



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
NÚCLEO DE PESQUISAS EM PLANTAS MEDICINAIS

JOSELMA SOUSA LACERDA LOPES

ATIVIDADE GASTROPROTETORA E PERFIL TOXICOLÓGICO AGUDO
DE *Tocoyena hispidula* Standl. EM ROEDORES

TERESINA – PI

2019

JOSELMA SOUSA LACERDA LOPES

**ATIVIDADE GASTROPROTETORA E PERFIL TOXICOLÓGICO AGUDO
DE *Tocoyena hispidula* Standl. EM ROEDORES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde/Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. RITA DE CASSIA MENESES OLIVEIRA

TERESINA – PI

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal do Piauí

Biblioteca Setorial do CCS

Serviço de Processamento Técnico

L864a Lopes, Joselma Sousa Lacerda.
Atividade gastroprotetora e perfil toxicológico agudo de *Tocoyena hispidula* Standl. em roedores / Joselma Sousa Lacerda Lopes. – 2019.
97 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, 2019.

Orientação: Profa. Dra. Rita de Cassia Meneses Oliveira.

Bibliografia

1. Toxicidade. 2. Úlcera. 3. Gastroproteção. 4. Cicatrização. 5. *Tocoyena hispidula* Standl. I. Título.

CDD 615.32

JOSELMA SOUSA LACERDA LOPES

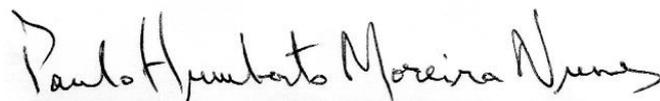
**ATIVIDADE GASTROPROTETORA E PERFIL TOXICOLÓGICO AGUDO
DE *Tocoyena hispidula* Standl. EM ROEDORES**

Data: 13 de maio de 2019

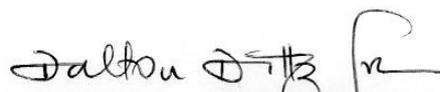
BANCA EXAMINADORA



Prof.^ª. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira
Universidade Federal do Piauí – UFPI (Presidente)



Prof. Dr. Paulo Humberto Moreira Nunes
Universidade Federal do Piauí – UFPI



Prof. Dr. Dalton Dittz Júnior
Universidade Federal do Piauí – UFPI

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por estar sempre comigo, sendo meu refúgio e fortaleza, transmitindo-me a segurança necessária para seguir em frente. A Ele minha vida e meu futuro.

À Universidade Federal do Piauí pelo apoio científico, através do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

À minha orientadora, Prof^ª. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira, exemplo de professora e pessoa, obrigada pela paciência, tolerância, preocupação, carinho e compreensão. Obrigada por ser essa mãezona científica de todos nós e pela amizade.

A todos os professores do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais (NPPM) pela transmissão de seus conhecimentos que tanto contribui para o meu amadurecimento pessoal e científico.

Aos meus pais, José Soares Lacerda e Antonia Valdeilza Sousa Lacerda, obrigada por todo carinho e amor, pelo exemplo de vida que foi fundamental na formação do meu caráter, por todas as orações, promessas e toda a força inesgotável nos momentos difíceis. São minha base forte, quando em minha mente vem o sentimento de paz e tranquilidade dentro de um abraço acolhedor, são deles que lembro, são eles o meu sinônimo de amor na terra. A vocês minha eterna gratidão e amor.

Ao meu marido Luís Eduardo Soares Lopes, meu companheiro e amigo de todas as horas, que sempre me incentiva a crescer. Obrigada por me apoiar nas horas árduas, me escutar, me entender e me aturar em dias difíceis, por me fazer feliz. Te amo.

Ao meu Filho José Santiago Lacerda Lopes, meu presente de Deus, só quem é mãe sabe o tamanho do amor que se carrega no peito por uma pessoa, é amor sem limite, não existe algo melhor no mundo do que um abraço bem forte das mãozinhas pequenas e delicadas desse príncipe lindo da mamãe dizendo: EU TE AMO MAMÃE! Principalmente depois de um dia exaustivo de protocolo que deu errado (rsrsrs), não tem incentivo maior que esse para conseguir ultrapassar as barreiras que a vida lhe impõe.

A minha maninha querida, Joelma Lacerda de Sousa que mesmo na correria do dia-a-dia, sempre lembra de mandar um oi, dizer que está ali para o que precisar, minha amiga fiel, maninha superprotetora, que eu amo muito. E ao meu cunhadinho/ compadre Gutemberg Passos

de Sousa, quem me inspirou a seguir a carreira de farmacêutica e está sempre na torcida por mim, ajudando e incentivando a progredir.

A minha sogra Sandra Maria Soares Lopes, ao meu sogro Clóvis Lopes da Silva, e as minhas cunhadas Ana Raquel Soares Lopes e Larissa Jordana Soares Lopes que sem nenhuma obrigação para comigo, me acolheram em sua casa e me tiveram como família desde então, obrigado por todo o apoio e ajuda.

A minha querida turma 2017/2018, todos compartilhando o mesmo sentimento de riso ou choro que gerava longas conversas no grupo do Whatssap, Lorena Braz de Oliveira, revoltada em um dia e no outro postando foto na balada (rsrsrs), geralmente acompanha de Lucas Solyano Almeida de Oliveira, que cheio das tarefas fora do mestrado, sempre dava um jeito de está presente em todas as aulas (ninja CDF), José Vitor Menezes Lacerda, marcado por seus gifs da Gretchen que sempre leva a turma a várias gargalhadas independente de quão grave for a discussão em questão, e sempre coladinho de Monique Luana Frazão Ramos, a menina que sempre formava dupla comigo quando era sorteio kkkkk. Rodolfo Richelle Lima dos Santos, sempre muito nobre e cavalheiro, um verdadeiro lorde, Jéssica Vanessa dos Santos Lindoso, sempre preocupada com suas ratinhas diabéticas, Mariana Sousa Silva, a buchudinha da turma. Suylane Sobral De Sousa, colega de laboratório, Mickael Laudrup de Sousa Cavalcante, salvou-me várias vezes nos momentos de aperreio, seja por falta de material ou por falta de mão de obra, sempre presente para ajudar no que precisar, Lorranya Éveli Pereira Feitosa Araújo, tem um radar que detecta aonde você está precisando de ajuda e já vem com a solução daquilo que está a seu alcance, foi minha amiga de laboratório é minha amiga para vida. Flaviano Ribeiro Pinheiro Neto, a quem estou sempre aperreando por algo rsrsrs. Dessa turma vai um carinho todo especial ao meu querido grupo Gastrobianos: Isabela Ribeiro De Sá G. Nolêto, a menina da enfermagem que tinha feito o PET-Saúde comigo na graduação e tinha me dado, sem saber, a resposta de uma das questões da prova do mestrado, no dia da prova, 5 minutos antes de começar, eternamente grata, me identifiquei de cara, nem sabia se ia formar grupo no mestrado, mas sabia que queria ficar no grupo dela, então já coleí desde o primeiro dia (rsrsrs). Raí Emanuel da Silva e Ingredy Lopes Dos Santos, biomédicos inseparáveis, ele todo certinho e detalhista e ela mais despojada e com uma alegria estonteante, não deu outra, quarteto que deu certo. Tenho certeza que minha turma não poderia ser melhor, tenho um carinho muito especial por todos vocês.

Aos meus queridos colegas de laboratório: Ruan Pablo Nunes Araújo, Douglas Soares da Costa, Valdelânia Gomes da Silva, Josyane Araújo Neves, Tayane Izabely Nunes Da Silva,

Woodyson Welson Barros da Silva Batista, Maisa Campelo de Sousa, Daniel Barbosa Nunes, Aline Jeane Costa Sousa, Eduarda Pereira da Silva, Polyanna dos Santos Negreiros e Ian Jhemes Oliveira Sousa, por estarem presentes durante os protocolos, me auxiliando sempre que possível, uma equipe que trabalha divinamente bem, o que seria de mim sem vocês? Sempre tornando os dias exaustivos de protocolos em dias alegres de sorrisos com brincadeiras e piadas internas, mas sempre com muita responsabilidade no experimento.

Agradeço ainda a Prof^a. Dra Ana Flávia Seraine Custódio Viana e ao Prof. Dr. Hélio de Barros Fernandes, que disponibilizaram parte de seu tempo para se dedicar a me auxiliar e ensinar a realizar alguns protocolos, e um agradecimento especial a Prof^a. Dra Francilene Vieira da Silva Freitas, por ter disponibilizado muito do seu tempo (que é bastante ocupado) pra me ensinar e fazer comigo a maioria dos protocolos, sempre disponível para tirar minhas dúvidas, me ouvir e tentar me fazer entender certos pontos.

Aos colegas dos outros laboratórios que foram indispensáveis nessa caminhada: Everton Moraes Lopes, Antonio Carlos Dos Reis Filho (LAFDOR), Julianne Viana Freire Portela, Alessandra Maria Braga Ribeiro (LAFAC), Benedito Pereira de Sousa Neto (Laboratório de inflamação), Ana Patrícia de Oliveira e André Luiz Fernandes Lopes (LAFDIG), e Sérgio Paulo Lima Guerra (Hematologia e Embriologia) que abriram as portas de seus laboratórios para que eu pudesse realizar protocolos que só foram possíveis com a ajuda deles, além das informações indispensáveis para a realização de outros protocolos.

Aos funcionários do Biotério: Daniel Roseno dos Santos, Kalina Alves da paz, Carlos Alberto de Deus e todos os demais que me ensinaram, auxiliaram a ajudaram na árdua tarefa que é cuidar do bem está dos animais.

Ao Jose Luis Albuquerque Borges e a Patrícia Portela da Costa que estão sempre pelo núcleo ajudando no que lhes é cabível.

A minha Banca de qualificação: Prof. Dr. Paulo Humberto Moreira Nunes e Prof^a. Dra Francilene Vieira da Silva Freitas, pela dedicação em avaliar minha parte escrita e pelas importantíssimas considerações.

A todos que ajudaram direto ou indiretamente para que isso se tornasse possível e torceram por mim para que eu pudesse chegar até aqui. Meu muito obrigada!.

“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado, é alguém que acredita que ele possa ser realizado”.

Roberto Shinyashiki

Atividade gastroprotetora e perfil toxicológico agudo de *Tocoyena hispidula* Standl. em roedores. LOPES, J.S.L. Pós-Graduação em Farmacologia. Dissertação de mestrado, NPPM/CCS/UFPI (2019).

RESUMO

A úlcera gástrica é um dos principais distúrbios gastrintestinais, sendo considerada uma doença comum que afeta mais de 10% da população mundial, com incidência e prevalência crescente e altas taxas de morbidade e mortalidade. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, foram relatadas 11.532 internações em 2018, relacionadas a presença de úlceras gástricas e duodenais, com taxa de mortalidade de 9,86%. *Tocoyena hispidula* Standl., conhecida popularmente como flor-do-cerrado, angeliquinha, angelca ou jenipapinho é um subarbusto usado popularmente como terapia medicinal para dor de barriga (chá preparado por infusão) e inflamação no útero (garrafada). Já foram identificados em sua composição compostos como cumarinas, triterpenóides e iridoídes que podem ter importante ação anti-inflamatória, antiulcerogênica e antioxidante. Esse estudo objetivou investigar a atividade gastroprotetora do extrato etanólico do caule de *Tocoyena hispidula* Standl. (Th-EtOHcc) e sua fração metanólica Th-MeOHcc (na melhor dose do extrato) em modelos de lesões gástricas em ratas ou camundongos. Possíveis mecanismos de ação bem como os sinais de toxicidade durante o acompanhamento dos animais (machos ou fêmeas) tratados por via oral com dose única ou com doses diárias do extrato foram avaliados em modelo crônico de lesão gástrica. Camundongos *Swiss* (30-35g) foram utilizados para avaliar a toxicidade aguda e a área ulcerada de lesões gástricas induzidas por etanol. Ratas Wistar (180-250 g), foram utilizadas para avaliar a área ulcerada de lesões gástricas induzidas por isquemia e reperfusão, bem como determinar o volume de lesão induzida por ácido acético, além da preservação da barreira de muco no modelo de ligadura de piloro (CEUA 413/17). Tanto na avaliação de toxicidade aguda (dose única de 2000 mg/kg, v.o.) quanto no tratamento diário durante 7 dias consecutivos (1, 10 e 50 mg/kg, v.o.), Th-EtOHcc não apresentou efeitos deletérios que implicasse toxicidade. Th-MeOHcc (50 mg/kg, v.o.) também não apresentou sinais de toxicidade nos animais tratados por 7 dias consecutivos. No modelo de úlceras induzidas por etanol absoluto, o Th-EtOHcc apresentou efeito gastroprotetor significativo nas doses de 1, 10 e 50 mg/kg, ao inibir a área da lesão em 72%, 86% e 84%, respectivamente. No modelo de isquemia e reperfusão, Th-EtOHcc apresentou efeito gastroprotetor nas doses de 10 e 50 mg/kg, ao inibir a área de lesão em 96% e 61%, respectivamente. Th-EtOHcc foi capaz de reduzir significativamente as citocinas pró-inflamatória TNF- α e IL-1 β no modelo de lesão induzido por isquemia e reperfusão, bem como, também foi capaz de preservar os níveis de muco no modelo de ligadura do piloro. Nas lesões induzidas por ácido acético, o extrato Th-EtOHcc nas doses de 1, 10, e 50 mg/kg diminuiu significativamente o volume da lesão ulcerativa em 81%, 58% e 71%, respectivamente, em comparação ao grupo veículo, demonstrando efeito restaurador da mucosa. Nesse último protocolo foi avaliado ainda um possível efeito cicatrizante da fração Th-MeOHcc (50 mg/kg), mostrando uma significativa redução do volume da lesão em 85%. O presente trabalho evidencia a baixa toxicidade de Th-EtOHcc, bem como seu efeito gastroprotetor sobre a lesão gástrica induzida por etanol absoluto e isquemia e reperfusão por meio da inibição da migração neutrofílica e da manutenção da integridade da mucosa, bem como pela preservação da barreira de muco evidenciado no protocolo de ligadura do piloro. Além disso, Th-EtOHcc e Th-MeOHcc apresentam atividade cicatrizante, por diminuição de infiltrado neutrofílico e aumento de fibras de colágeno, observados microscopicamente.

Palavras-chave: Toxicidade. Úlcera. Gastroproteção. Cicatrização. *Tocoyena hispidula* Standl.

Gastroprotector activity and acute toxicology profile of *Tocoyena hispidula* Standl in rodents. LOPES, J. S. L. Graduate Studies in Pharmacology. Master's Dissertation, NPPM / CCS / UFPI (2019).

ABSTRACT

Gastric ulcer is one of the main gastrointestinal disorders, being considered a common disease that affects more than 10% of the world population, with increasing incidence and prevalence and high rates of morbidity and mortality. In Brazil, according to the Ministry of Health, 11,532 hospitalizations were reported in 2018, related to the presence of gastric and duodenal ulcers, with a mortality rate of 9.86%. *Tocoyena hispidula* Standl., popularly known as cerrado-flower, “angeliquinha, angelca or jenipapinho” is a subshrub popularly used as medicinal therapy for tummy pain and inflammation in the uterus (bottle). Compounds such as coumarins, triterpenoids and iridoids have been identified in its composition, which may have an important anti-inflammatory, antiulcerogenic and antioxidant action. This study aimed to investigate the gastroprotective activity of *Tocoyena hispidula* Standl ethanolic extract (Th-EtOHcc) and its methanolic fraction Th-MeOHcc (in the best dose of the extract) in gastric lesions in rats or mice. Possible mechanisms of action as well as signs of toxicity during the monitoring of the animals (males or females) treated orally with single dose or with daily doses of the extract were evaluated in a chronic model of gastric lesion. Swiss mice (30-35 g) were used to assess the acute toxicity and the ulcerated area of gastric lesions induced by ethanol. Wistar rats (180-250 g) were used to evaluate the ulcerated area of gastric lesions induced by ischemia and reperfusion, as well as to determine the volume of injury induced by acetic acid, besides the preservation of the mucus barrier in the pylorus ligation model (CEUA 413/17). Th-EtOHcc showed no deleterious effects involving toxicity in both the acute toxicity assessment (single dose 2000 mg / kg, vo) and daily treatment during 7 consecutive days (1, 10 and 50 mg / kg, vol). Th-MeOHcc (50 mg / kg, v.o.) also showed no signs of toxicity in treated animals for 7 consecutive days. In the model of absolute ethanol-induced gastric ulcers, Th-EtOHcc showed a significant gastroprotective effect at doses of 1, 10 and 50 mg / kg, reducing the lesion area by 72%, 86% and 84%, respectively. In the model of ischemia and reperfusion, Th-EtOHcc showed a gastroprotective effect at 10 and 50 mg / kg, reducing the lesion area by 96% and 61%, respectively. Th-EtOHcc was able to significantly reduce the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β in the injury model induced by ischemia and reperfusion, as well as, it was also able to preserve mucus levels in the pylorus ligation model. Concerning the acetic acid-induced lesions, the Th-EtOHcc extract at 1, 10 and 50 mg / kg significantly reduced the volume of the ulcerative lesion by 81%, 58% and 71%, respectively, compared to the vehicle group, demonstrating restorative effect of the mucosa. In this latter experimental protocol, a possible healing effect of the Th-MeOHcc fraction (50 mg / kg) showing a significantly reduce from in lesion volume by 85%. The present work shows evidence of the low toxicity of Th-EtOHcc, as well as its gastroprotective effect on the gastric injury induced by absolute ethanol and ischemia and reperfusion through the inhibition of the neutrophil migration and the maintenance of the mucosal integrity. as well as by the preservation of the mucus barrier evidenced in the pylorus ligation model. In addition, Th-EtOHcc e Th-EtOHcc presents wound healing activity by reduction of neutrophilic infiltrate and increase of collagen fibers, observed microscopically.

Keywords: Toxicity. Ulcer. Gastroprotection. Healing. *Tocoyena hispidula* Standl.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ACh Acetilcolina
- ALP Fosfatase Alcalina
- AINES Anti-inflamatórios não esteroidais
- BD Bilirrubina Direta
- BT Bilirrubina Total
- CEEA Comissão de Ética em Experimentação Animal
- CONCEEA Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- COX-1 Ciclooxygenase 1
- COX-2 Ciclooxygenase 2
- CAT Catalase
- DAC Doença Arterial Coronariana
- cGMP Monofosfato cíclico de guanosina (cGMP)
- ECL Células enterocromafins
- E.P.M. Erro Padrão da Média
- EROs Espécies Reativas de Oxigênio
- Gama- GT Gama Glutamil Transferase
- GI Gastrointestinal
- GSH Glutathione redutase
- HDL Lipoproteína de alta densidade
- H₂O₂ Peróxido de Hidrogênio
- H. pylori *Helicobacter pylori*
- IBPs Inibidores da bomba de prótons
- IP3 Trisfosfato de inositol
- I/R Isquemia e Reperfusão
- LDH Lactato desidrogenase
- LDL Lipoproteína de alta densidade
- MeOH Metanol
- NAC N-acetil cisteína
- NO Óxido Nítrico

- PG Prostaglandina
- PGE2 Prostaglandina E2
- PGI2 Prostaciclina
- P. Totais Proteínas Totais
- SOD Superóxido dismutase
- TGI Trato Gastrointestinal
- Th-EtOHcc Extrato etanólico do caule de *Tocoyena hispidula Standl.*
- Th-MeOHcc Fração metanólica do extrato etanólico do caule de *Tocoyena hispidula Standl.*

- UFPI Universidade Federal do Piauí
- VLDL Lipoproteína de muito baixa densidade
- XO Xantina-Oxidase

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros clínico-comportamentais da análise da toxicidade aguda observados em camundongos sob tratamento com dose de 2000 mg/kg de Th-EtOHcc nas primeiras quatro horas após o tratamento.....	49
Tabela 2. Ganho de peso corporal e consumo de alimentos e água de camundongos <i>Swiss</i> sob tratamento agudo com dose de 2000 mg/kg de Th-EtOHcc.....	50
Tabela 3. Peso relativo dos órgãos (g/100g de peso corporal) de camundongos <i>Swiss</i> sob tratamento agudo com dose de 2000 mg/kg de Th-EtOHcc.....	50
Tabela 4. Parâmetros bioquímicos do tratamento agudo de camundongos <i>Swiss</i> com dose de 2000 mg/kg de Th-EtOHcc.....	51
Tabela 5. Ganho de peso corporal de Ratas <i>Wistar</i> sob tratamento de 7 dias com doses de 1, 10 e 50 mg/kg de Th-EtOHcc e dose de 50 mg/kg de Th-MeOHcc.....	54
Tabela 6. Peso relativo dos órgãos (g/100g de peso corporal) de Ratas <i>Wistar</i> sob tratamento de 7 dias com doses de 1, 10 e 50 mg/kg de Th-EtOHcc e dose de 50 mg/kg de Th-MeOHcc.....	54
Tabela 7. Parâmetros bioquímicos do tratamento de Ratas <i>Wistar</i> com doses de 1, 10 e 50 mg/kg de Th-EtOHcc e dose de 50 mg/kg de Th-MeOHcc.....	55
Tabela 8. Parâmetros hematológicos do tratamento de Ratas <i>Wistar</i> com doses de 1, 10 e 50 mg/kg de Th-EtOHcc, 50 mg/kg de Th-MeOHcc e 200 mg/kg de cimetidina por 7 dias após lesão induzida por ácido acético 80%	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da divisão anatômica do estômago e funcional da mucosa gástrica.....	19
Figura 2. Representação esquemática das células presentes na glândula gástrica.....	20
Figura 3. Regulação da secreção ácida gástrica pela célula parietal.....	22
Figura 4. Fatores agressores e protetores endógenos da mucosa gástrica.....	23
Figura 5. Processo de cicatrização da úlcera gástrica.....	29
Figura 6. Espécie <i>Tocoyena hispidula</i> Standl.....	34
Figura 7. Fluxograma da obtenção do extrato etanólico (Th-EtOHcc) e fração metanólica (Th-MeOHcc) do caule de <i>Tocoyena hispidula</i> Standl.....	40
Figura 8. Estudo histopatológico do tratamento agudo de camundongos <i>Swiss</i> com dose de 2000 mg/ Kg de Th-EtOHcc.....	52
Figura 9. Presença de esteatose microgoticular observado no estudo histopatológico do tratamento agudo de camundongos <i>Swiss</i> com dose única de 2000 mg/kg de Th-EtOHcc.....	53
Figura 10. (A) Efeito do Th-EtOHcc (1, 10 e 50 mg/kg, v.o), veículo ou carbenoxolona (100 mg/kg) no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos. (B) Imagem representativa dos estômagos de animais de cada grupo.....	56
Figura 11. (A) Efeito do Th-EtOHcc nas doses de 1, 10 e 50 mg/kg e da N-acetilcisteína (NAC) na dose de 200 mg/kg no modelo de lesões gástricas induzidas por isquemia e reperfusão em Ratas. (B) Imagem representativa dos estômagos de animais de cada grupo.....	57
Figura 12. Efeito do Th-EtOHcc nos níveis de citocinas TNF- α e IL-1 β em ratas com lesões gástricas induzidas por isquemia e reperfusão.....	58
Figura 13. Efeito do Th-EtOHcc (10 mg/kg) e da carbenoxolona (100 mg/kg) sobre a secreção de muco gástrico em ratas submetidas ao modelo de ligadura do piloro.....	59
Figura 14. (A) Efeito do Th-EtOHcc nas doses de 1, 10 e 50 mg/kg, do Th-MeOHcc na dose de 50 mg/kg e da cimetidina na dose de 200 mg/kg no modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético. (B) Imagem representativa dos estômagos de animais de cada grupo.....	60
Figura 15. Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos do tecido gástrico de ratas com e sem alterações induzidas por ácido acético 80%.....	63

Figura 16. Efeito do Th-EtOHcc, Th-MeOHcc e cimetidina sobre a deposição de fibras de colágeno na lesão gástrica induzida por ácido acético 80% em ratas.....	64
Figura 17. Fotomicrografias representativas da deposição de fibras de colágeno na lesão gástrica induzida por ácido acético em ratas <i>Wistar</i>	65

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	Anatomia e fisiologia gástrica.....	19
1.2	Mecanismos de defesa da mucosa gástrica.....	22
1.3	Úlcera gástrica.....	26
1.4	Terapêutica atual.....	28
1.5	Plantas medicinais.....	31
1.5.1	Toxicidade aguda.....	32
1.6	Família Rubiaceae e <i>Tocoyena hispidula</i> Standl.....	33
2.	OBJETIVOS.....	37
2.1	Objetivo geral.....	37
2.2	Objetivos específicos.....	37
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1	Material vegetal.....	39
3.2	Obtenção do extrato etanólico (Th- EtOHcc) e Fração metanólica (Th- MeOHcc) do caule de <i>Tocoyena hispidula</i> Standl.....	39
3.3	Animais.....	40
3.4	Toxicidade oral do extrato etanólico (Th- EtOHcc) do caule de <i>Tocoyena hispidula</i> Standl.....	41
3.4.1	Toxicidade oral aguda, dose única, em camundongos <i>Swiss</i>	41
3.4.2	Análise histológica do coração, fígado, rins, intestino e estômago dos animais submetidos ao protocolo de toxicidade aguda.....	42
3.4.3	Avaliação do efeito do Th-EtOHcc e Th-MeOHcc, após tratamento de 7 dias, sobre peso dos órgãos, parâmetros bioquímicos e peso dos animais no protocolo de lesão gástrica induzida por ácido acético 80%.....	42
3.5	Avaliação da atividade antiulcerogênica de Th-EtOHcc.....	42
3.5.1	Lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos <i>Swiss</i>	42
3.5.2	Lesões gástricas induzidas por isquemia e reperfusão em ratas <i>Wistar</i>	43
3.6	Investigação dos possíveis mecanismos de ação gastroprotetores de Th- EtOHcc.....	43
3.6.1	Dosagem dos níveis teciduais de TNF α e IL-1 β por ELISA.....	43
3.6.2	Determinação do conteúdo de muco na parede gástrica.....	44
3.7	Avaliação da atividade antiulcerogênica e cicatrizante de Th-EtOHcc e Th-MeOHcc.....	44
3.7.1.	Úlceras gástricas induzidas por ácido acético em ratas <i>Wistar</i>	44
3.7.2	Análise histológica das lesões gástricas induzidas por ácido acético.....	45
3.8	Investigação dos possíveis mecanismos de ação cicatrizante do Th-EtOHcc e Th-MeOHcc.....	46
3.8.1	Mensuração da deposição de colágeno na mucosa gástrica das lesões induzidas por ácido acético.....	46
3.9	Análise estatística	46
4	RESULTADOS.....	48
4.1	Toxicidade oral do extrato etanólico (Th-EtOHcc) do caule de <i>Tocoyena hispidula</i> Standl.	48
4.1.1	Toxicidade oral aguda, dose única, em camundongos <i>Swis</i>	48

4.1.2	Efeito do Th-EtOHcc e Th-MeOHcc, após tratamento de 7 dias, sobre peso dos órgãos, parâmetros bioquímicos e peso dos animais no protocolo de lesão gástrica induzida por ácido acético 80%.....	53
4.2	Atividade antiulcerogênica do Th-EtOHcc.....	56
4.2.1	Lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos <i>Swiss</i>	56
4.2.2	Lesões gástricas induzidas por isquemia e reperfusão em ratas <i>Wistar</i>	57
4.3	Determinação dos possíveis mecanismos de ação gastroprotetores do Th-EtOHcc.....	58
4.3.1	Efeito do Th-EtOHcc sobre os níveis teciduais de TNF α e IL-1 β durante a injúria gástrica ocasionada por I/R.....	58
4.3.2	Efeito do Th-EtOHcc sobre a produção de Muco Gástrico.....	59
4.4	Atividade antiulcerogênica e cicatrizante de Th-EtOHcc e Th-MeOHcc.....	59
4.4.1	Úlceras gástricas induzidas por ácido acético em ratas <i>Wistar</i>	59
4.4.2	Análise histológica das lesões gástricas induzidas por ácido acético.....	61
4.5	Determinação dos possíveis mecanismos de ação cicatrizante do Th-EtOHcc e Th-MeOHcc.....	64
4.5.1	Efeito de Th-EtOHcc e Th-MeOHcc sobre a deposição de colágeno.....	64
5	DISCUSSÃO.....	67
6	CONCLUSÕES.....	81
7	PERSPECTIVAS.....	83
	REFERÊNCIAS.....	85
	ANEXO I - FOLHA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	96

Introdução

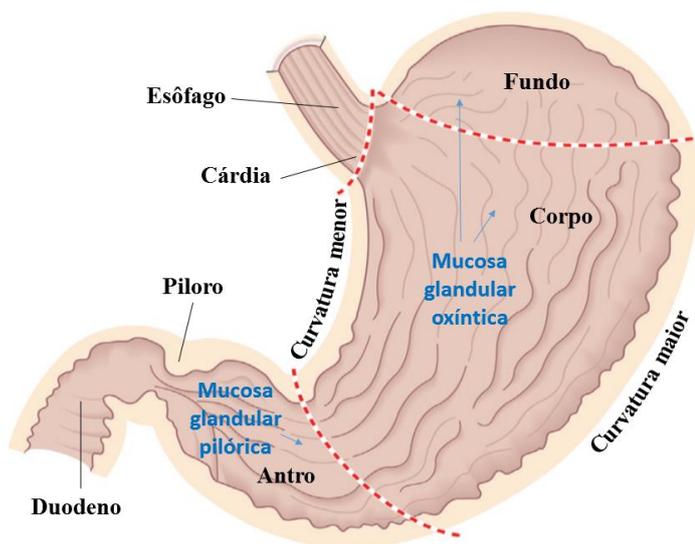
1 INTRODUÇÃO

1.1 Anatomia e fisiologia gástrica

O trato gastrointestinal (TGI) é um tubo muscular contínuo que vai da boca até o ânus e que tem entre um de seus órgãos principais, o estômago (SABBATINI; GORELICK; GLASER, 2014), um órgão de extrema importância com a função de armazenar, misturar e esvaziar os alimentos (IMAI, 2018) que auxilia na digestão, controle do apetite e regulação da nutrição (WILSON; STEVENSON, 2019).

O estômago é um órgão assimétrico, que possui uma curvatura menor e uma curvatura maior em lados opostos, é delimitado pelo esfíncter esofágico inferior ou cárdia na porção superior e pelo esfíncter pilórico ou piloro na porção inferior, anatomicamente, é subdividido em: fundo, corpo e antro e funcionalmente, tem a mucosa gástrica dividida em duas regiões glandulares: mucosa oxíntica, que corresponde a 80% do revestimento do estômago e está localizada na superfície interna do corpo e fundo gástrico; e mucosa antral ou pilórica, localizada no antro do estômago (**Figura 1**) (HOGBEN et al., 1974; CALSON, 2019).

Figura 1. Representação da divisão anatômica do estômago e funcional da mucosa gástrica

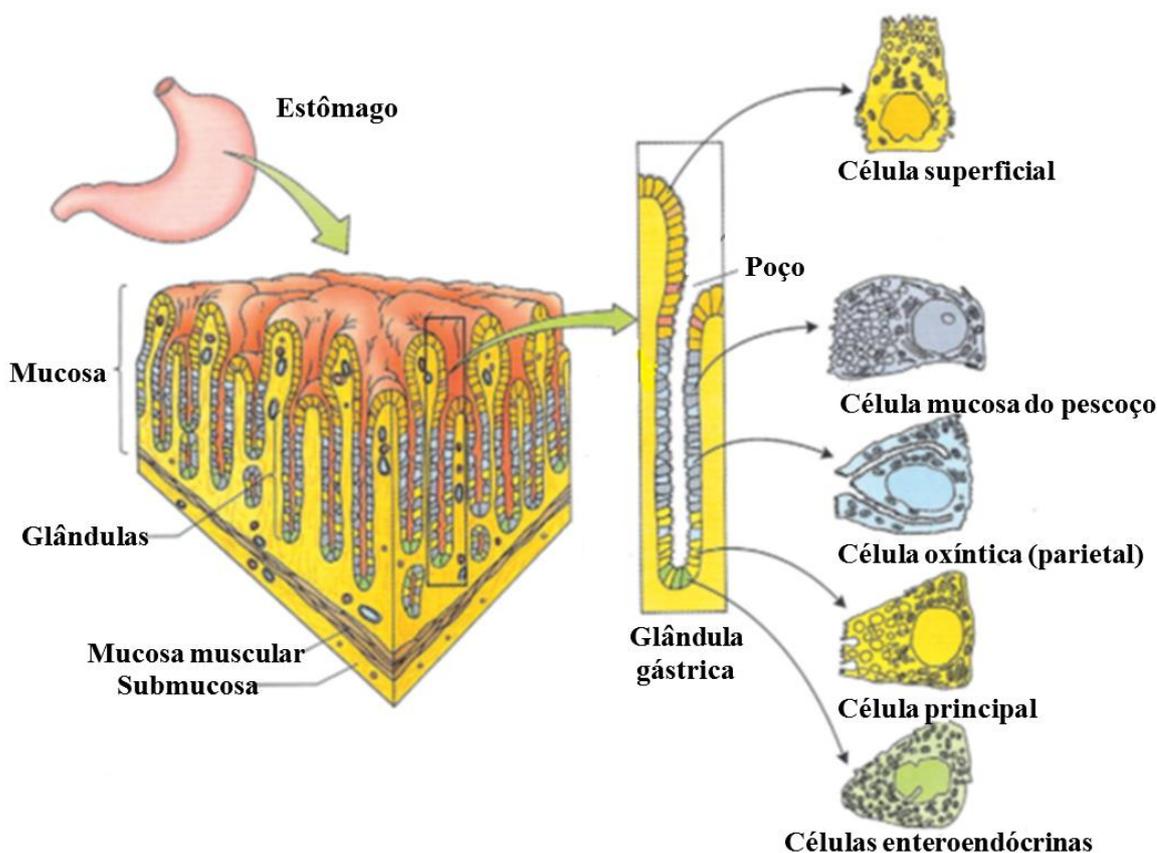


Fonte: adaptado de Calson, (2019)

A mucosa gástrica é cravejada por milhões de depressões gástrica e possui diferentes tipos de células secretoras essenciais para a digestão, entre elas: célula superficial e célula mucosa do pescoço glandular, produzem muco e constituem a maior parte da mucosa; célula

oxíntica (parietal), produz ácido clorídrico (HCl), é um tipo de célula dominante dentro das glândulas; célula principal, fonte de pepsinogênio, é outro tipo de célula dominante dentro da glândula (BI; KAUNITZ, 2003; CALSON, 2019); células enteroendócrinas, existe pelo menos 10 populações diferentes, sintetizam, armazenam e secretam hormônios gástricos locais tais como serotonina (Células D), histamina (Células ECL), enteroglucagon (células A), gastrina (Células G), entre outros (**Figura 2**) (WALLIG, 2018).

Figura 2. Representação esquemática das células presentes na glândula gástrica.



Fonte: adaptado de Calson, (2019)

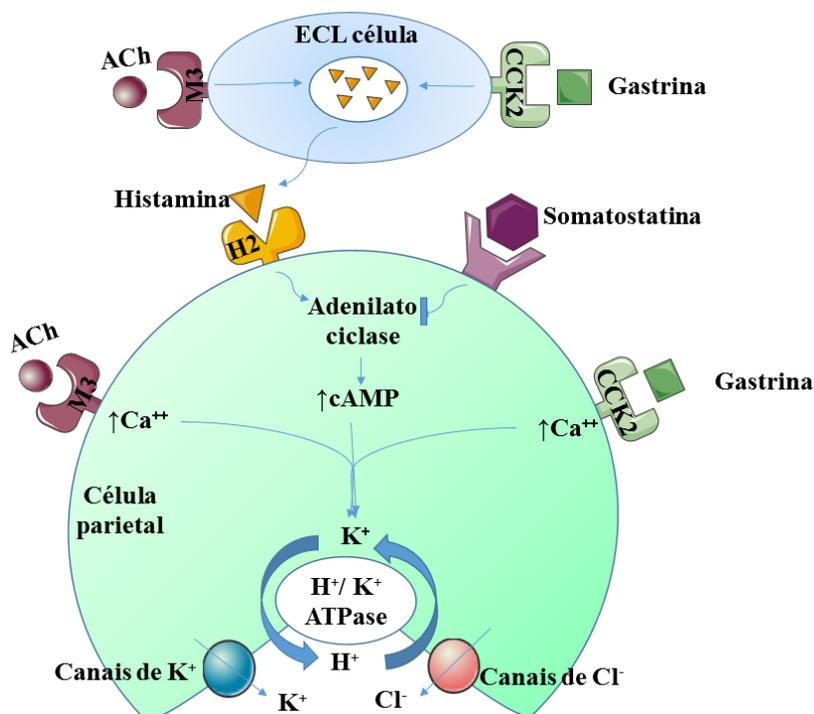
Alguns estudos sugerem que essas células estão distribuídas regionalmente no estômago, sendo a sua localização definidora das bordas anatômicas do estômago. Roland e colaboradores (2013) em seus resultados mostraram que as células secretoras de grelina e da gastrina melhor definem as divisões anatômicas entre o corpo e o antro, respectivamente; as células parietais foram observadas em todas as glândulas do fundo do estômago, e em mais de 50% das glândulas antrais, em estreita proximidade com células G, podendo contribuir para a propensão de doença ulcerosa duodenal em células epiteliais de superfície humana; as células principais estavam predominantemente no fundo, porém, havia a presença de algumas dessas

células também no antro; células produtoras de serotonina e somatostatina estão presentes no corpo e antro; Células imunorreativas de Chromogranin são expressas em níveis mais elevados no fundo; células mucosas estão mais proeminentemente ao longo da curvatura maior no antro; células endócrinas estão regionalmente localizadas no corpo superior (fundo).

As células parietais, responsáveis pela secreção de ácido clorídrico, são adaptadas para formá-lo e secretá-lo dentro de 10 minutos de diferentes tipos de estimulação. Essa secreção é controlada em três fases distintas: **fase cefálica**, mediada por sinais do nervo vago que, ao ser estimulado pela mastigação ou deglutição, estimula diretamente as células parietais a secretarem HCl; **fase gástrica**, a distensão da parede do estômago estimula nervos vagos que estabelecem reflexo vagovagal, atuando em células da área pilórica e duodeno induzindo a produção do hormônio local gastrina que é transportado para o corpo do estômago e estimula as células parietais a produzirem mais ácido gástrico; e **fase intestinal**, a presença de produtos de proteínas de digestão no duodeno estimula liberação de gastrina no duodeno superior, além disso, a absorção de aminoácido pode influenciar as células parietais (CALSON,2019).

Essas células possuem vários tipos de receptores, nos quais se ligam moléculas que controlam a secreção de HCl. Entre eles: **M3**, ativado por acetilcolina, resultando em um aumento de cálcio intracelular, também presentes em células enterocromafins (ECL), estimulando liberação de histamina; **CCK-2**, ativado por gastrina que também resulta em aumento de cálcio intracelular nas células parietais, gastrina também se liga a CKK-2 de ECL gástricas estimulando a liberação de histamina; **H2**, ativado por histamina, resultando em um aumento de adenosina monofosfato cíclico cAMP. Assim, Ca^{++} intracelular e cAMP ativam a bomba de prótons H^+ / K^+ -ATPase da célula parietal e a mesma bombeia íons de hidrogênio para o lúmen em troca de íons potássio (SPECHLER, 2018). Essa secreção também é controlada por moléculas inibidoras da mesma, entre essas, destaca-se a secreção de somatostatina, que dentre outros mecanismos, é capaz de inibir a secreção tanto diretamente nas células parietais, quanto indiretamente pela inibição da liberação de histamina pelas células ECL (**Figura 3**) (KOMASAKA et al., 2002).

Figura 3. Regulação da secreção ácida gástrica pela célula parietal.



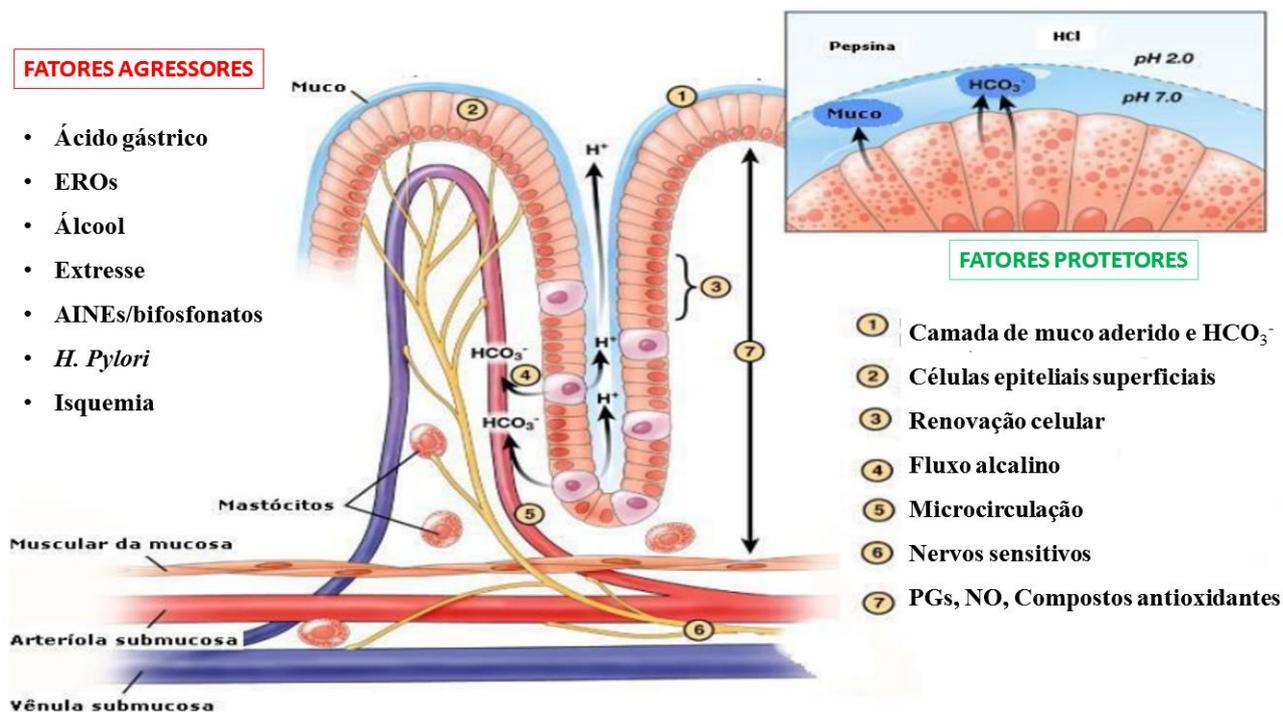
Fonte: elaborado pelo autor

A secreção ácida é importante para que ocorra a digestão dos alimentos, uma vez que a mesma facilita a quebra de proteínas, potencializando a absorção de ferro, cálcio e vitaminas, além disso, ela também tem sua importância como defensora da mucosa contra agentes infecciosos (SCHUBERT; PEURA, 2008). Entretanto, a disfunção de sua regulação está diretamente ligada ao desenvolvimento de úlceras pépticas, portanto, é necessário que haja um equilíbrio entre a secreção do ácido e os mecanismos protetores da mucosa, para que a mucosa gástrica permaneça intacta frente a exposição a agentes agressores (LU; GRAHAM, 2006)

1.2 Mecanismos de defesa da mucosa gástrica

Normalmente, existe um equilíbrio entre fatores da mucosa do estômago, tais como: agentes defensivos, a barreira de muco bicarbonato, células epiteliais de superfície, a regeneração da mucosa, circulação sanguínea, equilíbrio ácido-base, grupo sulfidril endógeno e fator de crescimento epidérmico, que atenuam os efeitos de agentes agressores, como o ácido gástrico e pepsina, que podem induzir o aparecimento de úlcera gástrica quando descompensado (**Figura 4**) (KALAYCI et al., 2017).

Figura 4: Fatores agressores e protetores endógenos da mucosa gástrica



Fonte: adaptado de Laine; Takeuchi; Tarnawski (2008)

A primeira linha de defesa da mucosa gástrica contra ácido gástrico e pepsina é constituída pela barreira muco bicarbonato, um composto constituído 90-95% de água, 5-10% de mucina, 1% de eletrólitos, e 5% de células desprendidas, enzimas, ácidos nucleicos, lipídios, proteínas plasmáticas, imunoglobulinas secretadas, bactérias e metabólitos bacterianos, secretado pelas glândulas mucosas, formando uma camada protetora sobre a mucosa gástrica. Esse muco retém o íon bicarbonato que é secretado pelas células epiteliais gástricas formando um gradiente de pH neutro na superfície do lúmen gástrico protegendo a mucosa contra a acidez do ambiente (LAINE et al., 2008; LUZ et al., 2018; WALLIG, 2018).

O muco gástrico é secretado das células epiteliais da superfície como um gel que adere à superfície da mucosa gástrica. A glicoproteína não degradada do muco gástrico é um polímero de quatro subunidades idênticas, cada uma com um peso molecular de cerca de 500.000, e unidas por pontes dissulfídicas ligando os seus núcleos proteicos. Este gel pode ser solubilizado por tratamento com reagentes que quebram pontes dissulfeto, ou por proteólise. Em condições fisiológicas, o muco do gel gástrico é constantemente produzido pelas células epiteliais da superfície e está constantemente sendo degradado pela atividade péptica luminal. (BICKEL; KAUFFMAN Jr, 1981). Qualquer irritação local à mucosa estimula a produção de mediadores

locais como as prostaglandinas, o que aumenta a produção de muco e íon bicarbonato, e também leva a outras alterações teciduais que promovem a cicatrização da lesão local (ARAÚJO, 2018).

Um outro fator importante na proteção gástrica é o fluxo sanguíneo que atua removendo, CO_2 , H^+ e substâncias tóxicas na região subepitelial e realiza o suprimento de oxigênio, HCO_3^- e nutrientes essenciais a manutenção da integridade da camada de muco-bicarbonato. Além disso, quando a mucosa está exposta a fatores agressivos, o fluxo sanguíneo aumenta, fazendo com que haja remoção ou diluição do ácido luminal (SZABO, 1991; LAINE et al., 2008; SOUSA, 2013; MARTINS, 2015). A obstrução do fluxo sanguíneo está relacionada a grave injúria do tecido, pois a mesma acarreta em isquemia (diminuição crítica do suprimento sanguíneo), causando perfusão e oxigenação inadequadas ao tecido. As células da mucosa epitelial são as mais suscetíveis à injúria e rapidamente são lesadas (ROWE e WHITE, 2002).

Em modelos experimentais tais como o modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão (I/R), em que ocorre a obstrução mecânica da artéria celíaca (artéria que irriga as células do estômago), seguida de desobstrução da mesma ocorre grave lesão ao tecido gástrico, pois além da injúria provocada pela isquemia, a reperfusão, quando ocorre com as células ainda viáveis, provoca dano mais grave, devido a uma cascata de eventos que ocorrem em conjunto desencadeados pela entrega de oxigênio ao tecido previamente isquêmico. O dano resultante é chamado injúria de reperfusão e baseia-se na renovação de oxigênio ao tecido, com participação de células endoteliais e receptores aferentes para criar a resposta inflamatória subsequente (ARAÚJO, 2018).

O processo natural de controle do fluxo sanguíneo ocorre principalmente por prostaglandinas (PG) e óxido nítrico (NO) (CORUZZI et al., 2000).

As prostaglandinas constituem um importante grupo de mediadores no corpo, envolvidas em diversos processos fisiológicos, tais como, modulação da reação inflamatória, agregação plaquetária, angiogênese e fluxo sanguíneo da mucosa gastrointestinal. São provenientes do ácido araquidônico e sintetizadas através das enzimas cicloxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2, respectivamente) (LAINE et al., 2008; MARTINS, 2015). Embora COX-1 esteja mais esclarecidamente envolvida na proteção gástrica, COX-2 também desempenha importante papel na proteção gástrica, atuando na restauração da mucosa gástrica (MANJEGOWDA et al., 2017).

As prostaglandinas são agentes anti-úlceras com atividade bem conhecida e efeito inibidor da secreção do ácido gástrico, que protegem a barreira da mucosa gástrica danificada,

aumentando a circulação sanguínea local e a secreção de muco gástrico e bicarbonato (SIDAHMED et al., 2018). Sua supressão está relacionada ao surgimento de efeito prejudicial a mucosa provocada pelos fatores agressivos (VERMA; KUMAR, 2017).

PGE2 e PGI2, são as principais prostaglandinas envolvidas na gastroproteção, atuam ativando receptor de prostaglandina do tipo 3 (EP3) das células epiteliais, o que causa uma diminuição da secreção de ácido e aumento da secreção de muco, além disso, ativam canais de potássio sensíveis a ATP (K_{ATP}) que estão envolvidos em diversos outros processos fisiológicos do sistema gastrointestinal, tais como a regulação do fluxo sanguíneo, secreção de ácido e contratilidade do estômago (POSSENTI et al., 2012; SCHNEIDER, 2014).

O óxido nítrico é outro mediador importante na defesa gástrica, que atua como vasodilatador endógeno regulando o fluxo sanguíneo gástrico e microcirculação, além disso, ele pode manter a camada viscoelástica de muco, aumentando a secreção de muco e diminuindo a agregação e secreção de neutrófilos (LUZ et al., 2018; YOO et al., 2018). Seu mecanismo de ação se dá pela ativação da enzima guanilil ciclase, aumento dos níveis de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) e subsequente ativação dos canais K_{ATP} levando à gastroproteção (MEDEIROS et al., 2008).

Outro importante fator de proteção da mucosa são os antioxidantes, mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos presentes no organismo que protegem contra o dano tecidual provocados por estresse oxidativo (WANG et al., 2014).

Naturalmente, o organismo produz pequenas quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs) constantemente, em processos como na cadeia transportadora de elétrons (na fosforilação mitocondrial), no metabolismo de xenobióticos e na resposta inflamatória. Mas o problema com tal produção só acontece quando existe um aumento considerável de radicais livres, capazes de ultrapassar os mecanismos de defesa intrínsecos. Algumas doenças inflamatórias, neurodegenerativas ou neoplásicas são capazes de induzir esse desequilíbrio (PINTO, 2013).

A fim de proteger os tecidos contra os danos provocados pela EROs, todas as células contêm enzimas antioxidantes, como a glutathiona-peroxidase (GPx), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathiona-redutase (GR), e eliminadores de radicais, tais como compostos sulfidrílicos (GSH), que desempenham papéis fundamentais nos mecanismos de

defesa, possuindo formulações com ação antioxidante, eficácia na citoproteção e cicatrização das lesões gástricas (AFALOBI, 2011; PINTO, 2013).

Assim, a presença de mecanismos defensivos na mucosa gástrica, permite que a mucosa permaneça íntegra mediante a exposição de uma série de agentes agressores tanto do ambiente externo, quanto interno. Entretanto, um aumento exacerbado de fatores agressores pode provocar sérias lesões a mucosa, tais como úlcera gástrica (CARVALHO, 2017)

1.3 Úlcera gástrica

A úlcera gástrica é identificada por erosão da mucosa gástrica (ELSHAZLY et al., 2018), que pode ser caracterizada desde danos superficiais nos tecidos, até perfurações na mucosa até a submucosa subjacente ou muscular externa (MANJEGOWDA et al., 2017). É um dos principais distúrbios gastrointestinais, sendo considerada uma doença comum que afeta mais de 10% da população mundial, com incidência e prevalência crescente (SHEN et al., 2017; YOO et al., 2018). Pode ser classificada como: **aguda**, distinta por inflamação ativa, com infiltrado neutrofílico e hemorragia na superfície da mucosa; ou **crônica**, caracterizado por vários graus de injúrias na mucosa e agregados linfóides na região (MARTINS, 2005)

As úlceras gástricas são causadas por um desequilíbrio entre os fatores protetores (barreira de muco, secreção de bicarbonato, aumento dos níveis de antioxidantes e produção de prostaglandinas, fluxo sanguíneo mucoso, entre outros) e fatores agressivos (pepsina, ácido clorídrico, radicais livres reativos e oxidantes) da mucosa, que participam na regulação de processos inflamatórios que envolvem neutrófilos, eosinófilos e mastócitos. E têm como fatores etiológicos importantes pra sua indução: o consumo de álcool, estresse, isquemia da mucosa gástrica, uso crônico de medicamentos como os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), infecção por *Helicobacter pylori*, entre outros (WANG et al., 2014; MANJEGOWDA et al., 2017; SHEN et al., 2017; ATHAYDES et al., 2018, ELSHAZLY et al., 2018; LIANG et al., 2018).

Entre os fatores agressores, o ácido é considerado o mais importante, pois, o argumento “se não houver ácido, não há úlcera” ainda é válido, entretanto, nem todas as úlceras estão envolvidas diretamente com ação do ácido gástrico, como é o caso da úlcera de estresse. Além disso, úlcera pode ser resultado da liberação de histamina devido à degranulação de mastócitos, hipermotilidade, diminuição da camada de muco e deterioração da circulação sanguínea da mucosa gástrica. Pesquisadores que induzem úlcera em animais, investigam mecanismos

etiológicos subjacentes, para assim, conseguir evitar ou curar a doença, no entanto, ainda não se determinou um tratamento ideal (KALAYCI et al., 2017).⁺

O estresse e a isquemia da mucosa gástrica também são importantes fatores etiológicos para úlcera gástrica. As úlceras da mucosa gastroduodenal que aparecem após graves insultos como queimaduras, choque séptico e grandes traumatismos, por exemplo, são chamadas de úlceras associadas ao estresse ou, mais genericamente, de doença mucosa associada ao estresse (DMAE). A redução do fluxo sanguíneo dirigido a mucosa gástrica é capaz de lesionar o tecido e a reperfusão da mucosa após o evento isquêmico, aumenta a lesão tecidual em comparação com a isquemia sozinha, mecanismo mediado por radicais livres do oxigênio. A quebra da integridade da mucosa gastroduodenal ocasionada pela isquemia associam-se os distúrbios da motilidade gástrica e as alterações da secreção ácida causada por medicamentos ou mesmo pelo jejum, constituindo as causas fisiopatológicas mais importantes no estabelecimento das lesões de estresse (POMPILIO; CECCONELLO, 2010).

A patogênese da úlcera péptica envolve múltiplas causas, por exemplo, fatores exógenos já considerados, fatores genéticos e fatores endógenos, como distúrbios fisiopatológicos, incluindo motilidade anormal. A função gástrica adequada é fundamental para a digestão e absorção de nutrientes, entretanto, tem sido cada vez mais comum o acometimento de distúrbios gastrointestinais como a úlcera péptica que causa desconforto e dor abdominal, problema esse que está intimamente relacionado aos hábitos de vida (LUZ et al., 2018).

A ingestão excessiva de álcool é um dos fatores relacionados ao hábito de vida que pode lesionar a mucosa, induzindo o surgimento de úlcera gástrica, pois o etanol age danificando as células endoteliais vasculares da mucosa gástrica, distorcendo a microcirculação e induzindo a hipóxia devido ao aumento da produção de EROs e citocinas (SHEN et al., 2017). A liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , aumenta ainda mais o dano oxidativo ao tecido através de geração de superóxido. O desequilíbrio resultante entre a capacidade pró-oxidante e antioxidante produz um efeito prejudicial na integridade do tecido e é um dos principais contribuintes para os danos na mucosa gástrica (VERMA; KUMAR, 2017).

Outro importante fator exógeno envolvido na fisiopatologia da úlcera gástrica é o consumo prolongado de AINEs, utilizados para fins analgésicos e anti-piréticos que apresenta efeitos secundários no trato gastrointestinal (KALAYCI et al., 2017). Um importante elemento patogênico desse tipo de lesão, é a depleção de prostaglandinas endógenas pela inibição da via da ciclooxigenase (COX), entretanto, existem mecanismos independentes de prostaglandinas,

tais como ativação de neutrófilos, hipermotilidade, radicais livres de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias da mucosa (LIM et al., 2014).

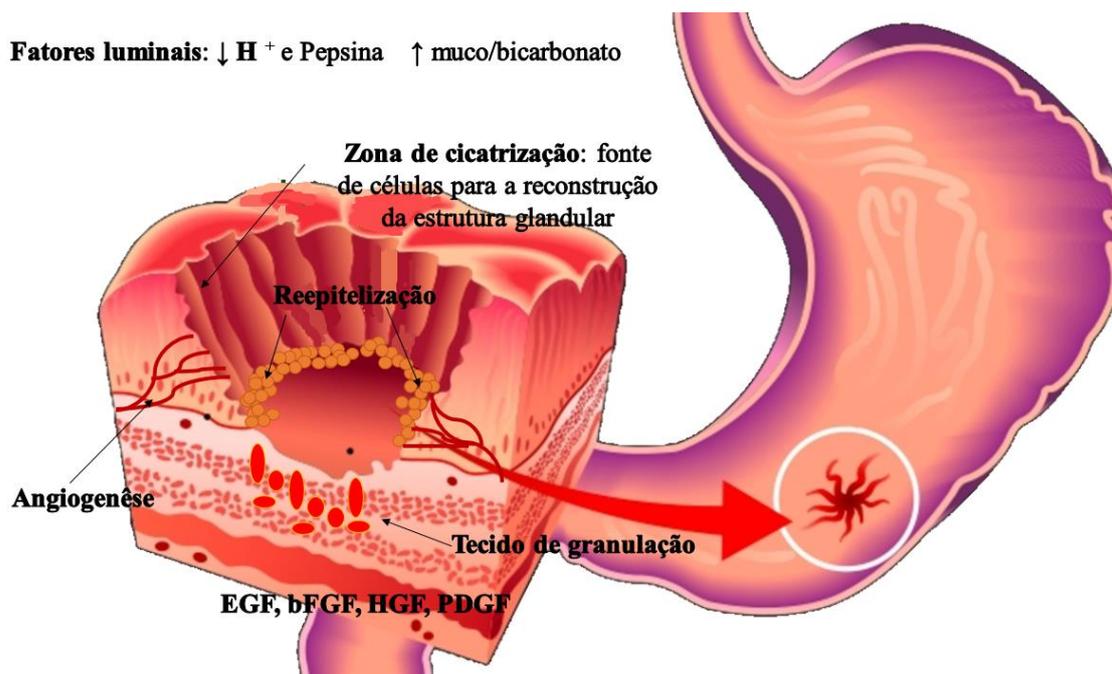
A infecção por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), constitui o principal fator exógeno de agressão a mucosa (SIDAHMED et al., 2018). *H. pylori* é uma bactéria gram negativa, espiralada e patogênica associada ao desenvolvimento de gastrite crônica, úlcera péptica, tumores e câncer gástrico com papel essencial no dano à barreira epitelial gástrica (WROBLEWSK; PEEK; WILSON, 2010)

1.4 Terapêutica atual

A relevância clínica das úlceras pépticas levou ao desenvolvimento de drogas capazes de aliviar os sintomas e até mesmo possibilitar a cura, tais como os antagonistas de receptores H₂, como a cimetidina e inibidores da bomba de prótons (IBPs), como o omeprazol, associados aos aumentos da taxa de cura de úlceras gástricas, porém seu uso está associado a uma série de efeitos colaterais e recorrência de úlcera ao término do tratamento (ARAÚJO, 2018).

A cura da úlcera é um processo complexo que envolve resposta inflamatória, como proliferação e migração celular, formação de tecido de granulação, contração do tecido alterado, angiogênese e reepitelização. Processos esses que são controlados por mediadores como as PGs, hormônios gastrointestinais, citocinas e fatores de crescimento, tais como: fator de crescimento epidérmico (EGF), fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), envolvidos na angiogênese (**Figura 5**) (LIMA, 2014). Além disso a presença de colágenos do tipo I, III e IV, que tem sua síntese estimulada durante a cicatrização do epitélio gástrico ulcerado, se encontra em abundância na fase final do processo de cicatrização, com papel fundamental na reorganização tecidual da mucosa (DE MELLO; PISSINATTI; FERREIRA, 2010; SOUZA, et al., 2016).

Figura 5. Processo de cicatrização da úlcera gástrica.



Fonte: elaborado pelo autor

Os tratamentos medicamentosos atuais são voltados a reduzir o agente agressivo, estimular a defesa da mucosa e/ou inibir o crescimento de micro-organismos (*H. pylori*) com a finalidade de permitir a cicatrização do tecido, para isso, a combinação de diferentes classes farmacêuticas têm se mostrado eficazes quanto a concretização do objetivo. As drogas que inibem secreção de ácido gástrico incluem: Antagonistas de receptores H_2 (H_2RA); inibidores da bomba de prótons, anticolinérgicos; análogos das prostaglandinas; antiácidos, protetores da mucosa e antibióticos (ALMEIDA et al., 2018; LIMA, 2014).

A primeira droga efetiva sistematicamente no combate a úlceras gástricas foi a carbenoxolona descoberta a partir de estudos com plantas medicinais da *Glycyrrhiza glabra*, conhecida popularmente por alcaçuz e utilizada na medicina popular rotineiramente por indígenas no tratamento de úlceras gástricas, inflamação, dentre outras enfermidades (AKTAR; MUNIR, 1989) com importante ação citoprotetora (BICKEL; KAUFFMAN Jr. 1981).

Os H_2RA , representados principalmente por cimetidina e ranitidina, são antagonistas seletivos nos receptores de histamina do estômago, capazes de inibir a secreção gástrica, apesar de não serem capazes de inibir a úlcera induzida por AINEs. São importante ferramenta terapêutica na úlcera por estresse e sangramento e apresentam como alguns de seus efeitos adversos: boca seca, urticária, diarreia, constipação, náuseas e vômitos, dor abdominal,

cãimbras nas pernas e impotência, podendo interagir com alguns medicamentos tais como: fenitoína, teofilina ou varfarina (ELBAKYAN, 2016).

Os IBPs, representados por: omeprazol, esomeprazol, lansoprazol, dexlansoprazol, pantoprazol e rabeprazol, são pró-fármacos que tem por mecanismo de ação a inibição da bomba de prótons após serem absorvidos e transportados através do sangue até o canalículo secretor de uma célula parietal onde o ácido converte o pró fármaco na sua forma ativa, sulfenamida, que se liga covalentemente a bomba de prótons e inibe irreversivelmente a secreção de ácido. Apesar de serem os inibidores mais importantes a longo prazo, sua ação precisa de um certo tempo para se iniciar, logo situações que exigem uma resposta rápida como alívio da pirose, é mais interessante usar um antiácido ou antagonista H₂ (SPECHLER, 2018).

O uso de IBPs está associado a alguns riscos, e efeitos adversos onde os principais são: probabilidade aumentada de desenvolver algumas malignidades e infecções entéricas; efeitos na absorção e metabolismo de certas vitaminas e minerais, levando ao risco de fratura óssea e deficiência nutricional; infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, doença renal, colite entre outros (SPECHLER, 2018; LUZ et al., 2018)

Os anticolinérgicos correspondem aos medicamentos capazes de inibir receptores muscarínicos. Na terapêutica da úlcera gástrica, eram utilizados fármacos como a piperazina que inibe o receptor M3 expressos em células parietais com papel essencial na secreção de ácido gástrico, entretanto, atualmente essa terapia caiu em desuso devido ao surgimento de medicamentos mais eficazes e seguros (AIHARA et al., 2005; MOSSNER; CACA, 2005). Os efeitos adversos mais comuns associados ao uso de piperazina são náusea, vômito, diarreia, dor abdominal, tontura e cefaleia, e raramente, neurotoxicidade e reação alérgica (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

Os análogos das prostaglandinas eram utilizados frequentemente antes do surgimento do IBPs e são uma excelente forma de prevenção e uma importante opção de ferramenta farmacológica na prevenção de úlceras associadas ao uso crônico de AINEs (LIMA, 2014). Tem como representante o misoprostol, e teve uso mais restrito devido aos seus efeitos adversos, entre os quais, os mais comuns são aborto, diarreia e dor abdominal, (ELBAKYAN, 2016).

Os antiácidos têm como principal ação terapêutica neutralizar diretamente o ácido gástrico levando a um aumento de pH do meio, causando a inibição da ativação de enzimas pépticas. Apesar de serem efetivos e de baixo custo podem reduzir a biodisponibilidade oral de

um grande número de fármacos e de minerais presentes em suplementos alimentares. São usados para aliviar pirose e desconforto abdominal, mas, por apresentarem curta permanência no estômago, não têm sido usados muito no tratamento de úlceras gástricas (AIHARA et al., 2003; ARAÚJO, 2018). Seus efeitos adversos diferem entre si, por exemplo, alguns antiácidos, como o bicarbonato de sódio e carbonato de cálcio, podem causar eructação e alcalose metabólica, já o hidróxido de magnésio e hidróxido de alumínio tem como principal efeito adverso a diarreia para o primeiro, e a constipação para o segundo (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

No tratamento da úlcera associada a *H. pylori* é necessária redução do ácido e erradicação da bactéria. Assim, o tratamento é feito através de uma combinação de inibidores de bomba protônica ou antagonista de receptor H2 com dois antibióticos por um período de 7 a 10 dias, sendo que a tendência atual é tratar inicialmente durante apenas sete dias (OLIVEIRA, 2011; ARAÚJO, 2018).

Embora existam vários medicamentos disponíveis para o tratamento da úlcera gástrica, a maioria deles produzem muitos efeitos colaterais, como: dores de cabeça, diarreia, hipersensibilidade, ginecomastia, náuseas, aumento de chance de infecções gastrointestinais e impotência, que limitam seu uso, além disso, é evidenciando também grande recorrência de úlcera após o tratamento (SHEN et al., 2017; ALMEIDA et al., 2018; SIDAHMED et al., 2018; YOUS et al., 2018).

Assim, diante da dificuldade de cura da úlcera gástrica, e presença significativa de efeitos colaterais na terapia atual e a grande recorrência das mesmas após o tratamento, é evidente a necessidade de se buscar um novo tratamento anti-úlcera que apresente alta eficácia, baixa ou nenhuma toxicidade e efeitos adversos mínimos.

1.5 Plantas medicinais

O uso medicinal de plantas existe desde a antiguidade sendo empregadas como principal fonte de medicina tradicional no tratamento de diversas doenças. Vários remédios a base de plantas são intensivamente usados em terapias para diferentes patologias, cerca de 50% dos medicamentos ortodoxos derivam de fontes vegetais (ZEB et al., 2016; ABAS et al., 2018).

A Organização Mundial de Saúde, estima que 80% da população dos países em desenvolvimento tem como uma de suas práticas na atenção primária a saúde, o uso de práticas tradicionais, entre elas o uso de plantas medicinais em 85% deles. Assim, com intuito de

regulamentar a prática, assegurando o acesso e a correta utilização de plantas medicinais, a utilização sustentável, a biodiversidade brasileira, e o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional, em 22 de julho de 2006, foi aprovada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos pelo governo federal (ARAÚJO, 2018).

Na natureza, muitas são as plantas que apresentam atividade farmacológica. Nesse sentido, o Brasil apresenta uma grande flora rica em variedade de plantas medicinais, acredita-se que exista entre 60 a 250 mil espécies vegetais no país, das quais 40% apresenta alguma atividade terapêutica, entretanto, a maioria dessas plantas são utilizadas sem embasamento científico, fundamentado apenas no conhecimento tradicional. Assim, muitas são as pesquisas desenvolvidas no mundo inteiro a fim de identificar plantas medicinais para a cura de doenças, bem como descobrir possíveis compostos derivados das mesmas com capacidade para prevenir e tratar doenças (HOLLENBACH, 2008; CESÁRIO et al., 2018^a). Essas pesquisas têm confirmado o potencial de plantas medicinais para a cura de diversas doenças, tais como diabetes e câncer, bem como para contrabalançar efeitos ulcerogênicos, nesse sentido, a medicina tradicional, que se refere a uma grande variedade de moléculas bioativas naturais, está surgindo como uma alternativa potencialmente segura (YOUS et al 2018).

Algumas espécies, tais como: *Byrsonima intermedia* A. Juss (SANTOS et al., 2019), *Muntingia calabura* (BALAN et al., 2015) *Clematis flammula* L. (YOUS et al., 2018), têm sido usadas tradicionalmente com finalidade do tratamento anti-úlceras, e muitos compostos já foram isolados de algumas delas (SIDAHMED et al., 2018). Assim, no intuito de descobrir melhores opções de tratamento mais seguros e com menos efeitos adversos para doenças gastrointestinais, plantas medicinais já foram estudadas, tendo sua atividade confirmada como sendo frequentemente pleiotrópica e sem efeitos adversos excessivos (ALMEIDA et al., 2018). Na literatura são encontrados muitas plantas e seus metabólitos secundários com efeito gastroprotetor, sendo uma valiosa alternativa para o tratamento da úlcera gástrica. Apresentando como principal ação, efeitos antioxidantes, responsáveis por diminuir a peroxidação lipídica, proteína e danos no DNA, auxiliando na prevenção da inflamação que leva a úlceras gástricas (ATHAYDES et al., 2018).

1.5.1 Toxicidade aguda

O uso de produtos de origem vegetal, atualmente, é uma importante opção para o tratamento de diversas doenças, desde patologias mais leves a crônicas, sendo uma alternativa fortemente impulsionada pelo aumento dos custos dos medicamentos e efeitos colaterais

associados ao uso prolongado dos mesmos, além da forte crença da população de que produtos naturais não apresentam efeitos tóxicos, porém, a maioria dos produtos naturais não foram cientificamente avaliados, tendo por isso, muitos dos seus efeitos adversos desconhecidos, o que compromete o seu uso na medicina popular (NG'UNI; KLAASEN; FIELDING, 2018; WOLFF, et al., 2018).

Muitas pesquisas são frequentemente realizadas com intuito de obter moléculas com finalidades terapêuticas. Nessa busca de novos fármacos ou produtos líderes usados no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, os produtos naturais se mostram extremamente importantes, entretanto, têm-se que considerar a potencialidade de fitoterápicos serem tóxicos, por isso, se torna necessário estudos adicionais de avaliação da segurança e toxicidade das plantas medicinais antes do seu uso (MOREIRA et al., 2018; NG'UNI; KLAASEN; FIELDING, 2018)

Apesar do extenso uso de plantas medicinais, poucos foram testados quanto a eficácia e segurança. O teste de toxicidade é uma ferramenta indispensável que possibilita a percepção de possíveis efeitos colaterais prejudiciais atribuídos a esses produtos (NG'UNI; KLAASEN; FIELDING, 2018).

De acordo com as diretrizes padrão, antes do estudo farmacológico e do desenvolvimento do produto fitofarmacêutico de qualquer planta medicinal, a toxicidade aguda e subaguda é obrigatória sendo também um processo necessário de determinação da dose no nível pré-clínico em drogas descobertas e em desenvolvimento (UPADHYAYA; SHUKLAB; MISHRAC, 2019)

1.6 Família Rubiaceae e *Tocoyena hispidula* Standl.

A família Rubiaceae é considerada a quarta maior família das angiospermas em número de espécies, aproximadamente 13.200, distribuídas em 620 gêneros. No Brasil ela representa a quinta maior família das angiospermas com aproximadamente 119 gêneros e 1.380 espécies (SOUSA; BAUTISTA; JARDIM, 2013) sendo caracterizada pela presença de substâncias medicinais tais como: alcalóides quinolínicos (quinina e cinchonina), isoquinolínicos (emetina) e indólicos (iombina) (COELHO; AGRA; BARBOSA, 2006; SOMAVILLA et al., 2016) e antraquinonas (ANJUSHA; GANGAPRASAD, 2016) e portanto, associada, tradicionalmente a vários usos medicinais (RIBEIRO et al., 2017). Em estudo bibliográfico que utilizou dados sobre as plantas brasileiras, obtidos de seis edições do livro Formulário e Guia Médico (Formulário e GuiaMédico), publicado em 1864, 1874, 1888, 1892, 1897 e 1920, mostraram a

família Rubiaceae entre as 3 primeiras famílias mais representadas para uso popular, entre esses, o uso como planta medicinal (RICARDO et al., 2017).

A subfamília Ixoroideae, possui cerca de 30 espécies e tem como principal marcador quimiotaxonômico a presença de iridóides, em algumas espécies foi identificada ainda a presença de saponinas triterpênicas e flavonóide. Essa subfamília é conhecida ainda por metabolizar além dos iridóides, flavonóides e triterpenos, os derivados fenólicos e alcalóides do tipo emetínicos, quinolínicos e poliindolenínicos (HAMERSKI, et al, 2005). Vários metabólitos importantes foram encontrados nas espécies pertencentes ao gênero *Tocoyena*: *T. bullata* Schumann - glicosídeos cianogênicos; *T. elliptica* Aubl.-alcalóides do tipo emetina; *T. formosa* Schumann - galiosídeo (éster metílico de monotropeína), galicósido aglicona, apodantosida, entre outros (POSER; SEIBT, 1997). O gênero ainda é conhecido popularmente pelo uso medicinal para: tosse, torsão, cistite, reumatismo, problemas renais, problemas cardíacos, fratura óssea e inchaço (ALBUQUERQUE et al., 2007; RIBEIRO et al., 2014).

A espécie *Tocoyena hispidula* Standl. (**Figura 6**), conhecida popularmente como flor-do-cerrado, angeliquinha ou angelca é um subarbusto usado popularmente como terapia medicinal para dor de barriga (chá preparado por infusão) e inflamação no útero (garrafada) (FARIAS; CASTRO, 2004), porém, estudos farmacológicos com essa espécie ainda são raros, sendo encontrado na literatura, até então, confirmação de atividade antileishmania com o extrato etanólico do caule da *Tocoyena hispidula* Standl., das frações: Clorofórmica (CHCl_3), Acetato de etila (AcOEt) e Metanólica (MeOH) e dos compostos Chelidonato de metila e Morindolídeo isolados do extrato etanólico do caule (SOUSA et al., 2018).

Figura 6. Espécie *Tocoyena hispidula* Standl.



Fonte: adaptado de Sousa et al., (2018)

Conforme descrito por Sousa e colaboradores (2018), grupo de trabalho que realizou a obtenção do extrato etanólico do caule de *T. hispidula* Standl. (Th-EtIOHcc) utilizado no presente estudo, o fracionamento cromatográfico do sobrenadante do extrato etanólico forneceu as frações hexânica (50 mg; 0,15%), CHCl₃ (2,8 g; 7,70%), AcOEt (3,6 g; 9,90%) e MeOH (26,6 g; 72,90%) e algumas substâncias foram isoladas e identificadas das mesmas.

A fração CHCl₃, depois de submetida a procedimentos cromatográficos clássicos, resultou no isolamento e identificação de compostos puros: lupenona, ácido acetiloleanólico, lapachol, chelidonato de metila, morindolideo, e quatro misturas de isoprenoides (M1-M4): M1(constituída por triterpenoides e esteroides esterificados com ácidos graxos, entre os quais: palmitato, margarato, linoleato, oleato e estearato de multiflorenila, lupeila, sitosterila e estigmasterila); M2 (composta pelos triterpenoides pentacíclicos: lupeol, taraxerol, germanicol, β-amirina e o diterpenoide: *E*-fitol). M3 (formada pelos esteroides: 3β-OH sitosterol, estigmasterol, campesterol, campestanol, Δ²²-stigmastenol, e sitostanol). M4 (7-cetositosterol e 7-cetoestigmasterol) (SOUSA et al., 2018).

A partir da fração MeOH foram isolados e identificados o iridoide 6α-hidroxigeniposídeo e a saponina triterpênica 3-*O*-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-β-D-glicopiranosil-oleanato de 28-*O*-β-D-glicopiranosil-(1→6)-β-D-glicopiranosila também foi feito o isolamento e identificação parcial de uma saponina, de esqueleto oleanano com duas unidades de açúcar (glicose e ramnose), faltando definir a posição da ramnose se estaria em C-19, C-21 ou C-22 (SOUSA, 2018).

A busca por medicamentos gastroprotetores oriundos de plantas medicinais representa uma vasta alternativa ainda a ser explorada. Por conseguinte, observa-se a necessidade crescente de pesquisas que identifiquem as propriedades farmacológicas das plantas, a fim de encontrar novas alternativas terapêuticas que apresentem eficácia, ausência de efeitos adversos graves. Logo, destacando-se as inúmeras atividades apresentadas pelas espécies da família Rubiaceae e gênero *Tocoyena*, bem como a importância etnobotânica e a escassez de pesquisa com a espécie *Tocoyena hispidula* Standl, um estudo para avaliar a toxicidade e a possível atividade gastroprotetora e cicatrizante dessa espécie mostra-se oportuno e justificado.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a toxicidade e o possível efeito gastroprotetor e cicatrizante do extrato etanólico do caule da *Tocoyena hispidula* Standl. (Th-EtOHcc) em modelos de lesões gástricas em roedores.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Investigar toxicidade aguda e subcrônica do Th-EtOHcc, bem como determinar a DL50 do mesmo;
- ✓ Investigar o efeito do Th-EtOHcc na proteção da mucosa gástrica em modelo agudo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos e isquemia e reperfusão em ratas;
- ✓ Verificar a ação anti-inflamatória do Th-EtOHcc no estômago através da dosagem de citocinas (TNF- α e IL1- β) em modelo de lesão induzida por isquemia e reperfusão;
- ✓ Determinar a influência do Th-EtOHcc na secreção de muco no estômago;
- ✓ Investigar o efeito do Th-EtOHcc e de sua fração metanólica (Th-MeOHcc) na cicatrização em modelo de úlcera gástrica crônica em ratas.
- ✓ Avaliar o efeito do Th-EtOHcc e Th-MeOHcc sobre a regeneração tecidual em modelo de lesão gástrica induzida por ácido acético, através das análises histológicas.
- ✓ Investigar mecanismo envolvido no efeito cicatrizante apresentado por Th-EtOHcc e Th-MeOHcc através da deposição de fibras de colágeno em modelo de lesão gástrica induzida por ácido acético.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

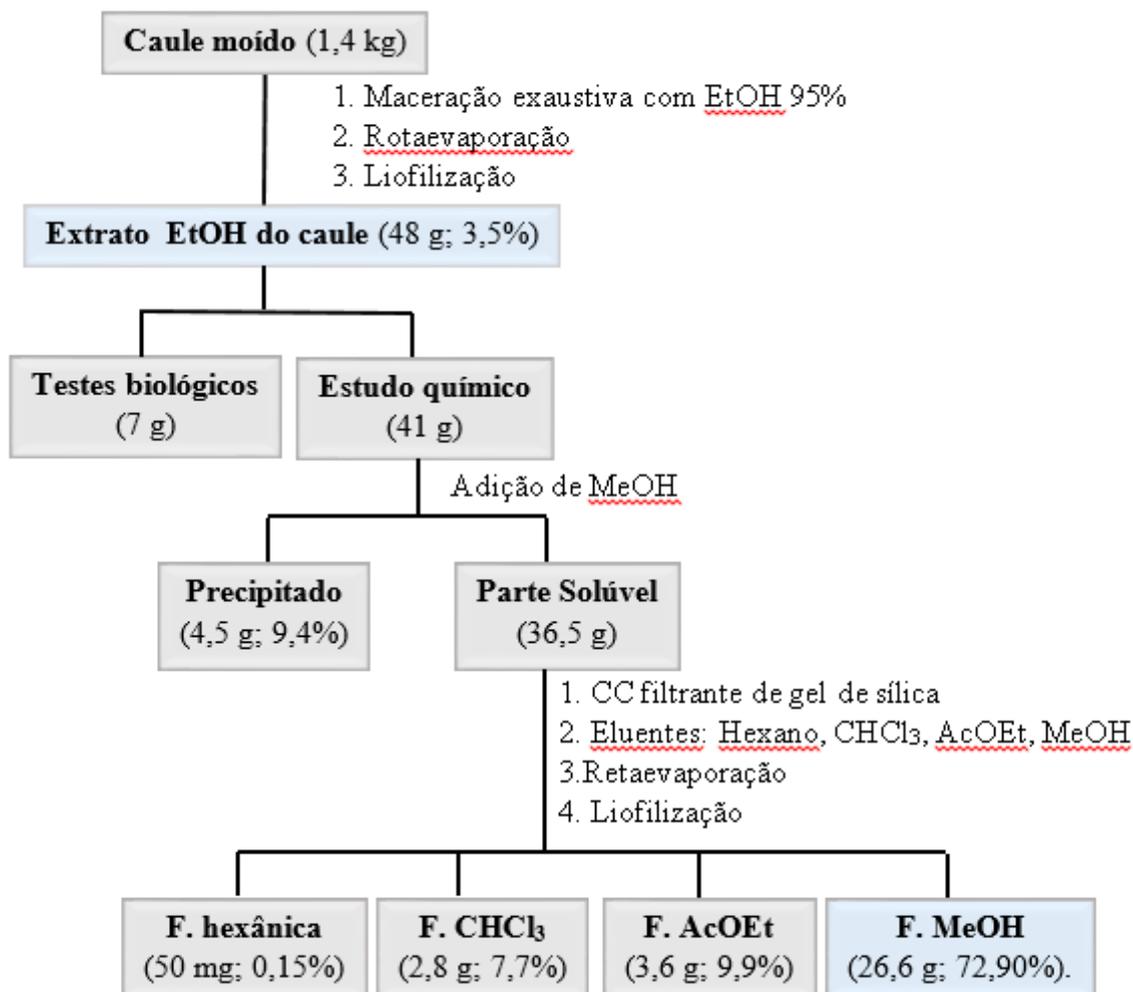
O caule de *Tocoyena hispidula* Standl foi coletado na cidade Jatobá do Piauí, na fazenda Lourdes (504°51'32,4" w042°03'42,9" altitude 154m), em 31 de maio de 2015. A espécie foi identificada pela Botânica Dra. Ruth Raquel Soares de Farias do Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade Federal do Piauí. Uma exsicata encontra-se depositada no Herbário Graziela Barroso da UFPI, com o código: TEPB 30.572.

3.2 Obtenção do extrato etanólico (Th-EtOHcc) e Fração metanólica (Th-MeOHcc) do caule de *Tocoyena hispidula* Standl

Th-EtOH e Th-MeOH utilizados na pesquisa foram fornecidos pelo grupo de pesquisa coordenado pela Prof^a Dra. Mariana Helena Chaves do Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade Federal do Piauí.

O caule foi seco à temperatura ambiente e triturado em moinho de facas. O material obtido (1,4 kg) foi submetido à maceração exaustiva com etanol (95%) à temperatura ambiente. A cada extração, os extratos foram concentrados em evaporador rotativo, e ao final reunidos e liofilizados, obtendo-se o Th-EtOHcc (48 g; 3,5%). Uma alíquota de 41 g do extrato foi solubilizada em MeOH, e a parte solúvel (36,5 g) foi submetida à cromatografia em coluna filtrante de gel de sílica, utilizando MeOH como eluente, fornecendo a fração Th-MeOHcc (26,6 g; 72,9%).

Figura 7. Fluxograma da obtenção do extrato etanólico (Th-EtOHcc) e fração metanólica (Th-MeOHcc) do caule de *Tocoyena hispidula* Standl



Fonte: adaptado de Sousa, (2017).

3.3 Animais

Foram utilizados para os experimentos, camundongos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss* machos e fêmeas com aproximadamente 2 meses de idade e com peso variando entre 30 a 35 g, ou ratos (*Ratus norvegicus*, linhagem *Wistar*), fêmeas, pesando de 180 a 250 g, provenientes do Biotério Setorial da Universidade Federal do Piauí. Os animais receberam água e dieta *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura (22 ± 2 °C). Os experimentos foram realizados após 18 horas de jejum de sólidos dos animais que foram climatizados por 2 horas no local teste antes de cada experimento. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí, sob parecer CEUA: 413/17.

O uso de animais seguiu os princípios e normas para utilização de animais em projetos de pesquisa e todos os procedimentos experimentais do projeto foram submetidos ao Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPI (CEUA/UFPI). Os procedimentos referentes à eutanásia dos animais foram realizados em consonância com Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.4 Toxicidade oral do extrato etanólico (Th-EtOHcc) do caule de *Tocoyena hispidula* Standl

3.4.1 Toxicidade oral aguda, dose única, em camundongos *Swiss*

O estudo de toxicidade foi conduzido de acordo com a diretriz aceita internacionalmente Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico 420 (OECD 420) (OECD, 2001).

Para este teste, foram utilizados 5 machos e 5 fêmeas de camundongos *Swiss*, em cada grupo, que após 4 horas de jejum, receberam dose oral única (2000 mg/kg) por gavagem do Th-EtOHcc. O grupo controle recebeu apenas veículo (10 mL/kg de solução salina a 0,9%) para estabelecer um comparativo (OECD, 2008). Os animais ficaram sob observação durante as primeiras 4 h após o tratamento, 3 vezes ao dia nos 3 primeiros dias consecutivos ao tratamento e uma vez nos demais dias até um total de 14 dias. O consumo de alimentos e água, e o peso dos animais, foram mensurados diariamente (OECD, 2008). Após o período de observação, os animais foram anestesiados com associação de cetamina e xilazina (50 mg/kg e 5 mg/kg i.m., respectivamente), o sangue foi retirado pelo plexo retro-orbital e posteriormente foi realizada a avaliação de parâmetros bioquímicos: Glicose, Creatinina, Uréia, Lactato Desidrogenase (LDH), Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT), Proteínas Totais (P. Totais), Colesterol, Triglicerídeos, lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de alta densidade (HDL), Bilirrubina Direta (BD), Bilirrubina Total (BT), Fosfatase Alcalina (ALP), Ácido Úrico, Gama Glutamil Transferase (Gama-GT) e Albumina; o fígado, rins, baço, coração, pulmão, intestino e estômago foram removidos, pesados e observados macroscopicamente; e, os órgãos, fígado, rins, coração, estômago e intestino foram analisados microscopicamente em lâmina histológica, corados com hematoxilina e eosina.

3.4.2 Análise histológica do coração, fígado, rins, intestino e estômago dos animais submetidos ao protocolo de toxicidade aguda

Após as avaliações realizadas no protocolo anterior os órgãos foram fixados em formalina tamponada (10%, pH entre 6,8 e 7,4) e emblocados em parafina. Os blocos de parafina foram cortados, os cortes com espessura de 5 µm foram fixados em lâminas histológicas e em seguida corados com hematoxilina e eosina (H&E) para avaliação microscópica. As lâminas foram examinadas com auxílio de um microscópio óptico com câmera acoplada para obtenção das fotomicrografias com aumento de 10X e 40X. Todas as análises foram realizadas por patologista experiente sem conhecimento prévio dos grupos, para evitar interferência nos resultados.

3.4.3 Avaliação do efeito do Th-EtOHcc e Th-MeOHcc, após tratamento de 7 dias, sobre peso dos órgãos, parâmetros bioquímicos e peso dos animais no protocolo de lesão gástrica induzida por ácido acético 80%

Foi avaliada possíveis alterações fisiológicas indicativas de toxicidade pela exposição diária de ratas Wistar a dose de 1, 10 e 50 mg/kg durante 7 dias de tratamento dos animais submetidos ao protocolo de úlcera gástrica induzida por ácido acético (subitem 3.7.1.) A cada 2 dias, foi mensurado o peso dos animais, no 8º dia, os animais foram anestesiados com associação de cetamina e xilazina (50 mg/kg e 5,0 mg/kg i.m., respectivamente), o sangue foi retirado pelo plexo retro-orbital e posteriormente foi realizada a avaliação de parâmetros bioquímicos, bem como a remoção, pesagem e observação macroscópica de órgãos vitais.

3.5 Avaliação da atividade antiulcerogênica de Th-EtOHcc

3.5.1 Lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos Swiss

Os animais foram divididos em 5 grupos e pré-tratados por via oral com veículo (10 mL/kg, salina 0,9%), Th-EtOHcc (1, 10 e 50 mg/kg) ou carbenoxolona (100 mg/kg) 60 minutos antes da administração oral do agente ulcerogênico: etanol absoluto (ROBERT et al., 1979) em um volume de 0,2 mL por animal. Após 30 minutos da administração de etanol absoluto, os animais foram eutanasiados com lidocaína (10 mg/kg, i.p.) e sobredose de tiopental sódico (150 mg/kg, i.p.) para remoção de seus estômagos, que foram abertos pela grande curvatura, lavados em solução salina 0,9% e comprimidos entre dois vidros de relógio para uma melhor visualização. O contorno das lesões no corpo do estômago foi traçado em película transparente

através de um marcador de ponta de feltro, conforme descrito por Iwata et al. (1997). O percentual da face glandular gástrica lesionada foi determinado com o auxílio de um programa de planimetria computadorizada (ImageJ®) e a área ulcerada foi expressa em termos de percentagem em relação à área total do corpo gástrico (BHARGAVA; GUPTA; TANGRI, 1973). Em seguida, foi também calculado o percentual de proteção (PP) a partir da fórmula: $PP = \frac{AU_v - AU_t}{AU_v} \times 100$, onde AU_v é a área ulcerada do veículo e AU_t é a área ulcerada do grupo tratado.

3.5.2 Lesões gástricas induzidas por isquemia e reperfusão em ratos Wistar.

Os animais foram divididos em 5 grupos e tratados por via oral com o veículo (10 mL/kg, salina 0,9%), Th-EtOHcc (1, 10 e 50 mg/kg) ou N-acetilcisteína (NAC 200 mg/kg) e após 30 min os animais foram anestesiados com associação de cetamina e xilazina (50 mg/kg e 5,0 mg/kg, i.m., respectivamente). Sob efeito da anestesia, a cavidade abdominal dos animais foi aberta por laparotomia e os mesmos foram submetidos a 30 minutos de isquemia induzida pela oclusão da artéria celíaca por um “clamp” microvascular e seguido por uma reperfusão de 1 h de acordo com o método adaptado de Ueda e colaboradores (1989). A seguir, os animais foram eutanasiados, seus estômagos removidos, abertos ao longo da curvatura maior e a área de lesões gástricas medida por planimetria seguido do cálculo do percentual de proteção como descrito anteriormente (Item 3.5.1 para camundongos)

3.6 Investigação dos possíveis mecanismos de ação gastroprotetores de Th-EtOHcc.

3.6.1 Mensuração dos níveis teciduais de TNF- α e IL-1 β por ELISA.

O ensaio imunoenzimático foi realizado a temperatura ambiente 25 ± 5 °C usando 100 μ L de cada componente da reação. O TNF α e a IL-1 β foram avaliados por meio de kit padrão (R&D Systems, Inc) conforme diretrizes do produto. Os anticorpos e demais substratos foram diluídos em BSA (Albumina Sérica Bovina Isolada 1 % em PBS pH 7,4). As amostras foram homogenizadas, também, em BSA. As placas foram lavadas três vezes com solução de lavagem PBS pH 7,4 + 0,05 % de Tween 20 entre as etapas.

Para realização do ELISA, revestiu-se cada poço da placa com a concentração ótima do anticorpo de captura pela incubação em overnight (temperatura ambiente 25 ± 5 °C). Após bloqueio com BSA por 1 h, seguido de lavagem, as amostras e padrões foram distribuídos em duplicata e incubados por 2 h. Após lavagem, adicionou-se o anticorpo biotilado de detecção e incubou-se por 2 h. Decorrido o tempo de incubação e sucedido de lavagem, a estreptoavidina

foi incubada durante 20 minutos (sucido de lavagem) e então a reação foi revelada pela incubação por 20 min a temperatura ambiente (e ao abrigo da luz), do substrato cromogênico TMB (tetrametilbenzidina + peróxido de hidrogênio), seguida de adição de inibidor da reação (H_2SO_4 1M 50 μL). A leitura foi realizada no comprimento de onda de 450 nm em espectrofotômetro de microplacas e os dados foram calculados a partir da curva dos padrões em concentração seriada, sendo os resultados expressos em pg/mL.

3.6.2 Determinação do conteúdo de muco na parede gástrica

Os animais foram divididos em 3 grupos e anestesiados com associação de cetamina e xilazina (50 mg/kg e 5,0 mg/kg i.m., respectivamente), sob efeito da anestesia, a cavidade abdominal dos animais foi aberta por laparotomia e todos foram submetidos a ligadura do piloro conforme o método descrito por Shay e colaboradores. (1945). Fez-se a administração intraduodenal do veículo (10 mL/kg, salina 0,9%), Th-EtOHcc (10 mg/kg) ou carbenoxolona (100 mg/kg). Após 4 h, os animais foram eutanasiados e os estômagos retirados e abertos pela grande curvatura. O muco da parede gástrica foi determinado pelo método descrito por Corne et al. (1974). Segmentos glandulares dos estômagos foram pesados e transferidos para 7 mL de solução de Alcian blue 0,1% (acetato de sódio/HCl 0,05 M, pH 5,8 em solução aquosa de sacarose 0,16 M) e incubados por 2 h em temperatura ambiente. O corante livre foi retirado através de duas lavagens sucessivas de 15 e 45 min em solução aquosa de sacarose 0,25 M. O corante aderido ao muco da parede gástrica foi extraído por imersão em 5 mL de cloreto de magnésio 0,5 M por 2 h com 1 min de agitação a cada 30 min. Em seguida, uma amostra de 3,5 mL do extrato azul foi agitada vigorosamente com volume igual de éter etílico e a emulsão resultante foi centrifugada a 3.500 rpm/10 min. A fase aquosa foi separada e a absorbância de cada amostra foi lida a 598 nm em um espectrofotômetro visível. A quantidade de mucina foi expressa em μg do Alcian blue extraído por peso (g) de tecido glandular do estômago.

3.7 Avaliação da atividade antiulcerogênica e cicatrizante de Th-EtOHcc e Th-MeOHcc

3.7.1 Úlcera gástrica induzida por ácido acético em ratas *Wistar*

Previamente anestesiados com associação de cetamina e xilazina (50 mg/kg e 5,0 mg/kg i.m., respectivamente), os animais foram submetidos a processo cirúrgico para indução de úlcera gástrica usando o ácido acético (80%) como agente indutor. A área lesada foi delimitada utilizando um tubo de vidro de 8 mm de diâmetro e 2 cm de altura, em contato com a serosa do estômago. Foi adicionado o ácido acético (70 μL), e este permaneceu em contato com a serosa do estômago por 1 minuto. Em seguida, o ácido acético foi removido com a ajuda

de uma pipeta automática e o local foi lavado com solução salina 0,9%. O estômago foi acomodado na cavidade abdominal e esta última suturada (OKABE; PFEIFFER, 1972).

Os animais foram divididos em 6 grupos. O tratamento foi realizado por via oral com o veículo (10 mL/kg, salina 0,9%), Th-EtOHcc (1, 10 e 50 mg/kg), Th-MeOHcc (50 mg/kg) ou Cimetidina (200 mg/kg), a partir do primeiro dia após indução da úlcera e seguiu até o 7º dia. Os animais foram eutanasiados no 8º dia com lidocaína (10 mg/kg, i.p.) e sobredose de tiopental sódico (150 mg/kg, i.p.) para remoção de seus estômagos, que foram abertos pela grande curvatura, lavados com água destilada e realizada a mensuração do volume ulcerado com auxílio de um paquímetro. A mensuração do volume lesado (mm^3) foi realizada através da medida do comprimento x altura x profundidade da úlcera (POTRICH et al., 2009). Posteriormente foi avaliado o Índice de cicatrização (IC) através da fórmula: $\text{IC} = (\text{VUv} - \text{VUt}) / \text{VUv} \times 100$, onde VUv representa o volume da úlcera em animais do grupo veículo e VUt representa o volume da úlcera em animais tratados.

3.7.2 Análise histológica das lesões gástricas induzidas por ácido acético

Para avaliação histológica, adicionou-se um grupo Sham, com animais que não receberam tratamento e nem sofreram lesão gástrica. Após as avaliações realizadas no protocolo anterior a área glandular dos estômagos foi retirada, fixada em formalina tamponada (10%, pH entre 6,8 e 7,4) e mantidas durante 24 horas. Após a fixação, as amostras foram transferidas para uma solução de álcool 70%. O material foi em seguida emblocado em parafina. Os blocos de parafina foram cortados, os cortes com espessura de 5 μm foram fixados em lâminas histológicas, em seguida corados com hematoxilina e eosina (H&E) para avaliação microscópica. As lâminas foram examinadas com auxílio de um microscópio óptico com câmera acoplada para obtenção das fotomicrografias com aumento de 4X, 10X e 40X. O dano microscópico gástrico foi pontuado de forma semi-quantitativa, usando uma escala de 0-3 (0, negativo; 1, fraco; 2, moderado; 3, forte) de acordo com os critérios descritos por Laine e Weinstein (1988) com modificações feitas por Mahmoud e El-Ghffar (2019). Resumidamente, cada seção histológica foi examinada para erosão epitelial (escore: 0-3), edema na submucosa (escore: 0-3), dano hemorrágico (escore: 0-3) e presença de células inflamatórias (escore: 0-3), resultando em um escore total máximo de 12. Todas as análises foram realizadas por patologista experiente sem conhecimento prévio dos grupos, para evitar interferência nos resultados.

3.8 Investigação dos possíveis mecanismos de ação cicatrizante do Th-EtOHcc e Th-MeOHcc.

3.8.1 Mensuração da deposição de colágeno na mucosa gástrica das lesões induzidas por ácido acético

A lesão gástrica emblocada em parafina proveniente do protocolo descrito no item anterior (3.8.1), foi cortada em micrótomo com espessura de 5 μm . Os cortes foram fixados em lâminas histológicas, desparafinizados com xilol, hidratados com álcoois, coradas com solução de picosirius (Direct Red 80 e ácido pícrico 1,3%) por 60 minutos e finalmente foram desidratados e as lâminas foram montadas com Bálsamo do Canadá. A análise das lâminas foi realizada com auxílio de microscópio óptico para obtenção das imagens com aumento de 10X (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979). A porcentagem das fibras de colágeno marcadas foi quantificada usando o sistema de deconvolução do ImageJ software (1.43). Para isso, foram analisadas três lâminas de cada grupo e de cada lâmina foram fotografados 3 campos diferentes para análise. Os resultados foram expressos como porcentagem (%) de fibras de colágeno em relação a área total da fotografia.

3.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Para as análises comparativas, as diferenças entre os grupos foram calculadas através do teste paramétrico t Studente com pós-teste Two-tailed quando havia apenas 2 grupos distintos, ou *One way* ANOVA e pós-teste de Tukey, quando havia mais de 2 grupos distintos. Para teste não paramétrico as diferenças entre os grupos foram calculadas utilizando o teste de Kruskal Wallis com pós teste de Dun. Utilizou-se o *software GraphPad Prism* (versão 7.0) sendo consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Toxicidade oral do extrato etanólico (Th-EtOHcc) do caule de *Tocoyena hispidula* Standl

4.1.1 Toxicidade oral aguda, dose única, em camundongos *Swiss*

Não houve morte ou sinal de toxicidade durante o período de observação de catorze dias dos animais tratados com dose única de 2000 mg/kg de Th-EtOHcc (**Tabela 1**). O peso corporal, e o consumo de água e ração não apresentaram diferença significativa quando comparado ao grupo controle em ambos os sexos (**Tabela 2**).

Os órgãos, macroscopicamente, não apresentaram alterações morfológicas que pudessem ser atribuídas ao tratamento com Th-EtOHcc. Também não apresentaram diferença significativa de peso, com relação ao controle (**Tabela 3**). Microscopicamente, não foram observadas alterações nos grupos tratados, exceto, por esteatose hepática microgoticular no grupo das fêmeas (**Figura 8 e 9**).

Com relação aos parâmetros bioquímicos, as alterações observadas nos grupos tratados foram: no grupo dos machos, aumento de ALT ($p < 0,05$) e diminuição de Colesterol Total ($p < 0,05$) e HDL ($p < 0,01$), enquanto que no grupo das fêmeas, aumento dos níveis de Colesterol Total ($p < 0,01$) e HDL ($p < 0,01$) e diminuição dos níveis de LDH ($p < 0,05$) e AST ($p < 0,05$). Os demais parâmetros bioquímicos analisados, não apresentaram diferença significativa comparados ao controle (**Tabela 4**).

Tabela 1. Parâmetros clínico-comportamentais da análise da toxicidade aguda observados em camundongos sob tratamento com dose de 2000 mg/kg de Th-EtOHcc na primeiras quatro horas após o tratamento.

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	TEMPO (min.)				
	30	60	120	180	240
ESTIMULANTE					
Hiperatividade	0	0	0	0	0
Agressividade	0	0	0	0	0
Tremores	0	0	0	0	0
Convulsão	0	0	0	0	0
Piloereção	0	0	0	0	0
DEPRESSORA					
Ptose palpebral	0	0	0	0	0
Sedação	0	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0	0
Ataxia	0	0	0	0	0
Reflexo de endireitamento	0	0	0	0	0
Catatonía	0	0	0	0	0
Analgesia	0	0	0	0	0
Perda do reflexo palpebral	0	0	0	0	0
Perda do reflexo auricular	0	0	0	0	0
SISTEMA NERVOSO AUTONÔMICO					
Diarréia	0	0	0	0	0
Constipação	0	0	0	0	0
Lacrimajamento	0	0	0	0	0
Salivação	0	0	0	0	0
Cianose	0	0	0	0	0
OUTROS COMPORTAMENTOS					
Ambulação	0	0	0	0	0
Autolimpeza	0	0	0	0	0
Levantar	0	0	0	0	0
Escalar	0	0	0	0	0
Vocalização	0	0	0	0	0
Contorções abdominais	0	0	0	0	0
MORTE	0	0	0	0	0

(0) Ausência da característica; (+) Característica aumentada; (-) Característica diminuída.

Tabela 2. Ganho de peso corporal e consumo de alimentos e água de camundongos *Swiss* sob tratamento agudo com dose de 2000 mg/kg de Th-EtOHcc.

Parâmetros	Fêmeas		Machos	
	Controle	Th-EtOHcc	Controle	Th-EtOHcc
Peso Inicial (g)	35 ± 1,23	34,4 ± 0,98	37,4 ± 0,81	35 ± 1,14
Peso Final (g)	35,6 ± 1,03	35 ± 1,38	40,2 ± 0,86	39,4 ± 1,29
Ganho de peso (%)	1 ± 0,32	1,4 ± 0,75	2,8 ± 0,2	4,4 ± 0,87
Ingestão de alimentos (g/dia)	28,77 ± 1,55	25,54 ± 2,19	31,15 ± 0,72	31,38 ± 0,94
Ingestão de água (mL/dia)	34,92 ± 3,49	30,38 ± 5,4	48,69 ± 3,82	55,69 ± 4,58

Os dados estão expressos como média ± E.P.M. (t Student com pós-teste Two-tailed), * $p < 0,05$, comparados ao grupo controle.

Tabela 3. Peso relativo dos órgãos (g/100 g de peso corporal) de camundongos *Swiss* sob tratamento agudo com dose de 2000 mg/kg de Th-EtOHcc.

Órgãos	Fêmeas		Machos	
	Controle	Th-EtOHcc	Controle	Th-EtOHcc
Estômago	0,85 ± 0,05	0,76 ± 0,03	0,72 ± 0,04	0,75 ± 0,02
Intestino	6,05 ± 0,23	5,03 ± 0,12	5,10 ± 0,20	5,19 ± 0,26
Fígado	3,66 ± 0,20	3,84 ± 0,15	4,62 ± 0,10	4,25 ± 0,16
Baço	0,31 ± 0,01	0,33 ± 0,04	0,42 ± 0,01	0,44 ± 0,03
Rins	1,25 ± 0,06	1,12 ± 0,04	1,49 ± 0,08	1,39 ± 0,04
Coração	0,46 ± 0,02	0,43 ± 0,03	0,58 ± 0,02	0,43 ± 0,01
Pulmão	0,59 ± 0,03	0,67 ± 0,07	0,75 ± 0,07	0,70 ± 0,05

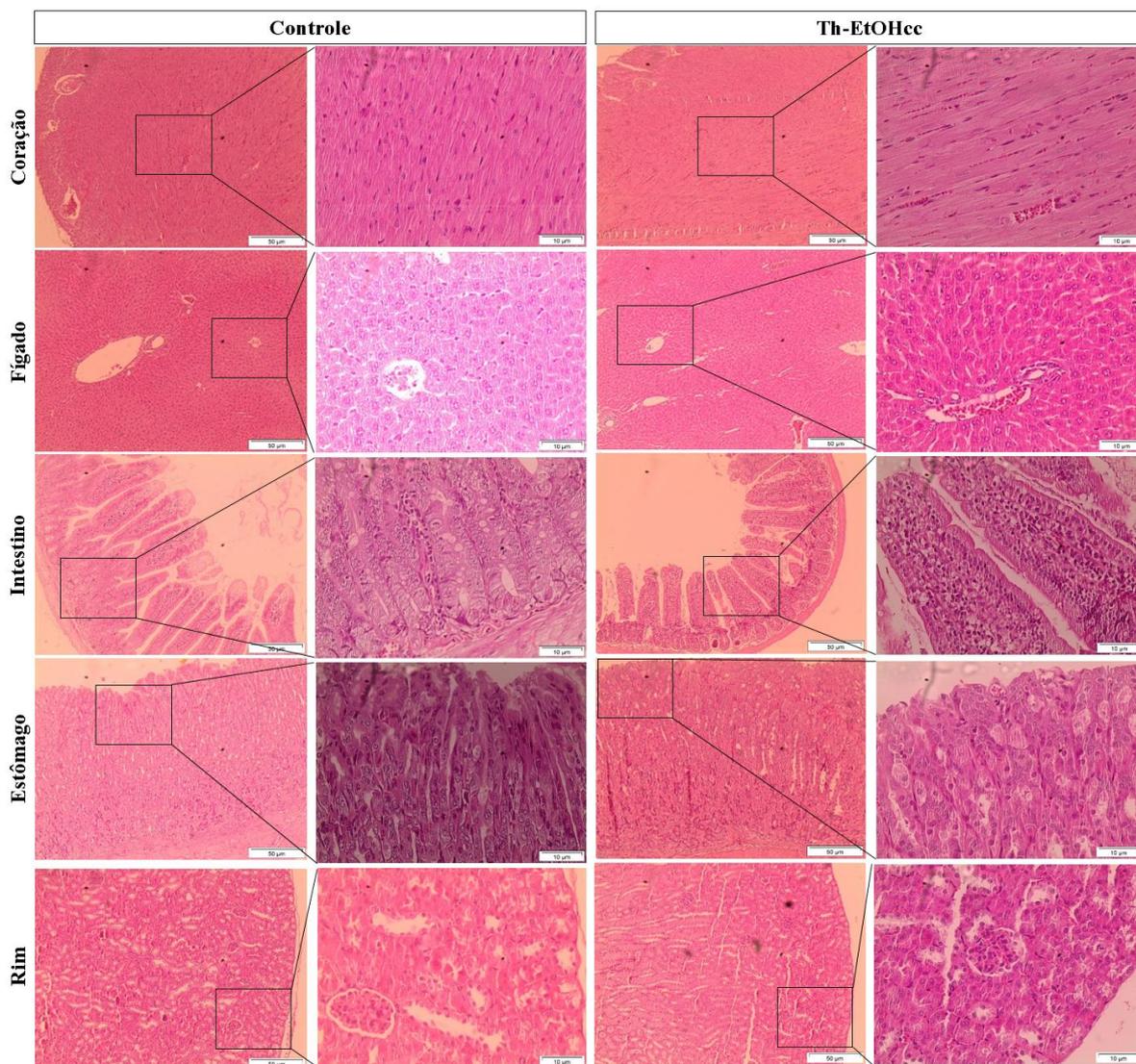
Os dados estão expressos como média ± E.P.M. (t Student com pós-teste Two-tailed), * $p < 0,05$, comparados ao grupo controle.

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos do tratamento agudo de camundongos *Swiss* com dose de 2000 mg/kg de Th-EtOHcc.

Parâmetros	Fêmeas		Machos	
	Controle	Th-EtOHcc	Controle	Th-EtOHcc
Glicose (mg/dL)	145,6 ± 21,53	149 ± 11,83	173,4 ± 16,23	130,4 ± 20,28
Creatinina (mg/dL)	0,34 ± 0,05	0,31 ± 0,01	0,32 ± 0,02	0,29 ± 0,01
Uréia (mg/dL)	47,6 ± 3,83	56,8 ± 1,63	61,2 ± 2,78	65,4 ± 2,21
LDH (U/L)	3843 ± 943,3	1421 ± 104,9 *	7183 ± 175,4	6514 ± 310,9
AST (U/L)	120,2 ± 12,46	86,6 ± 5,78 *	181,6 ± 7,75	255,8 ± 55,64
ALT (U/L)	45,4 ± 3,42	44 ± 3,70	39 ± 4,46	65,6 ± 7,5 *
P. Totais (g/dL)	5,92 ± 0,22	5,76 ± 0,1	5,69 ± 0,13	5,73 ± 0,2
CT (mg/dL)	80,6 ± 2,21	109,6 ± 6,21*	110,8 ± 6,42	93,8 ± 3,34 *
Triglic. (mg/dL)	48,2 ± 3,6	62 ± 6,95	52,2 ± 5,43	43,4 ± 2,99
LDL (mg/dL)	17,76 ± 3,77	17,2 ± 4,78	21,75 ± 5,29	16,32 ± 4,18
HDL (mg/dL)	53,2 ± 4,13	74,5 ± 4,27 *	81,5 ± 2,87	68,8 ± 1,5 *
BD (mg/dL)	0,006 ± 0,002	0,013 ± 0,01	0,07 ± 0,03	0,04 ± 0,01
BT (mg/dL)	0,074 ± 0,02	0,09 ± 0,04	0,04 ± 0,01	0,07 ± 0,01
ALP (U/L)	190 ± 7,36	218,2 ± 20,52	162,6 ± 31,28	143 ± 18,35
Ác. Úrico (mg/dL)	0,98 ± 0,11	1,53 ± 0,4	2,3 ± 0,6	1,848 ± 0,455
Gama-GT (U/L)	1,4 ± 0,51	1,25 ± 0,25	0,4 ± 0,68	1,4 ± 0,510
Albumina (g/dL)	2,07 ± 0,04	2,05 ± 0,03	1,81 ± 0,07	1,87 ± 0,044

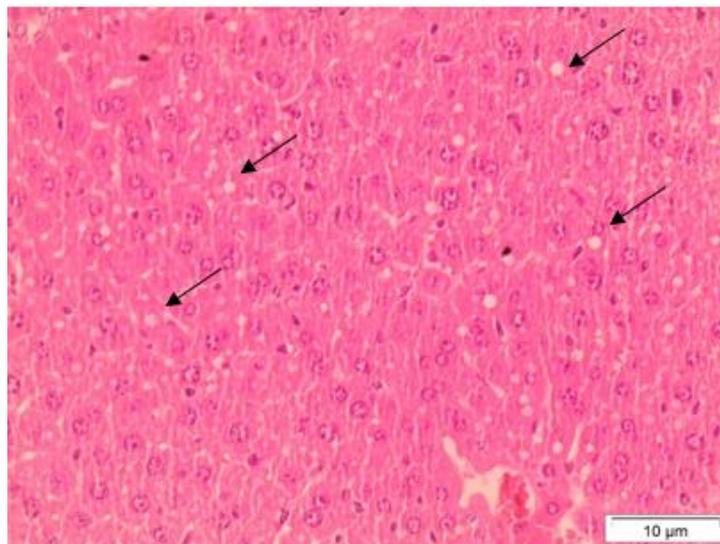
Os dados estão expressos como média ± E.P.M. (t Student com pós-teste Two-tailed), * $p < 0,05$, comparados ao grupo controle. Lactato Desidrogenase (LDH), Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT), Proteínas Totais (P. Totais), Colesterol Total (CT), Triglicerídeos (Triglic.), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de alta densidade (HDL), Bilirrubina Direta (BD), Bilirrubina Total (BT), Fosfatase Alcalina (ALP), Ácido Úrico (Ác. úrico), Gama Glutamil Transferase (Gama-GT).

Figura 8. Estudo histopatológico do tratamento agudo de camundongos *Swiss* com dose de 2000 mg/kg de Th-EtOHcc.



Orgãos do grupo controle (tratado uma única vez com veículo) e do grupo tratado com dose única de Th-EtOHcc 2000 mg/kg, após 14 dias de observação, aumento de 10X e 40X.

Figura 9. Presença de esteatose microgoticular observado no estudo histopatológico do tratamento agudo de camundongos *Swiss* com dose única de 2000 mg/kg de Th-EtOHcc.



Fígado de fêmeas do grupo Th-EtOHcc 2000 mg/kg, após 14 dias de observação, aumento de 40X.

4.1.2 Efeito do Th-EtOHcc e Th-MeOHcc, após tratamento de 7 dias, sobre peso dos órgãos, parâmetros bioquímicos e peso dos animais no protocolo de lesão gástrica induzida por ácido acético 80%

Não houve morte ou sinais de toxicidade durante os sete dias de tratamento diário dos animais com Th-EtOHcc nas doses de 1, 10 e 50 mg/kg ou Th-MeOHcc na dose de 50 mg/kg. Nem alteração no ganho de peso corporal quando comparado ao grupo controle (**Tabela 5**).

Os órgãos, macroscopicamente, assim como no tratamento agudo, também não apresentaram alterações morfológicas que pudessem ser atribuídas ao tratamento ou diferença de peso, com relação ao controle (**Tabela 6**).

Com relação aos parâmetros bioquímicos, não houve alterações relacionadas com o tratamento nas doses apresentadas, exceto por uma diminuição significativa dos níveis de ALP do grupo tratado com Th-MeOHcc 50 mg/kg (**Tabela 7**).

Tabela 5. Ganho de peso corporal de ratas *Wistar* sob tratamento de 7 dias com doses de 1, 10 e 50 mg/kg de Th-EtOHcc e dose de 50 mg/kg de Th-MeOHcc.

Parâmetros	Veículo	Th-EtOHcc	Th-EtOHcc	Th-EtOHcc	Th-MeOHcc
		1	10	50	50
Peso Inicial	211,6 ± 5,11	192,4 ± 6,70	197,2 ± 7,06	219,3 ± 5,46	192,8 ± 7,93
Peso Final	225 ± 5,82	199 ± 6,18	212,8 ± 6,63	228,6 ± 5,03	210,7 ± 6,65
Ganho de Peso (%)	7,18 ± 1,39	4 ± 1,45	8 ± 1,48	6,14 ± 2,63	8,29 ± 1,54

Os dados estão expressos como média ± E.P.M. (ANOVA *one way*, seguido do teste de Tukey), * $p < 0,05$, comparados ao grupo controle.

Tabela 6. Peso relativo dos órgãos (g/100g de peso corporal) de Ratas *Wistar* sob tratamento de 7 dias com doses de 1, 10 e 50 mg/kg de Th-EtOHcc e dose de 50 mg/kg de Th-MeOHcc.

Orgãos	Veículo	Th-EtOHcc 1	Th-EtOHcc	Th-EtOHcc	Th-MeOHcc
			10	50	50
Fígado	3,35 ± 0,09	3,36 ± 0,18	3,23 ± 0,12	3,21 ± 0,17	3,04 ± 0,20
Baço	0,43 ± 0,03	0,43 ± 0,03	0,51 ± 0,03	0,41 ± 0,03	0,41 ± 0,03
Rins	0,79 ± 0,02	0,85 ± 0,02	0,85 ± 0,02	0,81 ± 0,03	0,78 ± 0,03
Coração	0,41 ± 0,02	0,44 ± 0,03	0,39 ± 0,02	0,41 ± 0,03	0,45 ± 0,04
Pulmão	0,82 ± 0,06	0,68 ± 0,03	0,63 ± 0,03	0,65 ± 0,02	0,68 ± 0,03

Os dados estão expressos como média ± E.P.M. (ANOVA *one way*, seguido do teste de Tukey), * $p < 0,05$, comparados ao grupo controle.

Tabela 7. Parâmetros bioquímicos do tratamento de Ratas *Wistar* com doses de 1, 10 e 50 mg/kg de Th-EtOHcc e de 50 mg/kg de Th-MeOHcc.

Parâmetros	Salina	Th-EtOHcc 1	Th-EtOHcc 10	Th-EtOHcc 50	Th-MeOHcc 50
Glicose (mg/dL)	150,8 ± 19,08	146,4 ± 18,89	139,8 ± 6,45	84,5 ± 12,22	126,8 ± 21,94
Creatinina (mg/dL)	0,44 ± 0,02	0,39 ± 0,02	0,29 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,34 ± 0,08
Uréia (mg/dL)	34,4 ± 4,21	30,4 ± 3,76	32,4 ± 1,63	28,6 ± 0,93	29,4 ± 1,36
LDH (U/L)	2616 ± 357,3	2426 ± 442,5	1525 ± 227,4	2484 ± 578,6	1576 ± 269,4
AST (U/L)	188 ± 6,51	184,2 ± 17,05	165,8 ± 12,86	207,2 ± 28,99	135,6 ± 18,84
ALT (U/L)	54,6 ± 3,43	51,4 ± 2,50	56,4 ± 5,35	44,33 ± 5,9	41,4 ± 3,87
P. Totais (g/dL)	7,76 ± 0,09	7,32 ± 0,10	8,31 ± 0,45	8,03 ± 0,04	5,90 ± 1,12
CT (mg/dL)	82,40 ± 7,30	97,80 ± 6,45	90,60 ± 8,20	75,5 ± 10,92	57,2 ± 12,73
Triglicerídeos (mg/dL)	41,25 ± 13,68	51,6 ± 10,8	43,6 ± 3,70	23,8 ± 3,34	27,8 ± 4,27
LDL (mg/dL)	47,2 ± 4,33	58,28 ± 5,03	55,9 ± 8,81	64,33 ± 7,37	33,95 ± 8,84
HDL (mg/dL)	23,4 ± 1,89	29,2 ± 3,64	26,75 ± 4,07	19,75 ± 3,71	24,2 ± 5,30
BD (mg/dL)	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,02
BT (mg/dL)	0,13 ± 0,06	0,06 ± 0,04	0,11 ± 0,03	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,01
ALP (U/L)	270,2 ± 46,45	184,4 ± 25,25	180,6 ± 27,87	169,7 ± 26,66	101,6 ± 21,10 *
Albumina (g/dL)	2,46 ± 0,16	2,50 ± 0,09	2,57 ± 0,15	2,33 ± 0,06	2,06 ± 0,39

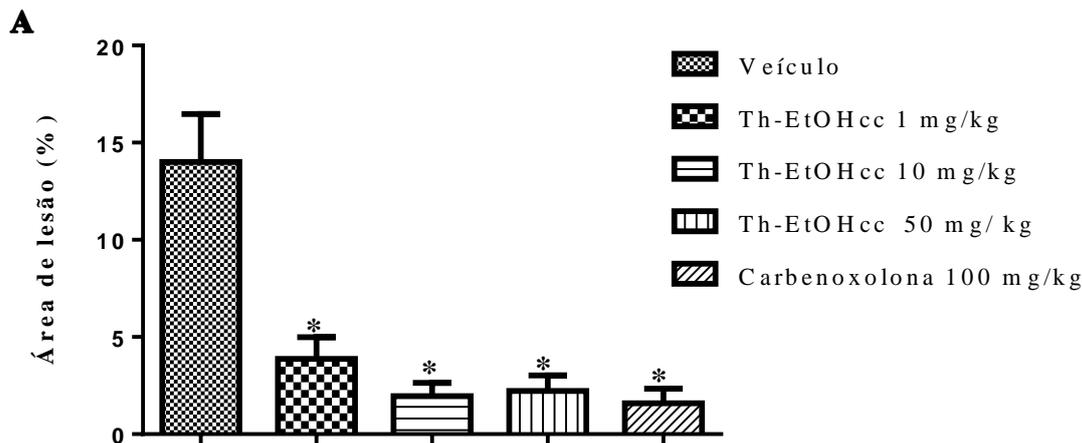
Os dados estão expressos como média ± E.P.M. (ANOVA *one way*, seguido do teste de Tukey), * $p < 0,05$, comparados ao grupo controle. Lactato Desidrogenase (LDH), Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT), Proteínas Totais (P. Totais), Colesterol Total (CT), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de alta densidade (HDL), Bilirrubina Direta (BD), Bilirrubina Total (BT), Fosfatase Alcalina (ALP), Ácido Úrico, Gama Glutamil Transferase (Gama-GT).

4.2 Atividade antiulcerogênica de Th-EtOHcc

4.2.1 Lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos *Swiss*

A administração por via oral do etanol (95%, 0,2 mL/animal), agente ulcerogênico, foi capaz de produzir grande área ulcerada no estômago dos animais pré tratados com veículo (salina 0,9%), provocando danos graves a mucosa gástrica, que se apresentaram, em sua maioria, como lesões hemorrágicas paralelas ao longo do eixo do corpo do estômago. A área de lesão expressa em porcentagem em relação a área total do corpo do estômago do grupo controle foi de $14,02 \pm 2,465$. O Th-EtOHcc apresentou efeito protetor da mucosa em todas as doses testadas nesse modelo: 1 mg/kg ($3,87 \pm 1,12$), 10 mg/kg ($1,96 \pm 0,67$) e 50 mg/kg ($2,22 \pm 0,8$) com percentual da proteção de 72%, 86% e 84%, respectivamente, quando comparados ao grupo tratado com veículo. O grupo pré-tratado com carbenoxolona (100 mg/kg) apresentou área de lesão reduzida para $1,59 \pm 0,75$ com gastroproteção de 89% (**Figura 10**).

Figura 10. (A) Efeito do Th-EtOHcc (1, 10 e 50 mg/kg, v.o), veículo ou carbenoxolona (100 mg/kg) no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos. (B) imagem representava dos estômagos de animais de cada grupo.



Os dados estão expressos como média \pm E.P.M., * $p < 0,05$, comparados ao grupo veículo (ANOVA *one way*, e pós-teste de Tukey).

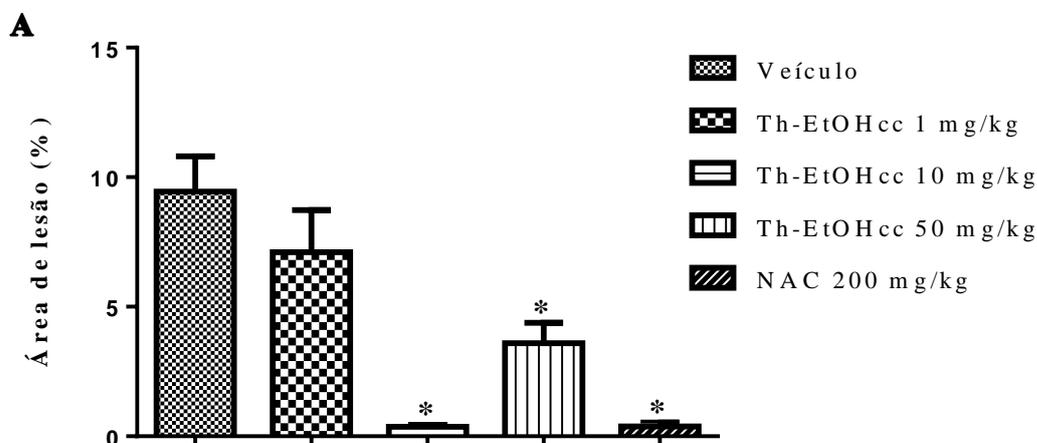
B



4.2.2 Lesões gástricas induzidas por isquemia e reperfusão em ratas *Wistar*.

Nesse modelo, a área de lesão gástrica provocada através da isquemia induzida por oclusão da artéria celíaca, seguida de reperfusão, no grupo veículo foi de $9,44 \pm 1,37$. O Th-EtOHcc apresentou efeito protetor da mucosa gástrica nas doses de 10 mg/kg ($0,37 \pm 0,07$) e 50 mg/kg ($3,59 \pm 0,79$) com gastroproteção de 96% e 61%, respectivamente, quando comparados ao grupo tratado com veículo. A dose de 1 mg/kg ($7,11 \pm 1,62$), não apresentou efeito gastroprotetor. O grupo pré-tratado com N-acetilcisteína (200 mg/kg), padrão antioxidante, apresentou área de lesão reduzida para $0,39 \pm 0,18$ com gastroproteção de 96% (Figura 11).

Figura 11. (A) Efeito do Th-EtOHcc nas doses de 1, 10 e 50 mg/kg e da N-acetilcisteína (NAC) na dose de 200 mg/kg no modelo de lesões gástricas induzidas por isquemia e reperfusão em Ratas. (B) imagem representava dos estômagos de animais de cada grupo.



Os dados estão expressos como média \pm E.P.M., * $p < 0,05$, comparados ao grupo veículo (ANOVA *one way*, e pós-teste de Tukey).

B

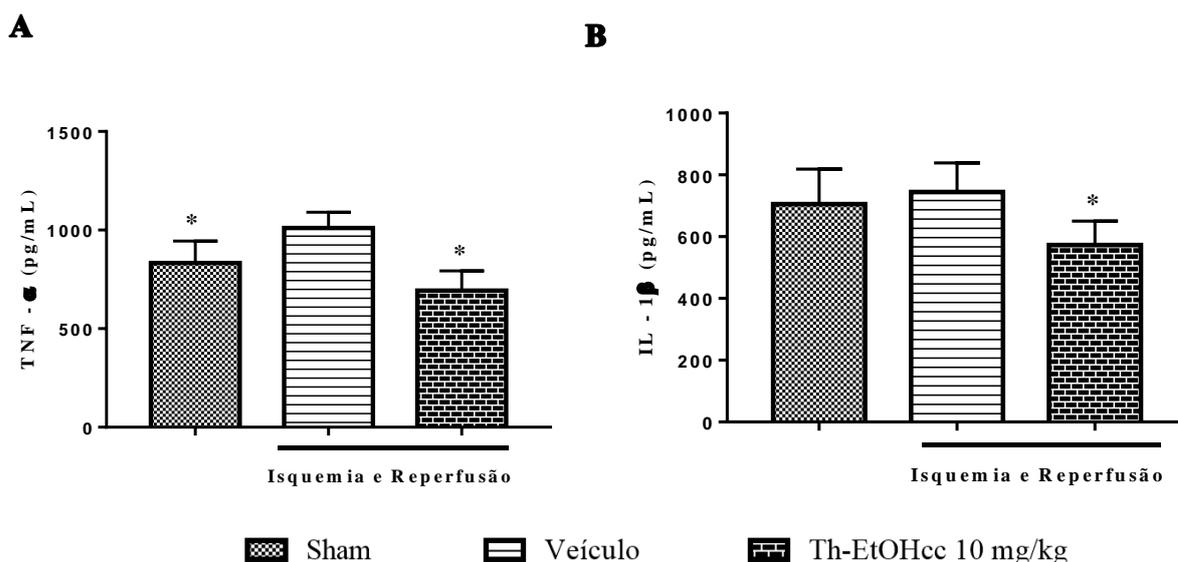


4.3 Determinação dos possíveis mecanismos de ação gastroprotetores do Th-EtOHcc.

4.3.1. Efeito do Th-EtOHcc sobre os níveis teciduais de TNF- α e IL-1 β durante a injúria gástrica ocasionada por I/R.

No grupo que recebeu apenas o veículo, e não sofreu a indução da úlcera (Sham), os níveis de TNF- α e IL-1 β foram de $833,3 \pm 45,55$ e $705,7 \pm 56,53$, respectivamente. A mensuração dos níveis dessas citocinas no grupo que recebeu o veículo e sofreu o procedimento de isquemia e reperfusão, foi de $1011 \pm 32,63$ e $744,5 \pm 42,22$, respectivamente, mostrando que a indução da lesão provocou aumento significativo dos níveis de TNF- α quando comparado ao grupo veículo. O grupo tratado com Th-EtOHcc antes do procedimento de isquemia e reperfusão, claramente mostrou redução significativa de ambas as citocinas com valores de $698,7 \pm 44,78$ para TNF- α e $572,7 \pm 34,9$ para IL-1 β . Esses resultados demonstraram que a Th-EtOHcc reduz os níveis de citocinas do tipo TNF- α e IL-1 β em danos gástricos provocados por isquemia e reperfusão (**Figura 12**).

Figura 12. Efeito do Th-EtOHcc nos níveis de citocinas TNF- α e IL-1 β em ratas com lesões gástricas induzidas por isquemia e reperfusão.

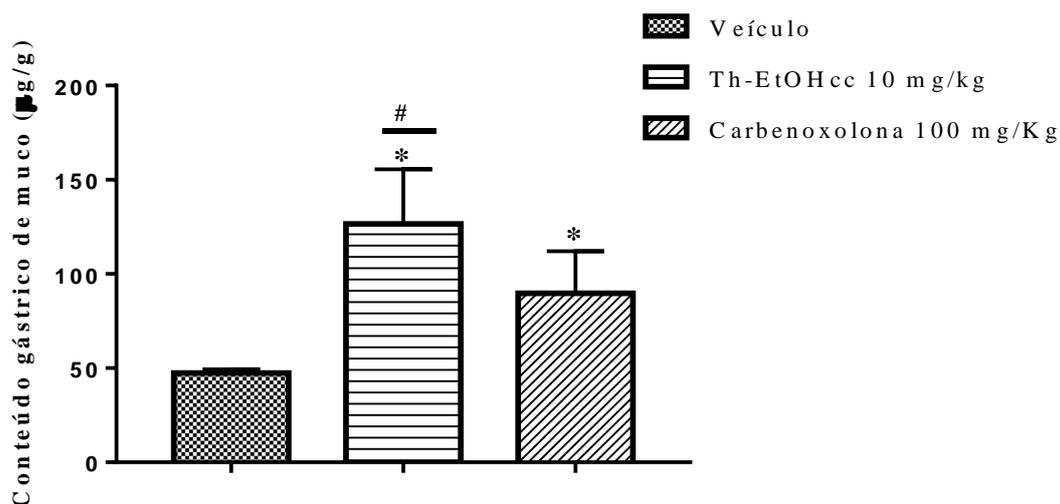


Os dados estão expressos como média \pm E.P.M., * $p < 0.05$, comparados ao grupo veículo (ANOVA *one way*, e pós-teste de Tukey).

4.3.2. Efeito do Th-EtOHcc sobre a produção de Muco Gástrico

A figura 13 mostra o efeito do Th-EtOHcc na dose de 10 mg/kg (v.o) sobre o teor de muco da parede gástrica após quatro horas de ligadura do piloro em ratas. A administração intraduodenal do Th-EtOHcc na dose de 10 mg/kg provocou um aumento significativo de 167% ($126,52 \pm 12,96 \mu\text{g/g}$) na quantidade de muco gástrico quando comparado ao veículo ($47,4 \pm 0,91 \mu\text{g/g}$). A carbenoxolona aumentou a porcentagem de muco gástrico em 89% ($89,76 \pm 9,11 \mu\text{g/g}$) (**Figura 13**).

Figura 14. Efeito do Th-EtOHcc (10 mg/kg) e da carbenoxolona (100 mg/kg) sobre a secreção de muco gástrico em ratas submetidas ao modelo de ligadura do piloro.



Os dados estão expressos como média \pm E.P.M., * $p < 0,05$; comparados ao grupo veículo, # $p < 0,05$ comparado ao grupo carbenoxolona. (ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey).

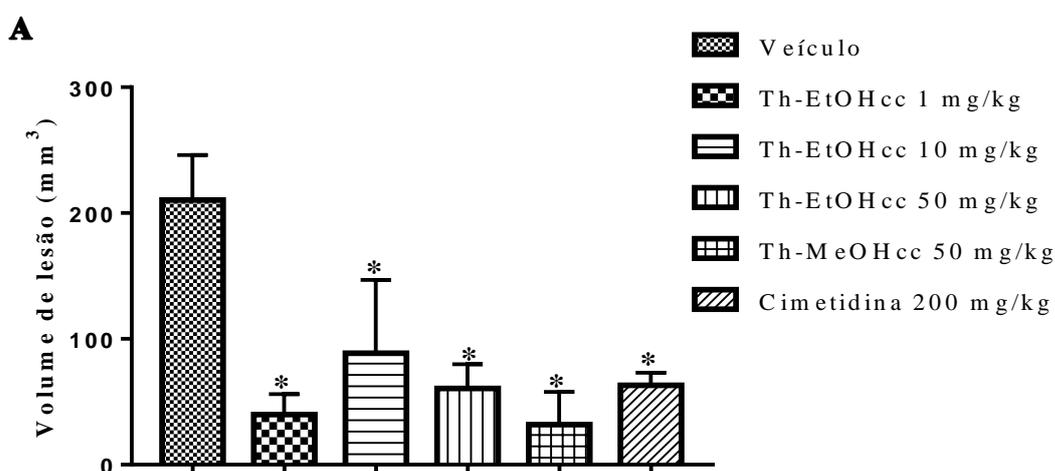
4.4 Atividade antiulcerogênica e cicatrizante de Th-EtOHcc e Th-MeOHcc

4.4.1. Úlceras gástricas induzidas por ácido acético em ratas *Wistar*

O tratamento oral por sete dias consecutivos, no presente modelo, mostrou que Th-EtOHcc e Th-MeOHcc são capazes de acelerar a cicatrização da úlcera gástrica crônica em ratas. Comparado ao grupo veículo ($210,3 \pm 16,05 \text{ mm}^3$), Th-EtOHcc conseguiu diminuir significativamente o volume de lesão ulcerado em todas as doses testadas: 1 mg/kg ($39,89 \pm 9,42$), 10 mg/kg ($88,6 \pm 23,76$) e 50 mg/kg ($60,64 \pm 8,60$), com redução da lesão em 81%, 58% e 71%, respectivamente, em comparação ao grupo veículo. Th-MeOHcc na dose de 50mg/kg ($31,78 \pm 11,63$) reduziu o volume da lesão em 85%, demonstrando efeito cicatrizante. Cimetidina, antagonista de receptores H2 usado no tratamento de úlcera crônica em humanos,

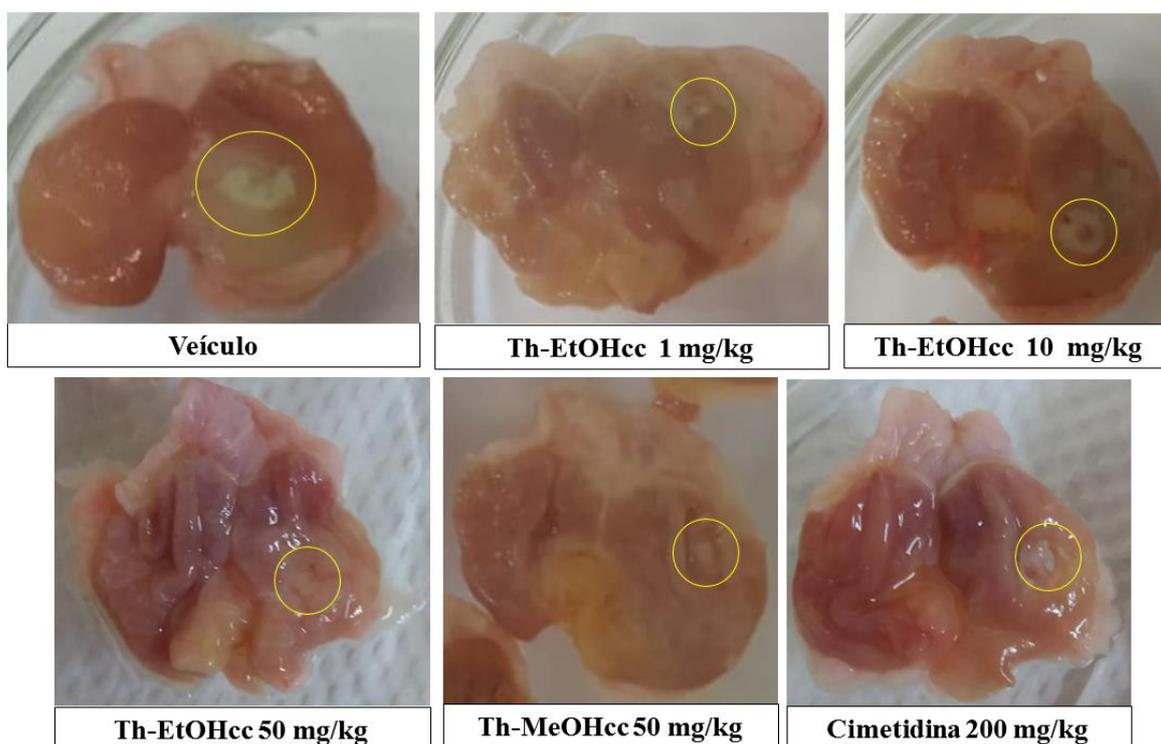
por sua vez reduziu de maneira significativa o volume de lesão em 67% ($63,22 \pm 4,43$) (**Figura 14**).

Figura 14. (A) Efeito do Th-EtOHcc nas doses de 1, 10 e 50 mg/kg, do Th-MeOHcc na dose de 50 mg/kg e da cimetidina na dose de 200 mg/kg no modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético. (B) imagem representava dos estômagos de animais de cada grupo.



Os dados estão expressos como média \pm E.P.M., * $p < 0,05$, comparados ao grupo veículo (ANOVA *one way*, e pós-teste de Tukey).

B



4.4.2. Análise histológica das lesões gástricas induzidas por ácido acético

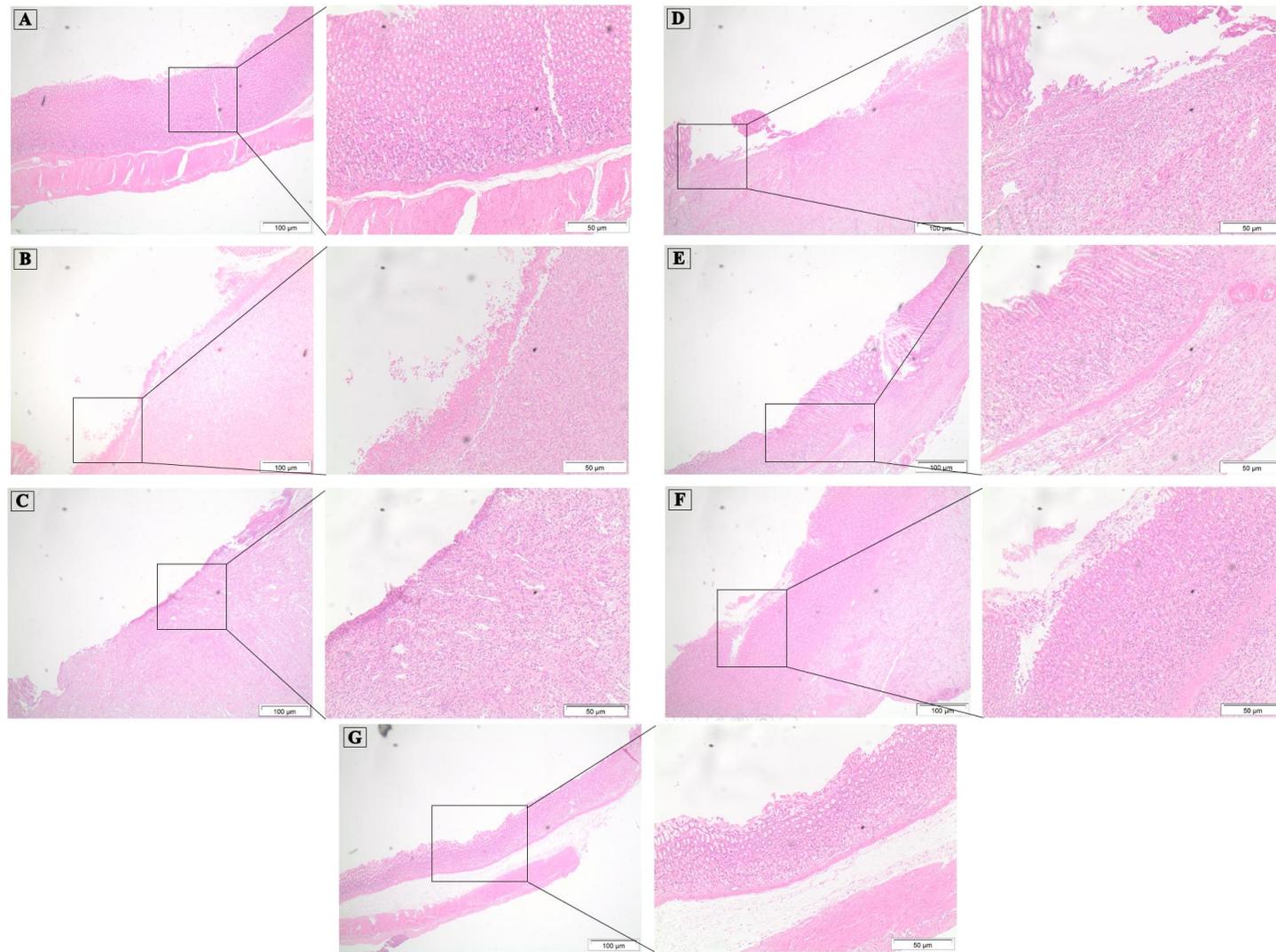
Os resultados da análise microscópica mostraram que os estômagos das ratas do grupo Sham, que não receberam tratamento e nem sofreram o processo de formação de úlcera por ácido acético, apresentaram arquitetura normal com mucosa, submucosa, muscular e serosa intactas (**Figura 15A**). Os animais que receberam apenas veículo, e sofreram lesão gástrica induzida por ácido acético apresentaram intenso dano epitelial com perda de células superficiais, elevada vacuolização e hemorragia com exsudatos inflamatórios abundantes e forte edema de submucosa, com reparo mínimo na úlcera (**Figura 15B**). O efeito gastroprotetor do Th-EtOHcc e Th-MeOHcc foi confirmado por análise histológica (**Tabela 8**). Os animais que receberam o tratamento com Th-EtOHcc na dose de 1 mg/kg, embora tenha apresentado melhora nos parâmetros observados (**Figura 15C**), estatisticamente, essas observações não tiveram diferença quando comparadas ao grupo veículo (**Tabela 8**), entretanto, os animais que receberam o tratamento com Th-EtOHcc nas doses de 10 e 50 mg/kg, Th-MeOHcc na dose de 50 mg/kg ou cimetidina 200 mg/kg, apresentaram redução no tamanho da área ulcerada, com a base da lesão quase que completamente coberta por tecido epitelial de restauração, poucas células inflamatórias e evidente reconstrução de glândulas secretoras. Estatisticamente, a soma dos parâmetros observados mostrou que o tratamento foi capaz de diminuir os indicadores lesivos de forma geral, com diferença significativamente comprovada quando comparada ao grupo veículo (**Tabela 8 e Figura 15 D, E e F**).

Tabela 8. Parâmetros hematológicos do tratamento de Ratas *Wistar* com doses de 1, 10 e 50 mg/kg de Th-EtOHcc, 50 mg/kg de Th-MeOHcc e 200 mg/kg de cimetidina por 7 dias após lesão induzida por ácido acético 80%

	Erosão epitelial	Edema submucosa	Hemorragia	Células inflamatórias	TOTAL
Sham	0	0	0	(0 - 1)	0 (0 - 1)
Veículo	3 (2 - 3) [#]	3 (2 - 3) [#]	2,5 (1 - 3) [#]	3 (2 - 3) [#]	10 (8 - 12) [#]
Th-EtOHcc 1	3 (0 - 3)	2 (1 - 2)	1 (1 - 3)	1,5 (1 - 3)	7 (4 - 11)
Th-EtOHcc 10	3 (0 - 3)	1 (0 - 2)*	1 (0 - 1)	2 (0 - 3)	3 (2 - 3)*
Th-EtOHcc 50	2 (0 - 3)	2 (1 - 3)	0 (0 - 2)*	1 (0 - 2)*	3 (2 - 3)*
Th-MeOHcc 50	1 (0 - 1)	2 (0 - 3)	1 (0 - 1)	0,5 (0 - 1)*	3 (2 - 3)*
Cimetidina 200	2 (0 - 3)	1 (0 - 1)*	1 (0 - 1)	1 (0 - 2)*	3 (2 - 3)*

Os dados estão expressos como medianas, com os escores mínimos e máximos indicados entre parênteses, *p<0,05 comparados ao grupo veículo, # p<0,05, comparado ao grupo Sham, (Kruskal - Wallis, e pós-teste de Dunn).

Figura 15. Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos do tecido gástrico de ratas com e sem alterações induzidas por ácido acético



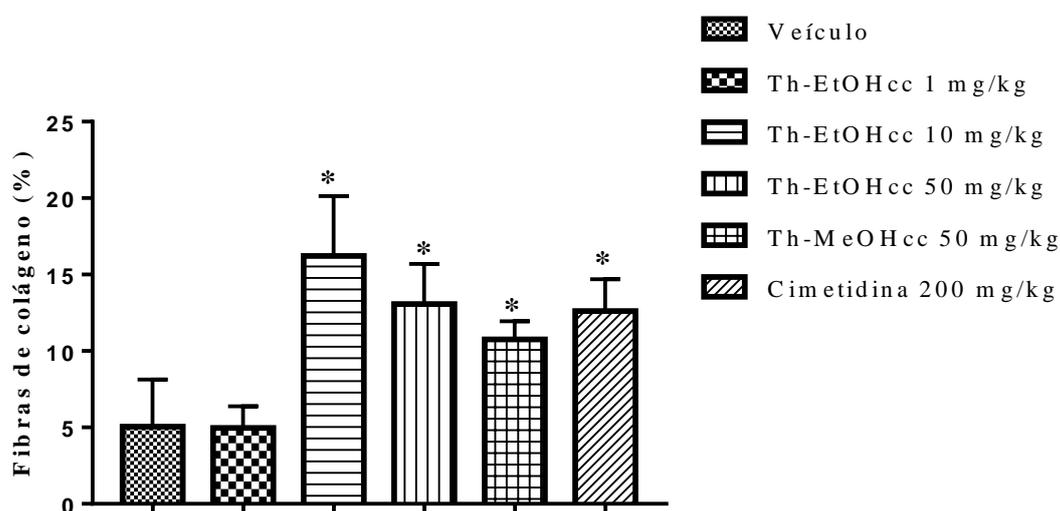
Ratas do grupo Sham (A), Veículo (B), Th-EtOHcc 1 mg/kg (C), Th-EtOHcc 10 mg/kg (D), Th-EtOHcc 50 mg/kg (E), Th-MeOHcc 50 mg/kg (F), ou Cimetidina 100 mg/kg (G); após 7 dias de tratamento, aumento de 4X e 10X

4.5. Determinação dos possíveis mecanismos de ação cicatrizante do Th-EtOHcc e Th-MeOHcc.

4.5.1. Efeito de Th-EtOHcc e Th-MeOHcc sobre a deposição de colágeno

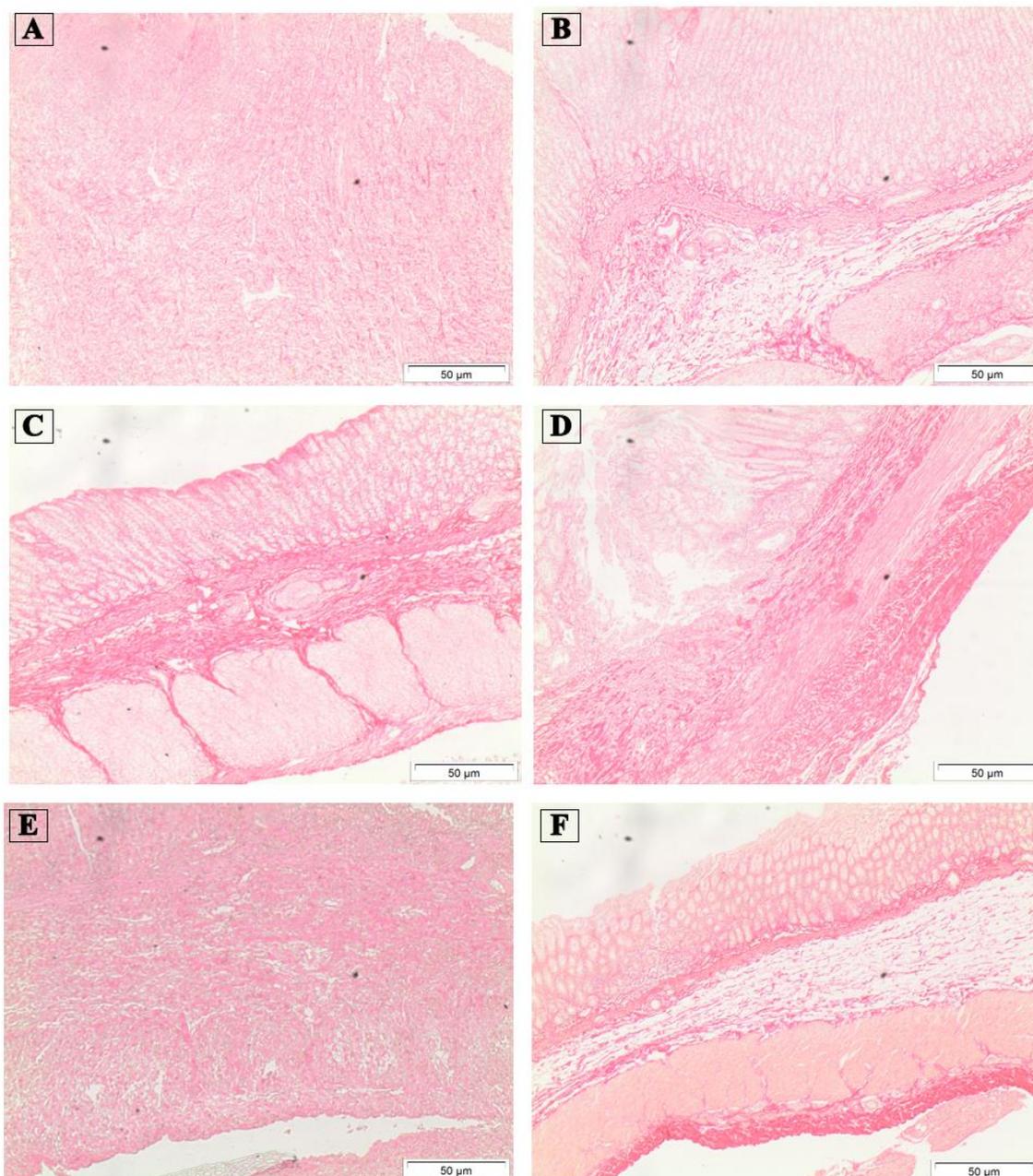
As ratas do grupo veículo, com lesão gástrica induzida por ácido acético, apresentaram apenas $5,05 \pm 1,3\%$ de fibras de colágeno, na lesão gástrica, semelhante ao grupo tratado com Th-EtOHcc na dose de 1mg/kg ($4,97 \pm 0,6\%$). Enquanto que os animais tratados com Th-EtOHcc nas doses de 10 e 50 mg/kg, Th-MeOHcc na dose de 50 mg/kg e cimetidina na dose de 200 mg/kg durante sete dias, apresentam considerável aumento das fibras de colágeno ($16,22 \pm 1,6$; $13,06 \pm 0,9$; $10,76 \pm 0,4$ e $12,62 \pm 0,8\%$ respectivamente), nas lesões gástricas induzidas por ácido acético, quando comparados com o grupo veículo ($5,05 \pm 1,3\%$) (**Figura 16 e 17**).

Figura 16. Efeito do Th-EtOHcc, Th-MeOHcc e cimetidina sobre a deposição de fibras de colágeno na lesão gástrica induzida por ácido acético 80% em ratas



Resultados expressos como média \pm E.P.M., * $p < 0,05$, comparados com o veículo ($n=3$ lâminas/grupo). (ANOVA "one way", seguida do pós-teste de Tukey).

Figura 17. Fotomicrografias representativas da deposição de fibras de colágeno na lesão gástrica induzida por ácido acético em ratos *Wistar*.



Grupo veículo (A) Grupo Th-EtOHcc 1 mg/kg, v.o. (B); Grupo Th-EtOHcc 10 mg/kg, v.o. (C); Grupo Th-EtOHcc 50 mg/kg, v.o. (D); Grupo Th-MeOHcc 50 mg/kg, v.o. (E) Grupo Cimetidina 200 mg/kg, v.o. (F) após 7 dias de tratamento. Aumento de 10X.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Ao longo da história, as plantas medicinais têm sido utilizadas pela humanidade para tratar várias doenças, pois são capazes de aliviar o estado de muitas enfermidades e possuem fitoconstituintes ativos de natureza química diversa (ABDALLA et al., 2018). O seu uso popular vem aumentando consideravelmente nos últimos anos, e isso se deve em grande parte, ao fato de acreditar-se que são naturais, benéficas, seguras, disponíveis, acessíveis e livres de efeitos adversos. Entretanto, essa crença se baseia apenas ao uso de longo prazo das plantas, sem nenhum embasamento científico. Atualmente, pesquisas têm comprovado que nem todas as plantas medicinais são seguras, podendo produzir efeito tóxico que pode estar relacionado ao princípio ativo, superdosagem, uso crônico, interações, alergias, contaminações (ABAS et al., 2018). Assim, além de se investigar o potencial curativo ou protetor do tratamento com plantas medicinais, é importante avaliar seu possível potencial tóxico.

Apesar da espécie *Tocoyena hispidula* Standl. possuir importância etnofarmacológica, ainda não existem estudos *in vivo* sobre a segurança da mesma, assim, procurou-se avaliar o perfil toxicológico do extrato Th-EtOHcc no tratamento agudo com a dose de 2000 mg/kg.

Os dados obtidos, mostraram, que não houve mortes ou alterações clínicas que implicassem toxicidade de Th-EtOHcc nas doses testadas. Alterações de peso corporal dos animais é bem conhecido como um dos primeiros sinais de toxicidade, sendo por isso, considerado um parâmetro importante a ser observado (ABDALLA et al., 2018). No presente estudo, não houve alterações de peso corporal dos animais tratados, comparados ao grupo controle, de acordo com isso, também não houve registro de variação no consumo de ração e água entre os animais dos grupos tratados e controle.

Além da diminuição de peso corporal, a redução do peso dos órgãos, também é frequentemente considerado como efeito tóxico no animal, o que resulta em redução da ingestão de água e alimentos (ABAS et al., 2018). Não houve alteração morfológica ou no tamanho dos órgãos dos animais tratados, mostrando que até então, Th-EtOHcc é seguro para uso.

Toxicidade e alterações em parâmetros bioquímicos, são úteis para prever possíveis eventos adversos de drogas teste antes de ensaios clínicos em seres humanos (ABDALLA et al., 2018). Assim, foi verificado também, possível alteração funcional, através de testes bioquímicos, e alteração morfológica, e análise de lâminas histológicas, dos principais órgãos que pudessem ser afetados pelo tratamento.

O fígado é um dos prováveis órgãos afetados pela toxicidade química, sendo responsável pelo metabolismo de drogas e outros xenobióticos (ABAS et al., 2018; VARIYA et al., 2019). É o órgão que protege o organismo de insultos químicos tóxicos, e por isso é importante avaliar os efeitos hepáticos de compostos naturais, o que pode ser feito por análise bioquímica de marcadores de função hepática, tais como: Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST), Fosfatase Alcalina (ALP), albumina, Lactato Desidrogenase (LDH) e Gama Glutamil Transferase (Gama-GT) (LUI, 2017; MOREIRA et al., 2018).

As transaminases ALT e AST são os marcadores mais comumente analisados para avaliar função hepática, ALT é o biomarcador mais específico, mas geralmente está associado a elevação de AST para indicar dano hepático, embora níveis elevados de AST possa também indicar infarto cardíaco ou lesão muscular (ABAS et al., 2018). O tratamento agudo com Th-EtOHcc 2000 mg/kg mostrou um aumento significativo de ALT nos animais tratados do sexo masculino, no entanto, para que se considere hepatotoxicidade, é necessário que as transaminases hepáticas, particularmente a ALT, esteja elevada mais de três vezes o nível basal (ABDALLA et al., 2018), essa elevação não chegou ao nível de três vezes maior que o controle, podendo-se então inferir que não houve toxicidade, além disso, o histológico do órgão não apresentou anormalidades nesse grupo. O mesmo tratamento, nas fêmeas, embora não tenha elevado os parâmetros bioquímicos específicos, e contraditoriamente tenha diminuído os valores de AST, na análise histológica, foi encontrado esteatose hepática microgoticular em todos os animais desse grupo, indicando que as fêmeas são mais susceptíveis a problemas hepáticos, nesse caso específico.

Além desses biomarcadores, a albumina, uma proteína sintetizada no fígado, também pode ser determinada como marcador para função hepática, já que sua produção é uma das funções vitais do fígado (ABDALLA et al., 2018; MOREIRA et al., 2018). Todos os grupos tratados apresentaram níveis normais de albumina, em concordância com os níveis observados no grupo controle.

Fosfate Alcalina (ALP), é uma isoenzima presente no fígado, ossos, rins, epitélio intestinal, placenta e células germinativas, sendo sua forma hepática ligada aos canalículos biliares, quando elevada em níveis séricos, indica leve obstrução biliar intra ou extra-hepática e é uma característica marcante nas doenças hepáticas colestáticas, geralmente com aumento de bilirrubina direta (ABAS et al., 2018; LUI, 2017), esta, juntamente com a bilirrubina indireta,

além de indicar distúrbios hepáticos, também são importantes marcadores de eritropoiese (WOLFF et al., 2018). Aumento dos níveis séricos de ALP, de forma isolada, porém, é mais indicativa de doença óssea, sendo por isso, importante avaliar os níveis séricos de Gama-GT, que está localizada na membrana canalicular dos hepatócitos, e em nível sérico elevado, embora não seja específico, indica lesão biliar, se tornando mais sensível quando associada a níveis elevados de ALP (LUI, 2017; CRUZ, 2018). Neste estudo, os níveis de ALP, gama GT ou bilirrubina sérica não foram alterados pelo tratamento agudo com o extrato.

LDH oxida o lactato em piruvato na glicólise, está presente no soro, miocárdio, glóbulos vermelhos, córtex renal, pulmões, músculos esqueléticos e fígado, portanto, sua elevação isolada não é inespecífica quanto a origem, porém, quando associada a elevação de ALP hepática, pode indicar lesões de ocupação do espaço como carcinoma hepatocelular ou metástases hepáticas com bloqueio dos canalículos biliares (LUI, 2017). O tratamento com o extrato não elevou os níveis de LDH ou ALP nos machos, indicando estabilidade na função hepatobiliar. As fêmeas, apresentaram uma diminuição significativa dos níveis de LDH, entretanto, essa diminuição não gera preocupação por não se apresentar como um indicativo de toxicidade. Humanos com deficiência hereditária das isoformas LDH A (expressa no fígado) ou B estão livres de sintomas, exceto rigidez muscular e mioglobinúria, e sua inibição não promove toxicidade (FERRIERO et al., 2018).

O rim é outro órgão principal afetado pela toxicidade química, sendo um local de grande relevância para a excreção de fármacos (VARIYA et al., 2019). Comumente, a nefrotoxicidade está associada ao uso de plantas medicinais, pois vários compostos presentes em plantas causam toxicidade renal, que pode ser detectada através da análise de parâmetros bioquímicos fornecedores de informações importantes sobre a função renal, tais como: creatinina, um subproduto do metabolismo muscular excretado exclusivamente pela filtração glomerular; úreia, um subproduto do metabolismo proteico que também é excretado apenas nos rins; e albumina, uma proteína responsável por regular o volume plasmático e transportar substância no sangue. Elevação dos níveis séricos desses marcadores, indica redução ou disfunção renal, que pode ser atribuído a efeito tóxico (ABAS et al., 2018; MOREIRA et al., 2018). Nenhum dos biomarcadores de função renal dos animais tratados, sofreu alteração quando comparado ao grupo controle, resultado esse que condiz com a histologia do órgão, que se apresentou preservada e sem anormalidades, indicando que o extrato, não é nefrotóxico.

Foi avaliado ainda o perfil lipídico dos animais, através da dosagem de Colesterol Total (CT), Lipoproteína de Alta Densidade (HDL), Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) e Triglicérides (TG), tais dosagens, são utilizadas para avaliar o risco cardíaco e determinar a probabilidade de doença cardíaca.

O colesterol, tem importância vital nas células e tecidos humanos, é um precursor de ácidos biliares, vitamina D e hormônios esteroides e é um dos elementos necessários de uma estrutura celular. Desempenha importante papel no cérebro e sistema nervoso e imunológico. Entretanto, embora o colesterol tenha importância plausível no mecanismo humano, sua elevação pode levar a vários distúrbios como doenças cardíacas, doença arterial coronariana, arteriosclerose, hipertensão, trombose cerebral etc. enquanto níveis reduzidos levam a doenças como hipertireoidismo, anemia, má absorção etc. (BATRA; TOMAR; GUPTA, 2014) (DERINA et al., 2014). No presente trabalho, verificou-se que os animais do sexo masculino apresentaram diminuição significativa dos níveis de colesterol total, enquanto que as fêmeas tiveram esse valor aumentado significativamente, indicando que, enquanto que nos machos os problemas com o tratamento estejam mais associados a diminuição de colesterol, nas fêmeas, o problema está inversamente proporcional. Esse dado, condiz com a análise histológica observada no fígado desses animais, onde pode-se verificar esteatose microgoticular em todas as fêmeas, fenômeno esse que não aconteceu no grupo masculino do mesmo tratamento.

As principais fontes de colesterol para o organismo são a ingestão alimentar e a produção hepática endógena. Quando ingerido, o colesterol sofre metabolização e produz lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), que ao ser metabolizada produz LDL, lipoproteína responsável por transportar pelo sangue, aproximadamente 60-70% do colesterol do organismo. Entretanto, também é um dos principais componentes no desenvolvimento de uma placa aterosclerótica, sendo por tanto, parâmetro importante a ser verificado, na intenção de se prevenir a progressão de Doença Arterial Coronariana (DAC) (ZACHARIAH et al., 2019). Os grupos tratados não apresentaram alterações nos níveis de LDL, diminuindo assim, a probabilidade de formação de uma placa aterosclerótica. O triglicérideo, que é o composto lipídico mais abundante na dieta diária (ZACHARIAH et al., 2019), também foi avaliado, não houve alteração em nenhum dos grupos tratados.

A lipoproteína de alta densidade (HDL), é responsável por transportar o colesterol dos tecidos para o fígado, onde são degradados e eliminados do corpo, assim, o mesmo possui uma relação inversa com o risco coronariano, portanto, é desejável que seus níveis estejam elevados

(ZACHARIAH et al., 2019). O tratamento no grupo dos machos, diminui os valores de HDL de forma significativa, indicando um risco maior na incidência de aterosclerose nesse grupo, apesar de não ter havido aumento de LDL. As fêmeas, entretanto, contrariamente ao grupo dos machos, apresentaram valores significativamente maiores de HDL, mostrando que o sexo feminino, além de não sofrer interferência nesses valores, ainda foi capaz de aumentar esses níveis, fornecendo assim, um grau maior de proteção ao desenvolvimento de aterosclerose.

Assim, pode-se inferir que Th-EtOHcc é seguro. A DL_{50} de Th-EtOHcc para administração oral em camundongos, foi estimada como >2000 mg/kg, e o mesmo foi incluído na categoria 5, segundo a OECD 423 (2001). Assim, verificando a baixa toxicidade do extrato e se baseando em trabalhos anteriores (RIBEIRO et al., 2018; CESÁRIO et al., 2018) realizados com extrato de plantas do gênero *Tocoyena*, optou-se por usar as doses de 1, 10 e 50 mg/kg para investigar o potencial gastroprotetor e cicatrizante do Th-EtOHcc.

Em um dos protocolos, o tratamento foi feito por 7 dias consecutivos nos animais, então, fez-se oportuno também, verificar a toxicidade subcrônica de Th-EtOHcc nas doses testadas e de sua fração metanólica Th-MeOHcc na dose de 50 mg/kg. Não houve variações significativas nos grupos de animais tratados, em nenhum dos parâmetros observados, quando comparados ao grupo controle, exceto por diminuição dos valores de ALP no grupo tratado com a fração, porém, não há relatos de que a diminuição de níveis de ALP seja indicativo de toxicidade.

As úlceras pépticas, conhecidas como úlceras gástricas ou úlceras intestinais, representam as doenças mais comuns do sistema digestivo, que afeta cerca de 10% da população mundial, sendo uma causa significativa de morbidade e mortalidade entre os indivíduos afetados (CERQUEIRA et al., 2012). Estudo epidemiológico aponta que aproximadamente 500.000 novos casos de úlceras gastrointestinais, são diagnosticados por ano nos Estados Unidos (ADEFISAYO et al., 2017; CHENG et al., 2019). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, foram relatadas no ano de 2018, 11532 internações relacionadas a presença de úlceras gástricas e duodenais com taxa de mortalidade de 9,86% (BRASIL, 2019).

Várias classes de fármacos estão incluídos no tratamento convencional de úlcera gástrica, entre eles: os inibidores da bomba de prótons, bloqueadores dos receptores histamínicos, bloqueadores dos receptores $M1$, drogas que destroem a barreira mucosa e análogos das prostaglandinas (CERQUEIRA et al., 2012; CHEN et al., 2016). No entanto, o uso desses medicamentos está associado a efeitos colaterais graves, eficácia limitada e a recorrência de úlcera gástrica após o tratamento, tornando questionável a sua eficácia e

evidenciando a importância de se procurar e desenvolver novas drogas antiulcerosas com menos efeitos colaterais (ZHANG et al., 2018; CERQUEIRA et al., 2012; ADEFISAYO et al., 2017) bem como, pesquisar novos fitoquímicos que sejam capazes de prevenir a úlcera gástrica (CHENG et al., 2019).

Atualmente o uso medicinal de extratos vegetais e ingredientes ativos para a prevenção e tratamento de úlceras tem se tornado crescente em todo o mundo (AZIZ et al., 2019). E muitas são as plantas medicinais utilizadas na medicina popular para tratar distúrbios gastrointestinais que tiveram sua eficácia comprovada (ADEFISAYO et al., 2017), tais como: *Byrsonima intermedia* A. Juss (SANTOS et al., 2019), *Muntingia calabura* (BALAN et al., 2015) *Clematis flammula* L. (YOUS et al., 2018) *Persea major* (Meisn.) L.E. Kopp (Lauraceae) (SOMENSI et al., 2017).

A espécie *Tocoyena hispidula* Standl., popularmente conhecida como flor-do-cerrado, angelca e jenipapinho, é um arbusto ou subarbusto encontrado no Brasil nas regiões Norte (Pará) e Nordeste (Maranhão e Piauí), utilizado como planta medicinal no combate a dor de barriga e inflamação do útero (PIOVESAN; VIERA, 2018). No extrato etanólico do caule dessa planta, já foram identificadas algumas classes de fitoconstituintes com importantes ações farmacológicas comprovadas na literatura, tais como: cumarinas, iridóides, triterpenóides, raftoquinona, esteroides, γ -pirona, cumarinas e poliálcool (SOUSA et al., 2018). Considerando o valor medicinal e a baixa disponibilidade de dados científicos para comprovar o efeito gastroprotetor, o presente estudo foi realizado para avaliar as propriedades antiulcerosas do extrato etanólico da *Tocoyena hispidula* Standl contra a úlcera gástrica.

A úlcera gástrica é ocasionada por múltiplos fatores, em especial fatores externos prejudiciais, como tabagismo, consumo excessivo de álcool, estresse, dieta inadequada e ingestão prolongadas de alguns medicamentos (ZHANG et al., 2018) que induzem desequilíbrio entre os mecanismos protetores e agressores do sistema gástrico com consequente formação de úlcera (AZIZ et al., 2019). Assim, optou-se por investigar o efeito gastroprotetor do extrato etanólico da *Tocoyena hispidula* Standl e de sua fração metanólica utilizando diferentes agentes ulcerativos e consequentemente, distintos mecanismos de ação envolvidos.

O primeiro modelo utilizado, o de úlcera induzida por etanol absoluto em camundongos, é um método rápido e fácil de avaliar atividade antiulcerosa de qualquer extrato vegetal ou ingrediente ativo e é o mais comumente usado (AZIZ et al., 2019). Estudos anteriores mostraram que o etanol em alta concentração pode erodir a mucosa gástrica diretamente dentro

de 30-60 minutos após ingestão entrando rapidamente na mucosa, causando distúrbios vasculares, resultando em hemorragia e lesões gástricas (LIANG et al., 2018; SIDAHMED et al., 2018), além de produzir danos gástricos diretos pode atuar ainda de maneira indireta, ao induzir o recrutamento de leucócitos, que estimula respostas inflamatórias, com aumento dos níveis de muitas citocinas pró-inflamatórias (AZIZ et al., 2019).

Os fatores patogênicos da úlcera gástrica induzida pelo etanol são complexos, sabe-se que, geralmente, envolve três dimensões: estresse oxidativo, apoptose e resposta inflamatória (LIANG et al., 2018).

A principal ação destrutiva do etanol está relacionada ao excesso de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) que ele estimula ao atingir a mucosa gástrica, tais como, ânions superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio (YOO et al., 2018) capazes de acelerar o processo apoptótico das células, agravando o dano gástrico da mucosa (LIANG et al., 2018).

A resposta inflamatória, está associada a um desequilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias, culminando em elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, estas, quando elevadas, podem mediar a inflamação local, induzindo dano a mucosa gástrica, provocando colapso no mecanismo de defesa antioxidante endógeno e apoptose (LIANG et al., 2018). A administração de etanol também está associada à modulação da via do óxido nítrico (NO). Etanol induz redução dos níveis de NO com conseqüente diminuição da permeabilidade vascular e supressão do fluxo sanguíneo para a mucosa gástrica, resultando em hipóxia, necrose hemorrágica e redução da secreção de muco gástrico o que provoca aumento no fluxo de Na^+ / K^+ e secreção de pepsina e perda de H^+ no lúmen gástrico (AZIZ et al., 2019)

Assim, como uma dose em alta concentração de álcool em modelo animal, pode induzir a úlcera, em humanos, a ingestão excessiva de álcool, também pode danificar a mucosa gástrica por lesar diretamente as células endoteliais vasculares da mucosa, interromper a continuidade das células, induzir a formação de EROs e citocinas inflamatórias, e causar isquemia local da mucosa gástrica, sendo esse portanto, um modelo que mostra grande semelhança a úlcera gástrica aguda em humanos e portanto, comumente usado para estudar a patogênese e terapias para a doença ulcerativa humana (YOO et al., 2018; ZHANG et al., 2018; AZIZ et al., 2019)

O presente estudo mostrou que Th-EtOHcc promoveu um efeito gastroprotetor contra a ação lesiva do etanol de forma significativa em todas as doses testadas, sugerindo que ele possui alguma atividade citoprotetora adaptativa, envolvendo mecanismo local e inespecífico, sendo este, o principal modelo capaz de rastrear drogas com essa função (SOUSA et al., 2018).

A citoproteção promovida por Th-EtOHcc foi semelhante a observada por carbenoxolona, um potente citoprotetor que tem como principal mecanismo de ação a capacidade de elevar a quantidade de muco gástrico (BICKEL; KAUFFMAN Jr, 1981). O muco gástrico é uma barreira semipermeável que reveste e protege a mucosa gástrica, sendo considerada a primeira linha de defesa do estômago contra fatores agressores (CONE, 2009), que além de ser uma barreira à ação lesiva do ácido luminal, também possui atividade antioxidante (REPETTO; LLESUY, 2002). Assim, o enfraquecimento dessa barreira, é diretamente responsável pela lesão gástrica, e já é bem conhecido, que o etanol absoluto destrói a camada de muco gástrico para então alcançar a mucosa e iniciar o processo de lesão (SIDAHMED et. al 2018).

Assim, fez-se interessante verificar se o Th-EtOHcc possui tal mecanismo de ação. O modelo escolhido para tal investigação foi o de ligadura do piloro, no qual, a administração intraduodenal da carbenoxolona, usado como controle positivo, foi capaz de aumentar o muco significativamente em comparação ao grupo veículo em 89% semelhante ao observado em outros trabalhos que utilizaram o mesmo protocolo, como o de Silva (2017) e de Oliveira et al., (2012) em que o tratamento com carbenoxolona 100 mg/kg aumentou o muco em 98% e 70%, respectivamente, em comparação ao veículo.

Observou-se que o tratamento com Th-EtOHcc na dose de 10 mg/kg foi capaz de preservar o muco gástrico, bem como aumentar a quantidade de muco de maneira significativa em 168% quando comparado ao grupo controle negativo, e também em comparação ao grupo tratado com a carbenoxolona na dose de 100 mg/kg, evidenciando que um dos mecanismos de ação envolvidos na gastroproteção é a produção de muco na parede gástrica, ação essa que se mostrou até mais potente que a do controle positivo. Bickel e Kauffman Jr (1981), corroboram nossos achados, uma vez que mostraram que a espessura da barreira de muco que recobre a mucosa gástrica é dinâmica, sendo sujeita a aumentar ou diminuir sob diferentes condições fisiológicas ou estímulos externos (medicamentos, substâncias específicas, outros). Tal ação, pode estar relacionada a presença de grande quantidade de terpenóides já identificados no extrato. A literatura aponta que muitos compostos dessa classe apresentam atividade gastroprotetora comprovada, com diferentes autores relatando que o possível mecanismo relacionada a gastroproteção dessa classe pode incluir principalmente o reforço de fatores defensivos da mucosa gástrica, em vez da inibição dos fatores agressivos (SANCHEZ et al., 2006).

Porém, além do aumento na barreira de muco, outros mecanismos, relacionados a composição fitoquímica de Th-EtOHcc, podem estar envolvidos na gastroproteção, tais como possível ação antioxidante e anti-inflamatória, pois foram identificadas classes de fitoconstituintes que possuem essa ação, como iridoídes e cumarinas (FREITAS et al., 2011; PIOVESAN; VIERA, 2018)

O segundo modelo de úlcera avaliado para evidenciar gastroproteção foi o de isquemia e reperfusão (I / R) em ratas. A I/R causa a interrupção do suprimento sanguíneo ao tecido do estômago, seguida pela reintrodução do sangue na área afetada, o que promove efeitos destrutivos sobre a mucosa gástrica sendo um modelo que mimetiza lesão induzida por estresse presente em vários contextos clínicos, tais como trauma e cirurgia de grande porte, e tem sido relatada como sendo aliviada significativamente por compostos antioxidantes (SANTOS, et al., 2019). É caracterizada por um número de alterações microvasculares e da mucosa, tais como: inchaço das células endoteliais, entupimento capilar, redução prolongada do fluxo sanguíneo gástrico e disfunção da barreira de muco. (VILLEGAS et al., 2004).

Durante o processo de isquemia, o tecido sofre lesão devido a privação de oxigênio para as células que podem sofrer apoptose, entretanto, quando se promove a reoxigenação do tecido com essas células ainda viáveis, as mesmas iniciam um processo de elevada produção de EROs, sendo esta a principal causa da lesão provocada pela reperfusão (VILLEGAS, et al., 2004).

O mecanismo de ação envolvido nesse tipo de lesão está principalmente ligado ao sistema xantina-oxidase (XO), gerador de radicais livres, que é operativo dentro da célula endotelial isolada mesmo na ausência de neutrófilos. Na isquemia, o ATP é degradado em hipoxantina e a xantina desidrogenase é convertida em XO, na reperfusão, a XO catalisa a conversão da hipoxantina em ácido úrico com a liberação de radicais superóxido e H₂O₂. Pela reação Haber-Weiss catalisada por ferro, esses radicais de oxigênio podem ser convertidos em radical hidroxilo altamente citotóxico, iniciando o processo de peroxidação lipídica e liberação de mediadores inflamatórios que recrutam e ativam leucócitos polimorfonucleares (CABEZA et al., 2001). A reperfusão é a responsável por agravar a lesão da mucosa, resultando em espécie reativas de oxigênio e nitrogênio, mediadores inflamatórios e quimiotaxia de células inflamatórias (SOUSA, et al., 2018).

Nesse modelo, Th-EtOHcc foi capaz de promover proteção gástrica significativa nas doses de 10 e 50 mg/kg, levando a forte hipótese de que sua proteção, possivelmente está relacionada a ação de compostos com efeito antioxidantes, que no modelo de I/R pode envolver

tanto a ação de enzimas, como pode atuar diretamente sequestrando radicais livres do meio (FREITAS et al., 2011).

O estresse oxidativo é um fator essencial na patogênese da ulcera gástrica, portanto, torna-se relevante investigar plantas ou compostos naturais que apresentem atividade antioxidante na avaliação terapêutica de alterações gástricas (CESÁRIO, et al., 2018b). Muitas pesquisas com planta medicinais que investigam gastroproteção mostram que a planta testada tem atividade antioxidante, tais como: *Gmelina arborea* (LAURENCE et al., 2016) *Tocoyena formosa* leaves (Cham. & Schlecht) K. Schum (CESÁRIO et al., 2018b) *Mallotus roxburghianus* L. (Muell.) (SAGUN et al., 2017), entre outros.

Drogas que desempenham atividade antioxidante, geralmente também apresentam atividade anti-inflamatória, pela inibição da produção de muitos mediadores inflamatórios tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina um beta (IL-1 β) (SHEHATA et al., 2018).

O aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias, promove insulto oxidativo ao tecido devido ao aumento na formação de superóxido, provocando um desequilíbrio entre a capacidade pró-oxidante e anti-oxidante endógeno, ocasionando efeito prejudicial à integridade do tecido, com surto de apoptose e ativação de neutrófilos durante a ulceração gástrica, sendo um dos principais contribuintes para os danos nos tecidos. (VERMA; KUMAR, 2017; LIANG et al., 2018). Portanto, considerando-se que tanto o modelo de úlcera por etanol, quanto de úlcera por I/R estimulam intensa liberação de mediadores inflamatórios recrutando células inflamatórias que agravam a lesão, fez-se interessante investigar se Th-EtOHcc possui ação anti-inflamatória local, visto que ação anti-inflamatória, é uma característica benéfica para o tratamento de úlceras gástricas. Para isso, dosou-se a concentração de citocinas pró-inflamatórias: fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina um beta (IL-1 β), presente na mucosa do estômago lesionado. TNF- α é o principal quimioatratador para neutrófilos, com papel chave na inflamação, capaz de induzir vasodilatação, permeabilidade vascular e recrutamento de células inflamatórias (VERMA & KUMAR, 2017), quando associado a IL-1 β induz atividades enzimáticas como a óxido nítrico sintase, fosfolipase A2, ciclooxigenases e proteases que estimulam moléculas de adesão nas células endoteliais e promovem a adesão de neutrófilos (VILLEGAS, et al., 2004).

O pré-tratamento com Th-EtOHcc foi capaz de reduzir significativamente a concentração de TNF- α e IL-1 β presentes no tecido, mostrando que o extrato apresenta

atividade anti-inflamatória como um dos seus mecanismos de ação envolvido na gastroproteção. Tal ação pode estar relacionada a compostos triterpenóides presentes em sua composição, que são compostos de conhecida ação anti-inflamatória na literatura, tais como β -amirina, lupeol e lupenona identificados na espécie que mostraram em outros trabalhos ação anti-inflamatória com diminuição da concentração das citocinas TNF- α e IL-1 β (SOUSA et al., 2018b; SHEHATA et al., 2018; XU et al., 2018). Bem como, a presença de cumarinas, como a escopoletina, que também tem atividade anti-inflamatória comprovada na literatura, também com redução de níveis de TNF- α e IL-1 β em diferentes processos inflamatórios (SOUSA et al., 2018b; YAO et al., 2012; JAMUNA et al., 2015)

Além do efeito preventivo contra agentes agressores da mucosa, é interessante que o efeito protetor esteja atrelado a ações curativas no tecido gástrico, embora, nem sempre as plantas medicinais que têm ação protetora possuam também atividade curativa (SANTOS, et al., 2019). Assim, optou-se por investigar ação cicatrizante no modelo de úlcera crônica induzida por ácido acético 80%. O processo de cura desse tipo de úlcera química é muito semelhante ao processo de regeneração e formação de cicatriz observada em úlceras gástricas em humanos (MAGIEROWSKI et al., 2017), sendo o modelo considerado mais próximo da doença humana em termos de características patológicas e do processo de cicatrização (ALMEIDA et al., 2019) com dano que se estende até a camada muscular, ultrapassando a camada de muco e a submucosa (BONAMIN et al., 2011)

A cicatrização da úlcera é um processo orquestrado que envolve o preenchimento da falha na mucosa com células epiteliais e do tecido conjuntivo, para isso, é necessário que ocorra proliferação celular, migração, diferenciação, regeneração, angiogênese ativa e deposição de matriz extracelular, levando à formação de cicatriz (SANTOS, et al., 2019). Os mecanismos envolvidos são complexos e envolvem reepitelização, restauração de glândulas e aumento da angiogênese no leito da úlcera, para isso, é necessário o envolvimento da atividade de muitas vias moleculares, hormônios gastrointestinais e fatores fisiológicos como PGs endógenas, citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α , Óxido nítrico vasoativo (NO), fator de crescimento tumoral (TGF- β), aumento da expressão de receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFr) e abundância de fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA) angiogênico (ALMEIDA et al., 2019; MAGIEROWSKI et al., 2017).

Nesse modelo, os resultados apresentados mostraram que o tratamento durante 7 dias com cimetidina foi capaz de reduzir as úlceras significativamente, assim como Th-EtOHcc em

todas as doses testadas, bem como, sua fração metanólica Th-MeOHcc na dose de 50 mg/kg, o que leva a sugerir que os fitoconstituintes que apresentam ação anti-úlceras estão presentes nessa fração. Essa atividade pode estar associada a presenças de compostos como a escopoletina, uma cumarina já evidenciada na literatura com ação tanto preventiva como curativa para úlcera gástrica, com mecanismos que envolve aumento de agentes protetores, ação antioxidante e antiinflamatória (SOUSA et al., 2018b; MAHATTANADUL et al., 2011), bem como pela presença de outras cumarinas como isofraxidina; triterpenóides como lupenona, lupeol, β -amirina, germanicol, ácido acetil oleanólico; e iridóides como α e β -gardiol, morindolídeo e genipina que estão presentes na planta e podem estar contribuindo para a ação cicatrizante da planta, por possuírem inúmeras ações benéficas já comprovadas (SOUSA et al., 2018b).

O ácido acético induz o processo de ulceração por múltiplos processos, nos quais, a ação inicial se dá pela depleção do conteúdo de muco da parede gástrica, depleção essa que é associada a produção excessiva de radicais livres que ocasionam dano a mucosa devido a elevação do estresse oxidativo. Portanto, é conclusivo dizer que o aumento na camada de muco observado pelo protocolo de ligadura do piloro, também é um mecanismo de citoproteção que atua no processo de cicatrização do Th-EtOHcc. Outro mecanismo na cicatrização é o de ação anti-inflamatória, também observada em protocolo anterior pela diminuição da expressão e liberação de citocinas pro-inflamatória, responsáveis por prejudicar a mucosa gástrica (SOUZA et al., 2016)

Há relatos que, mesmo após a cicatrização da úlcera, neutrófilo e macrófagos persistem dentro e abaixo do epitélio regenerado, esses macrófagos aumentam a produção de citocinas pró inflamatórias levando a quimiotaxia e acúmulo de neutrófilos, estes, liberam proteases e EROs que lesam o tecido cicatrizado e induzem a recorrência da úlcera (ARAKAWA et al., 2012; BOEING, 2015; SANTOS, et al., 2019). Em nosso estudo histológico observou-se que os animais que receberam apenas veículo, apresentaram resultados condicente com o observado macroscopicamente, com intensa presença de células inflamatórias, os animais tratados com Th-EtOHcc nas dose de 10 e 50 mg/kg, bem como os tratados com Th-MeOHcc na dose de 50 mg/kg apresentaram resposta também condicente com o achado macrosopico, semelhante ao observado no grupo tratado com cimetidina na dose 200mg/kg, com presença mínima ou ausência de células inflamatórias. Entretanto, os animais que receberam Th-EtOHcc na dose de 1 mg/kg, embora macroscopicamente tenham apresentando uma boa cicatrização, microscopicamente, o dano ainda estava bastante intenso, não diferindo estatisticamente do grupo veículo. Esse resultado, evidenciou que a dose de 1 mg/kg, embora tenha aparentando

cicatrização da úlcera, não é uma boa dose pra ser utilizada no tratamento, por não ser capaz de tratar internamente a úlcera, podendo ao fim do tratamento, ocasionar a recorrência da mesma. Entretanto, as doses de 10 e 50 mg/kg de Th-EtOHcc, bem como a dose de 50 mg/kg de Th-MeOHcc se mostraram ser tão eficazes quanto a cimetidina na dose de 200 mg/kg, e portanto, mais potente que a mesma.

No processo de cicatrização, vários eventos ocorrem de maneira ordenada para que aconteça reconstituição do tecido. Na fase final de remodelação do tecido, o colágeno desempenha papel fundamental na reorganização tecidual, sendo a proteína de maior abundância envolvida na fase de cura dos tecidos conjuntivos, por isso, na fase final do processo de cicatrização do epitélio gástrico, os colágenos do tipo I, III e IV, têm sua síntese estimulada e se encontram aumentados (DE MELLO; PISSINATTI; FERREIRA, 2010; SOUZA, et al., 2016; VIANA et al., 2019). Os resultados obtidos mostraram que houve aumento significativo da deposição das fibras de colágeno tipo I e III nos animais tratados com cimetidina 200mg/kg, Th-EtOHcc nas doses de 10 e 50mg/kg e Th-MeOHcc na dose de 50 mg/kg, enquanto que o grupo que recebeu apenas veículo, ou tratamento de Th-EtOHcc na dose de 1mg/kg não apresentaram aumento de colágeno demonstrando ausência de regeneração epitelial corroborando com os dados histológicos observados, e mostrando que Th-EtOHc tem como outro mecanismo de ação na cicatrização, o aumento da deposição de fibras de colágeno importante no processo de remodelação tecidual.

Diante dos resultados obtidos, evidenciou-se o efeito gastroprotetor e cicatrizante do Th-EtOHcc frente aos fatores ulcerogênicos, etanol, processo de isquemia e reperfusão e ácido acético. Th-EtOHcc não apresentou toxicidade aguda ou cumulativa ao tratamento consecutivo de 7 dias. Seu efeito gastroprotetor envolve mecanismos relacionados com o aumento de fatores protetores da mucosa gástrica, como a manutenção/aumento do muco gástrico, possível ação antioxidante e ação anti-inflamatória. O efeito cicatrizante gástrico promovido pelo Th-EtOHcc também está relacionado com a produção de muco gástrico, com intensificação do reparo tecidual e estímulo a reepitelização, com aumento da deposição de fibras de colágeno. Assim, o presente trabalho mostrou Th-EtOHcc como um potencial extrato antiulcerogênico e cicatrizante de forma inédita, fornecendo novas perspectivas pra futuros estudos mecanísticos e de toxicidade mais aprofundados.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

- ✓ Th-EtOHcc não apresenta toxicidade em modelo agudo e tratamento consecutivo de 7 dias das doses de 1, 10 e 50 mg/kg;
 - ✓ Th-EtOHcc possui efeito antiulcerogênico em modelos clássicos de lesões gástricas;
 - ✓ Ação anti-inflamatória e aumento de muco gástrico estão entre os mecanismos envolvidos no efeito gastroprotetor de Th-EtOHcc;
 - ✓ Th-EtOHcc e Th-EtOHcc possuem ação cicatrizante de úlcera gástrica no modelo de úlcera crônica induzida por ácido acético 80%;
 - ✓ Ação anti-inflamatória, aumento de muco e aumento da deposição de fibras de colágeno estão entre os mecanismos de ação envolvidos no efeito cicatrizante de Th-EtOHcc;
 - ✓ Aumento na deposição de fibras de colágeno está entre os mecanismos de ação envolvidos no efeito cicatrizante de Th-MeOHcc.
-

Perspectivas

7 PERSPECTIVAS

Na perspectiva de continuar o presente estudo da atividade gastroprotetora de Th-EtOHcc, é importante:

- ✓ Investigar possível ação gastroprotetora das frações hexânica, acetoacética, clorofórmica e metanólica do extrato estudado nos diferentes modelos de úlcera apresentados no presente trabalho;
 - ✓ Investigar o mecanismo de ação envolvido na gastroproteção do extrato e fração estudados, por meio da investigação do envolvimento das prostaglandinas (PGs), óxido nítrico (NO) e canais de potássio sensíveis ao ATP em modelos de indução aguda de lesões gástricas;
 - ✓ Determinar a atividade antioxidante da *Tocoyena hispidula* Standl, através de sua ação sobre os níveis de grupos sulfidrilas não proteicos, a atividade da catalase, glutathione reduzida (GSH), a enzima Superóxido Dismutase (SOD), e parâmetros de estresse oxidativo, como peroxidação lipídica (LPO) e atividade de mieloperoxidase (MPO) em modelos de indução aguda de lesões gástrica;
 - ✓ Avaliação dos níveis séricos de somatostatina, gastrina e PGE₂;
 - ✓ Investigação do envolvimento da bomba H⁺/K⁺-ATPase
-
-

Referências

REFERÊNCIAS

- ABBAS, M. Y.; EJIOFOR, J. I.; YAKUBU, M. I. Acute and chronic toxicity profiles of the methanol leaf extract of *Acacia ataxacantha* D.C (Leguminosae) in Wistar rats. **Bulletin of Faculty of Pharmacy**, v. 56, p.185–189, 2018.
- ABDALLAA, Y. O. A.; NYAMATHULLA, S.; SHAMSUDDIN, N.; ARSHAD, N.M.; MUN, K.S.; AWANG, K.; NAGOOR, N.H. Acute and 28-day sub-acute intravenous toxicity studies of 1'-S-1'- acetoxychavicol acetate in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 356, p. 204–213, 2018.
- ADEFISAYO, M. A.; AKOMOLAFE, R. O.; AKINSOMISOYE, S.O.; ALABIB, Q.K.; OGUNDIPE, O. L.; OMOLEB, J.G.; OLAMILOSOYEB, K.P. Gastro-protective effect of methanol extract of *Vernonia amygdalina* (del.) leaf on aspirin-induced gastric ulcer in Wistar rats. **Toxicology Reports**, v. 4, p. 625–633, 2017.
- AFOLABI, I. S.; MARCUS, G. D.; OLANREWAJU, T. O.; CHIZEA, V. BIOCHEMICAL effect of some food processing methods on the health promoting properties of under – utilized Carica papaya seed. **Journal of Natural Products** v. 4, p. 17-24, 2011.
- AIHARA, T; NAKAMURA, E.; AMAGASE, K.; TOMITA, K.; FUJISHITA, T.; FURUTANI, K.; OKABE S. Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: past, present, and future. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v.98, p. 109-127, 2003.
- AIHARA, T.; NAKAMURA, Y.; TAKETO, M. M.; MATSUI, M.; OKABE, S. Cholinergically stimulated gastric acid secretion is mediated by M (3), M (5), but not M (1) muscarinic acetylcholine receptors in mice. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 288, p. 1199-1207, 2005.
- AKTAR, M.S.; MUNIR, M. Evaluation of the gastric antiulcerogenic effects of *Solanum nigrum*, *Brassica oleracea* and *Ocimum basilicum* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 27, p. 163-176, 1989.
- ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L.; MONTEIRO, J. M.; LINS NETO E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325-354, 2007.
- ALMEIDA, G. V. B.; BALOGUN, K. A. S. O.; PAVAN, E.; ASCÊNCIO, S. D.; SOARES, I. M.; ZANATTA, A. C.; VILEGAS, W.; MACHO, A.; MARTINS, D. T. O. Chemical characterization and evaluation of gastric antiulcer properties of the hydroethanolic extract of the stem bark of *Virola elongata* (Benth.) Warb, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 231, p. 103-124, 2019.
- ANJUSHA, S.; GANGAPRASAD, A. Callus culture and in vitro production of anthraquinone in *Gynochthodes umbellata* (L.) Razafim. & B. Bremer (Rubiaceae) **Industrial Crops and Products**, p. 1-7, 2016.

ARAÚJO, Ruan Pablo Nunes. **Investigação da atividade gastroprotetora do fitol em ratos**. 2018. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2018.

ARAKAWA, T.; WATANABE, T.; TANIGAWA, T.; TOMINAGA, K.; FUJIWARA, Y.; MORIMOTO, K. Quality of ulcer healing in gastrointestinal tract: Its pathophysiology and clinical relevance. **World J Gastroenterol**, v.18, n.35, p. 4811-4822, 2012.

ATHAYDES, B. R.; ALVES, G. M.; ASSIS, A. L. E. M.; GOMES, J. V. D.; RODRIGUES, R. P.; CAMPAGNARO, B. P.; NOGUEIRA, B. V.; SILVEIRA, D.; KUSTER, R. M.; PEREIRA, T. M. C.; KITAGAWA, R. R.; GONÇALVES, R.C. R. Avocado seeds (*Persea americana* Mill.) prevents indomethacin induced gastric ulcer in mice. **Food Research International**. 2018.

AZIZ, R. S.; SIDDIQUA, A.; SHAHZADA, M.; SHABBIRC, A.; NASEEMD, N. Oxyresveratrol ameliorates ethanol-induced gastric ulcer via downregulation of IL-6, TNF- α , NF- κ B, and COX-2 levels, and upregulation of TFF-2 levels. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.110, p.554–560, 2019.

BALAN, T.; SANI, M. H. ; MUMTAZ, A. S. H.; SUPPAIAH, V.; MOHTARRUDIN, N.; ZAKARIA, Z. A..Antioxidant and anti-inflammatory activities contribute to the prophylactic effect of semi-purified fractions obtained from the crude methanol extract of *Muntingia calabura* leaves against gastric ulceration in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 164, p. 1-15, 2015.

BATRA, N. ; TOMAR, M.; GUPTA, V. ZnO–CuO composite matrix based reagentless biosensor for detection of total cholesterol. **Biosensors and Bioelectronics**. 2014.

BHARGAVA, K. P.; GUPTA, M. B.; TANGRI, K. K. Mechanism of ulcerogenic activity of indomethacin and oxyphenbutazone. **European Journal of Pharmacology**, v. 22, p. 191-195, 1973.

BICKEL, M.; KAUFFMAN Jr, G. L. Gastric Gel Mucus Thickness: Effect of Distention, 16,16-Dimethyl Prostaglandin E₂, and Carbenoxolone. **Gastroenterology**, v. 80, p.770-775, 1981.

BI, L. C.; KAUNITZ, J. D. Gastruodenal mucosal defense: na integrated protective response. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.19, p. 526-532, 2003.

BOEING, THAISE. **Avaliação da atividade gastroprotetora e cicatrizante gástrica do extrato etanolica das folhas de *Vernoniacondensata* Baker**. Dissertação do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí, 2015.

BONAMIN, F.; MORAES, T.M.; KUSHIMAA, H.; SILVA, M.A.; ROZZA, A.L.; PELLIZZONC, C.H.; BAUAB, T.M.; ROCHA, L.R.M.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A. Can a *Strychnos* species be used as antiulcer agent? Ulcer healing action from alkaloid fraction of *Strychnospseudoquina* St. Hil.(Loganiaceae).**Journal of Ethnopharmacology**, v.138, p.47– 52, 2011.

BONIN, E. A.; CAMPOS, A.C.L.; COELHO, J.C.U.; MATIAS, J.E.F.; MALAFAIA, O.; JONASSON, T.H. Effect of Pantoprazole Administered Subcutaneously on the Healing of Sutured Gastric Incisions in Rats. **European Surgical Research**, v. 37, p. 250–256, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de informações hospitalares. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/nruf.def>>. Acesso em: 22 de abril de 2019.

CARLSON, B. M. Capítulo 12 - O Sistema Digestivo. **The Human Body Linking Structure and Function**, p. 321-355, 2019.

CERQUEIRA, G. S.; SILVA, G.S.; VASCONCELOS, E.R.; FREITAS, A.P.F.; MOURA, B.A.; MACEDO, D.S.; SOUTO, A.L.; FILHO, J.M.B.; LEAL, L.K.A.; BRITO, G.A.C.; SOUCCAR, C.; VIANA, G.S.B. Effects of hecogenin and its possible mechanism of action on experimental models of gastric ulcer in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 683, p. 260–269, 2012.

CESÁRIO, F. R. A. S.; ALBUQUERQUE, T.R.; LACERDA, G.M.; OLIVEIRA, M.R.C.; SILVA, B.A.F.; RODRIGUES, L.B.; MARTINS, A.O.B.P.B.; ALMEIDA, J.R.G.S.; VALE, M.L.; COUTINHO, H.D.M.; MENEZES, I.R.A. Chemical fingerprint, acute oral toxicity and anti-inflammatory activity of the hydroalcoholic extract of leaves from *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum. **Saudi Journal of Biological Sciences**. 2018 a.

CESÁRIO, F. R. A. S.; ALBUQUERQUE, T.R.; SILVA, B.A.F.; LACERDA, G.M.; RODRIGUES, L.B.; MARTINS, A.O.B.P.B.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; ALMEIDA, J.R.G.S.; VALE, M.L.; COUTINHO, H.D.M.; MENEZES, I.R.A. Evaluation of the antioxidant and gastroprotective activity and HPLC analysis of the hydroalcoholic extract of *Tocoyena formosa* leaves (Cham. & Schlecht) K. Schum, **Food and Chemical Toxicology**. v. 112, p. 355-362, 2018 b.

CHEN, P.; SHEN, Y.; SHI, H.; MA, X.; LIN, B.; XIAO, T.; WU, F.; ZHU, J.; LI, Z.; XIAO, J.; LI, X.; ZHANG, H.; GENG, F. Gastroprotective effects of Kangfuxin-against ethanol-induced gastric ulcer via attenuating oxidative stress and ER stress in mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 260, p. 75-83, 2016.

COELHO, V. P. M.; AGRA, M. F.; BARBOSA, M. R. V. Estudo farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K.Schum. (Rubiaceae) **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 2, p. 170-177, 2006.

CONE, R. A. Barrier properties of mucus. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p.75-85, 2009.

CONNORS, J. M. Ulcers. **xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**, p. 1-8, 2007

CORNE, S. J.; MORRISEY, S. M.; WOODS, R. J. A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucous. **Journal of Physiology**, v. 242, p. 116-117, 1974.

CORUZZI, G.; ADAMI, M.; MORINI, G.; POZZOLI, C.; CENA, C.; BERTINARIA, M.; GASCO, A. Antisecretory and gastroprotective activities of compounds endowed with H2

antagonistic and nitric oxide (NO) donor properties. **J. Physiol Paris**, v. 94, n.1, p. 5-10, 2000.

CRUZ, A.T. Indications and Interpretation of Common Laboratory Assays in the Emergency Department Pediatr. **Pediatric Clinics of North America**, v.65, p. 1191–1204, 2018.

SILVA JUNIOR, I. F.; BALOGUN, S. O.; OLIVEIRA, R. G.; DAMAZO, A. S.; MARTINS, D. T.O. Piper umbellatum L.: A medicinal plant with gastric-ulcerprotective and ulcer healing effects in experimental rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v.192, p.123–131, 2016.

DERINAA, K.V.; KOROTKOVA, E.I.; DOROZHKO, E.V.;VORONOVA, O.A.; VISHENKOVA, D.A. Voltammetric sensor for total cholesterol determination **Procedia Chemistry**. v. 10, p. 513 – 518, 2014.

ELSHAZLY, S.M.; MOTTELEB, D. M. A.; IBRAHIM, I. A.A.E-H. Hesperidin protects against stress induced gastric ulcer through regulation of peroxisome proliferator activator receptor gamma in diabetic rats **Chemico-Biological Interactions**. v. 291, p. 153–161, 2018.

ELBAKYAN, A. Meyler's Side Effects of Drugs (Sixteenth Edition). Histamine H₂ receptor antagonists. **The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions**, p. 751-753, 2016.

FARIAS, R. R. S.; CASTRO, A. A. J. F. Fitossociologia de trechos da vegetação do Complexo de Campo Maior, Campo Maior, PI, Brasil. **Acta botanica brasílica**, v. 18, n. 4, p. 949-963, 2004.

FERRIERO, R.; NUSCO, E.; CEGLI, R.; CARISSIMO, A.; MANCO, G.; BRUNETTI-PIERRI, N. Pyruvate dehydrogenase complex and lactate dehydrogenase are targets for therapy of acute liver failure. **Journal of Hepatology**, v. 69, p. 325-335, 2018.

FREITAS, F.F.B.P.; FERNANDES, H.B.; PIAUILINO, C.A.; PEREIRA, S.S.; CARVALHO, K.I.M.; CHAVES, M.H.; SOARES, P.M.G.; MIURA, L.M.C.V.; LEITE, J.R.S.A.; OLIVEIRA, R.C.M.; OLIVEIRA, F.A. Gastroprotective activity of Zanthoxylum rhoifolium Lam. in animal models. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 137, p. 700-708, 2011.

HOGBEN, C. A.; KENT, T. H.; WOODWARD, P. A.; SILL, A.J. Quantitative histology of gastric mucosa: Man, dog, cat, guinea, pig, and frog. **Gastroenterology**, v. 67, n. 6, p. 1143-1154, 1974.

HOLLENBACH, C. B. **Estudo da toxicidade reprodutiva de duas formulações fitoterápicas comerciais contendo soja [Glycine max (L.) Merr] em ratos wistar**. 2008. 132f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

IMAI, Y. 3 - Biomechanics of the Digestive System. **Integrated Nano-Biomechanics Micro and Nano Technologies**, p. 71-99, 2018.

IWATA, F.; KOO, A.; ITOH, M.; LAM, K.; LEUNG, J. W.; LEUNG, F. W. Functional evidence linking potassium channels and afferent nerve-mediated mucosal protection in rat stomach. *Life Sciences*. v. 61, n.17, p. 1713-1720, 1997.

JAMUNA, S.; KARTHIKA, K.; PAULSAMY, S.; THENMOZHI, K.; KATHIRAVAN, S.; VENKATESH, R. Confertin and scopoletin from leaf and root extracts of *Hypochoeris radicata* have anti-inflammatory and antioxidant activities. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 221-230, 2015.

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochemicat Journal**, v. 11, p. 447-455, 1979.

KALAYCI, M.; MAKULOGLU, T. K.; SAHIN, İ.; SARAC, M.; AKSOY, A.; YARDIM, M.; DALKILIC, S.; GURSU, O.; AYDIN, S.; AKKOC, R. F.; UGRAS, M.; ARTAS, G.; OZERCAN, İ. H.; UGUR, K.; AYDIN, S. Comparison of the therapeutic effects of sildenafil citrate, heparin and neuropeptides in a rat model of acetic acid-induced gastric ulcer, **Life Sciences**. 2017.

KOMASAKA, M.; HORIE, S.; WATANABE, K.; MURAYAMA, T. Antisecretory effect of somatostatin on gastric acid via inhibition of histamine release in isolated mouse stomach. *European Journal of pharmacology*, v. 452, p. 235-243, 2002

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

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

LAURENCE, L.; MENON, S.; VINCENT, S.; SIVARAM, V.P.; PADIKKALA, J. Radical scavenging and gastroprotective activity of methanolic extract of *Gmelina arborea* stem bark. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, v. 7, p. 78-82, 2016.

LEEMAN, M. F.; SKOURAS, C.; PATERSON-BROWN, S. The management of perforated gastric ulcers International. **Journal of Surgery**, v. 11, p. 322-324, 2013.

LIANG, J.; DOU, Y.; WU, X.; LI, H.; WU, J.; HUANG, Q.; LUO, D.; YI, T.; LIU, Y.; SU, Z.; CHEN, J. Protective effect of patchoulene epoxide against ethanol-induced gastric ulcer in rats: Influence on oxidative stress, inflammation and apoptosis, **Chemico-Biological Interactions**. 2018.

LIM, J. H.; KIM, J. H.; KIM, N.; LEE, B. H.; SEO, P. J.; KANG, J. M.; JO, S. Y.; PARK, J. H.; NAM, R. H.; CHANG, H.; KWON, J. W.; LEE, D. H. Gastroprotective Effect of *Cochinchina momordica* Seed Extract in Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug-Induced Acute Gastric Damage in a Rat Model. **Gut and Liver**, v. 8, n. 1, p. 49–57, 2014.

LUI, F. Laboratory tests in liver Failure CLINICAL ASSESSMENT Anaesthesia and intensive care medicine 2017.

LU, H., GRAHAM, D. Y. New development in the mechanistic understanding of peptic ulcer diseases. **Drug Discov Today**, v. 3, n. 4, p. 431-437, 2006.

LUZ, B. B.; OLIVEIRA, A. F.; FERREIRA, D. M.; DALLAZEN, J. L.; CIPRIANI, T. R.; SOUZA, L. M.; WERNER, M. F. P. Chemical composition, antioxidant and gastrointestinal properties of *Sedum dendroideum* Moc & Sessé ex DC leaves tea infusion. **Journal of Ethnopharmacology**, 2018.

MARTINS, A. P. Regimes terapêuticos para a úlcera péptica. **Laboratory investigation**, v.21, p.431-444, 2005.

MAGIEROWSKI, M.; MAGIEROWSKA, K.; HUBALEWSKAMAZGAJ, M.; SURMIAK, M.; SLIWOWSKI, Z.; WIERDAK, M.; KWIECIEN, S.; CHMURA, A.; BRZOZOWSKI, T. Cross-talk between hydrogen sulfide and carbon monoxide in the mechanism of experimental gastric ulcers healing, regulation of gastric blood flow and accompanying inflammation. **Biochemical Pharmacology**. n. 149, p. 131-142, 2017.

MAHATTANADUL, S.; RIDTITID, W.; NIMA, S.; PHDOONGSOMBUT, N.; RATANASUWON, P.; KASIWONG, S. Effects of *Morinda citrifolia* aqueous fruit extract and its biomarker scopoletin on reflux esophagitis and gastric ulcer in rats **Journal of Ethnopharmacology**, v.134, n. 2, p. 243-250, 2011.

MAHMOUD, Y. I.; EL-GHFFAR, E. A. A. Spirulina ameliorates aspirin-induced gastric ulcer in albino mice by alleviating oxidative stress and inflammation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 314–321, 2019.

MANJEGOWDA, S. B.; RAJAGOPAL, H. M.; DHARMESH, S.M. Polysaccharide of Black cumin (*Nigella sativa*) modulates molecular signaling cascade of gastric ulcer pathogenesis, **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017.

MARTINS, J.L.R. **Mecanismos envolvidos na atividade gastroprotetora do extrato hexânico das folhas de *Celtisiguanaea* (jacq.) sargent (cannabaceae) e da fração aquosa do extrato hidroacetônico de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae)**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

MELLO, M. F. V.; PISSINATTI, A.; FERREIRA, A. M. R. Distribution of collagen types I, III, and IV in gastric tissue of marmosets (*Callithrix* spp. Callitrichidae: Primates). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 4, p. 317-320, 2010.

MEDEIROS, J. V.; GADELHA, G. G.; LIMA, S. J.; GARCIA, J. A.; SOARES, P. M.; SANTOS, A. A.; BRITO, G. A.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. Role of the NO/cGMP/K(ATP) pathway in the protective effects of sildenafil against ethanol-induced gastric damage in rats, **Br. Journal of Pharmacology**, v. 153, p. 721-727, 2008.

MIZUI, T.; DOUTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 33, p. 934-945, 1983.

MOREIRA, S. S.; TAMASHIRO, L. K.; JORGE, B. C.; BALIN, P. S.; HEREDIA-VIEIRA, S. C.; ALMEIDA, G. L.; CARDOSO, C. A. L.; KASSUYA, C. A. L.; ARENA, A. C.

- Toxicological safety evaluation in acute and 28-day studies of aqueous extract from *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae) leaves in rats, **Journal of Ethnopharmacology**, 2018.
- MOSSNER, J.; CACA, K. Developementes in the inhibition of gastric acid secretion. **European Journal of Clinical Investigacion**, v. 35, p. 469-475, 2005.
- NG'UNI, T.; KLAASEN, J. A. ;FIELDING, B.C. Acute toxicity studies of the South African medicinal plant *Galenia africana*. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 813–818, 2018.
- OKABE, S., PFEIFFER, C.J. Chronicity of acetic acid ulcer in the rat stomach. **Digestive and diseases**, v. 7, p. 619-629, 1972.
- OECD (2001), *Test No. 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.
- OECD (2008), *Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.
- OECD (2002), *Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.
- OLIVEIRA, Irisdalva Sousa. **Possíveis mecanismos envolvidos na ação gastroprotetora do carvacrol**. 2011.Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.
- OLIVEIRA, I. S.; SILVA, F.V.; VIANA, A.F. S. C.; SANTOS, M.R.V.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; MARTINS, M.C.C.; NUNES, P.H.M.; OLIVEIRA, F.A.; OLIVEIRA, R.C.M. Gastroprotective activity of carvacrol on experimentally induced gastric lesions in rodents. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 385, n. 9, p. 899–908, 2012.
- PINTO, Lorraine Aparecida. **Aplicação do extrato da semente do mamão (*Carica papaya* Linn) na prevenção e no tratamento da úlcera gástrica induzida em animais**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS, 2013
- PIOVESAN, N.; VIERA, V. B. Produção e controle de produtos naturais [recurso eletrônico] – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2018.
- POMPILIO, C. E.; CECCONELLO, I. Profilaxia das úlceras associadas ao estresse. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v.23, n. 2, p.114-117, 2010.
- POSER, G. L. V.; SEIBT, L. T. Gardenoside from *Tocoyena bullata*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 669 – 670, 1998.
- POSSENTI, A.; CARVALHO, J. E.; MONTEIRO, K. M.; DIAS, I. M. G.; GIBRIM, N. F.; JACOBUCCI, H. B. Efeito de fermentado (utilizado como alimento funcional) sobre: a citoproteção gástrica, atividade anti-secretória e a motilidade intestinal em animais. **International Journal of Nutrology**, v.5, n.1, p. 35-41, 2012.

- POTRICH, Francine Bittencourt. **Atividade gastroprotetora do extrato bruto Hidroalcoólico da *Achillea millefolium* L.: Envolvimento do sistema antioxidante**. 2009. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2009.
- REPETTO, M.G.; LLESUY, S.F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 523-534, 2002.
- RIBEIRO, D. D. S. F.; FREIRE, J. M. O.; TEIXEIRA, A. H.; VAL D. R. D.; FREITAS, A. R.; GOMES, F. I. F.; SILVA, A. A. R. E.; BANDEIRA, P. N.; SANTOS, H. S. D.; SANTOS, W. P. D.; ÁVILA, F. N.; PEREIRA, K. M. A; GOES, P.; PINTO, V. P. T.; CRISTINO-FILHO, G.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; CHAVES, H. V.; BEZERRA, M. M. *Tocoyena sellowiana* extract decreases bone loss in an experimental model of periodontitis in rats: Putative role for cyclooxygenase-2 and IL-1 β inhibition **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 98, p. 863–872, 2018.
- RIBEIRO, D. A.; OLIVEIRA, L. G.; MACÊDO, D. G.; MENEZES, I. R.; COSTA, J. G.; SILVA, M. A.; LACERDA, S. R.; SOUZA, M. M. Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil **Journal of Ethnopharmacology**, p.1-12, 2014.
- RIBEIRO, R. V.; BIESKI, I. G. C.; BALOGUN, S. O.; MARTINS, D. T. O. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil **Journal of Ethnopharmacology**, p.1-83, 2017.
- RICARDO, L. M.; PAULA-SOUZAD, J.; ANDRADEB, A.; BRANDÃO, M. G. L. Plants from the Brazilian Traditional Medicine: species from the books of the Polish physician Piotr Czerniewicz (Pedro Luiz Napoleão Chernoviz, 1812–1881) **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 388–400, 2017.
- ROBERT, A.; NEZAMIS, J. E.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A. J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterology**, v. 77, p. 433, 1979.
- ROLAND, J. T.; CHOI, E.; BARLOW, B. J.; O'NEAL, R.; RICH, A. E.; NAM, K. T.; SHI, C.; GOLDENRING, J. R. Geographic Mapping of the Cell Lineages Within the Human Stomach Reveals Regional Concentrations of Enteroendocrine Cells and Parietal Cells Throughout the Antrum. **Gastroenterology**, v. 144, Supplement 1, p. S-8, 2013.
- ROWE, Emma L.; WHITE, Nathaniel A. Reperfusion injury in the equine intestine. **Clinical techniques in equine practice**, v. 1, n. 3, p. 148-162, 2002.
- SABBATINI, M. E.; GORELICK, F.; GLASER, S. Adenylyl cyclases in the digestive system. **Cellular Signalling**, v. 26, p.1173-1181, 2014.
- SAGUN, K. Antioxidant potential, anti-inflammatory activity and gastroprotective mechanisms of *Mallotus roxburghianus* (Muell.) against ethanol-induced gastric ulcers in Wistar albino rats **Journal of Functional Foods**. v. 36, P. 448-458, 2017.

SÁNCHEZ, M.; THEODULOZ, C.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RAZMILIC, I.; YÁÑEZ, T.; RODRÍGUEZ, J.A. Gastroprotective and ulcer-healing activity of oleanolic acid derivatives: In vitro–in vivo relationships. *Life Sciences*, v. 79, n. 14, p. 1349-1356, 2006.

SANTOS, R. C.; BONAMINA, F.; PÉRICOA, L.L.; RODRIGUES, V.P.; ZANATTA, A.C.; RODRIGUES, C.M.; SANNOMIYA, M.; RAMOS, M.A.S.; BONIFÁCIO, B.V.; BAUAB, T.M.; TAMASHIRO, J.; ROCHA, L.R.M.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMAA, C.A. *Byrsonima intermedia* A. Juss partitions promote gastroprotection against peptic ulcers and improve healing through antioxidant and anti-inflammatory activities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 111, p. 1112-1123, 2019.

SCHNEIDER, Roseleine Emilia Guevedo. Avaliação do Efeito Gastroprotetor da Cutícula Coilina Retirada do Ventrículo de Gallus Gallus Domesticus em Ratos. 2014.

SCHUBERT, M. L.; PEURA, D. A. Control os gastric acid secretion in healt and disease. **Gastroenterology**. V. 134, n. 7, p. 1842-1860, 2008.

SHAY, H.; KOMAROV, S. A.; FELLS, S. S.; MERANZE, D.; GRUENSTEIN, M.; SIPLET, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in rat. **Gastroenterology**, v. 5, p. 43, 1945.

SHEHATA, I. A.; EL-HARSHANY, E.; ABDALLAH, H.M.; ESMAT, A.; ABDEL-SATTAR.; E.A. Anti-inflammatory activity of *Kleinia odora* **European Journal of Integrative Medicine**, v. 23, p. 64-69, 2018.

SHEN, Y.; SUN, J.; NIU, C.; YU, D.; CHEN, Z.; CONG, W.; GENG, F. Mechanistic evaluation of gastroprotective effects of Kangfuxin on ethanol-induced gastric ulcer in mice *Chemico-Biological Interactions*. v. 273, p. 115-124, 2017.

SIDAHMED, H. M. A.; VADIVELU, J.; LOKE, M.F.; ARBAB, I.A.; ABDUL, B.; SUKARI, M.A.; ABDELWAHAB, S.I. Anti-ulcerogenic activity of dentatin from *Clausena excavata* Burm.f.against ethanol-induced gastric ulcer in rats: possible role of mucus and anti-oxidant effect. **Phytomedicine**. p. 1-29, 2018.

SILVA, Francilene Vieira **Investigação do potencial farmacológico dos monoterpenos carvacrol e (-)-linalol livres ou complexados e o desenvolvimento de formulação tópica para aplicações farmacêuticas**. 2017. Tese (Doutorado Renorbio) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

SOMAVILLAA, N. S.; COSENZAC, G. P.; FAGGE, C. W.; BRANDÃO, M. G. L. Morpho-anatomy and chemical profile of native species used as substitute of quina (*Cinchona* spp.) in Brazilian traditional medicine. Part II: *Remijia ferruginea* **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 27, p.153–157, 2017.

SOMENSI, L. B. Hydroalcoholic extract from bark of *Persea major* (Meisn.) L.E. Kopp (Lauraceae) exerts antiulcer effects in rodents by the strengthening of the gastric protective factors. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 209, p. Pages 294-304, 2017.

SOUSA, E. A.; ROSA, A.P.A.; SANTOS, R.R.L.; SANTOS, I.L.; SOUSA, V.C.; CARVALHO, F.A.A.; JÚNIOR, G.M.V.; CHAVES, M.H. Composição química e atividade antileishmania de *Tocoyena hispidula* **Química Nova**, v. XY, n. 00, p.1-5, 2018a.

SOUSA, E. A.; CHAVES, M. H.; SILVA, L. F. F.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; ALMEIDA, B. C.; FARIAS, R. R. S. Capítulo 10: Iridoídes e cumarinas do caule de *Tocoyena hispidula*. In: PIOVESAN, N.; VIEIRA, V. B. (org.) Produção e Controle de Produtos Naturais. Ponta Grossa (PR): Atena Editora. 2018b.

SOUSA, E. A. **Estudo químico e biológico da espécie *Tocoyena hispidula* Standl. 2018.** Relatório científico (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2018.

SOUSA, Glaubert Aires. **Avaliação da atividade gastroprotetora dos extratos etanólicos da casca do caule e das raízes de *Pilosocereus gounellei* (A. Weber ex K. Schum.) Bly. ExRowl (Cactaceae) em modelos animais.** 2013. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2013.

SOUSA, G.A.; OLIVEIRA, I.S.; SILVA-FREITAS, F.V.; VIANA, A. F. S.C.; NETO, B. P.S.; CUNHA, F.V.M.; GONÇALVES, R.L.G.; FILHO, A.C.M.L.; AMARAL, M.P.M.; OLIVEIRA, R.C.M.; FERNANDES, P.D.; MACIEL, J.K.S.; SILVA, T.M.S.; SOUZA, M.F.V.; OLIVEIRA, F.A. Gastroprotective effect of ethanol extracts of cladodes and roots of *Pilosocereus gounellei* (A. Weber ex K. Schum.) Bly. Ex Rowl (Cactaceae) on experimental ulcer models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 218, p. 100-108, 2018.

SOUSA, L.A.; BAUTISTA, H.P.; JARDIM, J.G. Floristic diversity of Rubiaceae on the Serra da Fumaça - Mountains complex of Jacobina, Bahia, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 13, n. 3, p. 289-314, 2013.

SOUZA, L. K. M.; SOUZA, L.K.M.; NICOLAU, L.A.D.; SOUSA, N.A.; ARAÚJO, T.S.L.; SOUSA, F.B.M.; COSTA, D.S.; SOUZA, F.M.; PACÍFICO, D.M.; MARTINS, C.S.; SILVA, R.O.; SOUZA, M.H.L.P.; CERQUEIRA, G.S.; MEDEIROS, J.V.R. Diminazene acetate, an angiotensin-converting enzyme II activator, prevents gastric mucosal damage in mice: Role of the angiotensin-(1-7)/ Mas receptor axis. **Biochemical Pharmacology**. v. 112, p. 50–59, 2016.

SPECHLER, S. J. Proton Pump Inhibitors What the Internist Needs to Know **Medical Clinics of North America**. 2018.

SZABO, S; TRIER, J. S.; BROWN, A.; SCHNOOR, J. Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. **Gastroenterology**, v. 88, n. 1, pt 2, p. 228-236, 1985.

UPADHYAY, P.; SHUKLA, R.; MISHRA, S. K. Acute and sub-acute toxicity study of hydro-alcoholic leaves extract of *Reinwardtia indica* in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 36–41, 2019.

VARIYA, B C.; BAKRANIA, A. K.; MADAN, P.; PATEL, S. S. Acute and 28-days repeated dose sub-acute toxicity study of gallic acid in albino mice **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 101, p. 71–78, 2019.

VERMA, S.; KUMAR, V. L. Artesunate affords protection against aspirin-induced gastric injury by targeting oxidative stress and proinflammatory signalling. **Farmacology Reports**, p. 1-27, 2017.

VIANA, A. F. S. C.; LOPES, M.T.P.; OLIVEIRA, F.T.B.; NUNES, P.I.G.; SANTOS, V.G.; BRAGA, A.D.; SILVA, A.C.A.; SOUSA, D.P.; VIANA, D.A.; RAO, V.S.; OLIVEIRA, R.C.M.; SANTOS, F.A. (-)-Myrtenol accelerates healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats and in human gastric adenocarcinoma cells, **European Journal of Pharmacology**, v. 854, p. 139-148, 2019.

VILLEGAS, I.; MARTÍN, A.R.; TOMA, W.; DE LA LASTRA, C.A. Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, protects against gastric ischemia-reperfusion damage in rats: role of oxygen free radicals generation. **European Journal of Pharmacology**, v. 505, p. 195– 203, 2004.

WALLIG, M. A. Chapter 15 - Digestive System. **Fundamentals of Toxicologic Pathology (Third Edition)**, p. 395-442, 2018.

WANG, T.; ZHAO, S.; WANG, Y.; YANG, Y.; YAO, L.; CHU, L; DU, H.; FU, F. Protective effects of escin against indomethacin-induced gastric ulcer in mice **Toxicology Mechanisms and Methods** v. 24, n. 8, p. 560–566, 2014.

WILSON, R.L.; STEVENSON, C. E. Chapter 56 - Anatomy and Physiology of the Stomach. **Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract**, v. 1, p. 634-646, 2019.

WOLFF, F. R.; BROERING, M. F.; JURCEVIC, J. D.; ZERMIANI, T.; BRAMORSKI, A.; VITORINO, J. C.; MALHEIROS, A.; SANTIN, J. R. Safety assessment of *Piper cernuum* Vell. (Piperaceae) leaves extract: Acute, sub-acute toxicity and genotoxicity studies, **Journal of Ethnopharmacology**, 2018.

WROBLEWSK, L. E.; PEEK, R. M.; WILSON, K. T. Helicobacter pylori and Gastric Cancer: Factors That Modulate Disease Risk. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

XU, F.; HUANG, X.; WU, H.; WANG, X. Beneficial health effects of lupenone triterpene: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.103, p. 198-203, 2018

YAO, X.; DING, Z.; XIA, Y.; WEI, Z.; LUO, Y.; FELEDER, C.; DAI, Y. Inhibition of monosodium urate crystal-induced inflammation by scopoletin and underlying mechanisms. **International Immunopharmacology**, v. 14, n. 4, p. 454-462, 2012.

YOO, J.-H.; LEE, J.-S.; LEE, Y.-S.; KU, S.; LEE, H.-J. Protective effect of bovine milk against HCl and ethanol-induced gastric ulcer in mice. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 1–13.

YOUS, F.; ATMANI-KILANI, D.; DEBBACHE-BENAIIDA, N.; CHERAFT, N.; SEBAIHI, S.; SAIDENE, N.; BENLOUKIL, M.; ATMANI, D. Anti-ulcerogenic and proton pump (H⁺, K⁺ ATPase) inhibitory activity of *Clematis flammula* L. extract. **South African Journal of Botany**, v. 119, p. 390–399, 2018.

ZACHARIAH, S.; KUMAR, K.; LEE, S.W.H.; CHOON, W.Y.; NAEEM, S.; LEONG, C.
Interpretation of Laboratory Data and General Physical Examination by Pharmacists Chapter
7 Clinical Pharmacy Education, Practice and Research.

ZHANG, K.; LIU, Y.; WANG, C.; LI, J.; XIONG, L.; WANG, Z.; LIU 1, J.; LI, P.
Evaluation of the gastroprotective effects of 20 (S)-ginsenoside Rg3 on gastric ulcer models
in mice. **Journal of Ginseng Research**. p.1-12, 2018.

ANEXO I - FOLHA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**



Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceepi@ufpi.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação da atividade gastroprotetora de *Tocoyena em roedores***", registrada nº **413/17**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. RITA DE CÁSSIA MENESES OLIVEIRA do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia/CCS/UFPI** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **27/04/2018**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Maio/2018 à Fevereiro/2019
Espécie/Linhagem/raça	Camundongo heterogênico/swiss Rato heterogênico/wistar
Nº de Animais	474 318
Peso/ Idade	25-30g 180-220g
Sexo	237 Machos e 237 Fêmeas 159 Machos e 159 Fêmeas
Origem	Biotério Setorial da UFPI

Teresina, 27 de Abril de 2018.

Waldileny Ribeiro de Araújo Moura

Profa. Dra. Waldileny Ribeiro de Araújo Moura
Vice- Coordenadora da CEUA/UFPI