinar a dose gastroprotetora ideal de TRX, e

comparar os efeitos de TRX e NAC na reversão de lesões gástricas, evidenciados pelo percentual de área ulcerada (macroscopia) e escores histopatológicos (microscopia). Na segunda experimentação, realizou-se a determinação do potencial anti-inflamatório e antioxidante da TRX em lesões gástricas através de dosagem de glutathiona reduzida e malondialdeído (avaliação antioxidante) e dosagem de mieloperoxidase, contagem de mastócitos, imuno-histoquímica para fator de necrose tumoral alfa e óxido nítrico sintase induzível (avaliação anti-inflamatória). Na terceira experimentação determinou-se a influência do óxido nítrico no efeito gastroprotetor de TRX em lesões gástricas induzidas por etanol, e a quarta experimentação, foi avaliado se o efeito gastroprotetor de TRX envolve a via prostaglandina. Terceira e quarta experimentação foi determinado o efeito através da avaliação do percentual de área ulcerada. E por fim, realizou-se avaliação *in silico*, por docagem molecular para avaliar as possíveis interações moleculares de TRX com enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS).

Dessa forma, ao final da experimentação, e a depender do grupo experimental, os camundongos receberam administração prévia de solução fisiológica (NaCl a 0.9%), TRX (100 mg/kg), NAC (300 mg/kg, p.o.), L- NAME [10 mg/kg, intraperitonealmente (i.p)], indometacina (10 mg/kg, p.o), L- arginina (600 mg/kg, p.o), misoprostol (70µg/kg, p.o). O etanol absoluto foi administrado (0,2 ml/animal, p.o.) oralmente nos camundongos, 60 min após a administração das demais drogas. Após os protocolos experimentais, aos animais foram eutanasiados e amostras de tecido gástrico foram coletadas para análises subsequentes.

2.4. Análise macroscópica

Os estômagos foram removidos e abertos ao longo da grande curvatura a fim de fotografar a mucosa gástrica usando uma câmera digital (Nikon L315). A área da lesão gástrica foi quantificada usando Image J software (Instituto Nacional de Saúde Mental: Bethesda, MD, EUA) e os resultados expressos em porcentagem da área da lesão em relação a total área de tecido. Este procedimento foi realizado no primeiro experimento e avaliação das vias de ação conforme representado na terceira e quarta etapa experimental.

2.5. Avaliação histopatológica da mucosa gástrica de camundongos

Para o estudo histopatológico, amostras de estômago foram fixadas em solução tamponada de formaldeído a 10%, onde permaneceram por 24 horas. Em seguida, as amostras foram transferidas para solução de álcool 70%, onde permaneceram até a realização dos procedimentos histológicos. Logo após, os materiais biológicos foram seccionados e incluídos em parafina. Foram feitos cortes de 5 µm, transferidos para lâminas e corados com hematoxilina-eosina para estudo em microscópio óptico. As amostras foram avaliadas de acordo com os critérios de Lane e Weinstein (1988), avaliando a perda de células epiteliais (escores de 0-3), edema na superfície da mucosa (escores de 0-4), hemorragia (escores de 0-4) e infiltração de células inflamatórias (pontuações de 0-3), sendo 14 a pontuação máxima. Toda a avaliação histopatológica foi realizada através de um estudo cego.

2.6 Malondialdeído (MDA)

A determinação do MDA, pelo teste do ácido tiobarbitúrico - TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances), foi utilizada como estimativa da taxa de lipoperoxidação da mucosa gástrica. Para este procedimento, as membranas mucosas foram lavadas com soro fisiológico gelado para minimizar a interferência da hemoglobina com os radicais livres e para remover o sangue aderido à mucosa. As mucosas dos tecidos macerados foram homogeneizadas a 10% com cloreto de potássio (KCl) a 1,15%. Deste homogeneizado, 62,5 µL serão adicionados em um microtubo seguido da adição de 375 µL de ácido fosfórico (1%) e 125 µL de ácido tiobarbitúrico (0,6%). Nesta reação, duas moléculas de TBARS reagem estequiometricamente com uma molécula de MDA para formar um cromóforo rosa. Em seguida, as amostras foram imersas em banho-maria por 45 minutos a 100°C. Após esse tempo, 500 µL de n-butanol são adicionados a cada amostra e a mistura é centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, 200 µL do sobrenadante foram inseridos na placa de 96 poços e a absorbância será medida em um leitor de microplacas a 535 nm (MIHARA; UCHYAMA, 1978). Os resultados foram expressos como nmol MDA/mg de proteína.

2.7 Glutathiona (GSH)

A concentração de GSH na mucosa gástrica foi realizada de acordo com o método descrito por Sedlak e Lindsay (1968). Para determinar os níveis de grupos sulfidrilas não protéicos (NP-SH), uma amostra de 50 a 100 mg da mucosa gástrica dos animais foi homogeneizada em 1ml de EDTA 0,02M para cada 100mg de tecido. Alíquotas de 100µL do homogeneizado foram misturadas com 80µL de água destilada e 20µL de ácido tricloroacético (TCA) 50% para precipitação de proteínas. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 3.000 rpm a 4°C. Um total de 100µL do sobrenadante será adicionado a 200µL de tampão Tris 0,4M (pH 8,9) e 5 µL de 5,5-ditio•bis-(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB, Sigma Aldrich, EUA) 0, 01M. A mistura foi então agitada por 3 minutos e a absorbância lida a 412 nm. As concentrações de grupos sulfidrilas não proteicas serão expressas em µg de GSH/mg de tecido a partir da curva padrão.

2.8 Ensaio de mieloperoxidase (MPO)

A avaliação da atividade da MPO, por meio de amostras estomacais, correspondentes aos animais dos grupos Salina, TRX 100, NAC e Álcool, foi determinada pela técnica descrita por Bradley *et al.* (1982). Este experimento foi realizado utilizando 50 a 100 mg de estômago por animal, de cada grupo experimental. A MPO é uma enzima encontrada predominantemente em grânulos azurófilos de leucócitos polimorfonucleares e tem sido utilizada como um índice quantitativo para avaliar a inflamação em vários tecidos. Para tanto, as amostras foram suspensas em tampão hexadeciltrimetilamônio (pH 6,0; 50mg de tecido por mL de tampão) e posteriormente moídas em homogeneizador de tecidos. Os níveis teciduais de atividade de MPO foram determinados usando a técnica descrita por Bradley *et al.* (1982), usando 0,0005% de peróxido de hidrogênio como substrato para MPO. Uma unidade de MPO foi definida como a quantidade capaz de converter 1 µmol de peróxido de hidrogênio em água em 1 minuto a 25°C. No teste, à medida que o peróxido de hidrogênio é degradado, é produzido o ânion superóxido, responsável por converter a o-dianisidina em um composto marrom. A variação da densidade óptica da mistura das amostras com a solução de o-dianisidina em função do tempo de

reação foi medida por espectrofotômetro a 450 nm. Os resultados foram expressos em unidades MPO/mg de tecido.

2.9. Contagem de células da mucosa gástrica: mastócitos

Para determinar a quantificação de mastócitos da mucosa gástrica, os blocos de parafina com amostras estomacais foram selecionados para a coloração com azul de toluidina, segundo Michalany (2008). A coloração foi realizada após a desparafinização da lâmina com xilol, hidratação com álcool absoluto e uma série de álcool a 90%, álcool a 80%, álcool a 70% em seguidas as lâminas foram lavadas com água destilada, coradas com azul de toluidina por 8 minutos, lavadas e secas. E após a secagem as lâminas clareadas com uma série de xilol foram montadas. Foi utilizado microscópio óptico acoplado a um sistema de aquisição de imagens (LEICA), e realizou-se a captura de imagens digitais, para posterior contagem de no mínimo 10 campos, com auxílio de software Image J (National Institute of Mental Health: Bethesda, MD, USA), e com isso realizou-se a contagem de mastócitos na mucosa gástrica.

2.10 Docagem Molecular e determinação de sítios-alvo de ligação da troxerrutina

As estruturas 3D de todos os possíveis alvos da iNOS, foram obtidas no banco de dados de proteínas (PDB) (Protein Data Bank, 2017). Os cálculos de docagem molecular foram realizados com o programa Autodock 4.2® (GOODSELL *et al.*, 1996; GOODSELL, 2005; MORRIS *et al.*, 2008). As proteínas e ligantes foram preparados para docagem molecular utilizando o programa com Autodock Tools (ADT), versão 1.5.6. O receptor foi considerado rígido enquanto cada ligante foi considerado flexível. O algoritmo genético Lamarckiano (LGA) com busca global e pseudo-Solis e Wets com busca local foram os métodos utilizados na docagem molecular, onde para cada simulação foram realizadas 100 corridas independentes (RAMOS *et al.*, 2012). O resto dos parâmetros de docagem foi definido com os valores padrão. As análises da docagem molecular foram concentradas nos clusters de menor energia, e a conformação de menor energia combinada com inspeção visual foi escolhida para uma análise mais detalhada.

2.11 Imunohistoquímica

A imunohistoquímica para detecção de iNOS TNF- α foi realizada pelo método da estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE, 1981). Para a realização da imuno-histoquímica foram utilizados cortes histológicos da mucosa gástrica do primeiro protocolo experimental de úlcera gástrica. Os cortes histológicos foram colocados em lâminas especiais revestidas com poli-L-lisina ou gelatina.

Inicialmente, as lâminas foram deixadas em estufa a 66-88°C por 3 horas. Após esse tempo, a parafina foi retirada com banhos de xilol e em seguida as lâminas foram hidratadas em etanol e em seguida água. Logo após, as lâminas serão colocadas em um recipiente contendo tampão citrato pH 6,0 aquecido a 95°C por 15 min. Após resfriá-los por 20 minutos, a peroxidase tecidual foi bloqueada com dois banhos de 10 minutos em solução de peróxido de hidrogênio a 3%. Em seguida, as lâminas foram incubadas durante a noite com o anticorpo primário (anti-TNF- α de cabra, anti-IL-1 β de coelho ou anti-NOS α de coelho) diluído em albumina bovina 5% (BSA 5%), na diluição de 1:200.

No dia seguinte, o anticorpo primário foi removido por lavagem em tampão PBS e incubados por 30 minutos com o anticorpo secundário (anti-coelho ou anti-cabra, diluído em BSA 5%, diluição 1:400). Após lavagem em PBS, houve nova incubação com o complexo Estrepto-avidina peroxidase (complexo ABC). A coloração foi realizada incubando as lâminas por aproximadamente 2 minutos com uma solução de diaminobenzidina - peróxido de hidrogênio (DAB-peróxido). Este corante produz uma marcação de cor marrom. Em seguida, foi realizada a contracoloração com hematoxilina de Mayer por 5 minutos. As lâminas foram desidratadas em graus de etanol, seguido de xilol e depois montadas com entelan. Após a secagem, as lâminas foram examinadas em microscópio óptico e fotografadas. Escores variando de 0 a 4 foram atribuídos por um examinador cego aos tratamentos, de acordo com a intensidade da coloração marrom de cada corte e a densidade de células marcadas. A pontuação 0 (zero) foi atribuída à ausência de marcação; Pontuação 1 (uma) marcação leve; Nota 2 (dois) marcação moderada; escore 3 (três) marcação moderada a intensa; Nota 4 (quatro) marcação de alta intensidade.

2.12 Avaliação do mecanismo de ação gastroprotetora da Troxerrutina

2.12.1 Estudo do efeito das prostaglandinas (PGs) sobre o efeito gastroprotetor da Troxerrutina em modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.

Para avaliar a possível participação das prostaglandinas no efeito gastroprotetor do Troxertutina, utilizamos um grupo de (n=6) animais e todos foram pré-tratados com indometacina (10 mg/Kg, p.o.), dose que inibe a síntese de prostaglandinas, ou soro fisiológico 0,9%. Após 2 horas, os animais receberam solução salina 0,9%: TRX (100 mg/Kg) ou misoprostol (70 µg/Kg, p.o.), um análogo sintético da prostaglandina E1. O etanol foi administrado uma hora depois, e foi feito conforme descrito anteriormente quanto à análise do percentual de lesão gástrica.

2.12.2 Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor da Troxerrutina em um modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.

Para avaliar a possível participação da via do óxido nítrico no efeito antiulcerogênico da Troxerrutina, utilizamos um grupo de (n=6) animais e todos foram pré-tratados com solução salina 0,9% ou L-NAME (20 mg/Kg, s.c.), um inibidor da síntese de NO. Após 15 minutos, os animais receberam os seguintes tratamentos: solução salina; TRX (100 mg/Kg, p.o.) ou L-arginina (600 mg/Kg, i.p.), precursor do óxido nítrico. O etanol foi administrado uma hora depois e a porcentagem de área ulcerada foi realizada conforme descrito anteriormente (CHANDRANATH; BASTAKI; SINGH, 2002).

2.13. Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio do teste de análise de variância (ANOVA). Foi realizado o teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls. Para análise das alterações histológicas foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltipla de dados. Os resultados foram expressos como média \pm EP (variáveis com distribuição normal) ou mediana \pm

mínimo e máximo (variáveis sem distribuição normal), sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Efeito gastroprotetor de TRX na lesão gástrica macroscópica

A Figura 01 mostra que o pré-tratamento com TRX (100 mg/kg) e NAC (300 mg/kg) reduziram a porcentagem de lesões gástricas para 6,35% e 1,90%, respectivamente, conforme comparado ao grupo controle (18,31%).

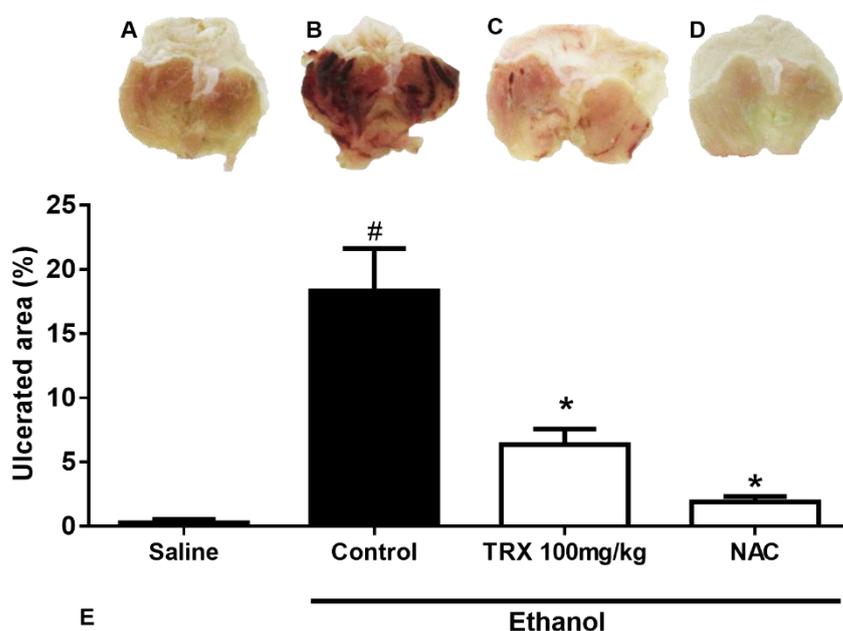


Figura 01. Efeito gastroprotetor de TRX na mucosa gástrica em um modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos através da avaliação macroscópica por percentual (%) de área ulcerada. (A) Salina; (B) Controle (Saline 0.9%+ etanol); (C) TRX 100 (TRX 100 mg/kg + 0,2 μ L de etanol absoluto); (D) NAC (300mg/kg de N-acetilcisteína + 0,2 μ L de etanol absoluto); (E) gráfico do percentual de área ulcerada. Os resultados são apresentados como média \pm S.E.M (n = 6). *P < 0,05 versus grupo controle.

3.2. Análise histopatológica

A Figura 02 e Tabela 1 mostram que o etanol levou à indução de hemorragias (pontuação média: 3), edemas (2), perda de células epiteliais (3), neutrofilia infiltração

(1) e pontuação total (9) em comparação com os tratados com solução salina grupo (escore total 0). Em contraste, o tratamento com TRX foi capaz de prevenir hemorragia, perda de células epiteliais, edema e infiltrado inflamatório.

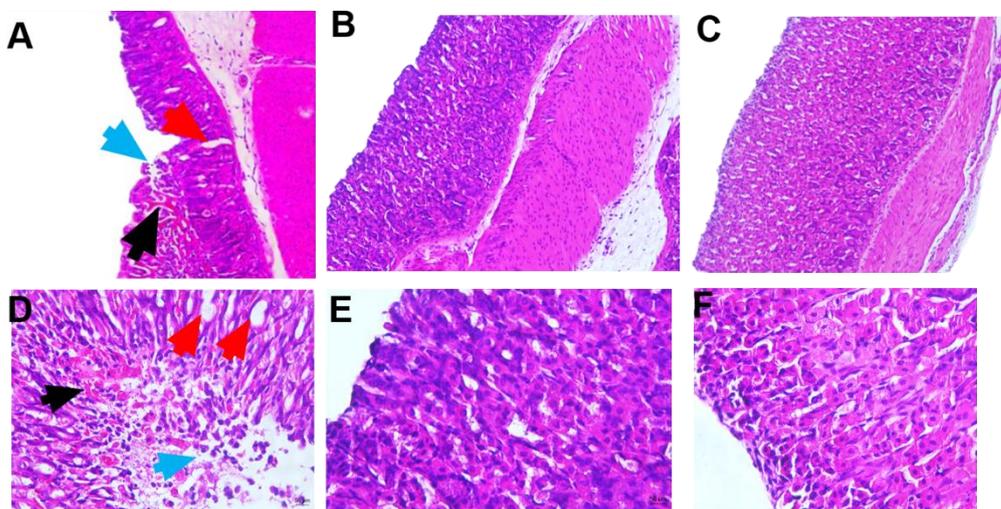


Figura 02. Análise histopatológica de TRX na lesão gástrica. Os cortes histológicos estão representados em aumento de 100x (A-C) e 400x (D-F) dos três grupos em estudo. (A e D) Controle (Saline 0.9%+ etanol); (B e E) TRX 100 (TRX 100 mg/kg + 0,2μL de etanol absoluto); (C e F) NAC (300mg/kg de N-acetilcisteína + 0,2μL de etanol absoluto). As setas pretas, vermelhas e azul indicam a presença de hemorragia, edema e perda de células epiteliais, respectivamente.

Tabela 01. Efeito gastroprotetor da troxerrutina e N-acetilcisteína em scores histopatológicos das lesões gástricas induzidas por etanol absoluto. Os dados são apresentados como valores medianos com mínimo e valores máximos entre parênteses. A significância estatística foi determinada por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn (comparações múltiplas). * Valores de p-valor<0,05 foram considerados estatisticamente significativo.

Grupos Experimentais	Hemorragia (score 0-4)	Edema (score 0-4)	Perda de células epiteliais (score 0-3)	Células inflamatórias (score 0-3)	Total (score 0-14)
Salina	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0
Controle	4 (3-4)	3 (3-4)	3 (2-4)	1 (0-1)	11
TRX	1 (0-2) *	1 (0-1) *	1 (0-2) *	0 (0-0) *	3
NAC	1 (1-2) *	1 (0-2) *	1 (0-2) *	0 (0-0) *	3

3.3. Ensaio de Glutathiona Reduzida (GSH)

A (Figura 3A) mostra a influência do pré-tratamento com Troxerrutina e NAC no conteúdo gástrico de GSH ($\mu\text{g/g}$ de proteína) em úlceras induzidas por etanol em animais saudáveis. demonstra que a administração de etanol ($20.71 \pm 1.63 \mu\text{g/g}$ de tecido) reduziram os níveis gástricos de GSH em comparação com grupo salina, que não recebeu etanol ($80.37 \pm 6.98 \mu\text{g/g}$ de tecido). Por outro lado, os grupos tratados com TRX ($50.82 \pm 4,18 \mu\text{g/g}$ de tecido) e NAC ($63.98 \pm 5.58 \mu\text{g/g}$ de tecido) preveniram a depleção do antioxidante promovida pelo etanol. Nossos resultados indicam que, na presença de lesões gástricas induzidas por etanol, os animais pré-tratados com Troxerrutina apresentaram níveis mais elevados de GSH, quando comparados ao etanol, reduzindo os efeitos do etanol e aproximando os valores do grupo salina, que não recebeu etanol.

3.4. Níveis de malondialdeído (MDA)

Nos resultados da peroxidação lipídica (Figura 3B) observou-se que os níveis de MDA gástrico aumentaram significativamente após administração de etanol ($5537.0 \pm 604.31 \text{ nmol/mg}$ de tecido) em relação ao grupo tratado com solução salina ($2391.0 \pm 99.67 \text{ nmol/mg}$ de tecido). O tratamento com TRX promoveu redução significativa ($p < 0.05$) dos níveis de MDA ($3919 \pm 11.27 \text{ nmol/mg}$ de tecido). Esses resultados sugerem a participação do estresse oxidativo e seu bloqueio no efeito antiulceroso da troxerrutina. Os resultados observados indicam que o bloqueio da produção de radicais livres também pode estar envolvido na ação antiulcerogênica da troxerrutina.

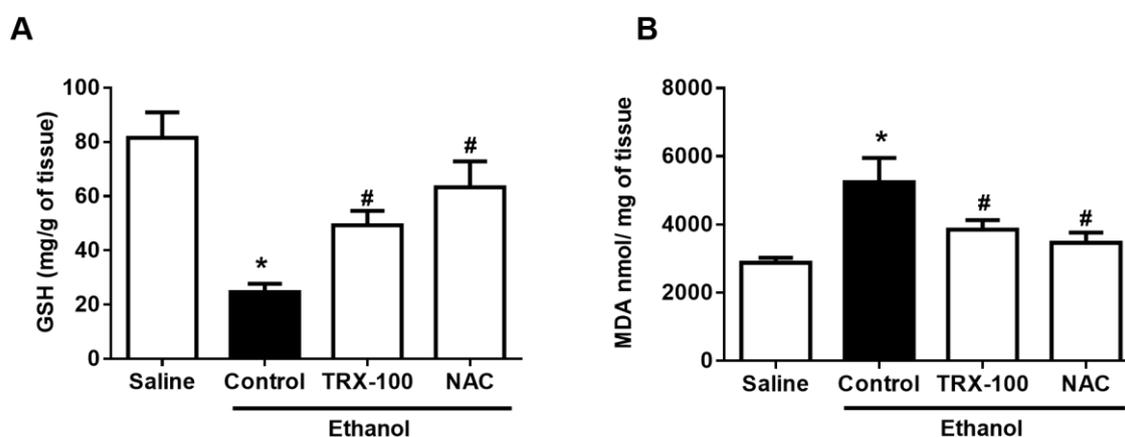


Figura. 03. Avaliação do efeito da troxerrutina no estresse oxidativo. A: Ensaio de Glutathiona Reduzida (GSH); B: Níveis de malondialdeído (MDA). Os resultados representam médias \pm S.E.M. * $p < 0,05$ vs. controle.

3.5. Mieloperoxidase (MPO)

A atividade enzimática da mieloperoxidase nos animais tratados com solução salina 0,9% antes da indução da gastrite com etanol 100% aumentou 5,9 vezes ($3,63 \pm 0,93$ U/mg de tecido) quando comparada ao grupo salina ($0,61 \pm 0,23$ U/mg de tecido). Já os animais tratados com TRX 100 e NAC tiveram redução na atividade da MPO ($1,44 \pm 0,31$; $1,81 \pm 0,43$ U/mg de tecido, respectivamente).

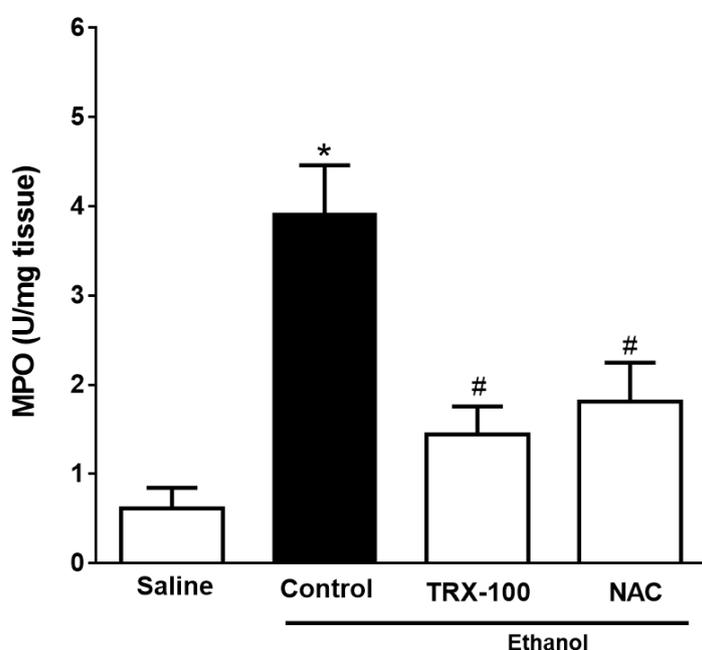


Figura 04. Efeito do TRX na atividade da MPO na mucosa gástrica. O pré-tratamento foi realizado com TRX 100mg/Kg (v.o.) e NAC 300 mg/Kg (v.o.), 30 minutos antes da indução da úlcera gástrica com etanol 100% (0,2 ml/30g). O grupo não tratado recebeu solução salina (v.o.). A atividade de MPO foi analisada 1 h após a indução do macerado do estômago. Média \pm SEM (n=6). * $p < 0,05$ versus grupo de controle. (ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferrini).

3.6. Contagem de células da mucosa gástrica: Mastócitos

Para avaliar o efeito do pré-tratamento TRX na mastocitose induzida por etanol, o número de mastócitos no tecido gástrico foi investigado. O álcool (Figura 5B) aumentou o número de mastócitos por campo em relação ao grupo salina (Figura 7A) ($p < 0,05$). O pré-tratamento com TRX (100 mg/kg) (Figura 7C) preveniu de mastócitos

em relação ao grupo álcool ($p < 0,05$) (Figura 7B). O grupo NAC (Fig. 7D) apresentou uma diminuição no número de mastócitos no estômago em relação ao grupo álcool ($p < 0,05$) NAC.

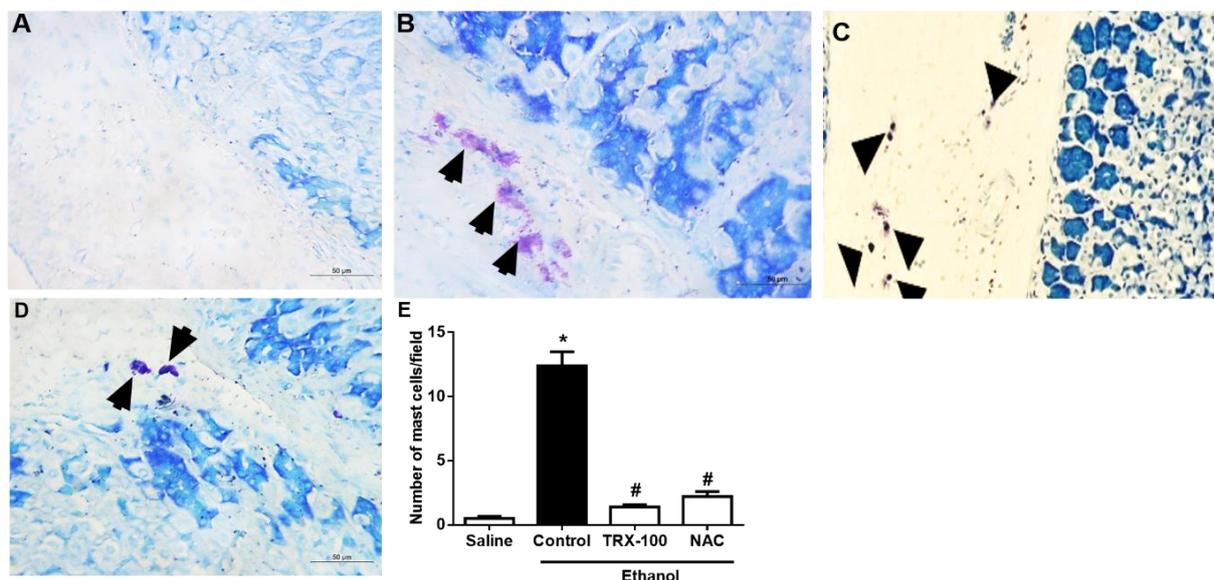


Figura 05. Contagem de mastócitos estomacais. Em (B), demonstra-se que o etanol promoveu aumento no número de mastócitos (setas pretas) quando comparado ao grupo salina (A). TRX (100mg/kg) reverteu a mastocitose induzida por álcool (C). Os painéis A, B, C e D correspondem a imagens obtidas com aumento de 400x. Os valores são apresentados como média \pm SE do número de mastócitos por campo. Para análise estatística, utilizou-se ANOVA one-way, seguido do teste de Tukey, onde $p < 0,05$ versus grupo salina e $*p < 0,05$ vs grupo TRX.

3.7. Imunohistoquímica para TNF- α e iNOS

Na imunomarcação da mucosa gástrica para iNOS e TNF- α (Figura 06), evidenciou-se que o etanol promoveu aumento significativo da imunomarcação para iNOS (Figura 06B) e TNF- α (Figura 06G), quando comparado com o grupo salina (Figura 06A e F). O tratamento com TRX promoveu diminuição significativa da imunomarcação para iNOS (Figura 06C) e TNF- α (Figura 06H), e NAC também reverteu a imunomarcação para iNOS (Figura 06D) e TNF- α (Figura 06I).

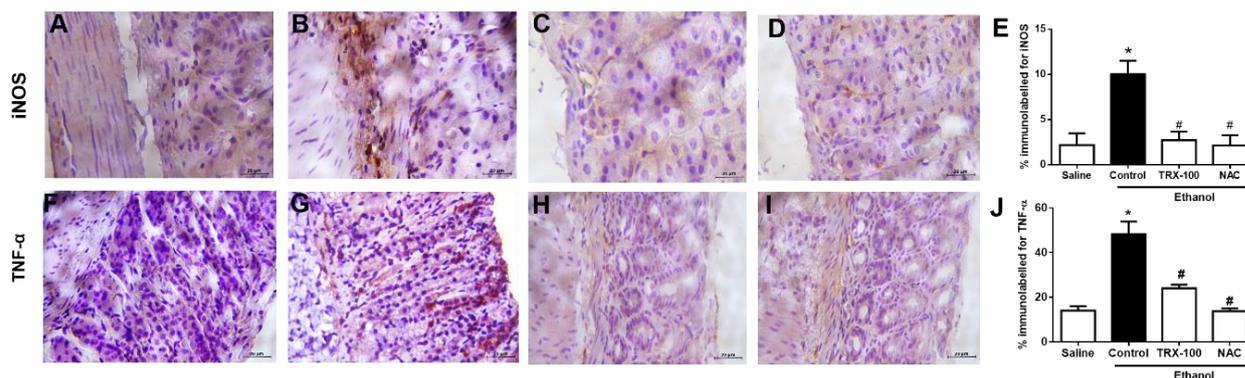


Figura 06. Análise imuno-histoquímica para avaliação da expressão de iNOS e TNF- α . Grupos Salina (A e F), Controle (B e G), TRX (C e H), NAC (D e I), % imunomarcada para iNOS e TNF- α (E e J). Os valores foram expressos como média \pm S.E.M. Para análise estatística foi utilizado ANOVA one-way seguida do teste de Tukey, onde * $p < 0,05$ vs. grupo salina, # $p < 0,05$ vs. Controle.

3.8. Docagem molecular de TRX com sítios de iNOS

Os resultados referentes a docagem molecular da troxerrutina e da iNOS são apresentados na Tabela 02. Os parâmetros de afinidade molecular foram obtidos a partir da interação entre os sítios ativos. A afinidade foi observada com energia de ligação igual a $-9,2 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (Tabela 02; Figura 09). Nos ligantes foi possível observar a interação com os aminoácidos Arg260, Arg382, Tyr341, Gln257, Arg193, Trp366, Pro344, Gly365, Ile456 e Trp457 do sítio ativo via ponte de hidrogênio.

Tabela 02. Parâmetros de afinidade molecular da troxerrutina com a enzima iNOS.

Complexo (Ligante-Proteína)	$\Delta G_{\text{ligação}}$ (kcal.mol^{-1})	Ponte de hidrogênio do sítio ativo
TRX - iNOS	-9.2	Arg260, Arg382, Tyr341, Gln257, Arg193, Trp366, Pro344, Gly365, Ile456, Trp457

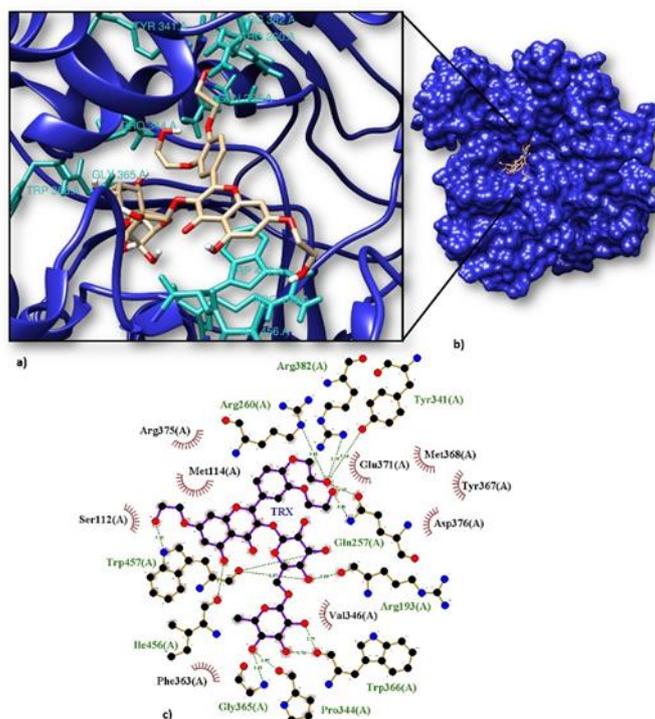


Figura 07. Docagem molecular do complexo proteína-ligante com a proteína iNOS e TRX, no sítio ativo, ilustrando o sítio ativo de ligação (A) com as respectivas interações ponte de hidrogênio (B e C).

3.9. Avaliação do papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor da troxerrutina em modelo de úlcera gástrica induzida por etanol.

Os resultados obtidos para o efeito gastroprotetor da troxerrutina após o pré-tratamento de camundongos com L-NAME, um inibidor da atividade de síntese de NO, são mostrados na Fig. 4. No grupo etanol (controle), as lesões gástricas ($18,31 \pm 3,31$) foram significativamente reduzidos pelo TRX 100 ($6,35 \pm 1,20$). A administração prévia de L-NAME interferiu na gastroproteção do TRX 100 ($14,82 \pm 2,48$) em relação ao grupo TRX, indicando que o sistema NO provavelmente está envolvido com os efeitos da troxerrutina.

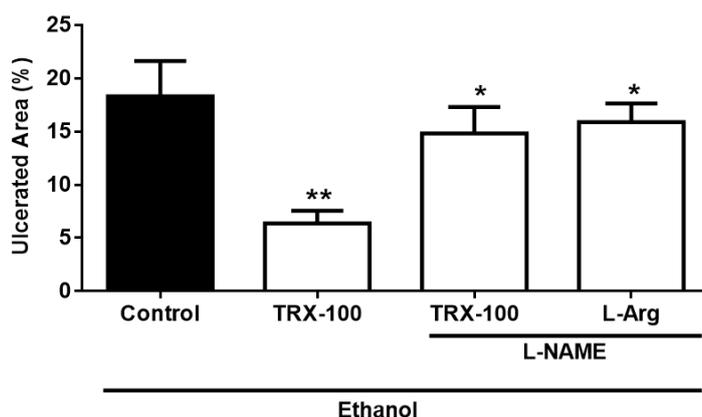


Figura. 08. Efeitos da inibição do óxido nítrico sintase por L-NAME + L-Arg na gastroproteção da troxerrutina em camundongos submetidos à ulceração gástrica induzida por etanol. L-NAME (10 mg/kg, i.p) ou veículo foram injetados 15 min antes da administração de Troxerrutina (TRX, 100 mg/kg, p.o). Sessenta minutos depois, as lesões da mucosa gástrica foram induzidas com etanol (0,2 ml, p.o.) em todos os grupos. Os resultados são apresentados como médias \pm S.E.M. ** $p < 0,05$ vs. controle; * $p < 0,05$ vs. TRX 100.

3.10. Avaliação do papel da prostaglandina no efeito gastroprotetor da Troxerrutina em modelo de úlcera gástrica induzida por etanol.

Os resultados do pré-tratamento com indometacina sobre o efeito gastroprotetor da Troxerrutina são mostrados na (Figura 09). Conforme descrito anteriormente, as úlceras induzidas por etanol foram significativamente reduzidas pelo pré-tratamento com TRX 100 ($5,41 \pm 0,79$) e misoprostol, um análogo da PGE1 ($8,13 \pm 1,55$), quando comparado ao controle ($18,31 \pm 3,31$). Este efeito foi significativamente alterado e as úlceras induzidas por etanol aumentaram pela administração prévia de indometacina ($14,26 \pm 2,51$) em comparação com TRX 100 sozinho. Um resultado semelhante também foi demonstrado pela combinação de indometacina mais misoprostol ($17,63 \pm 2,28$) em comparação com o grupo de misoprostol sozinho. Esses resultados indicam que o efeito da Troxerrutina, semelhante ao do misoprostol, é pelo menos em parte dependente da síntese de prostaglandinas.

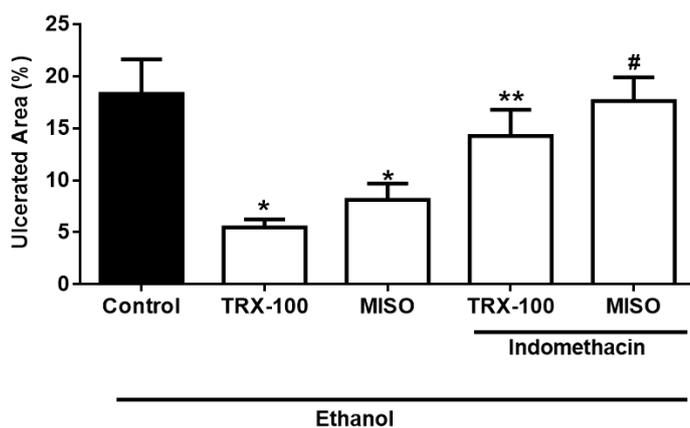


Figura. 09. Efeitos do pré-tratamento com indometacina na gastroproteção da troxerrutina em camundongos submetidos a ulceração gástrica induzida por etanol. Os camundongos foram pré-tratados com indometacina (10 mg/kg, p.o.) ou veículo, 2h antes da administração oral de TRX 100 ou solução salina para cada grupo. Sessenta minutos depois, as lesões gástricas foram induzidas com etanol absoluto (0,2 ml, p.o.). Os valores são expressos como médias \pm S.E.M. * $p < 0,05$ vs. controle; ** $p < 0,05$ vs. TRX; # $p < 0,05$ vs. MISO.

4 Discussão

A úlcera gástrica é uma doença ulcerativa de natureza inflamatória que pode se desenvolver no duodeno e no estômago e que tem prevalência ao longo da vida de 5 a 10% dos pacientes, onde boa parte dessa lesão é gerada pela ingestão de álcool e vale ressaltar que um número relevante de pacientes permanece assintomático até a descoberta da doença (WOOLF *et al.*, 2022). Dentre os efeitos lesivos promovidos pelo álcool na mucosa gástrica, pode-se relacionar lesão da membrana celular, esfoliação, citotoxicidade direta ou induzida pelo estresse oxidativo e inflamação, aumento da permeabilidade ao ácido gástrico, infiltração de mastócitos e macrófagos e neutrófilos e liberação dos seus grânulos intracitoplasmáticos de produtos vasoativos, que culminam em necrose e formação de úlcera (RUBAB *et al.*, 2022; SHAMS; EISSA, 2022). Por esta razão, o etanol é geralmente usado para induzir lesões gástricas em animais experimentais, devido a possibilidade de lesão direta ou indireta através da instauração do estresse oxidativo e do processo inflamatório (FAHMI *et al.*, 2018).

Os flavonoides, por sua vez, representam uma classe altamente diversa de metabólitos secundários, com diversas atividades biológicas, muitas delas no trato gastrointestinal, como propriedades antissecretora, antidiarreicas e antiulcerosas (MOTA *et al.*, 2009; ROKAYA *et al.*, 2014). Em nossos ensaios pré-clínicos, utilizamos um modelo experimental de lesão gástrica induzido por etanol determinado por Robert *et al.* (1979) com adaptações de Câmara Neto *et al.* (2022), onde foi avaliado o efeito do TRX em lesões gástricas induzidas por etanol absoluto e mostramos que a troxerrutina na dose de 100 mg/kg preveniu os efeitos nocivos ulcerativos induzidos pelo etanol. Esses resultados corroboram os demonstrados por Abdel-Raheem *et al.* (2010), que observou em seus estudos diminuição do dano histológico, do infiltrado inflamatório e melhora do estresse oxidativo alterado e dos parâmetros bioquímicos.

Flavonoides, já foram indicados como detentores de atividade citoprotetora por diversos mecanismos, como aumento do fluxo sanguíneo da mucosa, estimulação da síntese de muco e dos níveis de PGs (RUIZ-CRUZ *et al.*, 2017), bem como devido suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (AHMAD *et al.*, 2014; HIGUCHI *et al.*, 2014). Para TRX também é creditado efeito gastroprotetor, que possivelmente envolva múltiplos mecanismos de ação. Dessa forma, avaliamos o potencial antioxidante de TRX, e observou-se eficácia na reversão dos níveis de MDA e aumento de GSH, promovidos pelo etanol, o que se encontra em conformidade com relatos do efeito antioxidante de TRX (BADALZADEH *et al.*, 2015; PANAT *et al.*, 2016; BADALZADEH *et al.*, 2017; XIN *et al.*, 2018).

O álcool ao estimular a produção de espécies reativas de oxigênio e instauração do estresse oxidativo desempenha um papel importante no aparecimento e desenvolvimento de lesões gástricas (SELMI *et al.*, 2017), bem como induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que por sua vez exacerba a resposta inflamatória aguda já instalada. Quando avaliamos a expressão do TNF- α , evidenciamos que o tratamento de lesões gástricas com TRX apresentou menor percentual de área de imunomarcção tecidual, ou seja, menor número de células imunomarcadas, para esta citocina. Um estudo realizado com o flavonoide *Bryophyllum pinnatum* reforça os achados de nossas análises e o potencial antiulcerogênico da troxerrutina (ARAÚJO *et al.*, 2021). Esses dados reforçam o efeito protetor do TRX no dano gástrico induzido pelo etanol. Aliado os achados anti-inflamatórios já relatados, evidenciou ainda no presente estudo que TRX

promoveu a diminuição da atividade de mieloperoxidase (MPO) e diminuiu a degranulação de mastócitos teciduais. Miranda *et al.* (2020), obteve dados semelhantes do efeito anti-inflamatório da TRX em modelos experimentais de inflamação na mucosite intestinal.

Os mastócitos são poderosos moduladores imunológicos do microambiente tecidual, onde contribuem para a homeostase gastrointestinal, seja pela proteção imunológica ou pela regulação da arquitetura e permeabilidade da barreira epitelial (HAMILTON *et al.*, 2014). Todavia, de forma paradoxal, a depender da natureza de seus receptores de superfície e dos mediadores secundários liberados de seus grânulos, os mastócitos podem ser agentes críticos na patogênese dos processos inflamatórios, devido à amplificação da resposta inflamatória, que se deve à liberação de mediadores inflamatórios contidos em seus grânulos (DE WINTER *et al.*, 2012; THEOHARIDES *et al.*, 2012). A TRX conseguiu reverter significativamente a mastocitose, o aumento do número de mastócitos, promovida pelo etanol, todavia, além de evitar a instauração da degranulação como visto no grupo tratado somente com etanol.

Corroborando, evidenciou-se que TRX diminuiu a atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) promovida pelo etanol. Sabendo que a liberação dos grânulos primários dos neutrófilos detentores de MPO é precedida pela ativação neutrofílica através de citocinas pro-inflamatórias (JOHNSON *et al.*, 2011), e que este evento desencadeará a liberação e ativação da enzima MPO, que culminarão na liberação de espécies reativas de oxigênio, ativação de citocinas inflamatórias, ao evidenciarmos diminuição da atividade de MPO (RYMASZEWSKI *et al.*, 2014), determinamos um importante mecanismo anti-inflamatório que TRX atua para prevenir a lesão gástrica induzida por etanol.

Além da potente atividade anti-inflamatória e antioxidante de TRX, diversos mecanismos de ação podem estar envolvidos neste efeito protetor da troxerrutina. Dessa forma, na tentativa de elucidar o mecanismo de ação do efeito protetor da troxerrutina nas lesões gástricas, descobrimos que o TRX parece atuar tanto na via do óxido nítrico (NO) quanto nas prostaglandinas (PGs), ambas fundamentais na proteção da mucosa gástrica. O NO é um importante agente de proteção e defesa gástrica, e encontra-se envolvido na modulação da secreção gástrica, fluxo sanguíneo da mucosa gástrica e adesão de neutrófilos (RIOS *et al.*, 2010). Para investigar o

envolvimento de TRX na via do NO, o inibidor da NO sintase (L-NAME) foi usado para avaliar o efeito protetor de TRX na lesão gástrica induzida por etanol. Observamos que o pré-tratamento com L-NAME interferiu na gastroproteção de TRX. O NO é um mediador gasoso, tem sido apontado como um mediador crucial na defesa da mucosa gastrointestinal (NISHIO *et al.*, 2006; WALLACE, 2019), sendo um dos principais agentes envolvidos na regulação do fluxo sanguíneo gástrico e da microcirculação gástrica, ambos, conhecidamente são fatores protetores essenciais para regulação da homeostase gastrintestinal (MOUSA *et al.*, 2019). A geração contínua de prostaglandinas (PGs) também representa um mecanismo crucial de proteção gástrica. As PGs presentes em todo o trato gastrointestinal desempenham um papel fundamental na manutenção da integridade da mucosa modulando várias funções do trato gastrointestinal (BRZOZOWSKI *et al.*, 2005; TAKEUCHI *et al.*, 2018). Ao avaliar o efeito da TRX nesta via, usamos misoprostol (MISO), um análogo de prostaglandina E1 (PGE1), e indometacina, um inibidor da síntese de PGs, que atua pelo bloqueio reversível da via mediada pelas ciclooxigenases (COX), demonstramos que o efeito gastroprotetor da TRX no dano gástrico induzido por etanol, possivelmente envolva atuação pela via das PGs, pelo fato que o efeito protetor da TRX na lesão gástrica diminui significativamente quando a indometacina foi administrada.

Além da eliminação de radicais livres, inibição do estresse oxidativo e quelação de metais pesados, os mecanismos de ação dos flavonoides, envolvem sua capacidade de interação com receptores de membrana, produtos gênicos visando a inibição de ações específicas e, dessa forma, inibição da quinases e modular diretamente uma resposta limitada. O flavonoide epigallocatequina-3-galato (EGCG), por exemplo, atua como ligante ao receptor EP1 (receptor de prostaglandina) ocupando os sítios de ligação do ATP (SAFE *et al.*, 2021). Todavia, os flavonoides podem aumentar, diminuir ou não afetar os níveis de enzima inflamatórias como a COX-2 (LÓPEZ-POSADAS *et al.*, 2010), e por consequência a interferir ou não na produção de PGs, a depender do flavonoide envolvido (HÄMÄLÄINEN *et al.*, 2011).

Diante disso, realizou-se a docagem molecular para avaliar a interação entre TRX e enzima iNOS. Como esperado, observou-se que TRX se liga com grande afinidade a sítios ativos para ligação existente na enzima iNOS. Docagens moleculares entre TRX e sítios ligantes de outras enzimas inflamatórias também foram evidenciados em MIRANDA *et al.* (2020). Assim como os demais flavonoides, as

atividades biológicas de TRX em patologias ulcerativas e inflamatórias como úlcera gástrica, encontram-se pautadas pela modulação das diversas fases dos processos inflamatórios (RIBEIRO *et al.*, 2015), desde a transcrição e expressão gênicas à inibição de atividade enzimática e eliminação de espécies reativas de oxigênio. Nossos resultados demonstram que a troxerrutina na dose 100mg/kg possui atividade gastroprotetora contra lesão gástrica induzida por álcool absoluto, e esta ação aparentemente envolve a participação do óxido nítrico e prostaglandinas, além de termos evidenciado o potencial efeito antioxidante da Troxerrutina.

Referências

ABDEL-RAHEEM, I. T. Gastroprotective effect of rutin against indomethacin-induced ulcers in rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**. Sep;107(3):742-50. 2010.

AHMAD, Bashir Ado *et al.* Reviews of herbal and their secondary metabolites in the treatment of ulcerative colitis and peptic ulcer. **Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol**, v. 4, n. 08, p. 080-090, 2014.

ARAÚJO ERD, GUERRA GCB, ANDRADE AWL, FERNANDES JM, DA SILVA VC, DE ARAGÃO TAVARES E, DE ARAÚJO AA, DE ARAÚJO JÚNIOR RF, ZUCOLOTTI SM. Gastric Ulcer **Healing Property of Bryophyllum pinnatum Leaf Extract in Chronic Model In Vivo and Gastroprotective Activity of Its Major Flavonoid**. *Front Pharmacol*. 2021 Dec 16; 12:744192. doi: 10.3389/fphar.2021.744192. PMID: 34975468; PMCID: PMC8717929.

AZARFARIN, M. *et al.* Effects of troxerutin on anxiety-and depressive-like behaviors induced by chronic mild stress in adult male rats. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, 2018.

BADALZADEH, R. *et al.* Beneficial effect of troxerutin on diabetes-induced vascular damages in rat aorta: histopathological alterations and antioxidation mechanism. **International journal of endocrinology and metabolism**, v. 13, n. 2, 2015.

BADALZADEH, Reza; CHODARI, Leila; GHORBANZADEH, Vajihe. Troxerutin, a bioflavonoid, improves oxidative stress in blood of streptozotocin-induced type-1 diabetic rats. **Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 75-86, 2017.

BALUCHNEJADMOJARAD, T. *et al.* Troxerutin exerts neuroprotection in 6-hydroxydopamine lesion rat model of Parkinson's disease: Possible involvement of PI3K/ER β signaling. **European journal of pharmacology**, v. 801, p. 72-78, 2017.

BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. Investig. Dermatol*. 1982, 78, 206–209.

BRZOZOWSKI, T. *et al.* **Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation.** *Journal of physiology and pharmacology*, v. 56, n. 5, p. 33-55, 2005.

CÂMARA NETO, J. F. *et al.* Gastroprotective effect of hydroalcoholic extract from *Agaricus blazei* Murill against ethanol-induced gastric ulcer in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 292, p. 115191, 2022.

COURBAT, P.; FAVRE, J.; GUERVEN, R.; UHLMANN, G. Contribution a L'edude D'unproduit de hidroxyethylationdurutoside Parte 1. **Helv. Chim. Acta** 1966, 49, 1203–1211.

COURBAT, P.; UHLMANN, G.; GUERVEN, R. Contribution a L'etude D'unProduit de hidroxyethylationdurutoside. Parte 2. **Helv. Chim. Acta** 1966, 49, 1420–1424.

DE MIRANDA, J. A. L. *et al.* Troxerutin prevents 5-fluorouracil induced morphological changes in the intestinal mucosa: role of cyclooxygenase-2 pathway. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 1, p. 10, 2020.

FAHMI, Abdelgawad A. *et al.* *Pulicaria crispa* mitigates gastric ulcer induced by ethanol in rats: role of treatment and auto healing. **Biomarkers**, v. 24, n. 3, p. 286-294, 2019.

GEETHA, R.; PRIYA, C. S.; ANURADHA, C. V. Troxerutin abrogates mitochondrial oxidative stress and myocardial apoptosis in mice fed calorie-rich diet. **Chemico-biological interactions**, v. 278, p. 74-83, 2017.

H.M. BERMAN, J. WESTBROOK, Z. FENG, G. GILLILAND, T.N. BHAT, H. WEISSIG, I.N. SHINDYALOV, P.E. BOURNE. (2000) The Protein Data Bank Nucleic Acids Research, 28: 235-242.

HÄMÄLÄINEN, Mari *et al.* Effects of flavonoids on prostaglandin E2 production and on COX-2 and mPGES-1 expressions in activated macrophages. *Planta Medica*, v. 77, n. 13, p. 1504-1511, 2011.

HIGUCHI, M. Antioxidant Properties of Wheat Bran against Oxidative Stress. In: *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health*. **Academic Press**, v. 13, n.7, p. 181-199, 2014.

JOHNSON, J. L. *et al.* Increased Survival and Reduced Neutrophil Infiltration of the Liver in Rab27a- but Not Munc13-4-Deficient Mice in Lipopolysaccharide-Induced Systemic Inflammation. **Infection and immunity**, v. 79, n. 9, p. 3607-18, 2011.

LAINÉ, L.; WEINSTEIN, W. M. Histology of alcoholic hemorrhagic “gastritis”: a prospective evaluation. **Gastroenterology**, v. 94, n. 6, p. 1254-1262, 1988.

LEE, J.H. *et al.* Prevention effects of ND-07, a novel drug candidate with a potente antioxidative action and anti-inflammatory action, in animal models of severe acute pancreatitis. **Eur. J. Pharmacol.** 687, 28–38, 2012.

LÓPEZ-POSADAS, R. *et al.* Flavonoids exert distinct modulatory actions on cyclooxygenase 2 and NF-κB in an intestinal epithelial cell line (IEC18). **British journal of pharmacology**, v. 160, n. 7, p. 1714-1726, 2010.

MICHALANY, J. **Técnica histológico los anatomia patológica:** Com instruções para o cirurgião, enfermeiro, citotécnico. 3 ed. São Paulo: Editora Michalany Ltda. 2008. P. 153-5.

- MINAIYAN, Mohsen *et al.* Evaluation of the effect of hydroalcoholic and flavonoid-enriched extracts of *Dracocephalum kotschyi* on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 2, p. 141, 2021.
- MONTEIRO, Carlos Eduardo S. *et al.* LASSBio-596 protects gastric mucosa against the development of ethanol-induced gastric lesions in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 863, p. 172662, 2019.
- MORRIS, G. M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. K.; GOODSELL, D. S.; OLSON, A. J.; *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. **J. Comput. Chem.** 2009, 30, 2785–2791.
- MOTA, K. S. L. *et al.* Flavonoids with gastroprotective activity. **Molecules**, v. 14, n. 3, p. 979-1012, 2009.
- MOUSA, Amria M. *et al.* Antiulcerogenic effect of *Cuphea ignea* extract against ethanol-induced gastric ulcer in rats. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 19, p. 1-13, 2019.
- MURI, E. M. F. *et al.* Pharmacology of vasoactive drugs. **Acta Fisiátrica**, v. 17, n. 1, p. 22-27, 2010.
- NGEOW, W. C. *et al.* Management of radiation therapy-induced mucositis in head and neck cancer patients. Part II: supportive treatments. **Oncology Reviews**, v. 2, n. 3, p. 164-182, 2008.
- NISHIO, Hikaru *et al.* Role of endogenous nitric oxide in mucosal defense of inflamed rat stomach following iodoacetamide treatment. **Life sciences**, v. 79, n. 16, p. 1523-1530, 2006.
- PANAT, Niranjan A. *et al.* Troxerutin, a plant flavonoid, protects cells against oxidative stress-induced cell death through radical scavenging mechanism. **Food chemistry**, v. 194, p. 32-45, 2016.
- RIBEIRO, Daniela *et al.* Proinflammatory pathways: the modulation by flavonoids. **Medicinal research reviews**, v. 35, n. 5, p. 877-936, 2015.
- RIOS, E.R.V. *et al.* Mechanisms involved in the gastroprotective activity of esculin on acute gastric lesions in mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, n. 1, p. 246-254, 2010.
- ROBERT, A., NEZAMIS, J.E., LANCASTER, C., HANCHAR, J., 1979. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. **Gastroenterology** 77, 433–443.
- ROCHA, J.A.; REGO, N.C.S.; CARVALHO, B.T.S.; SILVA, F.I.; SOUSA, J.A.; RAMOS, R.M. *et al.* Computational quantum chemistry, molecular docking, and ADMET predictions of imidazole alkaloids of *Pilocarpus microphyllus* with schistosomicidal properties. **Plos. One**. 2018, 13, e0198476.
- ROKAYA, M. B. *et al.* Traditional uses of medicinal plants in gastrointestinal disorders in Nepal. **Journal of ethnopharmacology**, v. 158, p. 221-229, 2014.

ROMULO, O. *et al.* Interaction of Drug Candidates with Various SARS-CoV-2 Receptors: An in-Silico Study to Combat COVID-19. **Journal of Proteome Research**, v.19, n. 11, p. 4567-4575. 2020.

RUBAB, FARYAL *et al.* Gastroprotective effects of Caragana ambigua stocks on ethanol-induced gastric ulcer in rats supported by LC–MS/MS characterization of formononetin and biochanin A. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 102, n. 15, p. 7030-7038, 2022.

RUIZ-CRUZ, S.; CHAPARRO-HERNÁNDEZ, S.C.; HERNÁNDEZ-RUIZ, K. L. *et al.* Flavonoids: Important Biocompounds. **Food: Flavonoids**, 2017.

RYMASZEWSKI, A. L. *et al.* The Role of Neutrophil Myeloperoxidase in Models of Lung Tumor Development. **Cancers**, v. 6, p. 1111-27, 2014.

SAFE, Stephen *et al.* Flavonoids: structure–function and mechanisms of action and opportunities for drug development. **Toxicological Research**, v. 37, p. 147-162, 2021.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, v. 25, n. 1, p. 192-205, 1968.

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

SHAMS, S. G. *et al.* Amelioration of ethanol-induced gastric ulcer in rats by quercetin: implication of Nrf2/HO1 and HMGB1/TLR4/NF- κ B pathways. **Heliyon**, v. 8, n. 10, p. e11159, 2022.

SHAN, Q. *et al.* Troxerutin Protects Kidney Tissue against BDE-47-Induced Inflammatory Damage through CXCR4-TXNIP/NLRP3 Signaling. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018.

TAKEUCHI, K.; AMAGASE, K. Roles of cyclooxygenase, prostaglandin E2 and EP receptors in mucosal protection and ulcer healing in the gastrointestinal tract. **Current pharmaceutical design**, v. 24, n. 18, p. 2002-2011, 2018.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **J. Comput. Chem.** 2009, 31, 455– 461.

WALLACE, John L. Nitric oxide in the gastrointestinal tract: opportunities for drug development. **British journal of pharmacology**, v. 176, n. 2, p. 147-154, 2019.

WOOLF A, REHMAN RB, ROSE R. **Gastric Ulcer**. 2022 Apr 19. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 30725813.

XIN, X. *et al.* Biocatalytic synthesis of acylated derivatives of troxerutin: their bioavailability and antioxidant properties in vitro. **Microbial cell factories**, v. 17, n. 1, p. 130, 2018.

4. CONCLUSÃO GERAL

Em resumo, os resultados do presente estudo demonstraram que a troxerrutina tem efeito gastroprotetor significativo em modelos de úlcera induzida por etanol, que podem ser mediados por óxido nítrico e prostaglandinas. Esses efeitos gastroprotetores foram confirmados por dados histopatológicos e imunohistoquímicos para TNF- α . Além disso, a substância possui propriedades antioxidantes, observadas pelo aumento do teor de GSH e pelo bloqueio da lipoperoxidação (MDA) e da produção de radicais livres. Estudos ainda são necessários para elucidar melhor o exato mecanismo de ação da troxerrutina, provavelmente a participação da via NO/PG também esteja envolvida em seu efeito gastroprotetor.

REFERÊNCIAS

- ABD-ALLA, H.I. *et al*/ Phytochemical composition, protective and therapeutic effect on gastric ulcer and α -amylase inhibitory activity of *Achillea biebersteinii* Afan. **Arch Pharm Res**, v. 39, p.10-20, 2016.
- ABDEL-RAHEEM, I. T. Gastroprotective effect of rutin against indomethacin-induced ulcers in rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v.107, n. 3, p. 742-50, 2010.
- AHMAD, B. A. *et al*. Reviews of herbal and their secondary metabolites in the treatment of ulcerative colitis and peptic ulcer. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 4, n. 08, p. 080-090, 2014.
- ALBAQAWI A.S.B. *et al*. Profile of peptic ulcer disease and its risk factors in Arar, Northern Saudi Arabia. **Electron Physician**, v. 9, n.9, p.5740–5745, 2017.
- ALLEN, A., FLEMSTRÖM G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **Am J Physiol Cell Physiol**, v.288, n.1, p1-19, 2005.
- AMIRSHAHROKHI, K.; KHALILI, A. R. Gastroprotective effect of 2-mercaptoethane sulfonate against acute gastric mucosal damage induced by ethanol. **International Immunopharmacology**, v. 34, p. 183–188, 2016.
- ARAÚJO, E. R. D. *et al*. Gastric Ulcer Healing Property of *Bryophyllum pinnatum* Leaf Extract in Chronic Model In Vivo and Gastroprotective Activity of Its Major Flavonoid. **Front Pharmacol**, v.16 n. 12, p. 1-12, 2021.
- ARUNACHALAM, K. *et al*. *Cochlospermum regium* (Mart. ex Schrank) Pilg.: evaluation of chemical profile, gastroprotective activity and mechanism of action of hydroethanolic extract of its xylopodium in acute and chronic experimental models. **Journal of ethnopharmacology**, v. 233, p.101-114, 2019.
- AVRAMIDOU, M. *et al*. Epidemiology of gastrointestinal symptoms in young and middle-aged Swiss adults: prevalences and comorbidities in a longitudinal population cohort over 28 years. **BMC gastroenterology**, v. 18, n. 1, p. 21, 2018.
- AZARFARIN, M. *et al*. Effects of troxerutin on anxiety-and depressive-like behaviors induced by chronic mild stress in adult male rats. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 21, n.8, p.781-786, 2018.
- BADALZADEH, R. *et al*. Beneficial effect of troxerutin on diabetes-induced vascular damages in rat aorta: histopathological alterations and antioxidation mechanism. **International journal of endocrinology and metabolism**, v. 13, n. 2, p. 1-12, 2015.
- BADALZADEH, Reza; CHODARI, Leila; GHORBANZADEH, Vajihe. Troxerutin, a bioflavonoid, improves oxidative stress in blood of streptozotocin-induced type-1 diabetic rats. **Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 75-86, 2017.
- BADALZADEH, Reza; CHODARI, Leila; GHORBANZADEH, Vajihe. Troxerutin, a bioflavonoid, improves oxidative stress in blood of streptozotocin-induced type-1 diabetic rats. **Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 75-86, 2017.

BALUCHNEJADMOJARAD, T. *et al.* Troxerutin exerts neuroprotection in 6-hydroxydopamine lesion rat model of Parkinson's disease: Possible involvement of PI3K/ER β signaling. **European journal of pharmacology**, v. 801, p. 72-78, 2017.

BARCHI, A. *et al.* **A non-invasive method for the diagnosis of upper GI diseases.** Acta Biomed. 2018 Dec 17;89(8-S):40-43.

BAYANDOR, P. *et al.* The effect of troxerutin on anxiety and depressive like behaviours in the offspring of high fat diet fed dams. **Archives of physiology and biochemistry**, v. 125, n. 2, p. 1-7, 2018.

BIANCHI, M. M.; CANAVESI, R.; APRILE, GROSA, G. G.; DEL GROSSO, E Troxerutin, a mixture of O hydroxyethyl derivatives of the natural flavonoid rutin: Chemical stability and analytical aspects. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 150, p. 248-257, 2018.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol**, v. 78, n. 3, p. 206-9, 1982.

BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J. Investig. Dermatol**, v.78, p. 206–209, 1982.

BRZozowski, T. *et al.* Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 56, n. 5, p. 33-55, 2005.

BRZozowski, T. *et al.* Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 56, n. 5, p. 33-55, 2005.

BUNNETT, N. W.; LINGAPPA, V.R. Doença gastrointestinal. In: McPhee, S. J.; Ganong, W. F. **Fisiopatologia da doença: uma introdução à Medicina Clínica**. 5. ed. Porto Alegre: AMGH, 2011.

BURDAN, F.; ROZYLO-KALINOWSKA, I.; SZUMILO, J. Anatomical classification of the shape and topography of the stomach. **Surg Radiol Anat**, v.34(2):171-178, 2012.

CALOU, I.B.F.; LIMA, L.A.R.; FERREIRA, J.A.N.; CERQUEIRA, G.S. A atividade gastroprotetora da *Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolium*. **Revista saúde e ciência On line**, v.3, n2, p.33-42, 2014.

CÂMARA NETO, J. F. *et al.* Gastroprotective effect of hydroalcoholic extract from *Agaricus blazei* Murill against ethanol-induced gastric ulcer in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 292, p. 115-191, 2022. LAINÉ, L.; WEINSTEIN, W. M. Histology of alcoholic hemorrhagic "gastritis": a prospective evaluation. **Gastroenterology**, v. 94, n. 6, p. 1254-1262, 1988.

CERQUEIRA, G. S. *et al.* Effects of hecogenin and its possible mechanism of action on experimental models of gastric ulcer in mice. **European journal of pharmacology**, v. 683, n. 1-3, p. 260-269, 2012.

CHANDRANATH, S. I.; BASTAKI, S. M. A.; SINGH, J. A. Comparative study on the activity of lansoprazole, omeprazole and PD-136450 on acidified ethanol and indomethacin-induced gastric lesions in the rat. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 29, n. 3, p. 173–180, 2002.

CHOI, S. R. *et al.* Role of heat shock proteins in gastric inflammation and ulcer healing. **J Physiol Pharmacol**, v.60, n.7, p.5-17, 2009

CORNICK S, Tawiah A, Chadee K. Roles, and regulation of the mucus barrier in the gut. **Tissue Barriers**, v.3; n.3, p. 1-2, 2015.

COURBAT, P. **Process for manufacturing o-beta-hydroxyethyl ethers of rutin. U.S. Patent** n. 3,516,984, 23 jun. 1970.

COURBAT, P.; FAVRE, J.; GUERVEN, R.; UHLMANN, G. Contribution a L'edude D'unproduit de hidroxyethylationdurutoside Parte 1. *Helv. Chim. Act*, v.49, p.1203–1211, 1966.

CURADO MP, de OLIVEIRA MM, DE ARAÚJO FAGUNDES M. Prevalence of Helicobacter pylori infection in Latin America and the Caribbean populations: A systematic review and meta-analysis. **Cancer Epidemio**, v.60, p.141-148, 2019.

CZIMMER J, Tache Y. Peripheral Corticotropin Releasing Factor Signaling Inhibits Gastric Emptying: Mechanisms of Action and Role in Stress-related Gastric Alterations of Motor Function. **Curr Pharm Des**, v. 23, n. 27, p. 4042-4047,2017.

DE MIRANDA, J. A. L. *et al.* Troxerutin prevents 5-fluorouracil induced morphological changes in the intestinal mucosa: role of cyclooxygenase-2 pathway. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 1, p. 10, 2020. DOI: 10.3390/ph13010010.

DE WINTER, B. Y. *et al.* Intestinal mast cells in gut inflammation and motility disturbances. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1822, p. 66–73, 2012.

DINIZ, P. B. F. Efeitos gastroprotetores do timol em úlceras agudas e crônicas em ratos: evidências do envolvimento das prostaglandinas, canais para potássio sensíveis a ATP. **Tese** (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Sergipe, 2016.

Engevik AC, Kaji I, Goldenring JR. The Physiology of the Gastric Parietal Cell. **Physiol Rev**, v.100, n. 2, p. 573-602, 2020.

ERDMAN, J. W. *et al.* Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop. **J Nutr**. v.137, p.718S-37S, 2007.

FABJAN, N. *et al.* Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn) as a source of dietary rutin and quercitrin. **J Agric Food Chem**, v.51, p.6452–5, 2003.

FAHMI, A. *et al.* Pulicaria crispa mitigates gastric ulcer induced by ethanol in rats: role of treatment and auto healing. **Biomarkers**, v. 24, n. 3, p. 286-294, 2019.

FORSSELL, H. *et al.* Gastric mucosal defence mechanisms: a brief review. **Scand J Gastroenterol Suppl**, v.2; p.155:23-8, 1988

FOX, R. K.; MUNIRAJ, T. Pharmacologic Therapies in Gastrointestinal Diseases. **Med. Clin. Of North America**, v. 100, p.827-850, 2016.

GAO Z, Ma X, Liu J, Ge Y, Wang L, Fu P, Liu Z, Yao R, Yan X. Troxerutin protects against DHT-induced polycystic ovary syndrome in rats. **J Ovarian Res**, v.13, n.1, p.106- 110, 2020. doi: 10.1186/s13048-020-00701-z.

GAO, H. *et al.* Comparison of efficacy of pharmacological therapies for gastric endoscopic submucosal dissection-induced ulcers: a systematic review and network meta-analysis, **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 3, p. 207-220, 2020.

GEETHA, R.; PRIYA, C. S.; ANURADHA, C. V. Troxerutin abrogates mitochondrial oxidative stress and myocardial apoptosis in mice fed calorie-rich diet. **Chemico-biological interactions**, v. 278, p. 74-83, 2017.

GHOSH D, Dey SK, Saha C. Antagonistic effects of black tea against gamma radiation-induced oxidative damage to normal lymphocytes in comparison with cancerous K562 cells. **Radiat Environ Biophys**, v.53, n.4, p. 695-704, 2014.

GOETZ, M.T.; MISIEWICZ, J.J. Gastric acid secretion: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Journal of Physiology**, v.3, n.3, p. 12-16, 2019.

GRAHAM, D. Y. History of *Helicobacter pylori*, Duodenal Ulcer, Gastric Ulcer and Gastric Cancer. **World J. Gastroenterol**, v.20, p.5191–5204, 2014.

GRAHAM, D.Y.; LU, H.; DORE, M.P. Relative potency of proton-pump inhibitors, *Helicobacter pylori* therapy cure rates, and meaning of double-dose PPI. **Helicobacter**, v.24, n.1, p.54-58, 2019.

GUI, Y. *et al.* Involvement of AMPK/SIRT1 pathway in anti-allodynic effect of troxerutin in CCI-induced neuropathic pain. **European journal of pharmacology**, v. 769, p. 234-241, 2015.

HÄMÄLÄINEN, M. *et al.* Effects of flavonoids on prostaglandin E2 production and on COX-2 and mPGES-1 expressions in activated macrophages. **Planta Medica**, v. 77, n. 13, p. 1504-1511, 2011. DOI: 10.1055/s-0030-1270762.

HAMILTON, M. J. *et al.* The Multifaceted Mast Cell in Inflammatory Bowel Disease. **Inflamm Bowel Dis**, v. 20, n. 12, p. 2364–2378, 2014.

HARDY K. Paleomedicine and the use of plant secondary compounds in the Paleolithic and Early Neolithic. **Evol. Anthropol**, v. 28, p.60–71, 2019.

HIGUCHI, M. Antioxidant Properties of Wheat Bran against Oxidative Stress. In: *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health*. 2014. p. 181-199.

HILL DB, Button B, Rubinstein M, Boucher RC. **Physiology and pathophysiology of human airway mucus**. **Physiol Rev**. 2022 Oct 1;102(4):1757-1836. doi: 10.1152/physrev.00004.2021. Epub 2022 Jan 10. PMID: 35001665; PMCID: PMC9665957.

HOLZER, P. in **Physiology of the Gastrointestinal Tract** (Fifth Edition) 817-845 (Elsevier, 2012).

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

JACQUES, F. **Process of preparation of a tri-(hydroxyethyl) ether of rutin**. U.S. Patent n. 2,975,168, 14 mar. 1961.

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

JOHNSON, J. L. *et al.* Increased Survival and Reduced Neutrophil Infiltration of the Liver in Rab27a- but Not Munc13-4-Deficient Mice in Lipopolysaccharide-Induced Systemic Inflammation. **Infection and immunity**, v. 79, n. 9, p. 3607-18, 2011. DOI: 10.1128/IAI.05043-11.

JOSE, J. *et al.* A comparative evaluation of anticancer activities of flavonoids isolated from Mimosa pudica, Aloe vera and Phyllanthus niruri against human breast carcinoma cell line (MCF-7) using MTT assay. **Int J Pharm Pharm Sci**, v.6, n. 2, p. 319-22, 2014.

KARAMPOUR, N. *et al.* Gastroprotective Effect of Zingerone on Ethanol-Induced Gastric Ulcers in Rats. **Medicina (Kaunas)**, v.55, n.3, p.64-67, 2019.

KHAYYAL MT, Seif El-Naser MA, El-Gazaly MA, Okpanyi SN, Kelber O and Weiser D: **Mechanism involved in the gastroprotective effect of STW5 (Iberogast s) its components against ulcers and rebound acidity.** **Phytomed**, v. 1, n.2, p.56-66, 2006.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. **Gastroenterology**, v.135, n.1, p. 41-60, 2008.

LEE, J.H. *et al.* Prevention effects of ND-07, a novel drug candidate with a potente antioxidative action and anti-inflammatory action, in animal models of severe acute pancreatitis. **Eur. J. Pharmacol**, v.687, p. 28–38, 2012.

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

LIM, K. M.; AN, S.; LEE, O. K.; LEE, M. J.; LEE, J. P.; LEE, K. S.; BAE, S. Analysis of changes in microRNA expression profiles in response to the troxerutin-mediated antioxidante effect in human dermal papilla cells. **Molecular medicine reports**, v. 12, n. 2, p. 2650-2660, 2015.

LÓPEZ-POSADAS, R. *et al.* Flavonoids exert distinct modulatory actions on cyclooxygenase 2 and NF-κB in an intestinal epithelial cell line (IEC18). **British journal of pharmacology**, v. 160, n. 7, p. 1714-1726, 2010. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.00827. x.

MAHOMOODALLY M, F.; GURIB-FAKIM, A.; SUBRATTY, A. H. Antimicrobial activities and phytochemical profiles of endemic medicinal plants of Mauritius. **Pharm Biol**, v.43, n.3, p.237-42, 2005.

MALEKI, F. *et al.* Bacterial Heat Shock Protein Activity. **J Clin Diagn Res**, v. 10, n. 3, p.1-3, 2016

MARTINSEN, T.C.; FOSSMARK, R.; WALDUM, H.L. The Phylogeny and Biological Function of Gastric Juice-Microbiological Consequences of Removing Gastric Acid. **J Mol Sci**, v. 20, n. 23, p. 31-36, 2019.

MATHESIUS U. Flavonoid Functions in Plants and Their Interactions with Other; Organisms. **Plants**, v. 7, n.30, p. 7-14, 2018.

MICHALANY, J. **Técnica histológico los anatomia patológica: Com instruções para o cirurgião, enfermeiro, citotécnico.** 3 ed. São Paulo: Editora Michalany Ltda. 2008. P. 153-5.

MIHARA, M.; UCHYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal. Biochem**, v. 86, p. 271-278, 1978.

MINAIYAN, Mohsen *et al.* Evaluation of the effect of hydroalcoholic and flavonoid-enriched extracts of *Dracocephalum kotschy* on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 2, p. 141, 2021.

MIRANDA, J. A. L. *et al.* Troxerutin prevents 5-fluorouracil induced morphological changes in the intestinal mucosa: Role of cyclooxygenase-2 pathway. **Pharmaceuticals**, v.13, n.1, p. 1- 21, 2020.

MONTEIRO, C. E. S. *et al.* LASSBio-596 protects gastric mucosa against the development of ethanol-induced gastric lesions in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 863, p. 172662, 2019. DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.172662.

MORRIS, G. M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. K.; GOODSELL, D. S.; OLSON, A. J.; *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. **J. Comput. Chem**, v.30, p. 2785–2791, 2009.

MOTA, K. S. L. *et al.* Flavonoids with gastroprotective activity. **Molecules**, v. 14, n. 3, p. 979-1012, 2009. DOI: 10.3390/molecules14030979.

MOTAWI, T.K.*et al.* Protective and therapeutic effects of *Argyrea speciosa* against ethanol induced gastric ulcer in rats. **Zeit Naturforsch**, v.67, p. 47-57, 2012.

MOUSA, A. M. *et al.* Antiulcerogenic effect of *Cuphea ignea* extract against ethanol-induced gastric ulcer in rats. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 19, p. 1-13, 2019. DOI: 10.1186/s12906-019-2760-9.

MURI, E. M. F. *et al.* Pharmacology of vasoactive drugs. **Acta Fisiátrica**, v. 17, n. 1, p. 22-27, 2010.

NETTER: F. H. **Atlas De Anatomia Humana**. 5 ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2011.

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

NGEOW, W. C. *et al.* Management of radiation therapy-induced mucositis in head and neck cancer patients. Part II: supportive treatments. **Oncology Reviews**, v. 2, n. 3, p. 164-182, 2008. DOI 10.1007/s12156-008-0072-2.

NISHIO, Hikaru *et al.* Role of endogenous nitric oxide in mucosal defense of inflamed rat stomach following iodoacetamide treatment. **Life sciences**, v. 79, n. 16, p. 1523-1530, 2006. DOI: 10.1016/j.lfs.2006.04.013.

PANAT, Niranjan A. *et al.* Troxerutin, a plant flavonoid, protects cells against oxidative stress-induced cell death through radical scavenging mechanism. **Food chemistry**, v. 194, p. 32-45, 2016. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.07.078.

PANCHE A.N., Diwan A.D., Chandra S.R. **Flavonoids: An overview**. *J. Nutr Sci*, v. 6, n.1, p.1-12, 2016. doi: 10.1017/jns.2016.41.

PEMBERTON J.H. The Stomach. **Shires in Gastrointestinal and Liver Disease**, 2018.

RIBEIRO, Daniela *et al.* Proinflammatory pathways: the modulation by flavonoids. *Medicinal research reviews*, v. 35, n. 5, p. 877-936, 2015. DOI: 10.1002/med.21347.

RIOS, E. R. V. *et al.* Mechanisms involved in the gastroprotective activity of esculin on acute gastric lesions in mice. *Chemico-Biological Interactions*, v. 188, n. 1, p. 246-254, 2010. DOI: 10.1016/j.cbi.2010.07.020.

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

ROCHA, J.A. *et al.* Computational quantum chemistry, molecular docking, and ADMET predictions of imidazole alkaloids of *Pilocarpus microphyllus* with schistosomicidal properties. **Plos. One**, v.13, 2018.

ROKAYA, M. B. *et al.* Traditional uses of medicinal plants in gastrointestinal disorders in Nepal. **Journal of ethnopharmacology**, v. 158, p. 221-229, 2014. DOI: 10.1016/j.jep.2014.10.014.

ROMULO, O. **et al.** Interaction of Drug Candidates with Various SARS-CoV-2 Receptors: An in Silico Study to Combat COVID-19. **Journal of Proteome Research**, v.19, n.11, p. 4567-4575, 2020. DOI: 10.1021/acs.jproteome.0c00327

RUBAB, FARYAL *et al.* Gastroprotective effects of *Caragana ambigua* stocks on ethanol-induced gastric ulcer in rats supported by LC–MS/MS characterization of formononetin and biochanin A. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 102, n. 15, p. 7030-7038, 2022. DOI: 10.1002/jsfa.12064.

RUIZ-CRUZ, S. *et al.* Flavonoids: Important Biocompounds. **Food: Flavonoids**, IntechOpen, 2017.

RYMASZEWSKI, A. L. *et al.* The Role of Neutrophil Myeloperoxidase in Models of Lung Tumor Development. *Cancers*, v. 6, p. 1111-27, 2014. DOI: 10.3390/cancers6021111.

Sáenz JB, Mills JC. Acid and the basis for cellular plasticity and reprogramming in gastric repair and cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018 May;15(5):257-273. doi: 10.1038/nrgastro.2018.5. Epub 2018 Feb 21. PMID: 29463907; PMCID: PMC6016373.

SAFE, Stephen *et al.* Flavonoids: structure–function and mechanisms of action and opportunities for drug development. *Toxicological Research*, v. 37, p. 147-162, 2021. DOI: 10.1007/s43188-020-00080-z.

Scalbert A, Williamson G. **Dietary intake, and bioavailability of polyphenols**. *J Nutr*. 2000;130(8S Suppl):2073S-85S.

SCALLON, C.; BELL-SYER, S. E. M; AZIZ, Z. Flavonoids for treating venous leg ulcers. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 5, 2013.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*, v. 25, n. 1, p. 192-205, 1968. DOI: 10.1016/0003-2697(68)90092-4.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, v. 25, n. 1, p. 192-205, 1968.

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

SHAMS, Shams Gamal Eldin; EISSA, Rana G. Amelioration of ethanol-induced gastric ulcer in rats by quercetin: implication of Nrf2/HO1 and HMGB1/TLR4/NF- κ B pathways. *Heliyon*, v. 8, n. 10, p. e11159, 2022. DOI: 10.1016/j.heliyon. 2022.e11159.

SHAN, Q. *et al.* Troxerutin Protects Kidney Tissue against BDE-47-Induced Inflammatory Damage through CXCR4-TXNIP/NLRP3 Signaling. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018.

TAKEUCHI, K.; AMAGASE, K. Roles of cyclooxygenase, prostaglandin E2 and EP receptors in mucosal protection and ulcer healing in the gastrointestinal tract. **Current pharmaceutical design**, v. 24, n. 18, p. 2002-2011, 2018. DOI: 10.2174/1381612824666180629111227.

TAKEUCHI, K.; AMAGASE, K. Roles of cyclooxygenase, prostaglandin E2 and EP receptors in mucosal protection and ulcer healing in the gastrointestinal tract. **Current pharmaceutical design**, v. 24, n. 18, p. 2002-2011, 2018.

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

THEOHARIDES, T. C. *et al.* Mast cells and inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1822, p. 21–33, 2012.

TORTORA, Gerard. J.; DERRICKSON, Bryan. **Princípios de Anatomia e fisiologia**. 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016

TOURANI, Mehdi *et al.* Association of TNF- α but not IL-1 β levels with the presence of *Helicobacter pylori* infection increased the risk of peptic ulcer development. **Cytokine**, v. 110, p.232-236, 2018.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, eficiente optimization, and multithreading. **J. Comput. Chem**, v.31, p. 455– 461, 2009.

TUSKEY, A.; PEURA, D. The use of H2 antagonists in treating and preventing NSAID-induced mucosal damage. **Arth. Resch. & Therapy**, v. 15, n. 2, p. 1-15, 2013.

WALI, R. *et al.* Ethnomedicinal appraisal of plants used for the treatment of gastrointestinal complaints by tribal communities living in Diamir district, Western Himalayas, Pakistan. **PLoS ONE**, v.17, n. 6, p. 1-12, 2022.

WALLACE, J. L. Nitric oxide in the gastrointestinal tract: opportunities for drug development. **British journal of pharmacology**, v. 176, n. 2, p. 147-154, 2019. DOI: 10.1111/bph.14527.

- WAN, C., CHEN, Y., GAO, L. *et al.* Development and validation of the peptic ulcer scale under the system of quality-of-life instruments for chronic diseases based on classical test theory and generalizability theory. **BMC Gastroenterol**, v. 20, n. 1, p.422-429, 2020
- WANG, M. *et al.* Quantification of protodioscin and rutin in asparagus shoots by LC/MS and HPLC methods. **J Agric Food Chem**, v.51, p. 6132–6, 2003.
- WANG, X. *et al.* Troxerutin Improves Dextran Sulfate Sodium-Induced Ulcerative Colitis in Mice. **J Agric Food Chem**, v.69, n.9, p. 2729-2744, 2021. doi: 10.1021/acs.jafc.0c06755. Epub 2021 Feb 23. PMID: 33621077.
- WILLIAMSON, G. Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? **Br J Nutr**, v.104, n. 3, p.S48-66, 2010.
- WISNUWARDANI, R. W. *et al.* Polyphenol intake and metabolic syndrome risk in European adolescents: the HELENA study. **Eur J Nutr**, v.59, n. 2, p. 801-812, 2020
- WOOLF A, REHMAN RB, ROSE R. Gastric Ulcer. 2022 Apr 19. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 30725813.
- Woolf A, Rehman RB, Rose R. **Gastric Ulcer**. 2022 Apr 19. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 30725813.
- WU, X. *et al.* Antioxidative and Anti-Inflammatory Effects of Water Extract of *Acrostichum aureum* Linn. against Ethanol-Induced Gastric Ulcer in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, 2018.
- XIN, X. *et al.* Biocatalytic synthesis of acylated derivatives of troxerutin: their bioavailability and antioxidant properties in vitro. **Microbial cell factories**, v. 17, n. 1, p. 130, 2018. DOI: 10.1186/s12934-018-0976-x.
- XIN, X. *et al.* Biocatalytic synthesis of acylated derivatives of troxerutin: their bioavailability and antioxidant properties in vitro. **Microbial cell factories**, v. 17, n. 1, p. 130, 2018.
- XU, G. Y.; TANG, X. J. Troxerutin (TXN) potentiated 5-Fluorouracil (5-Fu) treatment of human gastric cancer through suppressing STAT3/NF- κ B and Bcl-2 signaling pathways. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 95-107, 2017.
- YANDRAPU H, SAROSIEK J. Protective Factors of the Gastric and Duodenal Mucosa: An Overview. **Curr Gastroenterol Rep**, v.17, n.6, p. 24-34, 2015.
- YARIBEYGI, H. Protective effects of plant-derived natural products on renal complications. **J Cell Physiol**, v. 234, n.8, p.12161-72, 2019.
- ZHANG, W. *et al.* Preventative and Therapeutic Potential of Flavonoids in Peptic Ulcers. **Molecules**, v.11, n.25, p.26- 36, 2020.
- ZHAO, Z. *et al.* Effect and mechanism of evodiamine against ethanol-induced gastric ulcer in mice by suppressing Rho/NF- κ B pathway. **International immunopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 588-595, 2015.
- ZOU, Y. *et al.* Protective effect of against ethanol-induced gastric ulcer and its mechanism. **Med JZU**, v.50, n. 5, p. 561-567, 2020

APÊNDICE A- COMPROVAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

European Journal of Pharmacology

Potential anti-ulcerogenic effect of troloxutin in ethanol-induced gastric lesions in mice: anti-inflammatory and antioxidant mechanisms and possible action pathways

–Manuscript Draft–

Manuscript Number:	EJP-64789
Article Type:	Research Paper
Section/Category:	Pulmonary, gastrointestinal and urogenital pharmacology
Keywords:	Flavonoid; Gastroprotection; Inflammation; Gastritis
Corresponding Author:	João Antônio Leal De Miranda BRAZIL
First Author:	Francisco Rafael Oliveira da Silva, Student of Doctor
Order of Authors:	Francisco Rafael Oliveira da Silva, Student of Doctor Conceição da Silva Martins Paulo Victor de Souza Pimental João Francisco Câmara Neto Matheus da Silva Campelo Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro Nágila Maria Pontes Silva Ricardo Ícaro Guamão Pinto Vieira Carlos Eduardo Silva Monteiro Pedro Marzco Gomes Soares Maria Luana Gaudêncio dos Santos Morais Cassio Silva Souza Jefferson Almeida Rocha Gilberto Santos Cerqueira Gerly Anna de Castro Brito João Antônio Leal De Miranda Francisca Cléia Lourenço de Sousa
Abstract:	Gastric ulcer represents an ulcerative and inflammatory gastrointestinal disorder that is a serious worldwide public health problem. The emergence of this condition is the result of an imbalance between aggressive and protective agents of the gastric mucosa, among them the exacerbation of alcohol consumption. Flavonoids such as troloxutin (TRX) are noteworthy in the pharmacological field for their antioxidant, anti-inflammatory, and cytoprotective properties. The present study aimed to determine the gastroprotective effect of TRX on ethanol-induced gastric ulcer in mice and its role in the action pathways of nitric oxide (NO), prostaglandins (PGs), as well as antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. After inducing gastric lesions with ethanol (0.2 mL, p.o.), treatment was performed with TRX (10 and 100 mg/kg, p.o), N-acetylcysteine, L-Arginine, L-NAME [N(G)-nitro-L-arginine], indomethacin, and Misoprostol (MISO). To determine the gastroprotective effect of TRX on gastric lesions, the following evaluations were used: percentage of ulcerated area, histopathological analysis, measurement of glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO), immunohistochemistry for TNF- α and iNOS, and molecular assessment. It was evidenced that TRX has a gastroprotective effect at 100mg/kg, and the possible mechanisms of action involved for this protective effect were determined.

ANEXO A - Certificado de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFC.



**UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ**

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA E MECANISMO DE AÇÃO DA TROXERRUTINA: UM FLAVONOÍDE SEMISSINTÉTICO DA RUTINA", protocolada sob o CEUA nº 2349251021 (ID 002074), sob a responsabilidade de **Francisca Cléa Florenço de Sousa e equipe; Francisco Rafael Oliveira da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 20/01/2022.

We certify that the proposal "ANTIULCEROGENIC ACTIVITY AND MECHANISM OF ACTION OF TROXERUTIN: A SEMIS-SYNTHETIC FLAVONOID OF RUTIN", utilizing 48 Heterogenics mice (48 males), protocol number CEUA 2349251021 (ID 002074), under the responsibility of **Francisca Cléa Florenço de Sousa and team; Francisco Rafael Oliveira da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 01/20/2022.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [02/2022](#) a [12/2022](#)

Área: [Departamento de Fisiologia E Farmacologia](#)

Origem: [Biotério Central da UFC](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [3 a 5 semanas](#)

N: [48](#)

Linhagem: [Swiss](#)

Peso: [25 a 35 g](#)

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

Fortaleza, 20 de janeiro de 2022

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

Prof. Dra. Karuza Maria Alves Pereira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará