



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE GASTROPROTETORA  
DO EXTRATO HEXÂNICO DAS FOLHAS DE *Celtis iguanaea* (JACQ.)  
SARGENT (Cannabaceae) E DA FRAÇÃO AQUOSA DO EXTRATO  
HIDROACETÔNICO DE *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae)**

**JOSÉ LUÍS RODRIGUES MARTINS**

**Goiânia  
2015**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**       Dissertação       Tese

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

Autor (a):	José Luís Rodrigues Martins		
E-mail:	jlfarmacia@hotmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor	Professor		
Agência de fomento:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	Sigla:	CAPES
País:	Brasil	UF: Brasília	DF      CNPJ:
Título:	Mecanismos envolvidos na atividade gastroprotetora do extrato hexânico das folhas de <i>Celtis iguanaea</i> (JACQ.) Sargent (Cannabaceae) e da fração aquosa do extrato hidroacetônico de <i>Eugenia uniflora</i> L. (Myrtaceae).		
Palavras-chave:	Úlceras pépticas, <i>Celtis iguanaea</i> (JACQ.) Sargent, <i>Eugenia uniflora</i> L., Oenoteína B, atividade gastroprotetora.		
Título em outra língua:	Mechanisms involved in gastroprotective activity of the hexane leaf extract of <i>Celtis iguanaea</i> (JACQ.) Sargent (Cannabaceae) and aqueous fraction of hydroacetone extract of <i>Eugenia uniflora</i> L. (Myrtaceae).		
Palavras-chave em outra língua:	Peptic ulcers, <i>Celtis iguanaea</i> (JACQ.) Sargent, <i>Eugenia uniflora</i> L., Oenotein B, gastroprotective activity.		
Área de concentração:	Farmacologia e Fisiologia		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	29/05/2015		
Programa de Pós-Graduação:	Ciências Biológicas		
Orientador (a):	Prof. Dr. Elson Alves Costa		
E-mail:	xico@ufg.br		
Co-orientador (a):*			
E-mail:			

\*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação. O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: 18 / 12 / 2015

Assinatura do (a) autor (a)

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

**JOSÉ LUÍS RODRIGUES MARTINS**

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE  
GASTROPROTETORA DO EXTRATO HEXÂNICO DAS FOLHAS  
DE *Celtis iguanaea* (JACQ.) SARGENT (Cannabaceae) E DA  
FRAÇÃO AQUOSA DO EXTRATO HIDROACETÔNICO DE  
*Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae)**

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas

Área de concentração: Farmacologia e Fisiologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Elson Alves Costa

**Goiânia**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Rodrigues Martins, José Luís

Mecanismos envolvidos na atividade gastroprotetora do extrato hexânico das folhas de *Celtis iguanaea* (JACQ.) Sargent (Cannabaceae)  
e da fração aquosa do extrato hidroacetônico de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae)  
[manuscrito] / José Luís Rodrigues Martins. - 2015.  
CXXVI, 126 f.

Orientador: Prof. Dr. Elson Alves Costa.  
(Graduação) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências  
Biológicas (ICB) , Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2015.

Inclui siglas, abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Úlceras pépticas. 2. *Celtis iguanaea* (JACQ.) Sargent. 3. *Eugenia uniflora* L. 4. Oenoteína  
B. 5. Atividade gastroprotetora. I. Alves Costa, Elson, orient. II. Título.

**JOSÉ LUÍS RODRIGUES MARTINS**

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE GASTROPROTETORA  
DO EXTRATO HEXÂNICO DAS FOLHAS DE *Celtis iguanaea* (JACQ.)  
SARGENT (Cannabaceae) E DA FRAÇÃO AQUOSA DO EXTRATO  
HIDROACETÔNICO DE *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae)**

**BANCA EXAMINADORA**

  
Prof. Dr. Elson Alves Costa

Presidente da banca

Universidade Federal de Goiás

  
Prof. Dr. David do Carmo Malvar

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

  
Prof. Dr. Anderson Luiz Ferreira

Universidade Federal de Goiás

  
Profa. Dra. Joelma Abadia Marciano de Paula

Universidade Estadual de Goiás

  
Prof. Dr. Ricardo Menegatti

Universidade Federal de Goiás

Aprovada em: 29/05/2015

*Aos meus pais, José Umberto e Heloiza Helena, e irmão Pedro Ivo, por todo amor, carinho, apoio, paciência, proteção e incentivo.*

*A família Rodrigues e Martins pela confiança e respeito.*

*A Emerith Mayra, pelo companherismo, carinho, dedicação, paciência e amor.*

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente a Deus por me conceder vida, saúde, paciência e sabedoria, para realização deste trabalho.*

*Aos meus pais José Umberto e Heloiza Helena e meu irmão Pedro Ivo, pelo apoio, compreensão, paciência e incentivo nesta jornada árdua, porém muito valorosa. Por dedicarem suas valorosas vidas em prol da minha.*

*À Emerith pelo companherismo, carinho e amor, por suportar meus conflitos e estresse, por compartilhar momentos de tristeza, dor, alegria e felicidade.*

*A toda minha família que acompanhou e vibrou por todas as conquistas alcançadas. Obrigado Família.*

*Aos amigos do laboratório (LFPN), Marcus, Pablinny, Iziara, Fábio, James, Adriane, Roberta, Oscar, Dayanne Moreira, Dayanne Priscila, Danilo, Patrícia pelo companheirismo, dedicação, apoio e ensinamentos que irei levar por toda minha vida.*

*A Dra. Suzana Costa Santos pela colaboração e amizade.*

*A todos os professores, funcionários e alunos do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, que pelo esforço e dedicação de todos, contribuíram para a realização desta tese e do crescimento deste programa de Pós-graduação.*

*Agradeço especialmente ao Dr. Paulo César Ghedini e ao Dr. Anderson Luiz Ferreira pelos ensinamentos compartilhados, colaboração, amizade e discussões que muito contribuíram para este sonho;*

*Ao meu orientador e amigo Dr. Elson Alves Costa, por sempre acreditar e confiar no meu trabalho, não negando esforços para que eu pudesse ser um grande homem. Ensinou-me a ser um profissional dedicado, objetivado a vencer limites. Ensinou-me a ser bondoso e leal, a ter consciência que estamos sempre em aprendizado. Agradeço também a sua família, pela amizade e carinho.*

*Enfim, agradeço de coração a todos aqueles que me ajudaram até agora, aqueles que contribuíram para meu caráter e formação.*

*Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles são a abertura para achar as que estão certas". Eu as procurei.....*

*(Carl Sagan)*

## *SUMÁRIO*

Lista de Abreviaturas e Siglas.....	X
Lista de Figuras.....	XII
Lista de quadros.....	XIII
Apresentação.....	XIV
Resumo.....	XVII
Abstract.....	XIX
1. Introdução.....	1
1.1. Plantas Medicinais.....	2
1.2. <i>Celtis iguanaea</i> (Jacq.) Sargent.....	3
1.3. <i>Eugenia uniflora</i> L. ....	6
1.4. Taninos.....	8
1.4.1 Oenoteína B.....	9
1.5. Úlcera péptica.....	10
1.5.1. Etiologia da úlcera péptica.....	11
1.5.2. Fisiopatologia da úlcera péptica.....	12
1.5.3. Fatores moduladores da secreção gástrica.....	13
1.5.3.1. Gastrina e colescistoquinina (CCK).....	14
1.5.3.2. Acetilcolina.....	15
1.5.3.3. Histamina.....	16
1.5.3.4. Grelina.....	18
1.5.3.5. Peptídeo intestinal vasoativo.....	19
1.5.4. Fatores protetores da mucosa gástrica.....	19
1.5.4.1. Muco e HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....	19
1.5.4.2. PGs.....	20
1.5.4.3. NO .....	22
1.5.4.4. Noradrenalina.....	24
1.5.4.5. SST.....	25
1.5.4.6. Secretina.....	25
1.5.4.7. Fluxo sanguíneo.....	26
1.5.4.8. Sistema antioxidante.....	26
1.6. Farmacoterapêutica da úlcera péptica.....	27
2. Justificativa.....	30
3. Objetivos.....	32

3.1. Objetivo geral.....	33
3.2. Objetivos específicos.....	33
4. Capítulo1.....	34
5. Capítulo 2.....	60
6. Capítulo 3.....	81
7. Discussão.....	100
8. Conclusões.....	109
Referências Bibliográficas.....	112

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AINEs	Anti-inflamatórios não-esteroidais
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
CCK	Colecistocinina
CCK-2	Receptores de gastrina/colecistocinina do tipo 2
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
Cl <sup>-</sup>	Íon cloreto
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenase
DA	Dopamina
DAG	Diacilglicerol
ECL	Células enterocromafíns
EHEG	Extrato <i>n</i> -hexânico das folhas de esporão-de-galo
EP <sub>1</sub>	Receptor de prostaglandina subtipo 1
EP <sub>2</sub>	Receptor de prostaglandina subtipo 2
EP <sub>3</sub>	Receptor de prostaglandina subtipo 3
EP <sub>4</sub>	Receptor de prostaglandina subtipo 4
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAHP	Fração aquosa do extrato hidroacetônico das folhas de <i>Eugenia uniflora</i>
GC	Guanilato ciclase
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona
GSSG	Glutaciona oxidada
GTP	Guanosina trifosfato
H <sub>1</sub>	Receptor de histamina subtipo 1
H <sub>2</sub>	Receptor de histamina subtipo 2

H <sub>3</sub>	Receptor de histamina subtipo 3
H <sub>4</sub>	Receptor de histamina subtipo 4
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bicarbonato
ID	Intestino delgado
i.d.	Intraduodenal
IP <sub>3</sub>	Trifosfato de inositol
L-NAME	<i>L</i> -NG-nitroarginina metil éster
M <sub>1</sub>	Receptor muscarínico subtipo 1
M <sub>2</sub>	Receptor muscarínico subtipo 2
M <sub>3</sub>	Receptor muscarínico subtipo 3
M <sub>4</sub>	Receptor muscarínico subtipo 4
M <sub>5</sub>	Receptor muscarínico subtipo 5
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
NP-SH	Grupamentos sulfidrilas não-protéicos
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
OMS	Organização mundial de saúde
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandina D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGF <sub>2</sub> α	Prostaglandina F <sub>2</sub> α
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
PGs	Prostaglandinas
PKA	Proteína Quinase A
PKC	Proteína Quinase C
SCT	Secretina
SNC	Sistema Nervoso Central
SNE	Sistema Nervoso Entérico

SOD	Superóxido dismutase
SST	Somatostatina
SST <sub>1</sub>	Receptor de somatostatina subtipo 1
SST <sub>2</sub>	Receptor de somatostatina subtipo 2
SST <sub>3</sub>	Receptor de somatostatina subtipo 3
SST <sub>4</sub>	Receptor de somatostatina subtipo 4
SST <sub>5</sub>	Receptor de somatostatina subtipo 5
TGI	Trato gastrointestinal
TXA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>
VIP	Polipeptídeo intestinal vasoativo
VPAC1	Receptor do VIP subtipo 1
VPAC2	Receptor do VIP subtipo 2
α <sub>2a</sub>	Receptores adrenérgicos α <sub>2</sub> subtipo A
α <sub>2b</sub>	Receptores adrenérgicos α <sub>2</sub> subtipo B
α <sub>2c</sub>	Receptores adrenérgicos α <sub>2</sub> subtipo C
5-HT	Serotonina

**LISTA DE FIGURAS**

<b>FIGURA 1</b> - Árvore de <i>Celtis iguanaea</i> (Jacq.) Sargent (esporão-de-galo), zona rural em Goiânia-GO.....	4
<b>FIGURA 2</b> – Folhas e frutos de <i>Celtis iguanaea</i> (Jacq.) Sargent (esporão-de-galo), zona rural em Goiânia.....	5
<b>FIGURA 3</b> - Árvore de <i>Eugenia uniflora</i> L. (pitanga).....	7
<b>FIGURA 4</b> - Estrutura do estômago .....	12
<b>FIGURA 5</b> - Esquema de secreção de HCl pela célula parietal .....	18
<b>FIGURA 6</b> - Sinalização do óxido nítrico e vias de intervenção com potencial terapêutico .....	22
<b>FIGURA 7</b> - Diagrama esquemático dos mecanismos de ação do NO que estão envolvidos nos mecanismos de defesas da mucosa gastrointestinal.....	23
<b>FIGURA 8</b> - Formação das espécies reativas de oxigênio EROs e ações das enzimas antioxidantes no organismo .....	27
<b>FIGURA 9</b> - Diagrama esquemático ilustrando três dos principais componentes de patogênese dos AINEs na indução da lesão da mucosa gastrointestinal.....	101

**LISTA DE QUADROS**

<b>QUADRO 1</b> - Esquema fisiopatológico atual da úlcera péptica .....	12
<b>QUADRO 2</b> - Hormônios gastrointestinais, origem e funções .....	14
<b>QUADRO 3</b> - Envolvimento dos receptores adrenérgicos na regulação das funções gastrointestinal .....	24

# APRESENTAÇÃO

Meu interesse pela ciência despertou-se cedo, logo durante o ensino fundamental, através das aulas de ciências. Em seguida, no ensino médio, a grande afinidade com a área da biologia humana influenciou a minha escolha pelo curso de graduação em Farmácia.

No primeiro semestre de 2006, entrei na faculdade para o curso de Farmácia no Centro Universitário de Anápolis, Unievangélica. Durante minha graduação sempre busquei oportunidades para aprender e colaborar com a formação dos meus colegas de turma e logo no 3º período, iniciei como monitor da disciplina de Histologia, na qual permanece por 2 semestres. Logo no 3º período do curso tive a oportunidade de conhecer a disciplina de Farmacologia. Foi um momento especial na minha formação e logo deixei a monitoria de Histologia e aventurei-me como monitor de Farmacologia, onde fiquei por 2 semestres.

Tendo como objetivo de vida ensinar e compartilhar conhecimentos, no 8º período da minha graduação, procurei novos horizontes e fui participar da disciplina de Química de Produtos Naturais ministrada pelo Prof. Dr. Elson Alves Costa e José Realino de Paula no prédio da Faculdade de Farmácia da UFG.

Nesta oportunidade, procurei me informar sobre alguns laboratórios de pesquisas na área de Farmacologia. No dia 26 de Janeiro de 2010 iniciei um estágio no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais sob a orientação do Prof. Dr. Elson Alves Costa, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (ICB/UFG). A princípio, fui integrado ao projeto de pesquisa "Caracterização farmacognóstica e estudo das atividades farmacológicas dos extratos do Esporão-de-galo". No ano de 2010, já com o curso superior concluído, iniciei o Mestrado com orientação do Prof. Dr. Elson Alves Costa e bolsa financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Durante o mestrado estive envolvido diretamente na participação de 5 trabalhos, todos publicados.

Em agosto de 2012 com o Mestrado já concluído no programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e decidido a continuar nesta jornada, objetivando acrescentar novos conhecimentos à minha formação, iniciei o Doutorado no mês de agosto com bolsa financiada (CAPES). Durante esse tempo, cursei 31 créditos e participei de vários congressos nacionais além de um congresso internacional. O ano de 2014 foi sem dúvida um ano muito produtivo, visto que consegui a publicação do meu trabalho de mestrado bem como o de doutorado. O ano de 2015 começou muito promissor e em 4 meses tive 2 artigos aceitos e

recentemente publicados, sendo um destes uma revisão que iniciei a escrita no ano de 2011.

Este trabalho de conclusão de Doutorado apresentado em formato de artigos constitui uma das linhas de pesquisa do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais. A primeira parte da tese inclui uma revisão da literatura sobre plantas medicinais (*Celtis iguanaea* e *Eugenia uniflora*) e úlceras pépticas. O artigo 1 descreve "Os mecanismos envolvidos na atividade gastroprotetora de *Celtis iguanaea* sobre lesões gástricas em camundongos"; O artigo 2 descreve "O efeito gastroprotetor da fração aquosa do extrato hidroacetônico das folhas de *Eugenia uniflora* na gastroproteção" e o artigo 3 descreve " A atividade gastroprotetora da Oenoteína B em modelos experimentais de úlceras gástricas.

## RESUMO

A úlcera péptica é uma importante causa de morbidade e mortalidade, sendo caracterizada por lesão profunda na mucosa gástrica. Do ponto de vista fisiopatológico a úlcera péptica é descrita como um desequilíbrio entre os fatores agressores, tais como ácido clorídrico, pepsina, e os fatores protetores da mucosa gástrica, tais como muco, bicarbonato, óxido nítrico (NO), prostaglandinas e fluxo sanguíneo. No Brasil, estudos etnofarmacológicos relatam o uso de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent e *Eugenia uniflora* L. para o tratamento de distúrbios gastrointestinais. O objetivo deste estudo foi investigar os possíveis mecanismos envolvidos na atividade gastroprotetora do extrato hexânico das folhas de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent (EHEG), da fração aquosa do extrato hidroacetônico das folhas de *Eugenia uniflora* L. (FAHP) e do fitoconstituente isolado da FAHP (Oenoteína B). Os animais utilizados foram camundongos albinos Swiss, machos, adultos, pesando entre 35-40g ou ratos albinos Wistar, machos, adultos, pesando entre 180-200 g. Este trabalho mostrou que o EHEG apresentou atividade antiulcerogênica nos diferentes modelos de úlceras induzidas agudamente *in vivo*, tais como: estresse, HCl/EtOH e ácido acético. O EHEG na dose de 100 mg/kg administrado pela via oral (v.o) ou intraduodenal (i.d.) aumentou a capacidade de ligação do "Alcian blue" aderido à mucosa gástrica. No modelo para avaliar a participação dos receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ , foi observado que o pré-tratamento com ioimbina (antagonista dos receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ ) reduziu a gastroproteção exercida pelo EHEG (100 mg/kg, v.o). No modelo para avaliar a participação do NO, foi observada que o pré-tratamento com L-NAME (L-NG-Nitroarginina metil éster - inibidor inespecífico da NOs) reduziu a gastroproteção exercida pelo EHEG (100 mg/kg, v.o) e no modelo para avaliar a participação das prostaglandinas (PGs) endógenas, foi observada que o pré-tratamento com indometacina (inibidor da enzima cicloxigenase) reduziu a gastroproteção exercida pelo EHEG (100 mg/kg, v.o). Este trabalho mostrou também que no teste geral de atividade farmacológica, os animais tratados com FAHP nas doses de 10, 30, 100, 300 e 1000 mg/kg ou veículo (água destilada), não apresentaram nenhuma atividade que diferenciasse do grupo controle tratado com o veículo. FAHP apresenta atividade antiulcerogênica em diferentes modelos de úlceras induzidas agudamente *in vivo*, tais como:

indometacina, estresse e HCl/EtOH. A FAHP na dose de 300 mg/kg administrado pela via oral aumentou a capacidade de ligação do "Alcian blue" aderido à mucosa gástrica e os níveis dos grupos sulfidrílicos não-protéicos. Na avaliação da atividade antissecretória, o tratamento com a FAHP (300 mg/kg, i.d.) foi capaz de reduzir a acidez livre (pH) e a acidez total. No modelo para avaliar a participação do NO, foi observada que o pré-tratamento com *L*-NAME não reduziu a gastroproteção exercida pela FAHP. A oenoteína B também apresenta atividade antiulcerogênica em diferentes modelos de úlceras induzidas agudamente *in vivo*, tais como: indometacina, HCl/EtOH e ligadura pilórica. Na tentativa de elucidar os possíveis mecanismos de ação foram realizados bioensaios *ex vivo*. A administração oral de oenoteína B (15 mg/kg) foi capaz de aumentar a quantidade de catalase (CAT) na mucosa gástrica. No modelo para avaliar a participação das prostaglandinas (PGs) endógenas, foi observado que o pré-tratamento com indometacina reduziu a gastroproteção exercida pela oenoteína B. No entanto, o tratamento com Oenoteína B não evitou a redução nos níveis de PGE<sub>2</sub> em mucosas gástricas de ratos pré-tratados com indometacina. No estudo da atividade antissecretória, o tratamento com a oenoteína B (15 mg/kg, i.d.) foi capaz de reduzir o volume de secreção gástrica ácida (mL) e a acidez total. Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que o EHEG, FAHP e Oenoteína B possuem atividade gastroprotetora frente aos diferentes agentes ulcerogênicos utilizados. A gastroproteção foi relacionada principalmente ao aumento de fatores protetores como NO, PGs, muco ou atividade antioxidante, mas também ocorreu uma redução de fatores agressores, como a secreção gástrica ácida.

Palavras- chaves: úlceras pépticas, *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent, *Eugenia uniflora* L., Oenoteína B, ligadura pilórica, atividade gastroprotetora.

## ABSTRACT

Peptic ulcer disease is a major cause of morbidity and mortality, and is characterized by deep lesions in the gastric mucosa. The pathophysiological of peptic ulcer is described as an imbalance between aggressive factors such as hydrochloric acid, pepsin and protective factors of gastric mucosa, such as mucus, bicarbonate, nitric oxide (NO), prostaglandins and blood flow. In Brazil, ethnopharmacological studies report the use of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent and *Eugenia uniflora* L. for the treatment of gastrointestinal disorders. The objective of this study was to investigate the possible mechanisms involved in the gastroprotective activity of extract hexane of leaves *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent (EHEG), of the aqueous fraction of hydroacetic extract from the leaves of *Eugenia uniflora* (FAHP) and phytoconstituent isolated from FAHP (Oenoteína B). Male albino Swiss mice adult weighing between 35-40 g or male albino Wistar rats adult weighing between 180-200 g. Were used in this study the EHEG produced antiulcer activity in different *in vivo* models, such as stress, HCl/EtOH and acetic acid induced ulcer. The EHEG at dose of 100 mg/kg administered orally (p.o.) or intraduodenally (i.d.) increased the binding capacity of the Alcian blue adhered to the gastric mucus. In model to evaluate the role of  $\alpha_2$ -adrenoceptor was observed that pretreatment with yohimbine (an antagonist  $\alpha_2$ -adrenergic) reduced gastroprotection produced by EHEG (100 mg/kg, p.o.). In model to assess the role of NO was observed that pretreatment with L-NAME (NG-L-Nitroarginine methyl ester - non-specific NOS inhibitor) reduced gastroprotection exercised by EHEG (100 mg/kg, p.o.) and in model to evaluate the role of prostaglandins (PGs) endogenous, was observed that pretreatment with indomethacin (an inhibitor of cyclooxygenase enzyme) reduced the gastroprotection effect of EHEG (100 mg/kg, p.o.). This study also showed that animals treated with FAHP in doses of 10, 30, 100, 300 and 1000 mg/kg or vehicle (distilled water) produced not activity, when compared with the control group in overall pharmacological activity test. FAHP has antiulcer activity in different models of induced ulcers *in vivo*, such as indomethacin, stress and HCl/EtOH. FAHP in the dose of 300 mg/kg given orally increased binding capacity Alcian blue adhered to the gastric mucosa and the levels of GSH. In assessing the antisecretory activity, FAHP (300 mg/kg, i.d.) was able to reduce the free acidity (pH) and total acidity. In model to evaluate the role of NO was observed that pretreatment with L-NAME did not reduce the gastroprotection exerted by FAHP. The oenoteína B also showed antiulcerogenic

activity in different models of induced ulcers *in vivo*, such as indomethacin, HCl/EtOH and pyloric ligation. In an attempt to elucidate the possible mechanisms of action were performed *ex vivo* bioassays. The oenothain B (15 mg/kg,p.o.) was able to increase the activity of catalase (CAT) in the gastric mucosa. In model to evaluate the role of prostaglandins (PGs) Endogenous was observed that pretreatment with indomethacin, reduced gastroprotection produced by oenothain B. However, the treatment with oenothain B did not prevented the reduction of the levels of PGE<sub>2</sub> in the gastric mucus of rats pretreated with indomethacin. In the study of antisecretory activity, treatment with oenothain B (15 mg/kg i.d.) was able to reduce the amount of gastric acid secretion (mL) and total acidity. The findings of this study suggest that EHEG, FAHP and oenothain B have gastroprotective activity against the several ulcerogenic agents used. The gastroprotection was related mainly to the increase of protective factors (NO, PGs, mucus or antioxidant activity), but also there was a reduction of aggressive factors (gastric acid secretion).

Keywords: peptic ulcers, *Celtis iguanaea*, *Eugenia uniflora*, Oenothain B, pyloric ligation, gastroprotective activity.

# 1. INTRODUÇÃO

### **1.1. Plantas Medicinais**

O uso de plantas medicinais é difundido a milhares de anos, seja para uso em rituais mágicos/religiosos (1) ou como fonte para drogas, fármacos ou medicamentos (2). Relatos sobre o uso de plantas como medicamentos estão em papiros egípcios (2.000 a.C.), entre os quais se encontram os papiros de Ebers e Smith (3). O homem primitivo sempre buscou na natureza soluções para os diversos males que o acometiam (4) e usou seus conhecimentos empíricos para promover melhoria nas condições de alimentação e cura de suas moléstias, evidenciando a interrelação entre o uso de plantas e a evolução humana (5).

Vários métodos são utilizados para a descoberta de novos medicamentos, tais como: o isolamento de substâncias ativas a partir de plantas e outras fontes naturais, a química sintética e a modelagem molecular (6). Apesar do evidente sucesso na descoberta de novos fármacos, o processo para o desenvolvimento de um novo fármaco é lento, podendo perdurar em média 10 anos e o custo para o desenvolvimento deste fármaco é estimado em cerca de 800 milhões de dólares (7-8).

Sabe-se que aproximadamente 80% da população mundial utilizam plantas medicinais, sendo que a maioria vive em países em desenvolvimento (6). Em 2002, mais de 25% dos fármacos mais vendidos no mundo eram produtos naturais ou derivados de produtos naturais (9) e estes valores tem crescido anualmente, sendo que no ano de 2006 estima-se que este valor tenha alcançado 50% (6).

As plantas medicinais têm desempenhado um importante papel sócio-econômico, tanto para as populações rurais como urbanas. Para a população rural, a utilização de espécies medicinais, na maioria das vezes nativas de sua região ou cultivadas em seu próprio quintal, reduz ou até elimina os gastos com medicamentos industrializados (10).

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo com mais de 55.000 espécies catalogadas (11) de um total estimado entre 350 a 550 mil espécies (12). O uso de plantas com fins terapêuticos no Brasil sofreu influência indígena, africana, européia e asiática, enfim a medicina popular surgiu de uma multiplicidade de influências culturais (13). A população consome cada vez mais plantas medicinais com pouca ou nenhuma comprovação de sua eficácia, segurança, propriedades farmacológicas ou tóxicas, sendo este uso difundido por usuários ou comerciantes (14).

Os altos custos para síntese e produção de fármacos inéditos e o aumento nas vendas de alguns fitofármacos e fitoterápicos, culminou no aumento do interesse da indústria farmacêutica pela pesquisa e o desenvolvimento de novos medicamentos a partir de plantas medicinais e seus extratos (15). Em todo mundo, houve um significativo aumento na demanda de produtos naturais nos últimos anos, sendo que somente os fitoterápicos movimentaram no ano de 2008 cerca de 21,7 bilhões de dólares e no Brasil neste mesmo ano o valor estimado foi de aproximadamente 160 milhões de dólares. Estes valores têm sido constantemente aumentados, visto que as vendas de fitoterápicos crescem anualmente em torno de 15%, enquanto os sintéticos apenas 4% (16).

Apesar do constante aumento de pesquisas, estima-se que apenas uma minoria das espécies medicinais foram estudadas quanto as suas atividades farmacológicas (6, 17). Neste contexto, faz-se necessário uma maior investigação das diferentes espécies de plantas, buscando novas fontes de substâncias ativas que possam ser uma alternativa viável e de baixo custo para o desenvolvimento de novos fármacos.

## **1.2. *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent**

As espécies vegetais podem apresentar várias diferenças taxonômicas. A ordem comumente reconhecida como Urticales (18) é ainda controversa e possui até sete famílias e cerca de 2.600 espécies.

Diversos estudos em filogenia têm contribuído para a delimitação da ordem Urticales que é composta por 6 famílias: Cannabaceae, Cecropiaceae, Celtidaceae, Moraceae, Ulmaceae e Urticaceae (19-21). É o que ocorre com o gênero *Celtis* que pode ser descrito fazendo parte da família Ulmaceae ou Cannabaceae, segundo o sistema de classificação APGII de 2003 (22). Os gêneros *Celtis* e *Ulmus* são bem conhecidos e cultivados em regiões temperadas como o Cerrado (18).

O gênero *Celtis* possui aproximadamente 70 espécies de arbustos ou árvores, distribuídas principalmente em regiões tropicais e temperadas. As espécies mais encontradas na Coreia, Japão e China são *Celtis chinensis* Bunge ou *Celtis sinensis* Pers., sendo o uso de suas cascas indicado para o tratamento de irregularidades estomacais e menstruais (23).

*Celtis iguanaea* possui ampla distribuição geográfica, estando presente desde os Estados Unidos da América (EUA) até a América do Sul. No Brasil é encontrada nos estados da Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e

São Paulo (23). É comumente conhecida como esporão-de-galo (24), tela, taleira, sarã, gurrupιά e grão-de-galo dependendo da região do Brasil onde é encontrada (25-26).

*Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent é uma planta de 6 a 9 metros de altura, possui copa arredondada, armado de espinhos estipulares curtos, agudos, solitários e recurvados, ramos espetados verticalmente conferindo uma forma piramidal à copa, possui tronco ereto e cilíndrico, de 15 a 30 cm de diâmetro, com casca rugosa e íntegra (27). Os ramos são compridos (7 metros), flexíveis, armados com espinhos (28) e suas folhas são simples, descoradas, de bordas lisas na base e serrilhadas no restante (Figura 1). Possui flores amarelo-esverdeadas ou esbranquiçadas e produz frutos pequenos contendo polpa adocicada, comestível e com intensa coloração alaranjada (Figura 2). Estes frutos são consumidos naturalmente ou são transformados em sucos, licores, geleias e doces (23). Possui a capacidade de brotar facilmente após o corte, geralmente produzindo múltiplos troncos. Sua floração ocorre durante os meses de agosto a outubro e os frutos amadurecem de fevereiro a março (27). Como a maioria das outras espécies da família, *Celtis iguanaea* produz madeira fina que é utilizada na produção de estacas, cabo de ferramentas, construções rústicas, para obtenção de carvão (23). Os frutos são comestíveis e normalmente são bastante procurados por diversas espécies de aves (23).



**Figura 1** - Árvore de *Celtis iguanaea* (esporão-de-galo), zona rural em Goiânia-GO (Marcio André de Paula) (29).

No Brasil, estudos etnofarmacológicos relatam o uso das folhas de esporão-de-galo sob a forma de chá para o tratamento de dores no corpo, reumatismo, dores no peito, asma, cólicas, má-digestão e como diurético (30). Em algumas cidades do Equador utiliza-se a infusão das folhas e frutos para o tratamento de dores renais e hepáticas (31) e no México a infusão das folhas e flores é usada para o controle do *diabetes mellitus* (32). Uma pesquisa realizada na cidade de Ouro Verde - GO, mostrou que 54% da população local que fazem uso de plantas medicinais, utilizam suas folhas e raízes para tratar infecções do trato urinário (33). A casca apresenta elevado teor de tanino, sendo usada no tratamento de leucorréias e seu fruto macerado e fervido é utilizado em casos de disenteria (28).

Resultados anteriores do nosso laboratório com a fração hexânica do extrato etanólico das folhas de *Celtis iguanaea* mostram que a mesma possui atividade antiulcerogênica e antissecretória (34). Já o extrato aquoso das folhas de *Celtis iguanaea* possui atividade antígeno-tóxica e anticitotóxica (24)

A análise fitoquímica das folhas e caule de *Celtis iguanaea* mostrou a presença de flavonóides, cumarinas e mucilagem (35), compostos que podem ser eficazes no tratamento de úlceras (36-37). O estudo químico da fração hexânica obtida a partir da casca do caule de *Celtis iguanaea*, permitiu o isolamento e identificação de triterpenos pentacíclicos, tais como: friedelina e epifriedelinol (38).



**Figura 2** - Folhas e frutos de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent (esporão-de-galo), zona rural em Goiânia (Marcio André de Paula) (29).

### 1.3. *Eugenia uniflora* L.

A família Myrtaceae compreende aproximadamente 100 gêneros e 3.500 espécies que são distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais (39). No Brasil esta família possui cerca de 23 gêneros e mil espécies (40), sendo dividida em duas sub-famílias: *Myrtoideae* à qual pertencem os gêneros *Myrtus*, *Psidium*, *Pimenta*, *Eugenia*, *Pseudocaryophyllus* e *Syzygium* e *Leptospermoideae* à qual pertencem os gêneros *Eucalyptus*, *Leptospermum* e *Melaleuca* (41).

A composição química da família Myrtaceae é caracterizada pela presença de taninos, flavonoides, bem como monoterpenos, sesquiterpenos e triterpenos (42).

A espécie *Eugenia uniflora* L. é capaz de adaptar-se a condições adversas de solo e clima, sendo amplamente distribuída na América do Sul, podendo ser encontrada na Argentina, Paraguai, Uruguai e Brasil (43). Existindo também em plantios comerciais na Flórida, Califórnia, China e França (43). Suas espécies são arbustivas ou arbóreas com folhas inteiras de disposição oposta ou alterna e com estípulas pequenas (44). Esta planta é conhecida popularmente como pitanga, Ibitanga, pitangatuba ou naganpiri (45-46).

A pitangueria (Figura 3) é uma árvore de 6-12 metros de altura, possui tronco tortuoso com diâmetro de aproximadamente 40 centímetros, copa arredondada, raiz pivotante e pode ser utilizada no paisagismo ou cultivada em pomares domésticos (27, 47). Suas folhas são simples de 3 a 7 cm de comprimento, com aroma característico e suas flores são de cor branca, solitárias ou em grupos de 2-3 nas extremidades dos ramos (48).



**Figura 3** - Árvore de *Eugenia uniflora* L. (pitanga) (Maria Miranda Lopes, 2008 (49)).

A madeira é utilizada na confecção de cabos de ferramentas e de uma ampla variedade de instrumentos agrícolas (27). O fruto é uma baga globosa contendo de 1 a 2 sementes, brilhante de coloração alaranjada ou vermelho-sangue, que apresenta sete a dez sulcos longitudinais de 1,5 a 5,0 cm de diâmetro e possui aroma intenso, sabor doce e ácido (50). Os frutos são ricos em cálcio, antocianinas, flavonóides carotenóides e vitamina C, possuindo assim alto poder antioxidante. Apresentam sabor e odor agradável, sendo consumido *in natura* ou na fabricação de sorvetes, sucos, geléias e vinhos. O suco da fruta apresenta propriedades anti-inflamatórias na gengiva humana e nas células epiteliais bucais (51). Além disso, o fruto é frequentemente utilizado na indústria de cosméticos (52).

Várias espécies do gênero *Eugenia* têm sido tradicionalmente utilizadas para o tratamento de distúrbios gastrointestinais bem como na cicatrização de feridas (53-55). Na medicina popular, existem relatos com a utilização da infusão das folhas para o tratamento da hipertensão, inflamação, febre, reumatismo, hiperglicemia, hipertrigliceridemia, distúrbios estomacais, gota, além de relatos de atividade bactericida e citotóxica (45, 56-61). Nas ilhas portuguesas de Porto Santo e Madeira, utiliza-se a infusão das folhas para o tratamento de bronquite, gripe e distúrbios intestinais e na Nigéria como um febrífugo (46, 62). O extrato aquoso das folhas de *E.uniflora* possui ação diurética (63) e o extrato etanólico da folhas de *E. uniflora*

apresentou também atividade leishmanicida, sendo capaz de inibir 65% do crescimento da cepa testada na concentração de 100 µg/mL (64). A quercetina e a miricetina são os principais componentes encontrados na fração rica em flavonoides obtida das folhas de *E.uniflora* e ambas participam da atividade anti-inflamatória, que foi demonstrada pela diminuição dos níveis séricos de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em camundongos (65).

A análise fitoquímica das folhas de *Eugenia uniflora* L. mostrou a presença de ácido gálico, sitosterol e triterpenos (48). As folhas também são ricas em taninos hidrolisáveis, como Oenoteína B, eugeniflorina D1 e eugeniflorina D2, fenóis como galocatequina, miricetina-3-O-ramnoglicosídeo, quercetina e antraquinonas (57, 66). A investigação fitoquímica do extrato das folhas de *E. uniflora* resultou no isolamento de vários compostos fenólicos, como 2,3-di-O-galloil-  $\beta$ -D-glicose, 1,2,3,4,6-penta-O-galloil- $\beta$ -D-glicose, gemin D, hippomanina A, oenoteína B, eugeniflorina D<sub>2</sub>, camptotina A, afzelina, quercitrina, miricitrina e desmantina-1 (67). Os principais componentes encontrados no óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora* são o citronelol, geraniol, gineol, sesquiterpenos, germacreno, germacreno  $\beta$ , curzereno, curzereno  $\beta$ , cariofileno, furanoelemono  $\beta$  e furanodieno (60, 68-69).

#### 1.4. Taninos

As plantas sintetizam diversos compostos aromáticos, a maioria das quais são denominadas de metabólitos secundários. Em muitos casos, os metabólitos (70) secundários, tais como os taninos são substâncias que funcionam como mecanismos de defesa das plantas contra a ação dos predadores (71).

Os taninos são polifenóis presentes em plantas, alimentos e bebidas, sendo de grande interesse econômico e ecológico (72). Os taninos são solúveis em água e com pesos moleculares que variam entre 500 e 3000 Daltons (72), sendo compostos fenólicos conhecidos pelo seu potencial de complexar as proteínas da pele animal, inibindo assim sua putrefação (73). São responsáveis pela adstringência encontrada em vários frutos e produtos de origem vegetal (74), sendo capazes de precipitar as glucoproteínas salivares, ocasionando a perda do poder lubrificante da saliva (75).

Os taninos também formam complexos (tanino/proteína) que protegem tecidos epiteliais lesionados como queimaduras, bem como a mucosa gastrointestinal favorecendo o processo de reparo e cicatrização tecidual (75-76).

Muitas espécies de plantas produtoras de taninos são utilizadas na medicina popular para fins diferentes, visto que apresentam uma grande variedade de propriedades farmacológicas, incluindo atividade anti-inflamatória, antibacteriana e antitumoral (77). Os taninos também apresentam efeitos antidiarreicos e anti-sépticos por impermeabilizarem as camadas exteriores das mucosas mais expostas (78).

Os taninos são encontrados abundantemente em várias partes das árvores como raízes, galhos, folhas, flores, frutos e sementes, além de serem altamente reativos quimicamente formando pontes de hidrogênio, intra e intermoleculares, além de serem facilmente oxidáveis (75). Os taninos podem ser classificados de acordo com sua estrutura química em taninos condensados e taninos hidrolisáveis (79).

Os taninos condensados são formados a partir da junção da via do acetato com a via do chiquimato. Os taninos condensados ou pro-antocianidinas estão amplamente distribuídos no reino vegetal e apresentam baixa capacidade de serem digeridos (80). Estas pro-antocianidinas após hidrólise ácida formam pigmentos avermelhados (antocianidinas, cianidina e delphinidina) (75).

Os taninos hidrolisáveis são classificados em galotaninos e elagitaninos (81). Os taninos hidrolisáveis consistem de ésteres de ácidos gálico e elágico glicosilados, formados a partir da via do chiquimato (78). Sabe-se que os elagitaninos têm notável atividade antioxidante, o que pode estar envolvido nos mecanismos de suas atividades biológicas (82).

Dentre os taninos hidrolisáveis encontrados nas folhas da espécie estudada, destaca-se a Oenoteína B e a esta atribui-se diversas atividades biológicas (66-67).

#### **1.4.1 Oenoteína B**

Oenoteína B é um elagitanino macrocíclico solúvel caracterizado pela presença de vinte e dois grupos fenólicos hidroxil (83) sendo encontrado em várias espécies da família Lythraceae, Myrtaceae e Onagraceae (84). Oenoteína B foi isolada pela primeira vez a partir das folhas de *Oenothera erythrosepala* Borbás (85). Apresenta grande diversidade de atividades biológicas que são reportadas por vários autores, como por exemplo: atividade antitumoral (86), anti-inflamatória, antioxidante (70, 83), antibacteriana (87), antiviral (88), além de interferir na síntese da parede celular do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (89). Alguns efeitos imunomoduladores desse elagitanino têm sido relatados, principalmente na liberação de citocinas por

macrófagos e monócitos (90). Outra importante característica da oenoteína B é não apresentar efeitos genotóxicos ou mutagênicos nas concentrações testadas e condições experimentais submetidas (55).

### 1.5. Úlcera péptica

A úlcera péptica acomete mais de quatro milhões de pessoas anualmente em todo mundo, sendo que 10 a 20% dos pacientes apresentam várias complicações (91). Por mais de um século a úlcera péptica tem sido uma grande causa de morbidade e mortalidade, embora seja relatado que nos últimos 200 anos houve várias mudanças quanto a sua frequência e apresentação clínica (92). A úlcera péptica se divide em: úlceras gástricas e úlceras duodenais (93). A úlcera gástrica é localizada principalmente no antro (60%) e na junção do antro com o corpo (25%), enquanto que a úlcera duodenal encontra-se localizada nas proximidades da junção do piloro (90%) (94).

Estas complicações têm um significativo impacto econômico e os altos valores são devido aos custos diretos no tratamento ou devido à perda da produtividade no trabalho. Nos EUA, os valores gastos somente no ano de 2007 foram em torno de 5,65 bilhões de dólares (95).

A úlcera péptica foi a principal indicação de cirurgia gastroduodenal durante os anos de 1950 até 1970 (96). O surgimento dos antagonistas dos receptores H<sub>2</sub> na década de 70 reduziu em até 85% o número de cirurgias, bem como a recorrência e o risco de complicações devido à patogenia das úlceras pépticas (97). Já os inibidores da bomba de prótons surgiram no final dos anos 80 e contribuíram para a redução da ocorrência de taquifilaxia, assegurando assim altos índices na cicatrização da doença ulcerosa (98).

Sabe-se que a prevalência das úlceras pépticas difere ao redor do mundo, predominando nos países ocidentais e Asiáticos, especialmente no Japão (99). Na década de 90, um estudo realizado no País de Gales e na Inglaterra mostrou que houve uma significativa redução nos casos de infecção por *Helicobacter pylori*, provavelmente devido a melhora das condições socio-econômicas, sendo este fator responsável pela redução expressiva na prevalência da úlcera péptica. Neste estudo observou-se que em homens houve uma queda de 3,3 para 1,5 casos a cada 1000 indivíduos e para mulheres de 1,8 para 0,9 casos/1000 indivíduos (100).

A incidência de úlceras pépticas é ligeiramente maior nos homens que em mulheres (1,3:1) e apesar de ocorrerem em qualquer idade, a úlcera duodenal ocorre com uma maior frequência na faixa de 30-55 anos, enquanto a úlcera gástrica ocorre na faixa de 50-70 anos (94).

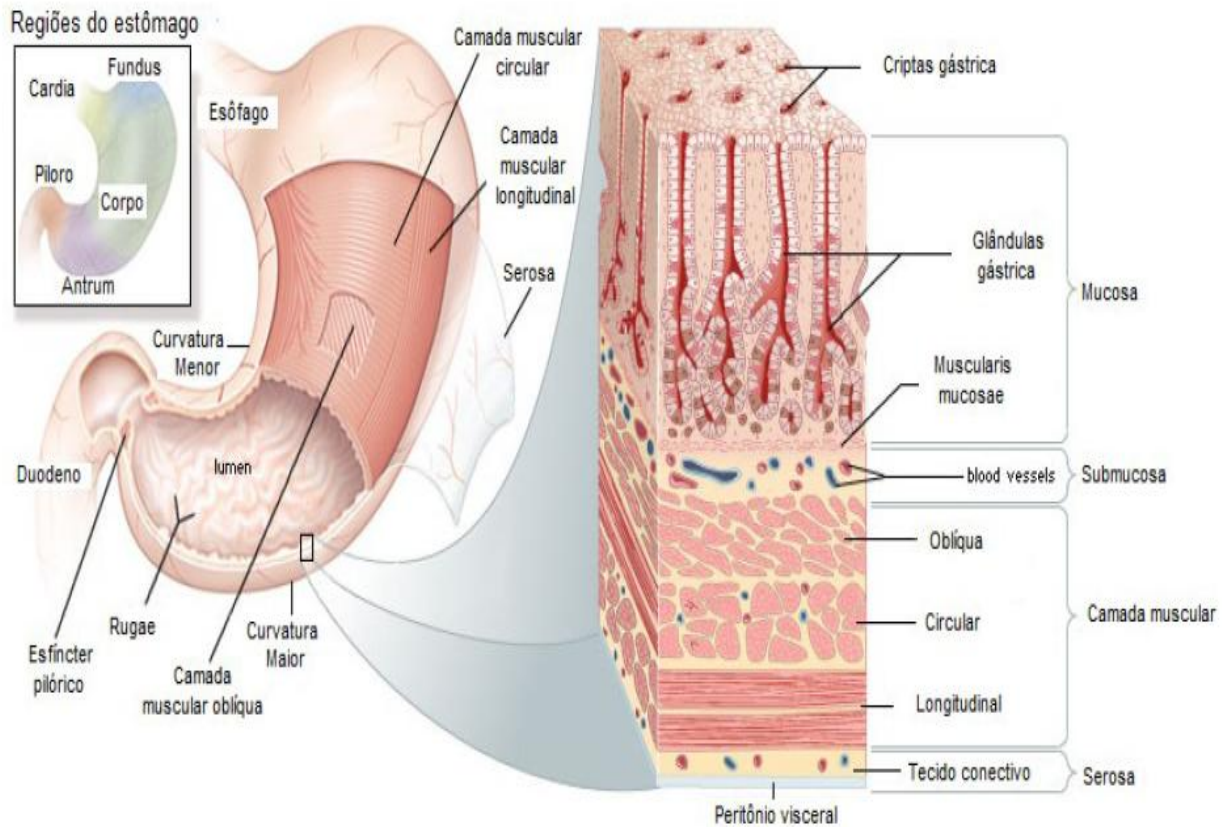
### **1.5.1. Etiologia da úlcera péptica**

A úlcera péptica é caracterizada por uma lesão profunda na mucosa, onde os componentes do tecido epitelial e conectivo, incluindo miofibroblastos subepiteliais, células do músculo liso, vasos e nervos, podem estar destruídos (101). A parede do estômago apresenta várias camadas teciduais, compreendendo a serosa, submucosa e a mucosa (Figura 4).

A serosa é constituída por uma camada tecidual que reveste a maior parte do órgão, exceto uma pequena porção da parte posterior do estômago, a submucosa é constituída de tecido conjuntivo frouxo e possui uma rica rede vascular e um plexo nervoso - conhecido como plexo submucoso e a mucosa que é dividida em quatro regiões anatômicas: cárdia, fundo, corpo e antro (figura 4) e possui diversas depressões e glândulas em toda sua extensão (102), como por exemplo: as glândulas oxínticas localizadas no fundo e no corpo (103). Sabe-se que as glândulas oxínticas são compostas de células superficiais que secretam muco, células parietais que secretam ácido clorídrico (HCl) e fator intrínseco e células principais que secretam pepsinogênio (103).

A secreção de ácido pelas células parietais ocorre pela via parácrina, endócrina e neural. A via parácrina é estimulada pela histamina produzida pelas células enterocromafíns, a via endócrina é estimulada pela gastrina produzida pelas células G do antro e a via neural é estimulada pela liberação de acetilcolina nas terminações nervosas eferentes do vago e do sistema nervoso entérico (104).

Diferentemente, as glândulas pilóricas localizadas no antro são compostas de células G, sendo estas responsáveis pela secreção de gastrina e células D que secretam somatostatina (SST) (105).



### 1.5.2. Fisiopatologia da úlcera péptica

A fisiopatologia da úlcera péptica é descrita como um desequilíbrio entre fatores agressores, tais como HCl, pepsina, grelina, peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxil ( $OH^-$ ) e *H. pylori* e fatores protetores da mucosa gástrica, tais como muco, bicarbonato ( $HCO_3^-$ ), NO, PGs, SST e fluxo sanguíneo. Além destes fatores endógenos, os fatores exógenos relacionados às condições de vida, como estresse psicológico, tabagismo, alcoolismo, uso contínuo de fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) entre outros, reduzem a defesa da mucosa gástrica e contribuem para a formação da úlcera péptica (Quadro 1) (99, 106).

Fatores protetores	Fatores agressores
Muco	HCl
Bicarbonato	Pepsina
Óxido Nítrico	Grelina
Prostaglandinas	$H_2O_2$
Somatostatina	$OH^-$
Fluxo sanguíneo	<i>Helicobacter pylori</i>



**Quadro 1** - Esquema fisiopatológico atual da úlcera péptica (Próprio autor).

A hipersecreção gástrica associada à síndrome de Zollinger-Ellison, o aumento no número de células parietais e células G, a hipersensibilidade e estimulação colinérgica, o descontrole entre os hormônios gástricos e SST também contribuem para a formação de úlcera péptica (99). Os sintomas mais comuns causados pela úlcera péptica são dor abdominal, vômitos, refluxo, perda de peso e de apetite e em casos mais graves hemorragia digestiva e perfuração que podem apresentar altas taxas de morbidade e mortalidade (107-108).

A complicação mais grave de úlcera péptica é o sangramento, sendo relatado com maior frequência em pessoas com idade acima de 60 anos (93). Normalmente, pacientes jovens não apresentam tal sintoma (108). O diagnóstico da úlcera péptica é realizado por meio da endoscopia, onde critérios como a ruptura da mucosa são estabelecidos. Para detecção da infecção por *H. pylori* é necessário o teste rápido de urease e exames histológicos (93).

### **1.5.3. Fatores moduladores da secreção ácida gástrica**

O controle neural realizado pelo Sistema Nervoso Entérico (SNE) e o envolvimento de hormônios gastrointestinais (Quadro 2) na regulação das funções gastrointestinais são relatados por diversos estudos.

O SNE é formado pelo plexo submucoso e mioentérico. O plexo mioentérico está relacionado à motilidade do trato gastrointestinal, enquanto que o plexo submucoso controla a atividade secretora endócrina e exócrina (109-110).

Os três principais mecanismos envolvidos na estimulação da secreção de ácido pela célula parietal são: estimulação neuronal através do nervo vago, estimulação parácrina por meio da liberação local de histamina pelas células enterocromafíns (ECL) e estimulação endócrina mediada pela liberação de gastrina das células G (111).

As células parietais das glândulas oxínticas na mucosa gástrica são responsáveis pela secreção de ácido gástrico e produz de dois a três litros de suco gástrico por dia (pH=1) (111). Nas glândulas oxínticas, também são encontradas as células D que liberam SST e as ECL que estão envolvidas na síntese e secreção de histamina (104, 112).

Vários mediadores endógenos são encontrados no trato gastrointestinal e estão envolvidos na fisiopatologia da úlcera péptica, como por exemplo: serotonina (5-HT), dopamina (DA), colecistocinina (CCK), substância P, polipeptídeo intestinal

vasoativo (VIP), SST, bombesina e gastrina (113). Os principais auxiliares no controle da função secretória no trato gastrointestinal são SST e a gastrina (114).

HORMÔNIOS	ORIGEM	LOCALIZAÇÃO	FUNÇÕES
<b>Gastrina</b>	Células G	Antro	Aumenta secreção ácida gástrica e motilidade gástrica e intestinal
<b>CCK</b>	Células I	Cérebro; íleo distal e cólon	Ingestão alimentar; secreção de suco pancreático, inibe esvaziamento gástrico e melhora motilidade intestinal
<b>Secretina</b>	Células S	Porção superior do ID	Aumenta secreção de $\text{HCO}_3^-$ , diminui secreção ácida gástrica e promove contração do piloro
<b>VIP</b>	Neurônios	TGI e cérebro	Relaxamento dos esfíncters do TGI, vasodilatação periférica e inibição da secreção ácida gástrica
<b>Grelina</b>	-	Estômago	Controle da ingestão alimentar e secreção de hormônios do crescimento

**Quadro 2** - Hormônios gastrointestinais, origens e funções (Adaptado de GANOG (2003). CCK: colescistoquinina; ID: intestino delgado; VIP: polipeptídeo intestinal vasoativo;  $\text{HCO}_3^-$ : bicarbonato; TGI: trato gastrointestinal).

### 1.5.3.1. Gastrina e colescistoquinina (CCK)

A gastrina é produzida pela célula G do antro gástrico, sendo também produzida em pequenas quantidades no intestino delgado, cólon e pâncreas. A molécula precursora da gastrina é o peptídeo preprogastrina que possui 101 aminoácidos em sua estrutura e é convertido por clivagem da extremidade N-terminal em progastrina que possui 80 aminoácidos (115). Em humanos, progastrina é encontrada na forma inativa e corresponde à aproximadamente 10% da gastrina na circulação sanguínea (116). A gastrina é liberada pela célula G do antro gástrico em resposta aos produtos da digestão bem como alcalinização do antro (117).

O hormônio gastrina, é o principal mediador da secreção ácida estimulada pela alimentação e atua principalmente estimulando a secreção de histamina pelas ECL, no corpo e fundo do estômago. A gastrina também pode estimular a secreção de pepsinogênio, a motilidade gástrica e a secreção de água e eletrólito pelo estômago

e intestino delgado (118). Quando liberada pela célula G é capaz de se ligar a receptores de gastrina/colecistocinina do tipo 2 (CCK-2) localizados nas células parietais, e promove o aumento da concentração de cálcio intracelular, o qual estimula a bomba de prótons ( $H^+/K^+$ -ATPase) desencadeando a formação de ácido (Figura 5) (115, 119). Desta forma, a gastrina estimula a secreção ácida do estômago de maneira direta, ao ocupar os receptores CCK-2 presentes na membrana das células parietais e de maneira indireta ao ligar-se nos receptores CCK-2 localizados nas células ECL, promovendo a liberação de histamina (120). A liberação da gastrina é inibida na presença do pH baixo (acidez gástrica  $\pm 3,0$ ) ou pelos peptídeos gastrointestinais SST, secretina e VIP (121).

A gastrina liga-se com elevada afinidade aos receptores de CCK-1 e CCK-2 e ambos receptores pertencem à família de receptores que possuem sete domínios transmembrânicos (122). A gastrina e a CCK apresentam a mesma sequência de peptídeos terminal carboxil (123).

A CCK é secretada pelas células I encontradas no duodeno e jejuno, sendo sua liberação evocada após alguma refeição. A CCK é descrita como um neurotransmissor abundante no sistema nervoso central (SNC) (124). Os receptores de CCK são subdivididos em CCKa ou CCK-1 e CCKb ou CCK-2 (125-126).

O receptor CCK-1 está localizado em células principais e células D no antro gástrico, além de algumas áreas do cérebro e seu acoplamento à proteína G leva a ativação de fosfolipase C (127). Os receptores CCK-1 são específicos para a CCK enquanto os receptores CCK-2 possuem alta afinidade para a CCK e gastrina (128).

O receptor CCK-2 está acoplado à proteína G e atua de maneira a ativar fosfolipase C (123). Os receptores CCK-2 são amplamente expresso no SNC e trato gastrointestinal (125). No trato gastrointestinal, são encontrados na região do fundo do estômago, onde os receptores de CCK-2 foram identificados nas células parietais, ECL e células D, enquanto que na região do antro eles estão confinados nas células D (115). No sistema digestivo, tanto a gastrina quanto a CCK participam do controle da secreção gástrica (129).

#### **1.5.3.2. Acetilcolina (ACh)**

A ACh é liberada pelos neurônios eferentes do vago, sendo sua liberação estimulada em resposta aos estímulos visuais, olfato ou paladar e por neurônios localizados na parede gástrica após distensão do estômago (117, 130). Os

receptores colinérgicos muscarínicos pertencem à família de receptores acoplados à proteína G e possuem uma estrutura composta por sete domínios transmembrânicos (131). A ACh pode se ligar a cinco diferentes subtipos de receptores muscarínicos ( $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ ,  $M_4$  e  $M_5$ ) que são encontrados em muitos órgãos periféricos (132). Os receptores  $M_1$  são expressos na superfície das células da mucosa, enquanto que os receptores  $M_3$  são expressos em células parietais (132).

Uma vez liberada, a ACh estimula diretamente a secreção de HCl através da ativação dos receptores muscarínicos  $M_3$  (Figura 5) localizados na superfície das células parietais, aumentando o  $Ca^{2+}$  intracelular e estimulando a liberação de  $H^+$  (133). Quando ligada aos receptores  $M_1$  e/ou  $M_3$ , a ACh promove o aumento da secreção de pepsinogênio pelas células pépticas no lúmen gástrico durante o processo digestivo, além de estimular a secreção de muco pelas células epiteliais superficiais (134).

A ACh promove diretamente o aumento da secreção gástrica ao ligar-se no receptor  $M_3$  que leva à ativação de fosfolipase C e hidrólise de fosfolídeos de membrana resultando, assim, na formação de segundos mensageiros: o trifosfato de inositol ( $IP_3$ ) e o diacilglicerol (DAG). Através da mobilização de  $Ca^{2+}$  do retículo endoplasmático, o  $IP_3$  ativa proteínas quinases dependentes do complexo cálcio/calmodulina e o DAG ativa a proteína quinase C (PKC), levando, então, à fosforilação proteica e ativação da bomba de prótons (135-136).

A ACh também se liga aos receptores  $M_3$  expresso nas ECL no fundo gástrico ou células G do antro gástrico e promove indiretamente a secreção gástrica ao provocar o aumento da liberação de histamina das ECL e de gastrina pelas células G (132, 137).

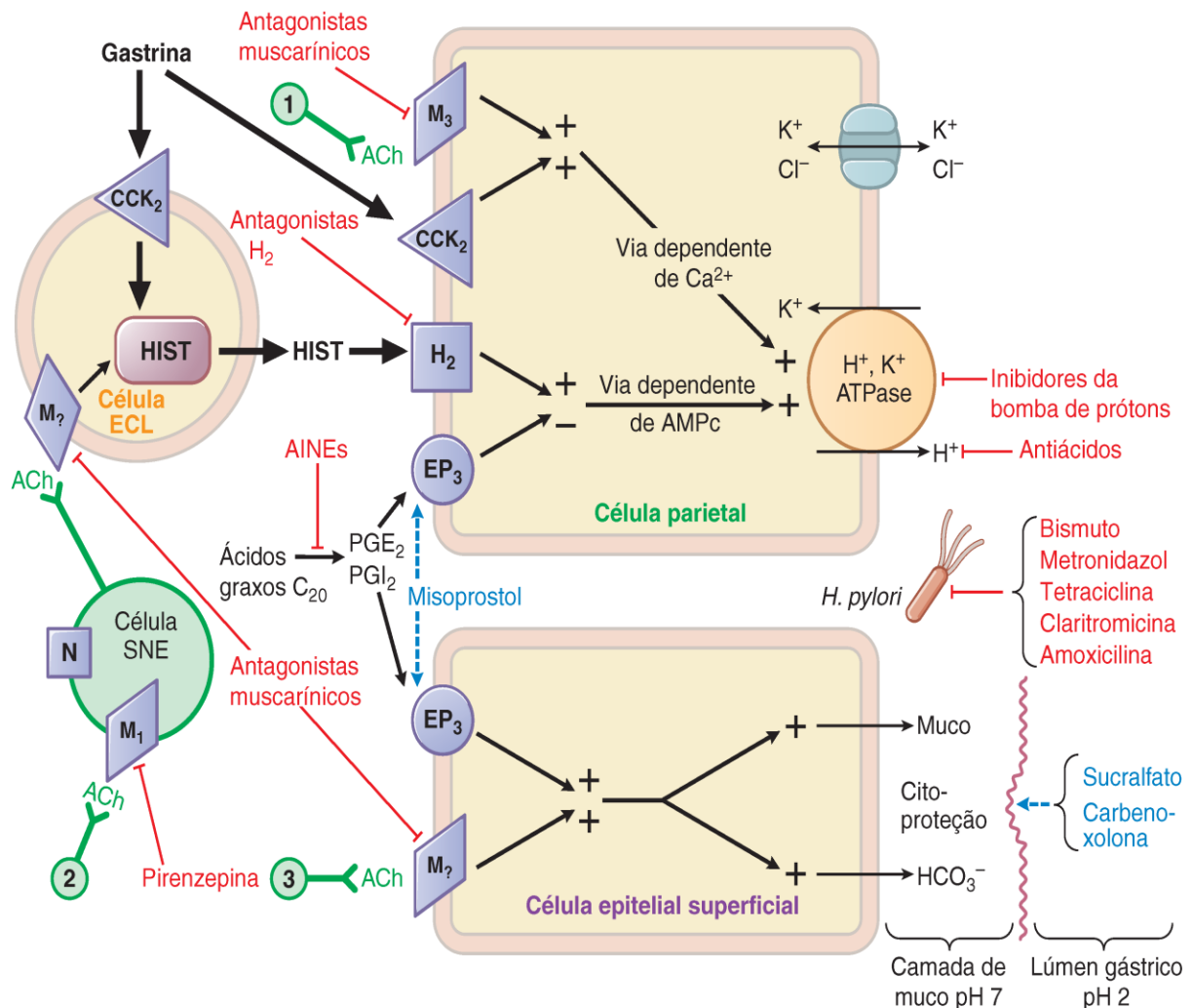
### **1.5.3.3. Histamina**

A histamina é uma amina biogênica com importante atividade reguladora. Nas ECL das glândulas oxínticas, a enzima histidina descarboxilase converte o aminoácido *L*-histidina em histamina (138).

Além de ser sintetizada nas ECL, a histamina também é estocada nestas células que normalmente se localizam na proximidade das células parietais e ao ser liberada pode se ligar aos quatro diferentes subtipos de receptores ( $H_1$ ,  $H_2$ ,  $H_3$ ,  $H_4$ ) acoplados à proteína G (139-140). A histamina é liberada através do mecanismo parácrino e

estimula a secreção do ácido gástrico diretamente pela ligação em receptores do tipo H<sub>2</sub> na célula parietal ligado à proteína G (Figura 5).

A ligação da histamina ao receptor H<sub>2</sub> promove a estimulação da adenilato ciclase que catalisa a conversão do ATP em monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), que por sua vez ativa proteína quinase A (PKA). A ativação desta via, estimula a bomba de prótons na célula parietal, resultando assim na secreção do HCl (111, 117). A ACh e a gastrina atuam sobre seus respectivos receptores (M<sub>3</sub>, CCK<sub>2</sub>) e estimulam a liberação de histamina das ECL (132, 141). O papel da histamina na modulação da secreção gástrica pelos receptores H<sub>3</sub> ainda permanece incerto (142). A primeira hipótese descreve que a ligação da histamina aos receptores H<sub>3</sub> em ratos e coelhos, resulta em ações farmacológicas inibitórias uma vez que ativa a proteína G inibitória e reduz a formação de AMPc, resultando na inibição da liberação e síntese da histamina (143-144). Vários estudos têm mostrado o efeito gastroprotetor da (R)- $\alpha$ -metil histamina, (um agonista seletivo dos receptores de histamina H<sub>3</sub>), diminuindo as lesões gástricas induzidas experimentalmente, como no modelo de estresse por contenção a frio, AINEs e etanol (EtOH) absoluto (145-146). A (R)- $\alpha$ -metil histamina também pode aumentar a espessura da camada de gel de muco aderente à superfície do epitélio (145). Por outro lado, histamina ou (R)- $\alpha$ -metil histamina em mucosa fúndica de ratos, inibe a secreção de SST, resultando assim na redução da secreção de SST e conseqüentemente no aumento da secreção ácida gástrica, por aumento na liberação da gastrina que irá estimular as células parietais e as células ECL (147). A histamina também estimula os receptores H<sub>3</sub> que são amplamente distribuídos no sistema nervoso central (corpo estriado) e é capaz de modular permanentemente a atividade neuronal colinérgica, diminuindo a liberação de ACh pela inibição dos canais de Ca<sup>2+</sup> pré-sinápticos, resultando na inibição da secreção gástrica (148-149).



**Figura 5** - Esquema de secreção de HCl e farmacoterapêutica da úlcera gástrica (Adaptado de Goodman; Gilman 2012) (150).

#### 1.5.3.4. Grelina

A grelina é um hormônio peptídico composto de 28 aminoácidos que foi recentemente identificado no trato gastrointestinal dos seres humanos, particularmente na mucosa gástrica (151-152). A grelina possui papel relevante na fisiologia do estômago, sendo as células produtoras de grelina o segundo tipo de célula endócrina mais abundante na mucosa gástrica (153). Este peptídeo é produzido por células P/D1 em seres humanos e suas principais funções são: estimulação da ingestão de alimento e ganho de peso corporal, além de aumentar a motilidade gástrica, secreção ácida gástrica e acelerar o esvaziamento gástrico (154-155). O efeito estimulador da grelina parece envolver o nervo vago e a liberação de histamina (156). Este peptídeo atua de maneira a aumentar os níveis de AMPc resultando assim no aumento da secreção gástrica (152). Foi visto que a SST é capaz de inibir a secreção de grelina e conseqüentemente retarda o esvaziamento gástrico e reduz a secreção gástrica (157).

Por outro lado, vários autores têm demonstrado o papel gastroprotetor da grelina. A administração central de grelina exerce proteção contra lesões induzidas por EtOH (158) e recentemente foi mostrado que a gastroproteção exercida pela grelina é mediada pela liberação endógena de NO e quando administrada por via intraperitoneal exibe gastroproteção de maneira dose-dependente como observado pelo modelo de lesões gástricas induzidas pelo estresse (154).

#### **1.5.3.5. Peptídeo intestinal vasoativo (VIP)**

O VIP é um neuromodulador não adrenérgico e não colinérgico abundantemente expresso em neurônios do SNE que participa da regulação da secreção e da motilidade gastrointestinal (159-160).

Este neuromodulador é um vasodilatador potente e participa na regulação da secreção de enzimas e no fluxo sanguíneo gastrointestinal (161). VIP pode se ligar a dois subtipos de receptores (VPAC1 e VPAC2), ambos acoplados à proteína G (162). Sabe-se que VPAC2 e VPAC1 compartilham 45% da mesma sequência de aminoácidos (163). A expressão de receptores para VIP é tecido específico e a mucosa gastrointestinal expressa receptores VPAC1 e VPAC2 e sua ativação pelo VIP resulta na estimulação da atividade da adenilato ciclase com consequente formação de AMPc (164-165). O VIP atua indiretamente ao estimular a secreção de SST que promove a redução da secreção gástrica ácida (166) e ao favorecer o aumento dos níveis de NO (156, 166). O VIP apresenta algumas atividades em comum com compostos de estrutura semelhante, como a secretina. Acredita-se que este neuromodulador atua localmente, sendo produzido por células denominadas D1 ou H (167).

#### **1.5.4. Fatores protetores da mucosa gástrica**

##### **1.5.4.1. Muco e $\text{HCO}_3^-$**

O muco é produzido e secretado pelas células epiteliais e pelas células das glândulas gástricas, sendo secretado em quase todo o trato gastrointestinal desde o estômago até o cólon. Juntamente com o  $\text{HCO}_3^-$  é considerado a primeira linha de defesa da mucosa gástrica, pois mantém a superfície da mucosa com um pH de 6-7, em meio ácido (pH 1-2) (168-169). Essa camada de muco/ $\text{HCO}_3^-$ , cuja espessura é

de aproximadamente 200-300  $\mu\text{m}$ , confere uma eficiente proteção para a mucosa gástrica e duodenal (170).

Alguns hormônios gastrointestinais como a gastrina e a secretina, a prostaglandina  $E_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) e agentes colinérgicos são conhecidos por exercerem ação moduladora na secreção de muco (168). No trato gastrointestinal, o muco auxilia a passagem de alimentos. Ele também ajuda a proteger o epitélio do cisalhamento de forças induzidas por ondas peristálticas (171).

O  $\text{HCO}_3^-$  secretado na superfície das células epiteliais é retido pelo muco viscoso originando um revestimento alcalino, que juntamente com a barreira de muco, promove um gradiente de pH capaz de neutralizar o ácido intraluminal (168). Sua regulação fisiológica envolve diversos fatores, tais como as PGs, peptídeos e fatores neuronais. A taxa de secreção máxima de  $\text{HCO}_3^-$  é de aproximadamente 10% da taxa de secreção de HCl máxima. A liberação de íon hidrogênio ( $\text{H}^+$ ) mediada pelas células parietais resulta no transporte do  $\text{HCO}_3^-$  pela membrana basolateral que é responsável pela troca de  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  resultando assim na maior disponibilidade do  $\text{HCO}_3^-$  (172). Sabe-se também que cada íon de  $\text{H}^+$  secretado pela célula parietal, proporciona a conversão de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) em  $\text{HCO}_3^-$ , resultando na alcalinização da secreção ácida gástrica (173). A secreção de  $\text{HCO}_3^-$  no duodeno ocorre pela ação das PGs que são sintetizadas pela cicloxigenase-1 (COX-1) e ativam a secreção de  $\text{HCO}_3^-$  através da interação com receptores  $\text{EP}_3$  e  $\text{EP}_4$  (174). A secreção de  $\text{HCO}_3^-$  é estimulada pelo odor, paladar, visão e pensamentos nos alimentos (fase cefálica), pelo ácido no lúmen gástrico (fase gástrica) e pelo ácido gástrico no lúmen duodenal (fase duodenal) (175-176).

#### **1.5.4.2. Prostaglandinas (PGs)**

As PGs são derivadas de ácidos graxos que possuem 20 carbonos em sua estrutura, estão envolvidos em uma variedade de funções fisiológicas e patológicas no TGI e são encontradas em vários órgãos e tecidos do corpo humano (177).

A enzima cicloxigenase (COX) é responsável por catalisar reações que levam à regulação de várias funções fisiológicas, tais como: modulação da reação inflamatória, agregação plaquetária, angiogênese e fluxo sanguíneo da mucosa gastrointestinal (178) sendo encontrada em pelo menos duas isoformas distintas denominadas COX-1 e COX-2.

Estas enzimas catalisam a conversão do ácido araquidônico (AA) que é um componente encontrado nos fosfolípidos da membrana, à prostaglandina  $G_2$  ( $PGG_2$ ) e em seguida à prostaglandina  $H_2$  ( $PGH_2$ ) (179). A formação dos produtos finais é dependente da presença de sintases tecido específicas que produzem diferentes prostanóides, tais como: prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ), prostaglandina  $D_2$  ( $PGD_2$ ), prostaciclina ( $PGI_2$ ), prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) e tromboxano  $A_2$  ( $TXA_2$ ) (180).

As PGs exercem um importante mecanismo na defesa da mucosa gástrica, uma vez que foi constatado que a capacidade de AINEs em induzir danos gástricos correlaciona-se com a sua capacidade de suprimir a síntese das PGs gástricas (181). Sabe-se que aproximadamente 20% dos indivíduos que fazem uso contínuo de AINEs desenvolvem úlcera péptica (181). Os efeitos da  $PGE_2$  em fibroblastos, macrófagos e na mucosa gástrica são bem conhecidos e são mediados através de interações com quatro receptores de membrana acoplados à proteína:  $EP_1$ ,  $EP_2$ ,  $EP_3$ ,  $EP_4$  (182). A  $PGE_2$ , inibe a secreção de HCl pela bomba de prótons por inibir a adenilciclase, enzima responsável pelo aumento do AMPc intracelular, sendo esta de extrema valia para a regulação da secreção ácida gástrica (123). A  $PGE_2$  e a  $PGI_2$  previnem a formação de úlceras por diferentes mecanismos adicionais tais como: a secreção de muco e  $HCO_3^-$ , a inibição da ativação dos mastócitos, diminuição da aderência leucocitária ao endotélio, a vasodilatação e a rápida regeneração epitelial (183-184).

A COX-1 é encontrada em quase todas as células do organismo, o que a caracteriza como constitutiva, sendo esta enzima responsável pela produção de níveis basais de PGs que são vitais para proteger o estômago através da produção de muco e pela manutenção do fluxo sanguíneo. Por outro lado, a COX-2, possui uma baixa expressão, não sendo detectável na maioria das células, porém em condições patológicas esta expressão aumenta drasticamente sendo proposta como uma enzima induzível encontrada em vários estados patológicos (185).

A isomerização da  $PGH_2$  endoperóxido à  $PGE_2$  é catalisada por três diferentes prostaglandinas sintase (PGES): PGES citosólicas (cPGES), PGES microssomais (mPGES)-1 e mPGES-2 (186-187). A cPGES é constitutivamente e ubiquamente expressa e seletivamente acoplado com a COX-1 (188). A mPGES é regulada em resposta a vários estímulos e atua na COX-2 para a geração de  $PGE_2$ .

Os fármacos inibidores seletivos para a COX-2 não parecem possuir vantagens quanto às úlceras pré-existentes. A inibição da COX-2 pode retardar a cicatrização

gástrica ao reduzir o fluxo sanguíneo gástrico e suprimir a produção de PGE<sub>2</sub> na mucosa gástrica (189).

Vale ressaltar que além das PGs, há participação de outros mediadores endógenos, tais como óxido nítrico também desempenha um papel importante na defesa da mucosa. O óxido nítrico (NO) realiza muitas das ações semelhantes as prostaglandinas e parece existir uma cooperação na modulação das PGs e síntese de NO (184, 190).

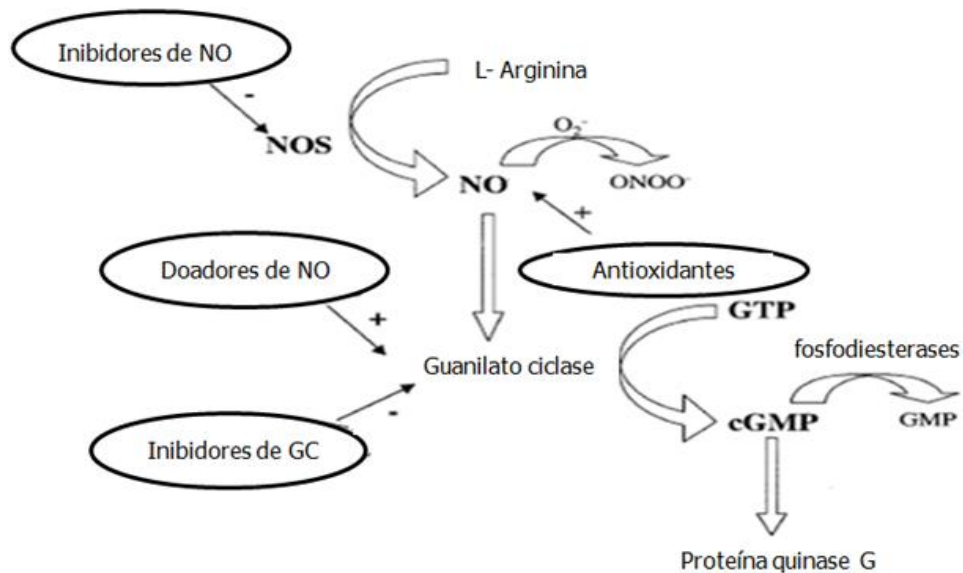
#### **1.5.4.3. Óxido nítrico (NO)**

O NO é um gás produzido pela ação de duas diferentes isoformas de óxido nítrico sintase (NOS), a NO sintase induzida (iNOS) ou constitutiva (cNOS), e ambas as enzimas são encontradas na mucosa gástrica e plaquetas (191).

A NOSc é dividida em duas isoformas, sendo a primeira isoforma a óxido nítrico-sintase neuronal (nNOS) e a segunda isoforma a óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS). A cNOS possui forma monomérica, peso molecular de 133 kd e é dependente de cálcio-calmodulina (192).

As NOS convertem a *L*-arginina em *L*-citrulina e NO após uma série de etapas enzimáticas que resultam na transferência de elétrons, bem como hidroxilação (193).

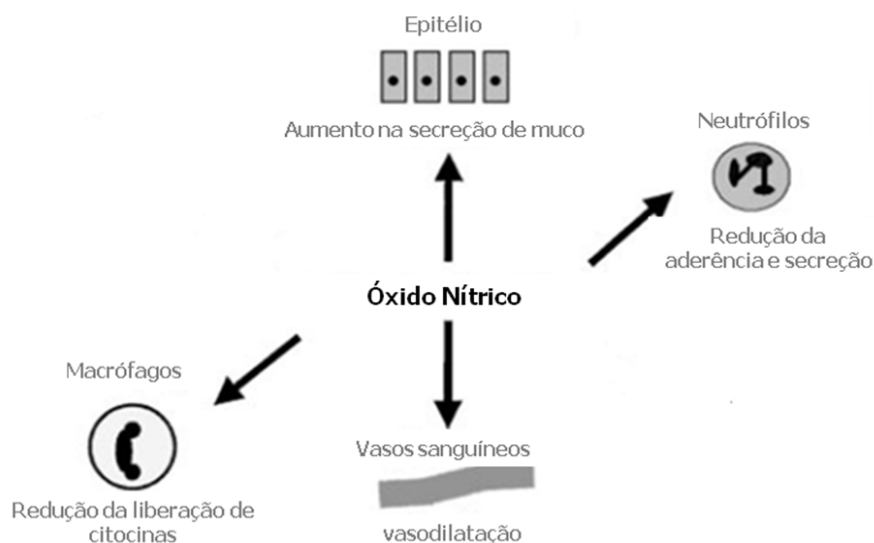
O NO é um importante modulador da mucosa gástrica e seus efeitos são produzidos pela estimulação de guanilato ciclase (GC) na célula epitelial (190). Uma vez ativada a GC aumenta a conversão de guanosina trifosfato (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) que atua sobre a proteína quinase G (194) (Figura 6). O NO reage com a hemoglobina e a ligação ao grupo heme facilita a rápida degradação de NO, sendo assim muito difícil de medir os níveis de NO em fluidos biológicos e por isso geralmente mede-se o produto final do metabolismo do NO, ou seja, o nitrato e o nitrito (190).



**Figura 6** - Sinalização do óxido nítrico e vias de intervenção com potencial terapêutico (Adaptado de Shah et al., 2004) (194).

Este modulador medeia a regulação de perfusão vascular (194), o aumento na liberação de muco gástrico (195), bem como a secreção de fluido para dentro do lúmen gástrico que reduz a aderência dos neutrófilos (figura 7) (196-197).

Vários moduladores tais como a ACh, bradicinina e histamina, podem estimular a produção de NO. Alguns estudos têm mostrado a importância do NO na regulação do fluxo sanguíneo gastrointestinal, principalmente com a utilização de inibidores de NOS devido à capacidade do NO em induzir vasodilatação mediada pela estimulação da GC (190, 198)



**Figura 7** - Diagrama esquemático dos mecanismos de ação do NO que estão envolvidos nos mecanismos de defesas da mucosa gastrointestinal (Adaptado de Wallace e Miller, 2000) (190).

#### 1.5.4.4. Noradrenalina

O sistema nervoso simpático é responsável pela liberação de neurotransmissores adrenérgicos, como a noradrenalina e a dopamina. A noradrenalina é uma catecolamina endógena capaz de se ligar em diferentes tipos de receptores, tais como:  $\alpha$  e  $\beta$  (199). Quando a noradrenalina liga-se aos receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ , realiza o controle na modulação pré-sináptica da liberação dos neurotransmissores adrenérgicos e conseqüentemente na regulação das funções gastrointestinais (200).

Os receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  são amplamente distribuídos no TGI e divididos em três diferentes subtipos denominados  $\alpha_{2a}$ ,  $\alpha_{2b}$  e  $\alpha_{2c}$  e cada subtipo pode modular diferentes funções gastrointestinais (201). Todos os subtipos  $\alpha_{2a}$ ,  $\alpha_{2b}$  e  $\alpha_{2c}$  parecem ser responsáveis pela regulação da secreção gástrica e da motilidade gástrica (202-203).

Esses receptores  $\alpha_2$  são encontrados no SNC e desempenham um importante papel na regulação da atividade simpática. Neste mecanismo está envolvida a supressão da descarga simpática (137), além de perifericamente diminuir a descarga vagal ao inibir a liberação de acetilcolina localizada nos gânglios parassimpáticos intramurais (204).

É bem estabelecido que a ativação de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  no estômago resulta na redução da secreção ácida, motilidade e esvaziamento, bem como na manutenção da integridade da mucosa gástrica (205). No intestino, esses receptores medeiam efeitos inibitórios na motilidade, excreção fecal e no transporte de fluidos na mucosa (200) (Quadro 3).

ESTÔMAGO	INTESTINO
Inibição da secreção ácida gástrica	Inibição do transporte eletrolítico
Manutenção da integridade da mucosa ácida gástrica	Inibição da motilidade e trânsito
Inibição da motilidade	Inibição da excreção fecal

**Quadro 3** - Envolvimento dos receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  na regulação das funções gastrointestinal (Adaptado de Blandizzi, 2007) (200).

Os agonistas dos receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  como a clonidina são capazes de inibir a secreção ácida gástrica (202, 206), o esvaziamento e a motilidade gástrica

(201, 205), além de diminuir as lesões da mucosa gástrica em diferentes modelos de lesões gástricas (203, 206).

#### **1.5.4.5. Somatostatina (SST)**

A SST é um hormônio polipeptídico com 14 aminoácidos secretado pelas células D. No trato gastrointestinal é encontrada na região do antro e do fundo do estômago, além do pâncreas. A SST é conhecida como o inibidor fisiológico da secreção gástrica e inibe alguns hormônios como a pepsina, motilina, colescitoquinina e gastrina (207-208). Este peptídeo diminui a secreção de ácido *in vivo* pela inibição da liberação da gastrina a partir das células G (209) e vários autores têm relatado a redução local deste polipeptídeo na fisiopatologia da úlcera péptica (208, 210).

Os receptores de SST (SST<sub>1</sub>, SST<sub>2</sub>, SST<sub>3</sub>, SST<sub>4</sub> e SST<sub>5</sub>) são acoplados à proteína G (211) e foi relatado que a liberação de SST no trato gastrointestinal de ratos pode ser modulada pela presença de 5-HT (212). Uma acidificação do pH luminal gástrico para valores de pH menor que 3 é capaz de estimular a liberação de SST que por sua vez, suprime a liberação de gastrina através de um mecanismo de *feedback* negativo (137).

#### **1.5.4.6. Secretina**

O hormônio SCT é conhecido por sua capacidade de regular a secreção de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, água e eletrólitos de células epiteliais do ducto pancreático, bem como a motilidade gástrica (213-214).

A SCT inibe a secreção de ácido gástrico ao promover a inibição da secreção de gastrina (215). Este hormônio é produzido e liberado das células S do duodeno e jejuno e atua sobre receptores SCT que estão acoplados à proteína G (141). A SCT também pode estimular a secreção de muco pelo aumento de cAMP (172, 216) e foi demonstrado que em doses fisiológicas induz o relaxamento gástrico (213, 217) e a secreção pancreática (218). A secretina é capaz de estimular a secreção de pepsinogênio e a secreção de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, aumentando desta maneira o pH no lúmen gástrico (167, 219).

#### **1.5.4.7. Fluxo sanguíneo**

O fluxo sanguíneo protege a mucosa gástrica por propiciar o aporte adequado de oxigênio, nutrientes e hormônios gastrointestinais, removendo os íons  $H^+$  que ultrapassam a barreira de muco- $HCO_3^-$  (220). Além disso, a microcirculação da mucosa gástrica promove a proteção gástrica por fornecer à mucosa gástrica, quantidades significativas de  $HCO_3^-$ , substâncias nutritivas e por remover  $CO_2$ ,  $H^+$ , bem como permitir a difusão de agentes tóxicos do lúmen gástrico (221). As células endoteliais que revestem os microvasos são capazes de liberar NO e  $PGI_2$  (172).

O fluxo sanguíneo é essencial para muitos mecanismos de proteção da mucosa, como por exemplo, no processo de reparação, as áreas lesionadas da mucosa são recobertas em poucos minutos pela rápida migração de células da mucosa adjacente (222).

A redução do fluxo sanguíneo causa hipóxia gástrica que resulta no acúmulo de  $H^+$  na mucosa gástrica e leva à acidificação do estômago e desenvolvimento de úlceras gástricas como observado em diferentes modelos de úlceras gástricas induzidas (222-223).

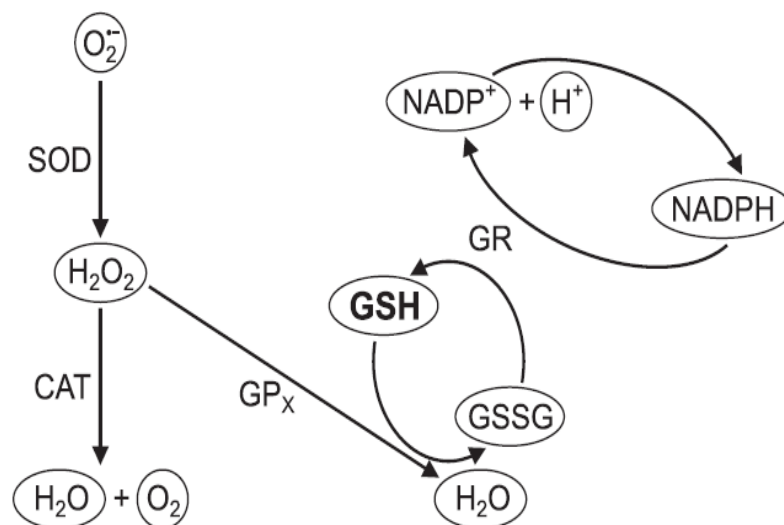
#### **1.5.4.8. Sistema antioxidante**

O estresse oxidativo pode ser definido como o aumento dos níveis intracelulares das espécies reativas de oxigênio (EROs) de maneira que exceda o nível das defesas antioxidantes celulares (224). Vários compostos químicos possuem propriedades antioxidantes, tais como vitaminas, flavonoides, carotenóides, ácido úrico e glutathione (224-225).

Os grupamentos sulfidrílicos endógenos ou compostos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH) possuem um papel chave na atividade gastroprotetora, sendo encontrados no muco gástrico e em várias enzimas do sistema antioxidante (226). O composto sulfidrílico não-protéico mais prevalente nas células animais é a glutathione (GSH), sendo este essencial para a manutenção e prevenção da integridade da mucosa gástrica (227). A GSH é um tripeptídeo solúvel em água, composto pelos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina (227). É um antioxidante e atua como um cofator enzimático essencial para a regulação da atividade celular. A GSH também participa de vários aspectos no metabolismo oxidativo, incluindo a remoção de hidroperóxidos, proteção das radiações ionizantes e na manutenção do estado fisiológico dos grupos sulfidrílicos das proteínas visando a desintoxicação e

excreção dos compostos oxidativos (191). Em condições específicas de estresse oxidativo, as EROs são reduzidas por GSH resultando na formação de glutathiona oxidada (GSSG) (figura 8) (224).

A redução nos níveis de GSH pode colaborar para o dano oxidativo e para uma variedade de patologias incluindo desordens neurodegenerativas e envelhecimento (227). Vários autores mostraram a depleção de GSH em diversos modelos de indução de úlcera gástrica como EtOH, AINEs e estresse (228-229). O acúmulo de radicais livres nas regiões ulceradas reduz a concentração de GSH na mucosa gástrica (230).



**Figura 8** - Formação das espécies reativas de oxigênio EROs e ações das enzimas antioxidantes no organismo (Adaptado de Kwiecien et al., 2002) (231) .

### 1.6. Farmacoterapêutica da úlcera péptica

Durante vários anos, as úlceras pépticas foram controladas cirurgicamente, com altas taxas de morbidade e mortalidade. A farmacoterapia da úlcera péptica envolvia tanto a neutralização da acidez gástrica do estômago como a utilização de antiácidos, como bicarbonato de sódio, carbonato de cálcio, hidróxido de alumínio e hidróxido de magnésio que foram em grande parte substituídos por fármacos mais efetivos. Estes fármacos atuam de modo a neutralizar o pH gástrico de maneira rápida e eficaz, porém possuem vários efeitos adversos como náuseas, flatulência, prisão de ventre e diarreia (99, 150).

Outros fármacos utilizados para o tratamento das úlceras pépticas são os antagonistas dos receptores muscarínicos  $M_1$ , pirenzepina e telenzepina que suprimem a estimulação neural para produção de ácido, por bloquear os receptores  $M_1$  dos gânglios intramurais. A baixa eficácia e os efeitos colaterais inviabilizaram o seu uso que se tornou cada vez menos frequente (150).

Uma grande contribuição foi dada pelos antagonistas de receptores  $H_2$  que inibem a produção ácida por competirem de modo reversível com a histamina pela ligação aos receptores  $H_2$  na membrana basolateral das células parietais. Os fármacos cimetidina e ranitidina representaram um marco fundamental na terapêutica da doença ácido-péptica (99, 150). Os principais efeitos adversos destes fármacos são: alterações hematológicas que incluem mielossupressão, trombocitopenia, anemia e neutropenia, confusão, agitação, dores de cabeça, complicações hepáticas renais além de ginecomastia e impotência (232).

Por outro lado, os supressores mais potentes da secreção ácido gástrico são os inibidores da bomba de prótons (omeprazol, lansoprazol e pantoprazol). No início dos anos 80 esses fármacos melhoraram a inibição da acidez gástrica, melhorando também a cicatrização das úlceras gástricas e duodenais. Os inibidores de bomba são pró-fármacos que necessitam de ativação em ambiente ácido e ao entrarem na célula parietal acumulam-se em canálculos secretores ácidos da célula parietal, onde são ativados por um processo catalisado por prótons que resulta na formação de um ácido sulfênico. Em doses usuais, esses fármacos reduzem a produção diária de ácido em 80 a 95% (99, 150). No entanto, a utilização prolongada destes fármacos pode levar a vários efeitos adversos, tais como: deficiências nutricionais, aumento da susceptibilidade a fraturas, pneumonia, infecções entéricas, hipergastrinemia, atrofia gástrica e hipocloridria crônica e câncer (232-233).

Por fim, temos o sucralfato que é um sal de complexo de sulfato de sacarose e hidróxido de alumínio, capaz de promover efeitos citoprotetores ao funcionar como uma barreira física na mucosa gástrica (234). O mecanismo farmacológico do sucralfato baseia-se na estimulação da síntese de PGs, na produção local do fator de crescimento epidérmico, na inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias bem como estímulo para a absorção de pepsina (235-236). O efeito adverso mais comum consiste em constipação (150).

O grande avanço nas investigações experimentais e clínicas das lesões gastrointestinais têm estimulado o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos

(237). Desta maneira, faz-se necessário a pesquisa de novos fármacos na expectativa de podermos nos deparar com uma via inovadora ou quem sabe um mecanismo farmacológico inédito capaz de promover a prevenção e a cicatrização de úlceras, com ausência ou redução destes efeitos adversos.

## 2. JUSTIFICATIVA

Todos os anos aproximadamente quatro milhões de pessoas são acometidas pela úlcera péptica e em torno de 10-40% destes podem evoluir para óbito, evidenciando assim o prejuízo social, clínico e econômico dos indivíduos acometidos por essa patologia (238-239).

Sabe-se que o consumo prolongado dos fármacos utilizados na terapêutica atual ocasiona inúmeros efeitos adversos, como hipergastrinemia, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, ginecomastia e impotência (233, 240).

O estudo farmacológico de plantas medicinais ou compostos isolados de plantas proporciona uma base importante para a descoberta e desenvolvimento de novas opções para a farmacoterapêutica atual (241). O uso de plantas medicinais é muitas vezes incentivado por propagandas que prometem "benefícios seguros, já que se trata de fonte natural", entretanto uma grande parte das espécies medicinais não possui validação científica (14).

Dentre as espécies vegetais comumente utilizadas pela população brasileira, encontra-se a *Celtis iguanaea* e *Eugenia uniflora* que são espécies vegetais encontradas no Cerrado e relata-se sua utilização para o tratamento de distúrbios gástricos. Resultados anteriores mostraram que o extrato hexânico das folhas do esporão-de-galo (EHEG) possui atividade antiulcerogênica e antissecretória (242) e que *Eugenia uniflora* apresentou atividade antioxidante (243).

Portanto, dentre os pontos de relevância do desenvolvimento deste trabalho, podemos citar a possibilidade de obtermos conhecimentos científicos que permitam o desenvolvimento de fitoterápico ou fitofármaco, que venha se tornar uma alternativa terapêutica para o tratamento da úlcera péptica ou outras patologias do trato gastrointestinal.

### 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo geral

Investigar os possíveis mecanismos envolvidos na atividade gastroprotetora do extrato hexânico das folhas de *Celtis iguanaea* (EHEG), da fração aquosa do extrato hidroacetônico das folhas de *Eugenia uniflora* (FAHP) e do fitoconstituente isolado da FAHP (Oenoteína B).

### 3.2. Objetivos específicos

- Obtenção do extrato hexânico das folhas do Esporão-de-galo (EHEG) e identificação dos principais fitoconstituintes presentes no EHEG.
- Realizar o teste geral de atividades farmacológicas com FAHP em camundongos.
- Avaliar a atividade gastroprotetora do EHEG, FAHP e Oenoteína B em modelos agudos de lesões gástricas induzidas *in vivo* (indometacina, EtOH e ligadura pilórica).
- Quantificar o muco aderido à mucosa gástrica e os grupos sulfidrílicos não-protéicos em camundongos expostos ao agente irritante (EtOH) e tratados com FAHP.
- Avaliar a atividade antioxidante da Oenoteína B, através de sua ação sobre os níveis da catalase.
- Verificar o envolvimento do óxido nítrico no mecanismo gastroprotetor do EHEG e FAHP no modelo de úlcera gástrica induzida por HCl/EtOH.
- Verificar o envolvimento das PGs no mecanismo gastroprotetor do EHEG e Oenoteína B no modelo de úlcera gástrica induzida por HCl/EtOH (*in vivo*) ou por indometacina (*ex vivo*).
- Avaliar a atividade da FAHP e Oenoteína B na secreção gástrica pelo método de ligadura pilórica, determinando alterações no volume, pH e acidez total do suco gástrico.

## 4. CAPÍTULO 1

## **Mechanisms involved in the gastroprotective activity of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent on gastric lesions in mice**

José Luís Rodrigues Martins<sup>a</sup>, Oscar Romero Lopes Rodrigues<sup>a</sup>, Dayane Moreira da Silva<sup>a</sup>, Pablinny Moreira Galdino<sup>a</sup>, José Realino de Paula<sup>b</sup>, Wanderson Romão<sup>d</sup>, Helber Barcellos da Costa<sup>d</sup>, Boniek Gontijo Vaz<sup>c</sup>, Paulo César Ghedini<sup>a</sup>, Elson Alves Costa<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biological Sciences, Department of Physiological Sciences, Federal University of Goiás, Campus Samambaia, Goiânia-GO, Brazil

<sup>b</sup> Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Setor Universitário, Goiânia-GO, Brazil

<sup>c</sup> Institute of Chemistry, Federal University of Goiás, Campus Samambaia, Goiânia-GO, Brazil

<sup>d</sup> Laboratory of Petrolômica and Chemistry Forense, Department of Chemistry, Federal University of Espírito Santo, Goiabeiras, Vitória-ES, Brazil

### **Abstract**

#### **Ethnopharmacological relevance**

*Celtis iguanaea* (Canabaceae) is popularly known as esporão-de-galo, stands out among the medicinal plants used for treatment of gastric ulcers. In Brazil, the leaves they are used traditionally in infusion forms as an analgesic, antiasthmatic, digestive and diuretic.

#### **Aim of the study**

The present study was aimed to investigate the antiulcer mechanisms of hexane extract *Celtis iguanaea* leaves (HE) in several induced-gastric ulcer and characterize its chemical composition.

#### **Materials and methods**

The HE was obtained by exhaustive extraction in Soxhlet apparatus. The chemical characterization of HE was performed Electro spray Fourier transform ion cyclotron mass spectrometry (ESI FT-ICR MS) analysis. Mice were used for the evaluation of the gastroprotective activity. HE was analyzed in the HCl/ethanol, hypothermic restraint stress ulcer and acetic acid. In the investigation of the gastroprotective mechanisms of HE, were performed the amount of adhered gastric mucus,

participation of the  $\alpha_2$ -adrenoceptor, nitric oxide (NO) and prostaglandins (PGs) using the HCl/ethanol -induced gastric mucosa lesion model.

## Results

ESI FT-ICR MS analysis of HE suggest the presence of compounds as lipids, sterol lipids, steroids glycosides and polyphenol glycosides. The oral administration of HE at doses of 100 mg/kg or 200 mg/kg was able to protect the gastric mucosa against HCl/ethanol (10 mL/kg p.o.), and HE at dose of 100 mg/kg protected against hypothermic-restraint stress and acetic -induced gastric lesions. The pretreatment with Yoimbine (2 mg/kg, s.c.), an antagonist  $\alpha_2$ -adrenergic, L-NAME (20 mg/kg, s.c.), an inhibitor of nitric oxide synthesis or indomethacin (10 mg/kg, s.c.), an inhibitor of prostaglandin production, reversed the gastroprotective activity of HE (100 mg/kg, p.o.).

## Conclusions

Our results suggestive that the *Celtis iguanaea* HE exhibits gastroprotective activity in different gastric ulcer models. The mechanism of gastroprotective effect of *Celtis iguanaea* HE suggests the participation of mucus as well as the involvement of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors, NO and prostaglandins. The hydroxyl-linolenic acid, linoleic acids and conjugated oxo-linoleic acids are among the phytoconstituents that were identified in the *Celtis iguanaea* HE.

## 1. Introduction

Peptic ulcer disease embraces both gastric and duodenal ulcers which has been a major cause of morbidity and mortality for over a century (Malfertheiner et al., 2009). Several authors have reported that peptic ulcers are some of the major human pathologies that occur in at least 10% of the world population (Grob, 2004; Zapata-Colindres, 2006). Peptic ulcer is one gastrointestinal disorders, which occur due to an imbalance between the offensive (chloridric acid and pepsin) and defensive (mucus and bicarbonate) factors (Hoogerwerf and Pasricha, 2006) which is affected by stress, the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and *Helicobacter pylori* (Stewart and Ackroyd, 2011).

Several drugs have been used for the treatment of gastric ulcers, among which we can cite the antisecretory, such as antagonists of the histamine H<sub>2</sub> receptor (ranitidine) and the irreversible proton pump inhibitors (omeprazole) (Jain et al., 2007). However, prolonged use of these drugs may lead to series of adverse effects, such as thrombocytopenia, nephrotoxicity, hepatotoxicity, gynecomastia and

impotence (Chan and Leung, 2002; Sheen and Triadafilopoulos, 2011). Thus, medicinal species are being used in traditional medicine worldwide to treat ulcer (Zakaria et al., 2014, Borelli and Izzo, 2000).

In folk medicine, *Celtis iguanaea* is used as an infusion to treat fever, liver and kidney pains (Rodrigues and Carvalho, 2008; Tene et al., 2007). In Mexico, leaves of *Celtis iguanaea* are used for the control of *diabetes mellitus* (Galizia et al., 2002). *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent (family Cannabaceae), popularly known as "esporão-de-galo, tela, taleira, sarã, gurrupιά" (Silva and Proença, 2008; Sousa et al., 2012) stands out among the medicinal plants that are used for the treatment of gastric ulcers. In the state of Goiás, Brazil, the leaves they are used traditionally in infusion forms as an analgesic, antiasthmatic, digestive and diuretic (Silva and Proença, 2008; Paula et al., 2010). The phytochemical screening of the leaves and stem of *Celtis iguanaea* showed the presence of flavonoids, coumarins and mucilage (Paula et al., 2010). Previous studies performed in our laboratory showed gastroprotective effect of the hexane fraction obtained from the partitioning of *Celtis iguanaea* ethanol leaves extract (Sousa et al., 2012). Preliminary data with leaves hexane extract of *Celtis iguanaea* (HE) showed antiulcer and gastric acid antiseecretory effects (Martins et al., 2014).

Although *Celtis iguanaea* is used in ethnomedicine as the aqueous extract, the chemical investigation of plant extracts is generally succeeded by organic extracts, since this procedure generally takes a complete recognition of chemical compounds present in the species to be investigated. There is lack of relevant literature to our knowledge to clarify the mechanisms gastroprotective of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent. To attempt fulfill this lack, specially the chemical composition characterization of *Celtis iguanaea*, we use the electrospray Fourier transform ion cyclotron mass spectrometry for chemical composition characterization of HE and we evaluate the effect of this extract using both acute and chronic gastric lesion models, including its phytochemical analysis and possible gastroprotective mechanisms. The main analytical tools used for chemical characterization of plant extracts or metabolomics of plants are so far based on nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrum (MS) techniques (Hollywood, 2006). Due to sensitivity limitations in NMR, the application of MS in this field is increasingly growing (Chen, 2008). It may be used either com chromatography or stand-alone technique. In this regard, the use of high-field Fourier transform ion cyclotron resonance mass

spectrometry (FT-ICR MS) enables the assignment of thousands of elemental compositions of metabolites in complex mixture by virtue of this unique mass accuracy (< 100 ppb) and resolution (> 400,000 in full scan mode at  $m/z$  500) allowing to detect fine scale diversity in complex mixture (Vaz, 2013). These properties allow the correspondence between accurate masses to elementary compositions. The great applications of MS and in particular FT-ICR MS to metabolomics have been reviewed elsewhere (Dettmer et al., 2007). Therefore, the present study was aimed to investigate the gastroprotective mechanisms of hexane extract *Celtis iguanaea* leaves (HE) in several induced-gastric ulcer and characterize its chemical composition.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Plant material**

The leaves of *Celtis iguanaea* were collected in Hidrolândia, Goiás, Brazil (16° 53'59,4" S - 49° 13' 29,4" W) with an altitude of 786 m. Samples were authenticated by Prof. Dr. José Realino de Paula, and a voucher specimen was deposited at the Herbarium of the Federal University of Goiás (40.110/UFG).

### **2.2. Preparation of extract**

The leaves were oven dried with forced ventilation at 40°C and then crushed to a fine powder. The HE was obtained by exhaustive extraction in Soxhlet apparatus and concentrated under reduced pressure in rotary evaporator. The extraction process yielded 4.81%. At the time of use, the HE was dissolved in filtered water with Tween 80<sup>®</sup> (2%).

### **2.3. Electrospray Fourier transform ion cyclotron mass spectrometry (ESI FT-ICR MS) analysis**

Mass analysis was performed on 9.4 T FT-ICR MS (Solarix, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with commercially available ESI source set to operate over a mass region of  $m/z$  200-1200. Briefly, FT-ICR mass spectra of HE samples were acquired using positive and negative ionization modes, ESI ( $\pm$ ).

The extract samples were diluted to  $\approx$  0.2-0.4 mg mL<sup>-1</sup> in methanol. After, they were sonicated for 5 min and directly infused at a flow rate of 10  $\mu$ L min<sup>-1</sup>. The ESI ( $\pm$ )

source conditions were as follows: nebulizer gas pressure of 2.0 bar, capillary voltage of 2-3 kV, transfer capillary temperature of 250 °C. The ion accumulation time in the hexapole was of 0.3 s followed by transport to the analyzer cell through the electrostatic lens system. Each spectrum was acquired by accumulating 200 scans of time-domain transient signals in 4 mega-point time-domain data sets. The front and back trapping voltages in the ICR cell were - 0.60 V and - 0.65 V for ESI (-) and + 0.80 V and + 0.85 V for ESI (+). All mass spectra were externally calibrated using a NaTFA solution ( $m/z$  from 200-1200) after they were internally recalibrated using a set of the most abundant homologous alkylated compounds for each sample. A resolving power ( $m/\Delta m_{50\%} \approx 500\,000$ , in which  $\Delta m_{50\%}$  is the full peak width at half-maximum peak height) of  $m/z$  400 and a mass accuracy of  $< 1$  ppm provided unambiguous molecular formula assignments for singly charged molecular ions. Mass spectra were acquired and processed using Data Analysis Software (Solarix, Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

## 2.4. Animals

Male albino Swiss mice weighing 25-35 g (supplied by Central Animal House, Federal University of Goiás) were used in all experiments. The animals were maintained under controlled conditions of temperature with a 12 h dark/light cycle and free access to water and standard food. All experiments were conducted between 8:00 a.m. to 4:00 p.m. The experimental protocols were approved by Research Ethic Council of Federal University of Goiás (Protocol number 106/08).

## 2.5. Chemicals and drugs

The following drugs and chemicals were used: absolute ethanol (EtOH) (Quimex, São Paulo, SP, Brazil), carbenoxolone, yohimbine, L-Name (N-G-nitro-L-arginine), indomethacin and Alcian blue (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, U.S.A.); ranitidine (Cloridrato de Ranitidina® Teuto, Brazil), Tween 80 (Sigma-Aldrich), sucrose (Labsynth, Diadema, SP, Brazil), magnesium chloride (Quimibras, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), sodium acetate (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brazil), sodium hydroxide (Cristália, São Paulo, SP, Brazil), acetic acid (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brazil) and halothane (Cristália, Itapira, SP, Brazil). The *Celtis iguanaea* HE was first solubilized in filtered water with Tween 80® (2%), after *Celtis iguanaea*

HE and drug concentrations were adjusted for the treatment to yield 10 mL/kg body weight (BW) and control groups were treated with vehicle: filtered water with Tween 80<sup>®</sup> (2%). The indomethacin was dissolved in sodium bicarbonate solution (5%). All drugs and reagents were prepared immediately before use. Other drugs were dissolved in distilled water.

## **2.6. Antiulcerogenic activity**

### **2.6.1. Ethanol/HCl-induced ulcer**

The procedures for 0.45 M HCl/60% ethanol-induced ulcers were an adaptation of the method of Mizui and Doteuchi (1983). After a 16 h fast, the animals received vehicle (2% Tween 80<sup>®</sup>, 10 mL/kg), HE (50, 100 and 200 mg/kg) or carbenoxolone in dose of 200 mg/kg (Cordeiro et al., 2012; Tavares et al., 2011; Mezzaroba et al., 2006) by gavage. After 60 min, all groups were orally treated with 0.45 M HCl/60% ethanol solution (10 mL/kg, p.o.) for gastric ulcer induction. The animals were euthanized, 1 h after the administration of HCl/ethanol, the stomach removed and opened along the greater curvature. The stomachs were photographed and the area of lesions was measured by CAD software. The lesion area of the gastric mucosa in each animal was calculated and was expressed in percentage (%) in relation to total area of stomach.

### **2.6.2. Hypothermic restraint stress ulcer**

The antiulcerogenic activity of HE in the hypothermic restraint stress induced gastric ulcer model was assessed in mice by the method of Levine (1971) with modifications. After a 16 h fast, the animals received vehicle (2% Tween 80<sup>®</sup>, 10 mL/kg), HE (100 mg/kg) or ranitidine (50 mg/kg) by gavage. After 60 minutes treatment, gastric ulceration was induced by immobilizing the animals in a closed cylindrical cage maintained at 4°C and after 2 h the mice were euthanized, the stomach removed to assess the lesions index (LI). The LI and percentage inhibition was calculated. For the determination of LI, the stomach was cut open along the greater curvature and the inner surface was examined with the help of a microscope. The degree of lesion formation was performed as described by Rios et al. (2010) with few modifications (table 1).

Table 1. Scale by attribution of scores for degree of ulceration.

Injury	Scores
Discoloration of mucosa	1
Edema	1
Hemorrhages	1
Number of petechia	
Until 25%	2
More than 25%	3
Intensity of ulceration	
Ulcers or erosion up to 1 mm	$N \times 2$
Ulcers or erosion larger than 1 mm	$N \times 3$
Perforated ulcers	$N \times 4$

(N number of stomach lesions).

### 2.6.3. Acetic acid-induced chronic gastric ulcer in mice

Chronic gastric ulcers were induced in mice with acetic acid according to a modification of the method described by Takagi et al. (1969). Briefly, animals were anaesthetized, the abdomen was exposed and 50  $\mu$ L of 20% acetic acid (v/v) was injected into the posterior subserosa and 50  $\mu$ L of 0.9% saline into the anterior subserosa of the gastric wall. After the application of acetic acid, the animals were allowed to recover from anesthesia and received only water at the day of operation. Animals were orally treated with vehicle (2% Tween 80<sup>®</sup>, 10 mL/kg), HE 100 mg/kg or ranitidine (50 mg/kg) twice a day for 7 days, starting on the 1 day after injection of acetic acid. The animals were euthanised, 24 h after the last administration, at which time their stomachs were removed and opened along the greater curvature. The area of lesions was measured and was expressed as described in item 2.6.1.

## 2.7. Gastroprotective mechanism

### 2.7.1. Determination of adhered mucus to gastric wall

The modified method of Corne et al. (1974) was utilized for determination of gastric mucus. After a 16 h fast, the animals were treated with ethanol 75% (10 mL/kg, p.o.) or anaesthetized (2% halothane in O<sub>2</sub>) prior to pylorus ligation (Shay et al., 1945). Segment of the glandular region of the stomach was weighed and transferred to a test tube containing 7 mL of 0.1% Alcian blue (0.16 M sucrose in 0.05 M sodium acetate, pH 5.8). After two consecutive rinses with 5 mL of sucrose

(0.25 M), 5 mL of  $\text{MgCl}_2$  (0.5 M) was added in each test tube for the extraction of mucus content with the dye. The glandular segment remained in this solution for 2 h, with intermittent agitation. After which 4 mL of the resultant blue solution was agitated vigorously with 4 mL of ethyl ether until the formation of an emulsion and was centrifuged for 10 minutes at 3600 g. The absorbance of the supernatant was measured at 598 nm using a spectrophotometer. The concentration of Alcian blue was calculated through a calibration curve and the results were expressed in  $\mu\text{g}$  of Alcian blue/g of glandular tissue.

### **2.7.2. HCl/ethanol-induced gastric mucosal ulcer in yohimbine pretreated in mice**

This method was performed as adapted from Arrieta et al. (2003). After a 16 h fast, the animals were pretreated with 0.9% saline (10 mL/kg s.c.) or yohimbine (2 mg/kg, s.c.) ( $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonist) and 30 minutes later, received an oral dose of vehicle (2% Tween 80<sup>®</sup>, 10 mL/kg) or HE (100 mg/kg). After 60 minutes, all groups were orally treated with 0.45 M HCl/60% ethanol solution (10 mL/kg, p.o.) for gastric-ulcer induction. Animals were, 1h after the administration of inductor agent and the stomachs were removed, opened along the greater curvature and gastric damage determined as described above (item 2.6.1).

### **2.7.3. HCl/EtOH-induced gastric mucosal ulcer in L-NAME pretreated in mice**

This method was performed as adapted from Matsuda et al. (1999). After a 16 h fast, the animals were pretreated with 0.9% saline (10 mL/kg, i.p.) or L-NAME (20 mg/kg, i.p.) (an inhibitor of NO synthase) and 30 minutes later, received an oral dose of vehicle (2% Tween 80<sup>®</sup>, 10 mL/kg) or HE (100 mg/kg). After 60 min, all groups were orally treated with 0.45 M HCl/60% ethanol solution (10 mL/kg) for gastric-ulcer induction. Animals were euthanized, 1 h after the administration of inductor agent and the stomachs were removed, opened along the greater curvature and gastric damage determined as described above (item 2.6.1).

### **2.7.4. HCl/EtOH-induced gastric mucosal lesion in indomethacin pretreated in mice**

This method was performed as adapted from Matsuda et al. (1999). After a 16 h fast, the animals were pretreated with 0.9% saline (10 mL/kg s.c.) or indomethacin

(10 mg/kg, s.c.) (an inhibitor of COX) and 60 min later, received an oral dose of vehicle (2% Tween 80<sup>®</sup>, 10 mL/kg) or HE (100 mg/kg). After 60 min, all groups were orally treated with 0.45 M HCl/60% ethanol solution (10 mL/kg) for gastric-ulcer induction. Animals were euthanized, 1 h after the administration of inductor agent and the stomachs were removed, opened along the greater curvature and gastric damage determined as described above (item 2.6.1).

## 2.8. Statistical analysis

In order to compare level of significance between two groups, unpaired Student's t-test was used as described by Drummond and Tom (2011a,b). To compare more than two groups, we used one way - ANOVA followed by Tukey as the *post hoc* test. All analyses were performed using the software Prism 3.0 for Windows. Effects were considered significant at  $P \leq 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Chemical analysis

Figure 1 shows the negative-ion ESI FT-ICR mass spectra of HE extracts. Majority, the oxygen-containing compounds were detected by the ultra-high resolution and accuracy of FT-ICR MS. The molecular weight of acidic oxygen compounds ranged from 200 to 1200 Da. The molecular-weight of these compounds is higher than that common detected by CG-MS (300 Da).

Figure 1: Mass spectra negative-ion ESI FT-ICR obtained from analysis of *Celtis iguanaea* HE (Cannabaceae).

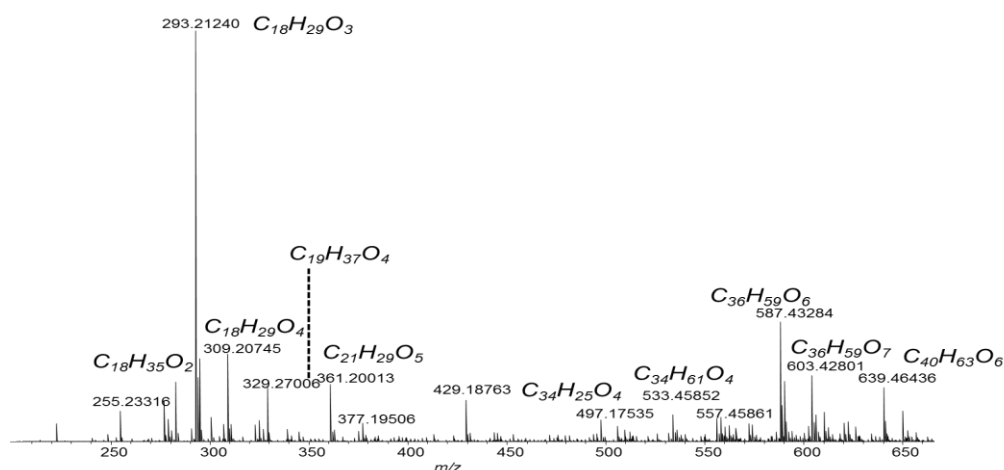


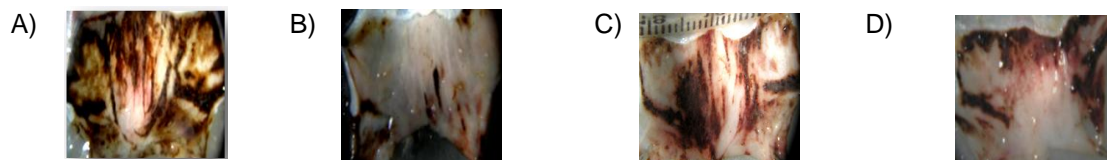


Table 2. Effect of oral treatment of the *Celtis iguanaea* HE or carbenoxolone in HCl/ethanol-induced gastric lesion in mice.

Groups	Treatment	Dose	Ulcerated area (%)	Reduction (%)
Control	Vehicle	10 mL/kg	64.78 ± 2.73	-
Carbenoxolone	Carbenoxolone	200 mg/kg	36.05 ± 5.51**	44.3
HE	HE	50 mg/kg	60.43 ± 4.44	6.7
		100 mg/kg	45.53 ± 4.06**	34.3
		200 mg/kg	36.78 ± 3.94***	43.2

The results are expressed as mean ± SEM of the ulcerated area (%) of each group (n = 8). One-way ANOVA followed by the Tukey *post hoc* test. \*\*  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*  $P \leq 0.001$  compared with the vehicle group. n = number of animals in each group.

Figure 3: Gastroprotective effects of *Celtis iguanaea* HE or carbenoxolone on the HCl/ethanol- induced gastric lesion in mice.



The representative figure of mice that received (p.o) vehicle 10 mL/kg (A), carbenoxolone 200 mg/kg (B), HE 100 mg/kg (C) or HE 200mg/kg (D).

### 3.2.2. Effect of the *Celtis iguanaea* HE in hypothermic restraint stress ulcer

The hypothermic restraint stress induced gastric ulcer model, the treatment with HE or ranitidine reduced significantly the LI when compared to the control group by 49.2 % and 43.8 %, respectively (Table 3).

Table 3: Effect of oral treatment of the *Celtis iguanaea* HE or ranitidine in hypothermic restraint stress induced gastric lesion in mice.

Groups	Treatment	Dose (p.o.)	LI	Reduction (%)
Control	Vehicle	10 mL/kg	9.10 ± 1.05	-
Ranitidine	Ranitidine	50 mg/kg	5.11 ± 0.35***	43.8
HE	HE	100 mg/kg	4.62 ± 0.26***	49.2

The results are expressed as mean ± SEM of the LI of each group (n = 8). One-way ANOVA followed by the Tukey *post hoc* test. \*\*\*  $P \leq 0.001$  compared with the vehicle group. n = number of animals in each group.

### 3.2.3. Effect of the *Celtis iguanaea* HE acetic acid-induced gastric ulcer

The acetic acid-induced gastric ulcer model, the treatment with HE or ranitidine reduced significantly the ulcerated area when compared to the control. The reduction in the formation of LI was by 68.4 % and 57.8 %, respectively (Table 4).

Table 4: Effect of the *Celtis iguanaea* HE in gastric lesions induced by 20 % acetic acid in mice.

Groups	Treatment (p.o.)	Dose	Ulcerated area (%)	Reduction (%)
Control	Vehicle	10 mL/kg	19.8 ± 2.7	-
Ranitidine	Ranitidine	50 mg/kg	11.5 ± 1.8 *	57.8
HE	HE	100 mg/kg	6.2 ± 1.1 ***	68.4

The results are expressed as mean ± SEM of the ulcerated area (%) of each group (n=7-9). One-way ANOVA followed by the Tukey *post hoc* test. \*  $P \leq 0.05$ ; \*\*\*  $P \leq 0.001$  compared with the vehicle group.

### 3.3. Gastroprotective mechanism

#### 3.3.1.1. Effect of the *Celtis iguanaea* HE on determination of adhered mucus to gastric wall

The Alcian blue binding capacity of gastric mucus in the control group with lesion (ethanol 75%, 10 mL/kg p.o.) was decreased significantly as compared to control group without lesion. However, the groups of animal with lesion that were pretreated with HE significantly enhanced the Alcian blue binding capacity of gastric wall mucus (Table 5).

Table 5: Effects of oral treatment of *Celtis iguanaea* HE or ranitidine on the adhered mucus in the model of ethanol (75%, 10 mL/kg p.o.) in mice.

Groups	Treatment	Dose	Alcian blue bound (µg/g tissue)
Control without lesion	Vehicle + water	10 mL/kg	36.06 ± 2.04
Control with lesion	Vehicle + ethanol	10 mL/kg	8.12 ± 1.76***
Ranitidine	Ranitidine + ethanol	50 mg/kg	26.42 ± 1.58 <sup>###</sup>
HE	HE + ethanol	100 mg/kg	21.22 ± 3.02 <sup>##</sup>

The results are expressed as mean ± SEM( n= 8). One-way ANOVA followed by the Tukey *post hoc* test. \*\*\*  $P \leq 0.001$  vs control without lesion or <sup>##</sup> $P \leq 0.01$ ; <sup>###</sup> $P \leq 0.001$  vs control with lesion.

### 3.3.1.2. Effect of the *Celtis iguanaea* HE on determination of adhered mucus to gastric wall

The Alcian blue binding capacity of gastric mucus in the control group with lesion was decreased significantly as compared to control group without lesion. However, the groups of animal with lesion that were pretreated with HE or carbenoxolone demonstrated an increase in the binding capacity of the Alcian blue to gastric mucus (Table 6).

Table 6: Effects of intraduodenal treatment with *Celtis iguanaea* HE or carbenoxolone on the adhered mucus in the model of pyloric ligation in mice.

Groups	Treatment	Dose	Alcian blue bound ( $\mu\text{g/g}$ tissue)
Control without lesion	Sham	-	23.68 $\pm$ 1.81
Control with lesion	Vehicle + pyloric ligation	10 mL/kg	17.12 $\pm$ 1.68*
Carbenoxolone	Carbenoxolone + pyloric ligation	200 mg/kg	28.79 $\pm$ 1.89 <sup>##</sup>
HE	HE + pyloric ligation	100 mg/kg	26.84 $\pm$ 2.32 <sup>##</sup>

The results are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 8). One-way ANOVA followed by the Tukey *post hoc* test. \*  $P \leq 0.05$  vs control without lesion or <sup>##</sup> $P \leq 0.01$  vs control with lesion.

### 3.3.2. Effect of the *Celtis iguanaea* HE on lesion HCl/ethanol-induced gastric mucosal with yohimbine-pretreated mice

The HCl/ethanol treatment produced significant gastric lesions (58.3  $\pm$  6.0%) that were reduced by HE (32.0  $\pm$  8.1%). However, the pretreatment with yohimbine reversed the gastroprotection activities of HE (59.3  $\pm$  4.1%; Table 7).

Table 7: Role of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors in the gastroprotective effect of *Celtis iguanaea* HE against HCl/ethanol-induced gastric injury in mice. Animal groups were pretreated with saline or yohimbine 30 minutes before oral treatment with vehicle or HE.

Pretreatment (s.c.)	Treatment (p.o.)	Ulcerated area (%)
Saline 10 mL/kg	Vehicle 10 mL/kg	58.3 $\pm$ 6.0
Saline 10 mL/kg	HE 100 mg/kg	32.0 $\pm$ 8.1**
Yohimbine 2 mg/kg	HE 100 mg/kg	59.3 $\pm$ 4.1 <sup>#</sup>

Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM (n = 8/group). \*\* $P \leq 0.01$  HE vs mice treated with vehicle and <sup>#</sup> $P \leq 0.05$  yohimbine vs HE treatment alone using unpaired Student's "t" test.

### 3.3.3. Effect of the *Celtis iguanaea* HE on lesion HCl/ethanol-induced gastric mucosal with L-NAME- pretreated mice

The HCl/ethanol treatment produced significant gastric lesions ( $63.2 \pm 1.9\%$ ) that were reduced by HE ( $43.2 \pm 4.0\%$ ). However, the pretreatment with L- NAME reversed the gastroprotection activities of HE ( $68.8 \pm 5.2\%$ ; Table 8).

Table 8: Role of oxide nitric (NO) in the gastroprotective effect of *Celtis iguanaea* HE against HCl/ethanol-induced gastric injury in mice. Animal groups were pretreated with saline or L- NAME 30 minutes before oral treatment with vehicle or HE.

Pretreatment (i.p.)	Treatment (p.o.)	Ulcerated area (%)
Saline 10 mL/kg	Vehicle 10 mL/kg	$63.2 \pm 1.9$
Saline 10 mL/kg	HE 100 mg/kg	$43,2 \pm 4.0^*$
L-Name 20 mg/ kg	Vehicle 10 mL/kg	$68.1 \pm 5.0$
L-Name 20 mg/ kg	HE 100 mg/kg	$68,8 \pm 5.2^{###}$

Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM (n = 8/group). \* $P \leq 0.05$ ; \*\*\* $P \leq 0.01$  HE vs compared with the corresponding control group by Tukey *post hoc* test and  $^{###} P \leq 0.01$  L- Name vs HE treatment alone using unpaired Student's "t" test.

### 3.3.4. Effect of the *Celtis iguanaea* HE on lesion HCl/ethanol-induced gastric mucosal with indomethacin-pretreated mice

The HCl/ethanol treatment produced significant gastric lesions ( $58.5 \pm 3.9\%$ ) that were reduced by HE ( $38.0 \pm 5.0\%$ ). However, the pretreatment with indomethacin reversed the gastroprotection activities of HE ( $55.0 \pm 6.0\%$ ; Table 9).

Table 9: Role of prostaglandin in the gastroprotective effect of *Celtis iguanaea* HE against HCl/ethanol-induced gastric injury in mice. Animal groups were pretreated with saline or Indomethacin 60 minutes before oral treatment with vehicle or HE.

Pretreatment (s.c.)	Treatment (p.o.)	Ulcerated area (%)
Saline 10 mL/kg	Vehicle 10 mL/kg	$58.5 \pm 3.9$
Saline 10 mL/kg	HE 100 mg/kg	$38.0 \pm 5.0^*$
Indomethacin 10 mg/ kg	Vehicle 10 mL/kg	$58.2 \pm 4.2$
Indomethacin 10 mg/ kg	HE 100 mg/kg	$55.0 \pm 6.0^\#$

Values are expressed mean  $\pm$  SEM (n = 8/group). \* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$  vs mice treated with vehicle (control group) using ANOVA and Tukey *post hoc* test and  $^\# P \leq 0.05$ ,  $^{##} P \leq 0.01$  antagonist vs HE treatment alone using unpaired Student's "t" test.

#### 4. Discussion

*Celtis iguanaea* is known to possess various therapeutic properties and has been one of the species most frequently mentioned with popular usage in Goiás (Borges et al., 2013).

The current study investigated the gastroprotective activity of the hexanic extract obtained from the *Celtis iguanaea* (Jaq.) Sargent in several experimental models of gastric ulcer and their possible mechanisms. Our results obtained with HE reinforces the gastroprotective properties of the genus *Celtis* and its use to treat gastric disorders. These results are consistent with data obtained in our laboratory that demonstrated effects antiulcer and antisecretory gastric ethanolic extract of the leaves of *Celtis iguanaea* and the hexane fraction obtained after fractionation, showing that the compound (s) responsible for gastroprotection are present this fraction of low polarity (Souza et al., 2012).

The ESI (-) FT-ICR MS analysis of HE shows a distinct profile of O-containing compounds. As such technique provides compositional information in terms of molecular formula, these compounds are structurally compatible with lipids, sterol lipids, steroids glycosides and polyphenol glycosides. The high resolution ESI (-) spectrum of HE showed the  $m/z$  293 ( $C_{18}H_{29}O_3$ ) as the most intense. We propose as a possible structure for this compound that showed on Figure 2, (9S,10E,12Z,15Z)-9-Hydroxy-10,12,15-octadecatrienoic acid. This compound and its derivatives as hydroxyl-linolenic and linoleic acids and conjugated oxo-linoleic acids, was reported by Dong et al. (2000) as anti-inflammatory compounds, and here, it should act as inhibitory in different models of induced ulcers. It has been reported that conjugated unsaturated fatty acids such as conjugated linoleic acid and eicosatetraenoic acid showed such bioactivities as an antiplatelet effect (Tritt et al., 2001), anti-neoplastic activity (Ip et al., 1991), and inductions of apoptosis (Ip et al., 1999).

The model of HCl/EtOH-induced ulcer was the first test performed in this study to evaluate the gastroprotective effect of leaves of *Celtis iguanaea* HE. It is well established that the combination of HCl/EtOH induces gastric lesions considered one of the most intense agents that induce gastric ulcers because it promotes serious disturbances in the gastric mucosa by promoting stasis in gastric blood flow that contributes to the development of the hemorrhagic and necrotic aspects of tissue injury (Konturek et al., 1998). HCl/EtOH acts by exerting a direct toxic effect on the

epithelium, leading to the formation of characteristic necrotic lesions due to a reduction in the mucus production and bicarbonate secretion (Massignani et al., 2009). In addition, it induces reduction of gastric blood flow, the solubilization of components of the mucus of the stomach and oxidative stress (Marrotta et al., 1999). Thus, the experimental model of HCl/EtOH-induced gastric damage in mice has widely been employed to investigate cytoprotector effect of medicinal plants.

Our data clearly demonstrates that the group control treated orally with HCl/EtOH, as expected, produces mucosal injury with severe necrotizing and hemorrhagic areas. The HE significantly reduced the percentage of ulcerated area showing an dose-dependent effect. According to the rules of the Ethics Committee of the UFG and on expectation of reducing the number of animals used in experimental procedures, we decided to work only with the intermediate dose.

Hypothermia and restraint-induced gastric ulcer cause a gastric dysfunction probably mediated by the release of histamine. It does not only increases the gastric secretion, but also increase in gastric motility, vagal overactivity, mast cell degranulation and changes the levels of blood flow, bicarbonate in mucosa and mucus production (Barros et al., 2007; Overmier and Murison, 2000). Stress is capable of inactivate mucosal prostaglandin syntheses by accumulating  $H_2O_2$ , which also favors the generation of reactive oxygen species (Bandyopadhyay et al., 2002). Furthermore, stress-induced ulcers can be prevented entirely or partially by vagotomy, being established that excessive vagal activity is the major factor of stress-induced ulceration (Panda and Sonkamble, 2012). Our results suggest that the inhibitory effect of HE on stress-induced lesion might be as a result of a decreased acid secretion. This result is consistent with the previous research on hexane extract Martins et al. (2014) who reported reduced of the parameters involved in gastric secretion.

We also evaluated the antiulcerogenic activity of HE in chronic gastric ulcer model induced by acetic acid, there is seen that this model is assumed to be similar to human chronic ulcer, which it is difficult to treat and requires a long time to heal (Okabe and Amagase, 2005). Acetic acid is reported to produce ulcers gastric obstruction, and thus resulting in an increase in gastric acid (Jainu and Devi, 2006). This model the extracts are used in a curative manner, with the treatment after the ulcer formation, mimicking clinical use (Klein-Júnior et al., 2013). Oral administration of HE for seven consecutive reduced the ulcerated area of the gastric mucosa in

mice, when compared with the control group, suggesting that oral administration of HE for seven consecutive reduced the ulcerated area of the gastric mucosa in mice, when compared with the control group, suggesting that HE has curative properties. This result, suggest that the *Celtis iguanaea* HE have effect in treatment of chronic ulcer.

Gastric mucus is the first line of defense against acid and adheres together with bicarbonate secreted by the epithelium to serve as a barrier against self digestion (Allen and Flemström, 2005). Mucus gel is secreted by apical expulsion from surface epithelial cells and contains ~95% water and ~5% mucin glycoproteins (Laine et al., 2008). According to Zakaria (2014), the increased amount of mucus secreted by the cells of the gastric mucosa is able to prevent formation of gastric ulcers, acting as an effective barrier to the diffusion of the back hydrogen ions, improving the buffering effect of gastric juice and reducing the friction in the stomach wall during peristalsis. Our present study revealed that the amount of adhered gastric mucus was augmented by treatment with the HE in both EtOH 75% or with the pylorus ligation models. The results obtained in the pyloric ligation model suggest systemic gastroprotective effect of HE and possible involvement of an increase in the amount of mucus as undeligning mechanism. The systemic effect of HE is consistent with the previous study (Martins et al., 2014), where intraduodenal treatment was able to reduce the index of lesion and parameters of gastric secretion. According to Laine et al. (2008) an increase in the release of endogenous factors such as mucus and bicarbonate promote gastric cytoprotection. In agreement with this author, *Celtis iguanaea* HE has increased pH in our previous work (Martins et al., 2014).

It is well known that  $\alpha_2$ -adrenergic receptors, NO and PGs are involved in the modulation of the gastric mucosal integrity, and is important to the regulation of gastric pH and mucus secretion (Andreo et al., 2006; Junior et al., 2014). Additional experiments were conducted to determine the role of  $\alpha_2$ -adrenergic receptor in gastric protection mechanism HE, since the  $\alpha_2$ -adrenergic receptors play a physiological role in the regulation of gastrointestinal function. According to Jaatinen et al. (1995), EtOH exposure can induce sympathetic stimulation. In the literature, there are studies demonstrating that clonidine inhibits gastric ulceration (Bhandare et al., 1991). Activation of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors has been reported to inhibit gastric acid secretion (Blandizzi et al., 1988; Cheng et al., 1981; DiJoseph et al., 1987; Kunchandy et al., 1985) and shown to reduce gastric mucosal damage in various

animal ulcer models of indomethacin (Kunchandy et al., 1985), aspirin (Gyires, K. 1996) and cold restraint-stress induced gastric lesions (Niida et al., 1991). We therefore analyzed whether the gastroprotection exerted by *Celtis iguanaea* HE was due to the involvement of the  $\alpha_2$ -adrenergic receptors. *Celtis iguanaea* HE promoted gastroprotection can be completely reversed with yohimbine (antagonist  $\alpha_2$ -adrenergic), suggesting the involvement of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors.

Nitric oxide is a biological mediator that plays an important role as an endogenous derived from the action of NO synthase on the guanidine group of L-arginine (Falcão et al., 2013). In the gastrointestinal tract, this molecule (NO) is involved in the regulation of blood flow, maintenance of vascular tonus, gastric mucus secretion, modulation of mast cell activity participates and in the modulation of the smooth musculature tone, such as the regulation of intestinal peristaltism, gastric emptying, and antral motor activity (Martín et al., 2001). Our results showed that the inhibition of NO synthesis by the action of NO synthase inhibitor (*L*-NAME) blocked the gastroprotection exerted by *Celtis iguanaea* HE, indicating that the maintenance of the synthesis is critical for gastric protection by *Celtis iguanaea* HE. NO can also modulate the integrity of the gastric mucosa by interacting with other mediators involved in the protection of the mucosa, such as the prostaglandins, and secretion of mucus and bicarbonate (Kim and Hwan Kim, 2001).

The prostaglandins are also important endogenous gastroprotective factors modulated mucosal blood flow by stimulating the secretion of mucus and bicarbonate, inhibit neutrophil adherence and activation and increasing the resistance of epithelial cells against potential damage by cytotoxins (Cristians et al., 2013; Takayama et al., 2011). The indomethacin, as a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), induces gastric damage mainly by inhibiting prostaglandin production through inhibiting the activity of COX-1 isozymes (Rao and Knaus, 2008). The oral treatment with *Celtis iguanaea* HE was able of protect the gastric mucosa against lesions induced by HCl/EtOH and this effect was abolished after the administration of indomethacin, indicating the importance of prostaglandins in the mechanism of action of *Celtis iguanaea* HE.

## 5. Conclusion

This study provide convincing evidence a gastroprotective activity of *Celtis iguanaea* HE in different gastric ulcer models. The mechanism of gastroprotective effect of *Celtis iguanaea* HE suggests the participation of mucus as well as the involvement of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors, NO and prostaglandins. The hydroxyl-linolenic acid, linoleic acids and conjugated oxo-linoleic acids are among the phytoconstituents that were identified in the *Celtis iguanaea* HE. Our findings provide a pharmacological basis for potential clinical use of this species for the treatment of gastric ulcer. More studies are needed to ensure the isolation of the active compound (s) present in this plant and expand the mechanism of action involved in this activity.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Mrs. Ekaterina A.F.B. Rivera and Jackson Nascimento de Lima for technical assistance. Thanks are also due to CAPES and CNPq for financial support.

## References

- Allen, A., Flemström, G., 2005. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *American Journal of Physiology, Cell Physiology*. 288, 1 - 19.
- Andreo, M.A., Ballesteros, K.V., Hiruma-Lima, C.A., Rocha, L.R.M., Souza-Brito, A.R., Vilegas, W., 2006. Effect of *Mouriri pusa* extracts on experimentally induced gastric lesions in rodents: role of endogenous sulfhydryls compounds and nitric oxide in gastroprotection. *Journal of Ethnopharmacology*. 11, 431 - 441.
- Arrieta, J., Benitez, J., Flores, E., Castilho, C., Navarrete, A., 2003. Purification of gastroprotective triterpenoids from stem bark of *Amphipterygium adstringens*; roles of prostaglandins, sulphidryls, nitric oxide and capsaicin neurons. *Planta Medica*. 69, 905 - 909.
- Bandyopadhyay, D., Biswas, K., Bhattacharyya, M., Reiter, R.J., Banerjee, R.K., 2002. Involvement of reactive oxygen species in gastric ulceration: protection by melatonin. *Indian Journal of Experimental Biology*. 40, 693 – 705.
- Barros, M.P. de., Sousa, J.P.B., Bastos, J.K., Andrade, S.F.de., 2007. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 110, 567 - 571.

Bhandare, P.N., Rataboli, P.V., D'Souza, R.S.D., 1991. Dual action of clonidine on ethanol-induced gastric lesions: is the imidazoline-preffering receptor involved? *European Journal of Pharmacology*. 199, 243 - 245.

Blandizzi, C., Bernardini, M.C., Del Tacca, M., 1988. The effects of GABA agonists and antagonists on rat gastric acid secretion. *Pharmacological Research Communications*. 20, 419 - 420.

Borges, F.V., Machado, T.C., Cunha, K.S., Pereira, K.C., Costa, E.A., Paula, J.R., Chen-Chen, L., 2013. Assessment of the cytotoxic, genotoxic, and antigenotoxic activities of *Celtis iguanaea* (Jacq.) in mice. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 85, 955 – 963.

Borelli, F., Izzo, A.A., 2000. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytotherapy Research*. 14, 581– 591.

Chan, F.K., Leung, W.K., 2002. Peptic ulcer disease, *Lancet*. 360, 933 - 941.

Chen, J., Zhao, X., Fritsche, J., Yin, P., Schmitt-Kopplin, P., Wang, W., Lu, X., Haring, H.U., Schleicher, E.D., Lehmann, R., Xu, G., 2008. Practical approach for the identification and isomer elucidation of biomarkers detected in a metabonomic study for the discovery of individuals at risk for diabetes by integrating the chromatographic and mass spectrometric information. *Analytical Chemistry*. 80, 1280 - 1289.

Cheng, H.C., Gleason, E.M., Nathan, B.A., Lachmann, P.J., Woodward, J.K., 1981. Effects of clonidine on gastric acid secretion in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 217, 121 - 126.

Cordeiro, K.W., Pinto, L.A., Formagio, A.S.N., Andrade, S.F de., Kassuya, C.A.L., Freitas, K.C., 2012. Antiulcerogenic effect of *Croton urucurana* Baillon bark. *Journal of Ethnopharmacology*. 143, 331 – 337.

Corne, S.J., Morrisey, S.M., Woods, R.J., 1974. A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. *Journal of Physiology*. 242, 116 - 117.

Cristians, S., Bye, R., Navarrete, A., Mata, R., 2013. Gastroprotective effect of *Hintonia latiflora* and *Hintonia standleyana* aqueous extracts and compounds. *Journal of Ethnopharmacology*. 145, 530 - 535.

Dettmer, K., Aronov, P.A., Hammock, B.D., 2007. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*. 26, 51 - 78.

DiJoseph, J.F., Eash, J.R., Mir, G.N., 1987. Gastric antisecretory and antiulcer effects of WHR1582A, a compound exerting  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist activity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 241, 97 - 102.

Dong, M., Oda, Y., Hirota, M., 2000. (10E,12Z,15Z)-9-hydroxy-10,12,15-octadecatrienoic acid methyl ester as an anti-inflammatory compound from *Ehretia dicksonii*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 64, 882 - 886.

Drummond, G. B., Tom, B. D. M., 2011. "How can we tell if frogs jump further?" *British Journal of Pharmacology*. 164, 209 - 212.

Drummond, G. B., Tom, B. D. M., 2011. "Statistics, probability, significance, likelihood: words mean what we define them to mean," *British Journal of Pharmacology*. 164, 1573 – 1576.

Falcão, H. S., Maia, G.L.A., Bonamin, F., Kushima, H., Moraes, T.M., Hiruma-Lima, C.A., Takayama, C., Ferreira, A.L., Brito, A.R.M.S., Agra, M.F., Filho, J.M.B., Batista, L.M., 2013. Gastroprotective mechanisms of the chloroform and ethyl acetate phases of *Praxelis clematidea* (Griseb.) R.M.King & H.Robinson (Asteraceae). *Journal of Natural Medicines*. 67, 480 - 491.

Galicia, E. H., Contreras, A. A., Santamaria, L.A., Ramos, R.R., Miranda, A.A.C.; Vega, L.M.G., Saenz, J.L F., Aguilar, F.J.A., 2002. Studies on Hypoglycemic Activity of Mexican Medicinal Plants. *Western Pharmacology Society*. 45, 118 - 124.

Grob, N.G., 2004. Peptic ulcer in twenty-century of America. *New Jersey Medicine*. 101, 19 - 28.

Gyires, K., 1996. Analysis of the inhibiting activity of presynaptic  $\alpha_2$ - adrenoceptors against NSAID-induced gastric mucosal lesions in the rat. *Inflammopharmacology*. 4, 173 - 180.

Hiruma-Lima, C.A., Batista, L.M., Almeida, A.B.A., Magri, L.P., Santos, L.C., Vilegas, W., Brito, A.R.M.S., 2009. Antiulcerogenic action of ethanolic extract of the resin from *Virola surinamensis* Warb. (Myristicaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 122, 406 - 409.

Hollywood, K., Brison D. R., Goodacre R., 2006. Metabolomics: Current technologies and future trends. *Proteomics*. 6, 4716 - 4723.

Hoogerwerf, W.A., Pasricha, P.J., 2006. Pharmacotherapy of gastric acidity, peptic ulcers, and gastroesophageal reflux disease. In: Brunton, L.L., Lazo, J.S., Parker, K.L. (Eds.), *Goodman & Gilman's The Pharmacological basis of therapeutics*, 11th ed. McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York, pp. 967 – 981.

Ip, C., Chin, S.F., Scimeca, J. A., Pariza, M.W., 1991. Mammary Cancer Prevention by Conjugated Dienoic Derivative of Linoleic Acid. *Cancer Research*. 51, 6118 - 6124.

Ip, M.M., Masso-Welch, P.A., Shoemaker, S.F., Shea-Eaton, W.K., Ip. C., 1999. Conjugated Linoleic Acid Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis of Normal Rat Mammary Epithelial Cells in Primary Culture. *Experimental Cell Research*. 250, 22 – 34.

Jaatinen, P., Riihioja, P., Haapalinna, A., Heinonen, E., Kiianmaa, K., Hervonen, A., 1995. Prevention of ethanol-induced sympathetic overactivity and degeneration by dexmedetomidine. *Alcohol*. 12, 439 – 446.

Jain, K.S., Shah, A.K., Bariwal, J., Shelke, S.M., Kale, A.P., Jagtap, J.R., Bhosale, A.V., 2007. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid peptic disorders. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 15, 1181 - 1205.

Jainu, M., Devi, C.S., 2006. Antiulcerogenic and ulcer healing effects of *Solanum nigrum* (L.) on experimental ulcer models: possible mechanism for the inhibition of acid formation. *Journal of Ethnopharmacology*. 104, 156 - 163.

Júnior, F.E.B., Oliveira, D.R., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Kamdem, J.P., Macedo, G.E., Silva, G.F., Menezes, I.R.A., Costa, J. G.M., Coutinho, H.D.M., Kerntopf, M.R., Posser, T., 2014. Protective effects of *Croton campestris* A. St-Hill in different ulcer models in rodents: Evidence for the involvement of nitric oxide and prostaglandins. *Journal of Ethnopharmacology* (in press).

Kim, H., Hwan Kim, H., 2001. Role of nitric oxide and mucus in ischemia/reperfusion induced gastric mucosal injury in rats. *Pharmacology*. 62, 200 - 207.

Klein-Júnior, L.C., Santin, J.R., Lemos, M., Silveira, A.C de O., Rocha, J.A.R., Beber, A.P., Wagner, T.M., Bresolin, T.M.B., Bella-Cruz, A., Cechinel-Filho V., Andrade, S.F.de., 2013. Role of gastric mucus secretion, oxinitrenergic system and sulfhydryl groups on the gastroprotection elicited by *Polygala cyparissias* (Polygalaceae) in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 65, 767 – 776.

Konturek, J.W., Hengst, K., Konturek, S.J., Sito, E., Stachura, J., Domschke, W., 1998. Physiological role of cholecystinin in gastroprotection in humans. *American Journal of Gastroenterology*. 93, 2385 – 2390.

Kunchandy, J., Khanna, S., Kulkarni, S.K., 1985. Effect of  $\alpha_2$  agonists clonidine, guanfacine and B-HT 920 on gastric acid secretion and ulcers in rats. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie*. 275, 123 - 138.

Laine, L., Takeuchi, K., Tarnawski, A., 2008. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterology*. 135, 41 - 60.

Levine, R. J., 1971. A Method for Rapid Production of Stress Ulcers in Rats, In: Pfeiffer, C.J. (Eds.), *Peptic Ulcer*. Munksgarrd, Copenhagen, pp. 92 - 97.

Malfertheiner, P., Chan, F.K., McColl, K.E., 2009. Peptic ulcer disease. *Lancet*. 374, 1449 - 1146.

Marrotta, F., Tajiri, H., Safran, P., Fesce, E., Ideo, G., 1999. Ethanol related gastric mucosal damage: evidence of a free radical-mediated mechanism and beneficial effect of oral supplementation with bionormalizer, a novel natural antioxidant. *Digestion*. 60, 538 - 543.

Massignani, J.J., Lemos, M., Maistro, E.L., Schaphauser, H.P., Jorge, R.F., Sousa, J.P.B., Bastos, J.K., Andrade, S.F., 2009. Antiulcerogenic activity of the essential oil

of *Baccharis dracunculifolia* on different experimental models in rats. *Phytotherapy Research*. 23, 1355 – 1360.

Martin, M.J., Jimenez, M.D., Motilva, V., 2001. New issues about nitric oxide and its effects on the gastrointestinal tract. *Current Pharmaceutical Design*. 7, 881 - 908.

Martins, J.L.R., Sousa, F.B., Fajemiroye, J.O., Ghedini, P.C., Ferreira, P.M., Costa, E.A., 2014. Anti-ulcerogenic and antisecretory effects of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent hexane leaf extract. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. 16, 250 - 255.

Matsuda, H., Li, Y., Yoshikawa, M., 1999. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulphhydryls, and prostaglandins in gastro-protection by mormodin Ic, on oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol- induced gastric mucosal lesion in rats. *Life Sciences*. 65, 27 - 32.

Mezzaroba, L.F.H., Carvalho, J.E., Ponezi, A.N., Antônio, M.A., Monteiro, K.M., A. Possenti, V.C. Sgarbieri., 2006. Antiulcerative properties of bovine  $\alpha$ -lactalbumin. *International Dairy Journal*. 16, 1005 – 1012.

Mizui, T., Doteuchi, M., 1983. Effect of polyamines on acidified ethanol induced gastric lesions in rats. *Japanese Journal of Pharmacology*. 33, 939 - 945.

Niida, H., Takeuchi, K., Ueshima, K. Okabe, S., 1991. Vagally mediated acid hypersecretion and lesion formation in anesthetized rat under hypothermic conditions. *Digestive Diseases and Sciences*. 36, 441 - 448.

Okabe, S., Amagase, K., 2005. An overview of acetic acid ulcer models—the history and state of the art of peptic ulcer research. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 28, 1321 - 1341.

Overmier, J.B., Murison, R., 2000. Anxiety and helplessness in the face of stress predisposes, precipitates, and sustains gastric ulceration. *Behavioural Brain Research*. 110, 161 - 174.

Panda, V., Sonkamble, M., 2012. Anti-ulcer activity of *Ipomoea batatas* tubers (sweet potato). *Functional Foods in Health and Disease*. 2, 48 - 61.

Paula, M.A., Couto, R.O., Bara, M.T.F., Rezende, M.H., Paula, J.R., Costa, E.A., 2010. Caracterização farmacognóstica da *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent. *Latin American Journal of Pharmacy*. 29, 526 - 533.

Rao, P.N.P., Knaus, E.E., 2008. Evolution of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) Inhibition and Beyond. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 11, 81 – 110.

Rios, E.R.V., Rocha, N.F.M., Venâncio, E.T., Moura, B.A., Feitosa, M.L., Cerqueira, G.S., Soares, P.M.G., Woods, D.J., Sousa, F.C.F.de., Leal, L.K.A.M., Fonteles, M.M.F., 2010. Mechanisms involved in the gastroprotective activity of esculin on acute gastric lesions in mice. *Chemico-Biological Interactions*. 188, 246 - 254.

Rodrigues, V.E., Carvalho, D.A., 2008. Florística de plantas medicinais nativas de remanescentes de floresta estacional semidecidual na região do Alto do Rio Grande, Minas Gerais. *Revista Cerne*. 14, 93 - 112.

Shay, H., Komarov, S.A., Fels, S.S., Meranze, D., Gruenstein, M., Siple, H., 1945. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterology*. 5, 43 - 61.

Sheen, E., Triadafilopoulos, G., 2011. Adverse effects of long-term proton pump inhibitor therapy. *Digestive Diseases and Sciences*. 56, 931 - 950.

Silva, C.S.P., Proença, C.E.B., 2008. Uso e disponibilidade de recursos medicinais no município de Ouro Verde de Goiás, GO, Brasil. *Acta Botanica Brasílica*. 22, 481-492.

Sousa, F.B., Martins, J.L.R., Florentino, I.F., Couto, R.O.do., Nascimento, M.V.M., Galdino, P.M., Ghedini, P.C., Paula, J.R., Costa, E.A., 2012. Preliminary studies of gastroprotective effect of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent (Ulmaceae). *Natural Product Research*. 26, 1 - 9.

Stewart, D.J., Ackroyd, R., 2011. Peptic ulcers and their complications. *Surgery (Oxford) - Oesophagus and Stomach*. 29, 568 - 574.

Takagi, E., Okabe, S., Saziki, R., 1969. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on healing. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 19, 416 - 426.

Takayama, C., Faria, F.M., Almeida, A.C. de., Valim-Araujo, D.A.O., Rehen, C.S., Dunder, R.J., Eduardo Augusto Rabelo Socca, E.A.R., Manzo, L.P., Rozza, A. L., Marcos Jose Salvador, M.J., Pellizzon, C.H., Hiruma-Lima, C.A., Luiz-Ferreira, A., Souza-Brito, A.R.M., 2011. Gastroprotective and ulcer healing effects of essential oil from *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 135, 147 – 155.

Tavares, T.G., Monteiro, K.M., Possenti, A., Pintado, M.E., Carvalho, J.E., Malcata, F.X., 2011. Antiulcerogenic activity of peptide concentrates obtained from hydrolysis of whey proteins by proteases from *Cynara cardunculus*. *International Dairy Journal*. 21, 934 – 939.

Tene, V., Malagón, O., Finzi, P.V., Vidari, G., Armijos, C., Zaragoza, T., 2007. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchi, Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*. 111, 63 - 81.

Truitt, A., McNeill, G., Vanderhoek, J.Y., 1999. Antiplatelet effects of conjugated linoleic acid isomers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 18, 239 – 246.

Vaz, B.G., Abdelnur, P.V., Rocha, W.F.C., Gomes, A.O., Pereira, R.C.L., 2013. Predictive Petroleomics: Measurement of the total acid number by Electrospray

Fourier Transform Mass spectrometry and chemometric analysis. *Energy Fuels*. 27, 1873 – 1880.

Zakaria, Z.A., Balana, T., Suppaiahb, V., Ahmadc, Syahida., Jamaludin, F., 2014. Mechanism(s) of action involved in the gastroprotective activity of *Muntingia calabura*. *Journal of Ethnopharmacology*. 151, 1184 – 1193.

Zapata-Colindres, J.C., Zepeda-Gómez, S., Montaña-Loza, A., Vázquez-Ballesteros, E., Villalobos, J.J., Valdovinos-Andraca, F., 2006. The association of *Helicobacter pylori* infection and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in peptic ulcer disease. *Canadian Journal of Gastroenterology*. 20, 277 – 280.

5. CAPÍTULO 2









































## 6. CAPÍTULO 3





































## 7. DISCUSSÃO

A alta incidência de úlcera péptica na atualidade (0,10-0,19%) (95, 244) têm estimulado várias frentes de pesquisa que buscam encontrar e identificar produtos naturais que possam diminuir o surgimento das desordens gastrointestinais ou que favoreçam a cicatrização das lesões. A vários séculos, plantas medicinais são utilizadas tradicionalmente e estima-se que 25 a 30% dos fármacos são derivados de produtos naturais (245). As plantas medicinais podem ser fonte de novos fármacos que não poderiam ser obtidos por síntese química, como por exemplo, os alcalóides da *Papaver somniferum*, além disso, fornecem compostos que podem ser modificados, tornando-se mais eficazes e menos tóxicos (246). Infelizmente, a maioria das plantas medicinais usadas para fins terapêuticos não possuem comprovação de eficácia e segurança (247).

O Cerrado brasileiro é reconhecido como a savana mais rica em biodiversidade do mundo, com a presença de diversos ecossistemas e flora com mais de 10.000 espécies de plantas, sendo que 4.400 espécies são endêmicas nesta área (248). Uma grande variedade de plantas medicinais encontradas no cerrado brasileiro são usadas tradicionalmente para o tratamento das desordens gastrointestinais, dentre as quais estão a *Celtis iguanaea* (34, 242) e a *Eugenia uniflora* (53).

Martins et al. (242) mostraram a atividade antiulcerogênica e antissecretória do extrato hexânico das folhas de *Celtis iguanaea* em modelos agudos de úlcera gástrica. Na úlcera induzida por indometacina ou no modelo de ligação pilórica, o extrato hexânico do esporão-de-galo (EHEG) reduziu significativamente as lesões gástricas induzidas. Além disso, diminuiu a secreção de H<sup>+</sup> tanto basal quanto a estimulada por diferentes secretagogos (betanecol ou histamina), além de diminuir a secreção do volume gástrico e acidez total. Estes resultados sugerem que o efeito do EHEG nos modelos experimentais avaliados pode estar associado com a inibição da secreção de ácido.

Tendo mostrado o efeito antiulcerogênico e antissecretório do EHEG, prosseguiu-se o estudo objetivando caracterizar os constituintes, bem como os possíveis mecanismos farmacológicos envolvidos na atividade gastroprotetora do EHEG. Além disso, a espécie *Eugenia uniflora* também foi estudada. Investigou-se os possíveis mecanismos gastroprotetores da fração aquosa do extrato hidroacetônico da pitanga (FAHP) e do fitoconstituente majoritário (Oenoteína B) em diferentes modelos de úlceras induzidas experimentalmente em roedores.

Visando determinar a via de administração mais segura, bem como a faixa de doses adequadas para os demais testes biológicos *in vivo*, iniciou-se o estudo com o teste geral de atividade farmacológica. Este teste se baseia na ficha de identificação de alterações descritas por Irwin (249), sendo considerado o primeiro modelo farmacológico para a pesquisa de compostos de origem vegetal ou sintética que possam ter utilidade na terapêutica (250-251).

As alterações comportamentais observadas demonstraram que o tratamento com FAHP pela via oral não indicou nenhuma atividade que o diferenciasse do grupo controle e somente a maior dose (1000 mg/kg) administrada pela via intraperitoneal apresentava atividade sugestiva de toxicidade aguda devido à ocorrência de óbito.

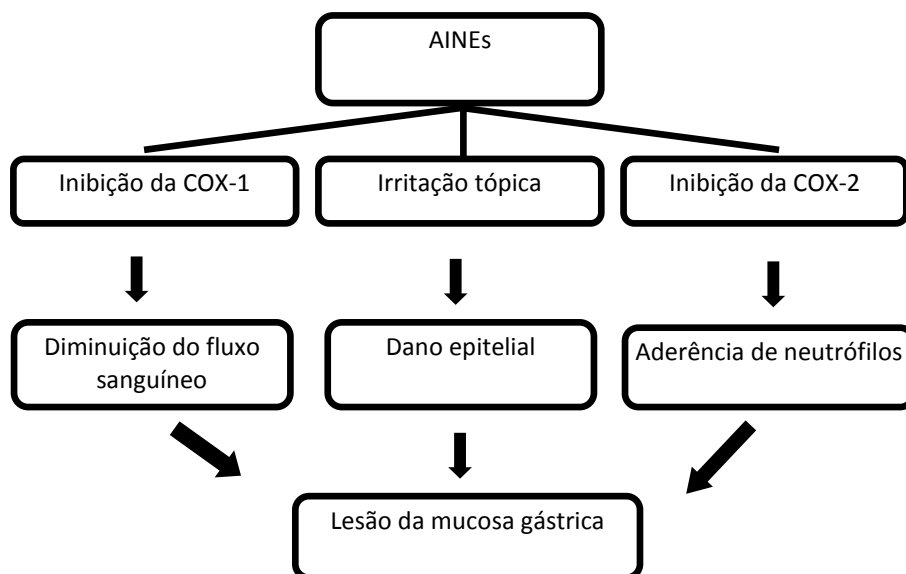
O conjunto de resultados indicaram a via oral como a melhor opção para os demais testes *in vivo*, sendo escolhida a faixa de dose de 100 a 1000 mg/kg, para os experimentos seguintes, na expectativa de se observar um efeito dose-dependente.

Vários mecanismos são descritos para a indução de úlceras pépticas em diferentes modelos experimentais, sendo impraticável pensar em um único mecanismo. Assim sendo, para a avaliação da atividade antiulcerogênica foram utilizados quatro modelos de lesões gástricas induzidas agudamente. Inicialmente, o modelo utilizado foi úlcera induzida por indometacina (30 mg/kg, s.c), visto que atualmente, aproximadamente 20% dos usuários de AINEs são acometidos por úlceras pépticas (252-253). Embora possa ocorrer lesão tópica direta na mucosa gástrica, o mecanismo pelo qual os AINEs provocam danos gastroduodenais é baseado na inibição da ciclo-oxigenase (COX) que resulta na redução da síntese das PGs gástricas (172, 254).

A COX é encontrada em diferentes isoformas, sendo a isoforma COX-1 expressa na maioria dos tecidos e em condições fisiológicas é responsável pela diminuição da secreção ácida, aumento do fluxo sanguíneo, aumento da produção e secreção de muco e bicarbonato, enquanto que a COX-2 é a isoforma prevalente durante renovação celular e reparação tecidual da úlcera (93, 255).

A inibição seletiva da COX-2 promove baixa toxicidade no TGI (256-257), porém aumenta aproximadamente em 50 vezes o risco de eventos cardiovasculares (133, 258-259). Nas situações de inflamação gastrointestinal, as PGs oriundas da COX-2 promovem a cicatrização e a regulação da resposta inflamatória. Desta maneira, a inibição da COX-2 pode resultar em exacerbação acentuada da lesão, levando à

perfuração e até morte (181). Outros fatores como a hipermotilidade gástrica, infiltração ou ativação de neutrófilos estão envolvidos na patogênese das lesões gástricas por AINEs (260).



**Figura 9** - Diagrama ilustrando três dos principais componentes de patogênese dos AINEs na indução da lesão da mucosa gastrointestinal (Adaptado de Wallace, 2001) (181).

Recentemente, vários estudos têm mostrado a utilização de fármacos antissecretores, como os antagonistas dos receptores H<sub>2</sub> (ranitidina) ou inibidores da bomba de prótons (omeprazol) na prevenção de úlceras induzidas por AINEs (181, 261), sugerindo a participação da secreção gástrica nesta modulação, como pode ser observado pelo controle positivo utilizado no ensaio, o qual foi capaz de reduzir o índice de lesões.

No experimento de úlceras induzidas por AINEs, o pré-tratamento pela via oral com a FAHP nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg ou Oenoteína B nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/kg, foi capaz de reduzir significativamente o índice de lesões gástricas, sugerindo envolvimento dos metabólitos da COX na proteção da mucosa gástrica. O pré-tratamento com FAHP não mostrou efeito dose-dependente. Contudo, observamos que o fitoconstituente majoritário desta fração (Oenoteína B) possui efeito dose-dependente.

Na sequência deste estudo, utilizamos o modelo de estresse por contenção a frio (4°C, 2 horas). É bem conhecido que o estresse desempenha um papel

importante na ocorrência de úlceras no estômago, que frequentemente ocorrem como resultado de eventos estressantes, como queimaduras, choque, sepse, cirurgia e traumas. Os principais fatores envolvidos no desenvolvimento de úlceras por estresse são: o aumento da secreção gástrica e da motilidade gástrica, desgranulação dos mastócitos, infiltração de neutrófilos e aumento das espécies reativas de oxigênio, bem como diminuição da secreção de muco, bicarbonato, fluxo sanguíneo e óxido nítrico (262-263). A histamina, acetilcolina e gastrina também desempenham papel importante além na hiperatividade vagal, sendo responsável em parte pela formação de úlcera induzida por estresse (264).

Os resultados demonstraram claramente que o EHEG ou FAHP reduziram o índice de lesões quando comparado com o grupo tratado com veículo.

O efeito antiulcerogênico também foi avaliado no modelo de lesão gástrica induzida por administração oral de HCl/EtOH. O álcool é a causa mais comum de ulceração gástrica no ser humano. A formação de lesões na mucosa gástrica por agentes necrotizantes tais como o EtOH, envolve a redução dos mecanismos de defesa gástricos (265). Ademais, a administração de EtOH reduz a produção de muco, o fluxo sanguíneo, a secreção de bicarbonato e os níveis de PGs e glutatona endógena e ainda é capaz de aumentar a infiltração de neutrófilos, geração de radicais livres e produção de leucotrienos (266).

A associação de HCl e EtOH (HCl/EtOH) induz lesões gástricas mais graves e intensas, porque promove estase do fluxo sanguíneo que contribui para o desenvolvimento de lesões gástricas com hemorragia e necrose (267). Neste modelo, avaliamos a capacidade dos extratos (EHEG e FAHP) e do fitoconstituente isolado (Oenoteína B) em manter a integridade da mucosa gástrica frente às lesões produzidas por HCl/EtOH. De acordo com os resultados obtidos nesse modelo, o EHEG, FAHP e Oenoteína B protegeram a mucosa gástrica contra o agente ulcerogênico. O controle positivo utilizado nas lesões induzidas por HCl/EtOH foi a carbenoxolona na dose de 200 mg/kg. É conhecido que carbenoxolona promove a proteção da mucosa gástrica contra uma variedade de agentes lesivos em experimentos animais (268-269). O efeito protetor da carbenoxolona é devido ao aumento da secreção de PGE<sub>2</sub> ou inibição da sua degradação na luz gástrica, ligação aos componentes do muco ou inibição de enzimas inativadoras de prostaglandinas (117). Como esperado, a carbenoxolona reduziu significativamente a área ulcerada.

Dando sequência ao estudo da atividade antiulcerogênica exercida pela Oenoteína B, foi utilizado o modelo da ligadura pilórica, no qual as lesões ocorrem possivelmente pelo acúmulo de ácido gástrico no estômago, gerando lesões semelhantes às provocadas por EtOH, já que ambos afetam a barreira de muco. Nesse modelo, verificamos que oenoteína B na dose de 15 mg/kg foi capaz de reduzir o índice das lesões gástricas. Desta forma, evidenciamos que a citoproteção observada neste modelo de úlcera induzida, pode ser devido uma ação sistêmica já que a administração da Oenoteína B neste modelo foi feita pela via intraduodenal.

Em seguida, mediante a constatação da atividade antiulcerogênica visto pelos diferentes tratamentos, executamos experimentos que possibilitassem explicar possíveis mecanismos pelos quais o EHEG, FAHP e oenoteína B exerciam seus efeitos.

O muco é um gel transparente, viscoso e elástico, sendo constituído por aproximadamente 95% de água e 5% de mucinas, capaz de aderir à superfície da mucosa, gerando assim uma barreira protetora entre o epitélio e o lúmen gástrico contra agentes biológicos, físicos e químicos (172, 270-271). O gel de muco é dissolvido pela redução dos grupos sulfidrílicos não-protéicos (168). O aumento na quantidade de muco previne a formação de úlceras gástricas, pois o muco atua como uma barreira eficiente à difusão de  $H^+$  e diminuindo o atrito na parede do estômago durante o peristaltismo (169).

Os resultados demonstraram que animais tratados pela via oral com FAHP na dose de 300 mg/kg, apresentaram um aumento de 28% na capacidade de ligação do Alcian blue no muco aderido a mucosa gástrica quando comparado aos animais que receberam etanol 75%. O aumento da produção de muco, representado pelo aumento da capacidade de ligação do "Alcian blue" no muco aderido a mucosa gástrica, pode ser pelo menos em parte, responsável pela atividade antiulcerogênica observada nos modelos experimentais avaliados anteriormente.

Vários autores tem mostrado que agentes necrotizantes tais como o etanol, aumentam demasiadamente os níveis de peroxidação lipídica e reduzem os níveis de GSH na mucosa gástrica, sendo que esta redução causa danos oxidativos, morte celular e erosão epitelial (231, 272). Verificamos se a FAHP gerava gastroproteção por alterar enzimas antioxidantes. O tratamento com FAHP na dose de 300 mg/kg foi capaz de aumentar em até 48,24% os níveis de GSH. As EROs são descritas como um dos fatores envolvidos na patogênese das úlceras gástricas induzidas por

estresse, AINEs, EtOH e HCl/EtOH (273-274). Sabe-se que o EtOH provoca danos diretos nas células da mucosa gástrica, como consequência da peroxidação lipídica (275) e formação de radicais livres (276). Assim sendo, compostos com ação antioxidante podem apresentar atividade gastroprotetora neste modelo experimental.

O desequilíbrio nas defesas antioxidantes alteram a formação e degradação das EROs, que irão exercer atividade danosa sobre o epitélio da mucosa gástrica. Desta forma, os antioxidantes têm papel crucial na prevenção e cura de lesões gástricas (277). Na tentativa de elucidar os mecanismos pelos quais a Oenoteína B promove a diminuição da área ulcerada induzida por HCl/EtOH, foi avaliado sua capacidade antioxidante.

Muitos sistemas de enzimas antioxidantes mantêm o ambiente redox, como por exemplo, a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT). Valores aumentados do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) podem ativar a enzima superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do radical superóxido à peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (231). O  $H_2O_2$  em seguida é inativado pela CAT e glutatona peroxidase (GPx) e degradado em água como mostrado na figura 8 (231).

O tratamento com Oenoteína B aumentou a atividade de CAT, restabelecendo a níveis semelhantes ao grupo Sham, sugerindo a importância desta enzima como primeira linha de defesa contra a ação destrutiva dos danos oxidativos.

Sabe-se que o NO é um dos principais fatores moduladores envolvidos na regulação do fluxo sanguíneo gástrico e microcirculação gástrica. O NO também participa na regulação da secreção de ácido e no fluxo sanguíneo da mucosa gástrica (195).

No modelo para avaliação do envolvimento do NO endógeno na gastroproteção, foi observado que na lesão gástrica induzida por HCl/EtOH, o pré-tratamento com *L*-Name (um inibidor inespecífico da NO sintase) reduziu o efeito gastroprotetor produzido pelo EHEG, sugerindo que parte do efeito gastroprotetor observado pode ser devido ao envolvimento da via do NO. Porém, o mesmo não foi notado com FAHP, uma vez que o que o pré-tratamento com *L*-NAME não alterou seu efeito, sugerindo que não há envolvimento do NO no efeito gastroprotetor de FAHP. O efeito gastroprotetor encontrado pelo EHEG pode estar sendo favorecido pelo aumento da síntese da  $PGE_2$ , pois sabe-se que o NO ou o nitroprussiato de sódio podem aumentar a atividade das diferentes isoformas da COX (278-279).

Evidências favoráveis levaram-nos a acreditar que os mecanismos observados anteriormente, poderiam ser adivindos de uma modulação nos níveis de PGs. Prosseguindo com este estudo, avaliou-se o envolvimento das PGs no efeito gastroprotetor do EHEG e da Oenoteína B.

A ação gastroprotetora das  $PGE_2$  e  $PGI_2$  é mediada principalmente pelos receptores  $EP_1$  que aumentam o fluxo sanguíneo e a secreção de bicarbonato na mucosa danificada (280-281). Já a ligação dessas PGs em receptores  $EP_3$  e  $EP_4$  altera a secreção de ácido gástrico e a secreção de muco (282-283). Fármacos capazes de aumentar a quantidade de muco gástrico, como o misoprostol (análogo sintético da  $PGE_1$ ) e a carbenoxolona, são eficazes na proteção gástrica, principalmente em lesões gástricas induzidas por AINEs ou HCl/EtOH (117, 269, 284).

Verificou-se que em animais pré-tratados com indometacina (um inibidor da enzima COX) os efeitos gastroprotetores do EHEG e Oenoteína B foram reduzidos. Possivelmente, EHEG e Oenoteína B estariam modulando a secreção gástrica por promover um aumento dos níveis de PGs endógenas. Por outro lado, em um modelo de dosagem de  $PGE_2$  em mucosa gástrica de ratos, o tratamento dos animais com oenoteína B não reverteu a redução dos níveis de  $PGE_2$  causado pelo pré-tratamento dos animais com indometacina.

Considerando que a FAHP e Oenoteína B foram capazes de promover a proteção da mucosa gástrica em diferentes modelos experimentais, decidimos investigar se a FAHP e Oenoteína B estariam interferindo na secreção ácida gástrica. O modelo de ligadura pilórica que foi utilizado fornece parâmetros que estão envolvidos na secreção ácida gástrica, como: volume, acidez livre (pH) e acidez total (285). Considerando que a secreção ácida é um fator marcante para injúria da mucosa gástrica, um aumento do pH e/ou uma redução da acidez total induzida pela FAHP ou Oenoteína B, poderia constituir como parte dos efeitos antiulcerogênicos descrito anteriormente.

Os resultados obtidos mostram que FAHP e Oenoteína B reduziram significativamente a acidez total em camundongos submetidos à ligadura pilórica, sugerindo desta forma que ambos apresentam substancial efeito antissecretório. No entanto, somente FAHP foi capaz de alterar a acidez livre (pH) e apenas a oenoteína B foi capaz de reduzir o volume gástrico. Segundo Lapa et al. (286), os valores de acidez total não correspondem necessariamente ao pH, uma vez que as proteínas

presentes na secreção podem tamponar parte da acidez. Desta forma, evidenciamos que a citoproteção mostrada pela FHAP e oenoteína B deve-se a um efeito sistêmico.

Os diferentes modelos experimentais utilizados neste estudo permitiram sugerir mecanismos gastroprotetores para o EHEG, FAHP e oenoteína B. Nestes mecanismos podem ser observados a participação de muco, NO, enzimas antioxidantes, PGs, bem como uma atividade antissecretória. No entanto, não podemos descartar a participação de outros mecanismos que poderiam estar envolvidos na atividade gastroprotetora, tais como: fator de crescimento endotelial e  $\text{PGI}_2$ . Desta maneira, são necessários mais estudos fitoquímicos para a identificação e isolamento de outros composto(s) presente(s) nas espécies estudadas e prosseguir com a investigação de outros mecanismos de ação que podem estar envolvidos na atividade gastroprotetora.

## 8. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo com o extrato hexânico das folhas do esporão-de-galo (EHEG), fração aquosa do extrato hidroacetônico das folhas de pitanga (FAHP) e do fitoconstituente isolado (oenoteína B) nos permitem sugerir que:

- O tratamento pela via oral com FAHP, em todas as doses utilizadas, mostrou não possuir alterações que diferenciasses dos animais controles.
- O EHEG mostrou atividade antiulcerogênica nos modelos de lesões gástricas induzidas por estresse e HCl/EtOH.
- A FAHP mostrou atividade antiulcerogênica nos modelos de lesões gástricas induzidas por indometacina, estresse e HCl/EtOH.
- A oenoteína B mostrou atividade antiulcerogênica nos modelos de lesões gástricas induzidas por indometacina, HCl/EtOH e ligadura pilórica.
- A FAHP protegeu a mucosa gástrica de camundongos quando as lesões foram induzidas pelo HCl/EtOH e aumentou o muco aderido à mucosa gástrica. Prosseguindo com o mesmo modelo, FAHP apresentou atividade antioxidante por aumentar os níveis de GSH.
- A oenoteína B apresentou atividade antioxidante através do aumento da atividade da enzima catalase.
- No modelo de lesões gástricas induzidas pelo HCl/EtOH, o pré-tratamento com inibidor inespecífico da NO sintase reduziu de maneira significativa a gastroproteção exercida pelo EHEG, porém não foi capaz de reduzir a gastroproteção exercida pela FAHP, sugerindo participação do NO somente na gastroproteção exercida pelo EHEG.
- No modelo de lesões gástricas induzidas pelo HCl/EtOH, o pré-tratamento com indometacina reduziu de maneira significativa a gastroproteção exercida pelo EHEG e pela oenoteína B, sugerindo participação das PGs endógenas no mecanismo de gastroproteção.
- O tratamento com oenoteína B não evitou a redução nos níveis da PGE<sub>2</sub> em mucosa gástrica de ratos pré-tratados com indometacina.
- A FAHP e oenoteína B foram capazes de reduzir a acidez total, entretanto, apenas Oenoteína B reduziu o volume gástrico, e somente FAHP reduziu a acidez livre, aumentando o pH da secreção ácida gástrica.

- Em suma, o extrato hexânico das folhas do esporão-de-galo (EHEG), extrato hidroacetônico das folhas de pitanga (FAHP) e oenoteína B apresentaram atividade gastroprotetora frente aos diferentes agentes ulcerogênicos. Demonstramos que a atividade gastroprotetora dessas espécies e do fitoconstituente isolado está relacionada ao aumento de fatores protetores, bem como, redução dos fatores agressores.

*REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. Firenzuoli F, Gori L, Neri D. [Clinical phytotherapy: opportunities and problematics]. *Ann Ist Super Sanita*. 2005;41(1):27-33.
2. Li Y, Ohizumi Y. Search for constituents with neurotrophic factor-potentiating activity from the medicinal plants of Paraguay and Thailand. *Yakugaku Zasshi*. 2004 Jul;124(7):417-24.
3. FontQuer P. *Plantas medicinales: el discórdides renovado*. 1988.
4. Palmeira G. A acupuntura no ocidente. *Cadernos de Saúde Pública*. 1990;6:117-28.
5. Miguel MD, Miguel OG. *Desenvolvimento de Fitoterápicos*. São Paulo, Brasil: Robe; 2000.
6. Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*. 2009;27:1-93.
7. Reichert JM. Trends in development and approval times for new therapeutics in the United States. *Nature reviews Drug discovery*. 2003;2:695-702.
8. Dickson M, Gagnon JP. Key factors in the rising cost of new drug discovery and development. *Nature reviews Drug discovery*. 2004;3:417-29.
9. Butler MS. The role of natural product chemistry in drug discovery 2004.
10. Calixto JS, EM. R. O Cerrado como fonte de plantas medicinais para uso dos moradores de comunidades tradicionais do alto Jequitinhonha, MG. Indaiatuba 2004.
11. Dias B. A implementação da convenção sobre a diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello; 1996.
12. Guerra MP, RO. N. Biodiversidade: Aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. . 3 ed. In Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, PR. P, editors. Porto Alegre/Florianópolis 2001.
13. Aquino D, Silva RBL, Gomes VF, EC. A. Nível de conhecimento sobre riscos e benefícios do uso de plantas medicinais e fitoterápicos de uma comunidade do Recife – PE. . *Rev enferm UFPE*. 2007 jul./set.;1(1):107-10.
14. Veiga-Junior VF, Pinto AC, Maciel MAM. Plantas medicinais: Cura segura. *Química Nova*. 2005;28:519-28.
15. Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug discovery from medicinal plants 2005.
16. Carvalho ACB, Balbino EE, Maciel A, JPS. P. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2008 Apr./jun.;18(2):314-9.
17. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann GM, Mello JCP, Mentz LA, PR. P. *Farmacognosia: da planta ao medicamento – Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos*. . 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFSC; 2003.
18. Cronquist A. *An Integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press; 1981.
19. Wiegrefe SJ, Sytsma KJ, RP. G. The Ulmaceae, one family or two? Evidence from chloroplast DNA restriction site mapping. *Plant Systematics and Evolution*. 1998 Jan.;210:249-70.
20. Song BH, Wang XQ, Li FZ, Hong DY. Further evidence for paraphyly of the Celtidaceae from the chloroplast gene matK. *Plant Systematics and Evolution*. 2001 Mar.;228:107-15.
21. Sytsma KJ, Morawetz J, Chris Pires J, Nepokroeff M, Conti E, Zjhra M, et al. Urticalean rosids: Circumscription, rosid ancestry, and phylogenetics based on rbcL, trnL-F, and ndhF sequences. *American Journal of Botany*. 2002 Apr.;89(9):1531-46.
22. Souza VC, H. L. *Botânica sistemática: guia ilustrado para a identificação das famílias fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APGII*. 2 ed. São Paulo: Instituto Plantarium de Estudos da Flora; 2008.
23. Trevisan R. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades biológicas das cascas de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent Ulmaceae. [Dissertação de Mestrado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2010.
24. Borges FFV, Machado TC, Cunha KS, Pereira KC, Costa EA, De Paula JR, et al. Assessment of the cytotoxic, genotoxic, and antigenotoxic activities of *Celtis iguanaea* (Jacq.) in mice. *Anais Da Academia Brasileira De Ciências*. 2013 Sep;85(3):955-63.

25. Pilati R, L.A. S. Morfoanatomia da plântula de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sarg. (Ulmaceae). *Acta Scientiarum Biological Sciences*. 2006 Jan./Mar.;28(1):1-6.
26. Giehl ELH, JA. J. Structural gradient of the tree component and relationship with flooding in a riverine forest, Rio Uruguai, southern Brazil. *Acta Botanica Brasilica*. 2008 Jul-Sep;22(3):741-53.
27. Lorenzi H, Souza HM. Plantas ornamentais do Brasil. In: Odessa N, editor. 2 ed. São Paulo: Instituto Plantarum 1999. p. 1088.
28. Pio C. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Plantas Exóticas Cultivadas. . 2 ed. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura; 1931.
29. Paula M. Caracterização farmacognóstica e atividade gastroprotetora do extrato aquoso das folhas de *Celtis iguanaea* (jacq.) Sargent. [Dissertação de mestrado]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2009.
30. Pereira KCS, Costa EA, Paula JR, KS. C. Ausência de efeiro genotóxico do extrato de esporão-de-galo em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. . Salvador 2008.
31. Tene V, Malagon O, Finzi PV, Vidari G, Armijos C, Zaragoza T. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchiipe, Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007 Apr 20;111(1):63-81.
32. Hernandez-Galicia E, Aguilar-Contreras A, Aguilar-Santamaria L, Roman-Ramos R, Chavez-Miranda AA, Garcia-Vega LM, et al. Studies on hypoglycemic activity of Mexican medicinal plants. *Proc West Pharmacol Soc*. 2002 Jan.;45:118-24.
33. Soares-Silva LH, CEB. P. A new species of *Psidium* L. (Myrtaceae) from southern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2008;158:51-4.
34. Sousa FB, Martins JL, Florentino IF, Couto RO, Nascimento MV, Galdino PM, et al. Preliminary studies of gastroprotective effect of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent leaves (Ulmaceae). *Nat Prod Res*. 2013 Jun.;27(12):1102-7.
35. Paula MA, Couto RO, Bara MTF, Rezende MH, Paula JR, Costa EA. Pharmacognostic characterization of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent. *Lat Am J Pharm*. 2010 Jun;29(4):526-33.
36. Bighetti AE, Antonio MA, Kohn LK, Rehder VL, Foglio MA, Possenti A, et al. Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania laevigata* Schultz Bip. *Phytomedicine*. 2005 Jan;12(1-2):72-7.
37. Mota KS, Dias GE, Pinto ME, Luiz-Ferreira A, Souza-Brito AR, Hiruma-Lima CA, et al. Flavonoids with gastroprotective activity. *Molecules*. 2009 Mar.;14(3):979-1012.
38. Trevisan R, Lima CP, Miyazaki CMS, Pesci FA, Silva C, Hirota BCK, et al. Evaluation of the phytotoxic activity focused on the allelopathic effect of the extract from the bark of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent Ulmaceae and purification of two terpenes. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2012 mar.;14(3):494-9.
39. Lattuada D. Micropropagação e miniestaquia de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2010.
40. Landrum LR, ML. K. The Genera of Myrtaceae in Brazil: An Illustrated Synoptic Treatment and Identification Keys. *Brittonia*. 1997 Dec.;49(4):508-36.
41. Souza V, Lorenzi H. Botânica sistemática: guia ilustrado para a identificação das famílias fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APGII. 2 ed. Flora IPdEd, editor. São Paulo: Instituto Plantarium; 2005.
42. Cruz AVM, MAC. K. A importancia das familias Myrtaceae e Melastomataceae na etnomedicina Brasileira. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2005 Jan.;10(1):1-12.
43. Bezerra JEF, Silva-Junior JF, IE. L. Pitanga (*Eugenia uniflora* L.). . Nativas F, editor. Jaboticabal: Funep; 2000.
44. Joly A. Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal. 4 ed. São Paulo 1977.
45. Weyerstahl P, Marschall-Weyerstahl H, Christiansen C, Oguntimein BO, Adeoye AO. Volatile constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil. *Planta Med*. 1988 Dec;54(6):546-9.
46. Consolini AE, Sarubbio MG. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. *J Ethnopharmacol*. 2002 Jun;81(1):57-63.

47. Sanchotene M. Frutíferas nativas úteis à fauna na arborização urbana. 2 ed. Porto Alegre: Sagra; 1989.
48. Fiuza TS, Rezende MH, Sabóia-Morais SMT, Bara MTF, Tresvenzol LMF, JR. P. Pharmacognostic characterization of the leaves of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). 2008 sept.;5(2):21-31.
49. Lopes. M. Composição química, atividade antibacteriana e alelopática dos óleos essenciais de *Eugenia uniflora* L. e *Myrciaria glazioviana* (kiaersk) G.M. Barroso e Sobral (Myrtaceae). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2008.
50. Lorenzi H, FJA. M. Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas. Plantarum I, editor2002.
51. Josino Soares D, Walker J, Pignitter M, Walker JM, Imboeck JM, Ehrnhoefer-Ressler MM, et al. Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) fruit juice and two major constituents thereof exhibit anti-inflammatory properties in human gingival and oral gum epithelial cells. *Food Funct.* 2014 Nov;5(11):2981-8.
52. Lopes M. Composição química, atividade antibacteriana e alelopática dos óleos essenciais de *Eugenia uniflora* L. E *Myrciaria glazioviana* (kiaersk) G. M. Barroso & Sobral (Myrtaceae). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2008.
53. Almeida CE, Karnikowski MG, Foletto R, Baldisserotto B. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. *Rev Saude Publica.* 1995 Dec;29(6):428-33.
54. Prado LC, Silva DB, de Oliveira-Silva GL, Hiraki KR, Canabrava HA, Bispo-da-Silva LB. The gastroprotective effects of *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) leaf extract: the possible role of condensed tannins. *Biol Pharm Bull.* 2014;37(5):722-30.
55. Silva CA, Silva CR, Veras JH, Chen-Chen L, Ferri PH, Santos SD. Genotoxicity and cytotoxicity evaluation of oenothin B and its protective effect against mitomycin C-induced mutagenic action. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2014 Apr 767(1):8-12.
56. Amat AG, ME. Y. Medicinal plants and ethnopharmacology in the province of Misiones (Argentina). *Acta Farmacéutica Bonaerense.* 1991 jun/jul;10(3):153-9.
57. Alice CB, Vargas VM, Silva GA, de Siqueira NC, Schapoval EE, Gleye J, et al. Screening of plants used in south Brazilian folk medicine. *J Ethnopharmacol.* 1991 Dec;35(2):165-71.
58. Schmeda-Hirschmann G, Theoduloz C, Franco L, Ferro E, de Arias AR. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. *J Ethnopharmacol.* 1987 Nov;21(2):183-6.
59. Bouzada MLM, Fabria RL, Duarte GG, Scioia E. Busca de novas drogas antimicrobianas a partir de vegetais2009 [cited 2015 15-01-15].
60. Schapoval EE, Silveira SM, Miranda ML, Alice CB, Henriques AT. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. *J Ethnopharmacol.* 1994 Dec;44(3):137-42.
61. Arai I, Amagaya S, Komatsu Y, Okada M, Hayashi T, Kasai M, et al. Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. *J Ethnopharmacol.* 1999 Dec 15;68(1-3):307-14.
62. Rivera D, Obon C. The ethnopharmacology of Madeira and Porto Santo Islands, a review. *J Ethnopharmacol.* 1995 May;46(2):73-93.
63. Amat AG, De Battista GA, Uliana RF. Diuretic activity of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) aqueous extract. Second World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare Wocmap-2: Pharmacognosy, Pharmacology, Phytomedicines, Toxicology. 1999(501):155-8.
64. Santos K, Rolón M, Vega C, Arias AR, Costa J, Coutinho H. Atividade leishmanicida *in vitro* de *Eugenia uniflora* e *Momordica charantia*. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2013 jul.;34(1):47-50.
65. Rattmann YD, de Souza LM, Malquevicz-Paiva SM, Dartora N, Sasaki GL, Gorin PAJ, et al. Analysis of Flavonoids from *Eugenia uniflora* Leaves and Its Protective Effect against Murine Sepsis. *Evid-Based Compl Alt.* 2012.
66. Lee MH, Nishimoto S, Yang LL, Yen KY, Hatano T, Yoshida T, et al. Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*. *Phytochemistry.* 1997 Apr.;44(7):1343-49.

67. Fortes GAC, Carvalho AG, Ramalho RRF, Silva AJR, Ferri PH, Santos SC Antioxidant Activities of Hydrolysable Tannins and Flavonoid Glycosides Isolated from *Eugenia uniflora* L. *Rec Nat Prod*. 2015 Jan.;9(2):251-6.
68. Melo RM, Correa VFS, Amorim ACL, Miranda ALP, Rezende CM. Identification of impact aroma compounds in *Eugenia uniflora* L. (Brazilian pitanga) leaf essential oil. *J Brazil Chem Soc*. 2007;18(1):179-83.
69. Peixoto CA, Oliveira AL, Cabral FA. Composition of Supercritical Carbon Dioxide Extracts of Pitanga (*Eugenia Uniflora* L.) Leaves. *J Food Process Eng*. 2010 Oct;33(5):848-60.
70. Kiss AK, Bazylo A, Filipek A, Granica S, Jaszewska E, Kiarszys U, et al. Oenothien B's contribution to the anti-inflammatory and antioxidant activity of *Epilobium* sp. *Phytomedicine*. 2011 May.;18(7):557-60.
71. Redondo LM, Chacana PA, Dominguez JE, Miyakawa MEF. Perspectives in the use of tannins as alternative to antimicrobial growth promoter factors in poultry. *Front Microbiol*. 2014 Mar 27;5.
72. de Jesus NZ, de Souza Falcao H, Gomes IF, de Almeida Leite TJ, de Moraes Lima GR, Barbosa-Filho JM, et al. Tannins, peptic ulcers and related mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2012;13(3):3203-28.
73. Deshpande SS, Cheryan M, Salunkhe DK. Tannin analysis of food products. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1986;24(4):401-49.
74. Monteiro JM, Lins-Neto EMF, Amorim ELC, Strattmann RR, Araújo EL, UP. A. Tannin concentration in three sympatric medicinal plants from caatinga vegetation. *Revista Árvore*. 2005 Nov./Dez.;29(6):999-1005.
75. Mello JCP, SC. S. Taninos In: Simões CMO, Schenckel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. (orgs) *Farmacognosia (da planta ao medicamento)*. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis 2001.
76. Haslam. E. *Plant Polyphenols: Vegetable Tannins Revisited*. . Press CU, editor. Cambridge 1989.
77. Yokozawa T, Chen CP, Dong E, Tanaka T, Nonaka GI, I. N. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochem Pharmacol* 1998 Jul.;56(2):213-22.
78. Monteiro JM, Albuquerque UP, Araújo EL, ELC. A. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Quim Nova*. 2005 Sept./Oct.;28(5):892-6.
79. Sgarbieri V. *Proteínas em alimentos protéicos: propriedades - degradações - modificações*. . 1 ed. São Paulo 1996.
80. Okuda T, Yoshida T, Hatano T. Pharmacologically active tannins isolated from medicinal plants. *Basic Life Sci*. 1992 Jun.;59:539-69.
81. Vatter DA, K S. Biological functionality of ellagic acid: a review. *J Food Biochem*. 2009 Jun.;29(3):234-66.
82. Bartolomé B, Jiménez-Ramsey LM, Butler L. Nature of the condensed tannins present in the dietary fibre fractions in foods. *Food Chemistry*. 1995 Dec.;53(4):357-62.
83. Martins JLR, Serrano SHP, Santos SC, Costa EA, ES. G. Redox behavior of the ellagitannin oenothien B and ellagic acid at a glassy carbon electrode. *Int J Electrochem Sci*. 2015;10.
84. Yoshida T, Amakura Y, Yoshimura M. Structural Features and Biological Properties of Ellagitannins in Some Plant Families of the Order Myrtales. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010 Jan;11(1):79-106.
85. Hatano T, Yasuhara T, Matsuda M, Yazaki K, Yoshida T, Okuda T. Oenothien B, a dimeric, hydrolysable tannin with macrocyclic structure, and accompanying tannins from *Oenothera erythrosepala*. *J Chem Soc*. 1990 Feb.;1(10):2735-43.
86. Miyamoto K, Nomura M, Murayama T, Furukawa T, Hatano T, Yoshida T, et al. Antitumor activities of ellagitannins against sarcoma-180 in mice. *Biol Pharm Bull*. 1993 Apr;16(4):379-87.
87. Yoshida T, Hatano T, Ito H. Chemistry and function of vegetable polyphenols with high molecular weights. *Biofactors*. 2000;13(1-4):121-5.
88. Fukuchi K, Sakagami H, Okuda T, Hatano T, Tanuma S, Kitajima K, et al. Inhibition of Herpes-Simplex Virus-Infection by Tannins and Related-Compounds. *Antivir Res*. 1989 Jun-Jul;11(5-6):285-97.

89. Santos GD, Ferri PH, Santos SC, Bao SN, Soares CM, Pereira M. Oenothien B inhibits the expression of PbFKS1 transcript and induces morphological changes in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*. 2007 Nov;45(7):609-18.
90. Schepetkin IA, Kirpotina LN, Jakiw L, Khlebnikov AI, Blaskovich CL, Jutila MA, et al. Immunomodulatory activity of oenothien B isolated from *Epilobium angustifolium*. *J Immunol*. 2009 Nov.;183(10):6754-66.
91. Zelickson MS, Bronder CM, Johnson BL, Camunas JA, Smith DE, Rawlinson D, et al. *Helicobacter pylori* is not the predominant etiology for peptic ulcers requiring operation. *Am Surg*. 2011 Aug;77(8):1054-60.
92. Higham J, Kang JY, Majeed A. Recent trends in admissions and mortality due to peptic ulcer in England: increasing frequency of haemorrhage among older subjects. *Gut*. 2002 Apr;50(4):460-4.
93. Malfertheiner P, Chan FK, McColl KE. Peptic ulcer disease. *Lancet*. 2009 Oct 24;374(9699):1449-61.
94. Abitbol RA. In: *Medstudents: Rotinas de Clínica Médica*. 2005.
95. Lau JY, Sung J, Hill C, Henderson C, Howden CW, Metz DC. Systematic review of the epidemiology of complicated peptic ulcer disease: incidence, recurrence, risk factors and mortality. *Digestion*. 2011 Apr.;84(2):102-13.
96. Sarosi GA, Jr., Jaiswal KR, Nwariaku FE, Asolati M, Fleming JB, Anthony T. Surgical therapy of peptic ulcers in the 21st century: more common than you think. *Am J Surg*. 2005 Nov;190(5):775-9.
97. Penston JG. A decade of experience with long-term continuous treatment of peptic ulcers with H<sub>2</sub>-receptor antagonists. *Aliment Pharmacol Ther*. 1993 Jan.;7 (2):27-33.
98. Sachs G. Proton pump inhibitors and acid-related diseases. *Pharmacotherapy*. 1997 Jan-Feb;17(1):22-37.
99. Yuan Y, Padol IT, Hunt RH. Peptic ulcer disease today. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2006 Feb;3(2):80-9.
100. Kang JY, Tinto A, Higham J, Majeed A. Peptic ulceration in general practice in England and Wales 1994-98: period prevalence and drug management. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002 Jun;16(6):1067-74.
101. Milani S, Calabro A. Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing. *Microsc Res Tech*. 2001 Jun.;53(5):360-71.
102. Dangelo JG, CA. F. *Anatomia humana sistêmica e segmentar*. . 3 ed. Atheneu E, editor. São Paulo 2007.
103. Vinagre A. Efeito anti-ulcerogênico do extrato de *Chlorella vulgaris*. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2005.
104. Yao X, Forte JG. Cell biology of acid secretion by the parietal cell. *Annu Rev Physiol*. 2003;65:103-31.
105. Jass JR, Walsh MD. Altered mucin expression in the gastrointestinal tract: a review. *J Cell Mol Med*. 2001 Jul-Sep;5(3):327-51.
106. Wolfe MM, Sachs G. Acid suppression: optimizing therapy for gastroduodenal ulcer healing, gastroesophageal reflux disease, and stress-related erosive syndrome. *Gastroenterology*. 2000 Feb;118(2 Suppl 1):S9-31.
107. Tack J, Talley NJ. Gastroduodenal disorders. *Am J Gastroenterol*. 2010 Apr;105(4):757-63.
108. Golbabapour S, Hajrezaie M, Hassandarvish P, Abdul Majid N, Hadi AH, Nordin N, et al. Acute toxicity and gastroprotective role of *M. pruriens* in ethanol-induced gastric mucosal injuries in rats. *Biomed Res Int*. 2013;2013:974185.
109. Barbuto R. Gastrinemia e densidade das células G e D no estômago de Gerbis infectados com *Helicobacter pylori* submetidos a vagotomia com piloroplastia. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2008.
110. Freitas L. Efeito protetor do sequiterpenóide B-ionona na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos: Envolvimento da via NO/GMPc/KATP e da glutatona. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 2013.

111. Jain KS, Shah AK, Bariwal J, Shelke SM, Kale AP, Jagtap JR, et al. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acidpeptic disorders. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2007 fev.;15(1):1181 - 205.
112. Costa M, Brookes SJ. The enteric nervous system. *Am J Gastroenterol*. 1994 Aug;89(8 Suppl):S129-37.
113. Guyton AC, JE. H. *Textbook of medical physiology*. . 11° ed. Saunders E, editor. Philadelphia2006.
114. Dockray GJ. Topical review. Gastrin and gastric epithelial physiology. *J Physiol*. 1999 Jul.;518 (2):315-24.
115. Aly A, Shulkes A, Baldwin GS. Gastrins, cholecystokinins and gastrointestinal cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Jul 6;1704(1):1-10.
116. Stepan VM, Krametter DF, Matsushima M, Todisco A, Delvalle J, Dickinson CJ. Glycine-extended gastrin regulates HEK cell growth. *Am J Physiol*. 1999 Aug;277(2 Pt 2):R572-81.
117. Brighetti AE, Antônio MA, JE. C. Regulação e modulação da secreção gástrica. *Revista Ciências Médicas*. 2002 jan./abr.;11(1).
118. Ganog W. *Fisiologia Médica*. 17 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998.
119. Beales IL. Gastrin and interleukin-1beta stimulate growth factor secretion from cultured rabbit gastric parietal cells. *Life Sci*. 2004 Nov.;75(25):2983-95.
120. Friis-Hansen L, Rieneck K, Nilsson HO, Wadstrom T, Rehfeld JF. Gastric inflammation, metaplasia, and tumor development in gastrin-deficient mice. *Gastroenterology*. 2006 Jul;131(1):246-58.
121. Smith EL, Hill RL, Lehman IR, Lefkowitz RJ, Handler P, A. W. *Bioquímica de Mamíferos*. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1988.
122. Shulkes A, Baldwin GS. Biology of gut cholecystokinin and gastrin receptors. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1997 Mar-Apr;24(3-4):209-16.
123. Schubert ML. Gastric secretion. *Curr Opin Gastroenterol*. 2005 Nov;21(6):636-43.
124. Moran TH, Schwartz GJ. Neurobiology of cholecystokinin. *Crit Rev Neurobiol*. 1994;9(1):1-28.
125. Woodruff GN, Hughes J. Cholecystokinin antagonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1991;31:469-501.
126. Santos C. Estudo Imuno-histoquímico das células endócrinas do tubo gastrintestinal de morcegos (Mammalia, Chiroptera). *Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*; 2007.
127. Wank SA. G protein-coupled receptors in gastrointestinal physiology. I. CCK receptors: an exemplary family. *Am J Physiol*. 1998 Apr;274(4 Pt 1):G607-13.
128. Schubert ML, Peura DA. Control of gastric acid secretion in health and disease. *Gastroenterology*. 2008;134:1842-60.
129. Walsh J. *Gastrointestinal hormones*. 3 ed. In: Johnson LR AD, Christensen J, Jacobson ED, Walsh JH. , editor. New York: Raven Press; 1994.
130. Hersey SJ, Sachs G. Gastric acid secretion. *Physiol Rev*. 1995 Jan;75(1):155-89.
131. Kitazawa T, Hashiba K, Cao J, Unno T, Komori S, Yamada M, et al. Functional roles of muscarinic M2 and M3 receptors in mouse stomach motility: studies with muscarinic receptor knockout mice. *Eur J Pharmacol*. 2007 Jan 12;554(2-3):212-22.
132. Aihara T, Nakamura Y, Taketo MM, Matsui M, Okabe S. Cholinergically stimulated gastric acid secretion is mediated by M(3) and M(5) but not M(1) muscarinic acetylcholine receptors in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005 Jun;288(6):G1199-207.
133. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, RJ. *Farmacologia*. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011.
134. Xie G, Drachenberg C, Yamada M, Wess J, Raufman JP. Cholinergic agonist-induced pepsinogen secretion from murine gastric chief cells is mediated by M1 and M3 muscarinic receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005 Sep;289(3):G521-9.
135. Guaraldo L. Atividade antiulcera gástrica do extrato aquoso e frações isoladas de Davilla rugosa Poiret: Avaliação dos mecanismos envolvidos. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2001.

136. Almeida ABA, Miotto AM, Nunes DS, Spadari-Bratfisch RC, ARMS. B. Mechanism of antiulcerogenic activity of semi-synthetic crotonin obtained from *Croton cajucara* Benth. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2002 Jan.;12(1):105-10.
137. Brunton LL, BA C, BC. K. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 12 ed. Porto Alegre: Artmed; 2012.
138. Takaishi S, Cui G, Frederick DM, Carlson JE, Houghton J, Varro A, et al. Synergistic inhibitory effects of gastrin and histamine receptor antagonists on *Helicobacter*-induced gastric cancer. *Gastroenterology*. 2005 Jun;128(7):1965-83.
139. Horie S, Hasebe K, Koshikawa H, Tsuchiya S, Yano S, Watanabe K. Stimulatory effect of dibutyryl cyclic GMP on acid secretion in mouse isolated stomach and on histamine release in gastric mucosal cells. *J Physiol Paris*. 2000 Jan-Feb;94(1):25-9.
140. Igel P, Dove S, Buschauer A. Histamine H4 receptor agonists. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010 Dec 15;20(24):7191-9.
141. Koeppen BM, BA. S. Berne & Levy - *Fisiologia*. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009.
142. Vuyyuru L, ML. S. Histamine, Acting Via H3 Receptors, Inhibits Somatostatin and Stimulates Acid Secretion in Isolated Mouse Stomach. *Gastroenterology*. 1997 Nov.;133(5):1545-52.
143. Zeng N, Sachs G. Properties of isolated gastric enterochromaffin-like cells. *Yale J Biol Med*. 1998 May-Aug;71(3-4):233-46.
144. Brown RE, Stevens DR, Haas HL. The physiology of brain histamine. *Prog Neurobiol*. 2001 Apr.;63(6):637-72.
145. Morini G, Grandi D, Arcari ML, Galanti G, Bertaccini G. Histological effect of (R)-alpha-methylhistamine on ethanol damage in rat gastric mucosa: influence on mucus production. *Dig Dis Sci*. 1997 May;42(5):1020-8.
146. Morini G, Grandi D, Bertaccini G. (R)-alpha-methylhistamine inhibits ethanol-induced gastric lesions in the rat: involvement of histamine H3 receptors? *Digestion*. 1995;56(2):145-52.
147. Schubert ML, Harrington L, GM. M. Reciprocal paracrine pathways link histamine and somatostatin secretion in the fundus of rat stomach (abstr). *Gastroenterology*. 1993 ag.;104(2):188.
148. Prast H, Tran MH, Fischer H, Kraus M, Lamberti C, Grass K, et al. Histaminergic neurons modulate acetylcholine release in the ventral striatum: role of H3 histamine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1999 Nov;360(5):558-64.
149. Kohler CA, da Silva WC, Benetti F, Bonini JS. Histaminergic mechanisms for modulation of memory systems. *Neural Plast*. 2011 Jun.;2011:1-16.
150. Brunton LL, Chabner BA, Knollman. B, editors. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman* 2012.
151. Murray CD, Martin NM, Patterson M, Taylor SA, Ghatei MA, Kamm MA, et al. Ghrelin enhances gastric emptying in diabetic gastroparesis: a double blind, placebo controlled, crossover study. *Gut*. 2005 Dec;54(12):1693-8.
152. Kojima M, Kangawa K. Structure and function of ghrelin. *Results Probl Cell Differ*. 2008;46:89-115.
153. Locatelli V, Bresciani E, Bulgarelli I, Rapetti D, Torsello A, Rindi G, et al. Ghrelin in gastroenteric pathophysiology. *J Endocrinol Invest*. 2005 Oct;28(9):843-8.
154. Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Kwiecien S, Drozdowicz D, Bielanski W, et al. Exogenous and endogenous ghrelin in gastroprotection against stress-induced gastric damage. *Regul Pept*. 2004 Aug.;120(1-3):39-51.
155. Brzozowski T, Konturek PC, Drozdowicz D, Konturek SJ, Pawlik M, Sliwowski Z, et al. Role of central and peripheral ghrelin in the mechanism of gastric mucosal defence. *Inflammopharmacology*. 2005 Mar.;13:45-62.
156. Schubert ML, Peura DA. Control of gastric acid secretion in health and disease. *Gastroenterology*. 2008 Jun;134(7):1842-60.
157. Levin F, Edholm T, Ehrstrom M, Wallin B, Schmidt PT, Kirchgessner AM, et al. Effect of peripherally administered ghrelin on gastric emptying and acid secretion in the rat. *Regul Pept*. 2005 Nov;131(1-3):59-65.

158. Sibilía V, Rindi G, Pagani F, Rapetti D, Locatelli V, Torsello A, et al. Ghrelin protects against ethanol-induced gastric ulcers in rats: studies on the mechanisms of action. *Endocrinology*. 2003 Jan;144(1):353-9.
159. Furness JB, Young HM, Pompolo S, Bornstein JC, Kunze WA, McConalogue K. Plurichemical transmission and chemical coding of neurons in the digestive tract. *Gastroenterology*. 1995 Feb;108(2):554-63.
160. Adegate E, Ponery AS, Sharma AK, El-Sharkawy T, Donath T. Diabetes mellitus is associated with a decrease in vasoactive intestinal polypeptide content of gastrointestinal tract of rat. *Arch Physiol Biochem*. 2001 Jul;109(3):246-51.
161. Shetzline MA, Walker JK, Valenzano KJ, Premont RT. Vasoactive intestinal polypeptide type-1 receptor regulation. Desensitization, phosphorylation, and sequestration. *J Biol Chem*. 2002 Jul 12;277(28):25519-26.
162. Umetsu Y, Tenno T, Goda N, Shirakawa M, Ikegami T, Hiroaki H. Structural difference of vasoactive intestinal peptide in two distinct membrane-mimicking environments. *Biochim Biophys Acta*. 2011 May;1814(5):724-30.
163. Laburthe M, Couvineau A, Marie JC. VPAC receptors for VIP and PACAP. *Receptors Channels*. 2002;8(3-4):137-53.
164. Harmar AJ, Fahrenkrug J, Gozes I, Laburthe M, May V, Pisegna JR, et al. Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR Review 1. *Brit J Pharmacol*. 2012 May;166(1):4-17.
165. Mahavadi S, Bhattacharya S, Kim J, Fayed S, Al-Shboul O, Grider JR, et al. Caveolae-dependent internalization and homologous desensitization of VIP/PACAP receptor, VPAC(2), in gastrointestinal smooth muscle. *Peptides*. 2013 May;43:137-45.
166. He XD, Goyal RK. Nitric oxide involvement in the peptide VIP-associated inhibitory junction potential in the guinea-pig ileum. *J Physiol*. 1993 Mar.;461(1):485-99.
167. Rodrigues SS, Fonseca CC, MTD. N. Endocrine cells of the gastroenteropancreatic system: Concepts, distribution, secretions, action and regulation. *Arq ciênc vet zool*. 2005 jul./dez.;8(2):171-80.
168. Allen A, Flemstrom G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005 Jan;288(1):C1-19.
169. Zakaria ZA, Balan T, Suppaiah V, Ahmad S, Jamaludin F. Mechanism(s) of action involved in the gastroprotective activity of *Muntingia calabura*. *J Ethnopharmacol*. 2014 Feb.;151(3):1184-93.
170. Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowski T, Konturek JW, Pawlik WW. From nerves and hormones to bacteria in the stomach; Nobel prize for achievements in gastrology during last century. *J Physiol Pharmacol*. 2005 Dec;56(4):507-30.
171. Peppas NA, Sahlin JJ. Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: a review. *Biomaterials*. 1996 Aug;17(16):1553-61.
172. Laine L, Takeuchi K, Tarnawski A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterology*. 2008 Jul;135(1):41-60.
173. Dong MH, Kaunitz JD. Gastroduodenal mucosal defense. *Curr Opin Gastroenterol*. 2006 Nov;22(6):599-606.
174. Hogan DL, Yao B, Steinbach JH, Isenberg JI. The enteric nervous system modulates mammalian duodenal mucosal bicarbonate secretion. *Gastroenterology*. 1993 Aug;105(2):410-7.
175. Allen A, Flemstrom G, Garner A, Kivilaakso E. Gastroduodenal mucosal protection. *Physiol Rev*. 1993 Oct;73(4):823-57.
176. Hogan DL, Ainsworth MA, Isenberg JI. Review article: gastroduodenal bicarbonate secretion. *Aliment Pharmacol Ther*. 1994 Oct;8(5):475-88.
177. Dey I, Lejeune M, Chadee K. Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. *Br J Pharmacol*. 2006 Nov;149(6):611-23.
178. Patrignani P, Tacconelli S, Sciulli MG, Capone ML. New insights into COX-2 biology and inhibition. *Brain Res Brain Res Rev*. 2005 Apr;48(2):352-9.

179. Atay S, Tarnawski AS, Dubois A. Eicosanoids and the stomach. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2000 May;61(3-4):105-24.
180. Fiancette R, Vincent-Fabert C, Guerin E, Trimoreau F, Denizot Y. Lipid mediators and human leukemic blasts. J Oncol. 2011;2011:1-7.
181. Wallace JL. Pathogenesis of NSAID-induced gastroduodenal mucosal injury. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2001 Oct;15(5):691-703.
182. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. Trends Immunol. 2002 Mar;23(3):144-50.
183. Takeuchi K, Kato S, Ogawa Y, Kanatsu K, Umeda M. Role of endogenous prostacyclin in gastric ulcerogenic and healing responses--a study using IP-receptor knockout mice. J Physiol Paris. 2001 Jan-Dec;95(1-6):75-80.
184. Wallace JL, Granger DN. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. FASEB J. 1996 May;10(7):731-40.
185. Burian M, Geisslinger G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. Pharmacol Ther. 2005 Aug;107(2):139-54.
186. Shinji Y, Tsukui T, Tatsuguchi A, Shinoki K, Kusunoki M, Suzuki K, et al. Induced microsomal PGE synthase-1 is involved in cyclooxygenase-2-dependent PGE2 production in gastric fibroblasts. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2005 Feb;288(2):G308-15.
187. Samuelsson B, Morgenstern R, Jakobsson PJ. Membrane prostaglandin E synthase-1: A novel therapeutic target. Pharmacol Rev. 2007 Sep;59(3):207-24.
188. Tanioka T, Nakatani Y, Semmyo N, Murakami M, Kudo I. Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. J Biol Chem. 2000 Oct 20;275(42):32775-82.
189. Kvaternick V, Pollmeier M, Fischer J, Hanson PD. Pharmacokinetics and metabolism of orally administered firocoxib, a novel second generation coxib, in horses. J Vet Pharmacol Ther. 2007 Jun;30(3):208-17.
190. Wallace JL, Miller MJ. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. Gastroenterology. 2000 Aug;119(2):512-20.
191. Natale G, Lazzeri G, Lubrano V, Colucci R, Vassalle C, Fornai M, et al. Mechanisms of gastroprotection by lansoprazole pretreatment against experimentally induced injury in rats: role of mucosal oxidative damage and sulfhydryl compounds. Toxicol Appl Pharmacol. 2004 Feb 15;195(1):62-72.
192. Cerqueira N, Yoshida W. Óxido nítrico. Revisão. Acta Cirúrgica Brasileira. 2002 nov-dez.;17(6):417-23.
193. Florentino IF, Galdino PM, De Oliveira LP, Silva DP, Pazini F, Vanderlinde FA, et al. Involvement of the NO/cGMP/KATP pathway in the antinociceptive effect of the new pyrazole 5-(1-(3-fluorophenyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2H-tetrazole (LQFM-021). Nitric Oxide. 2015 May 1;47:17-24.
194. Shah V, Lyford G, Gores G, Farrugia G. Nitric oxide in gastrointestinal health and disease. Gastroenterology. 2004 Mar;126(3):903-13.
195. Wallace JL. Nitric oxide, aspirin-triggered lipoxins and NO-aspirin in gastric protection. Inflamm Allergy Drug Targets. 2006 Apr;5(2):133-7.
196. MacNaughton WK. Nitric oxide-donating compounds stimulate electrolyte transport in the guinea pig intestine in vitro. Life Sci. 1993;53(7):585-93.
197. Tamai H, Gaginella TS. Direct evidence for nitric oxide stimulation of electrolyte secretion in the rat colon. Free Radic Res Commun. 1993;19(4):229-39.
198. Price KJ, Hanson PJ, Whittle BJ. Stimulation by carbachol of mucus gel thickness in rat stomach involves nitric oxide. Eur J Pharmacol. 1994 Sep.;263(1-2):199-202.
199. Alquati T, Piva J, Garcia P. Norepinephrine in shock treatment: Current recommendations and new perspectives. Scientia Medica. 2008 jul./set. ;18(3):141-5.
200. Blandizzi C. Enteric alpha-2 adrenoceptors: pathophysiological implications in functional and inflammatory bowel disorders. Neurochem Int. 2007 Oct;51(5):282-8.

201. Zadori ZS, Shujaa N, Fulop K, Dunkel P, Gyires K. Pre- and postsynaptic mechanisms in the clonidine- and oxymetazoline-induced inhibition of gastric motility in the rat. *Neurochem Int.* 2007 Oct;51(5):297-305.
202. Mullner K, Gyires K, Furst S. Involvement of the opioid system in the central antisecretory action of alpha-2 adrenoceptor agonists in rat. *J Physiol Paris.* 2001 Jan-Dec;95(1-6):209-14.
203. Gyires K, Mullner K, Furst S, Ronai AZ. Alpha-2 adrenergic and opioid receptor-mediated gastroprotection. *J Physiol Paris.* 2000 Mar-Apr;94(2):117-21.
204. Yelken B, Dorman T, Erkasap S, Dundar E, Tanriverdi B. Clonidine pretreatment inhibits stress-induced gastric ulcer in rats. *Anesth Analg.* 1999 Jul;89(1):159-62.
205. Fulop K, Zadori Z, Ronai AZ, Gyires K. Characterisation of alpha2-adrenoceptor subtypes involved in gastric emptying, gastric motility and gastric mucosal defence. *Eur J Pharmacol.* 2005 Dec 28;528(1-3):150-7.
206. Blandizzi C, Natale G, Colucci R, Carignani D, Lazzeri G, Del Tacca M. Characterization of alpha 2-adrenoceptor subtypes involved in the modulation of gastric acid secretion. *Eur J Pharmacol.* 1995 May 15;278(2):179-82.
207. Zaki M, Koduru S, McCuen R, Vuyyuru L, Schubert ML. Amylin, released from the gastric fundus, stimulates somatostatin and thus inhibits histamine and acid secretion in mice. *Gastroenterology.* 2002 Jul;123(1):247-55.
208. Sun FP, Song YG, Cheng W, Zhao T, Yao YL. Gastrin, somatostatin, G and D cells of gastric ulcer in rats. *World J Gastroenterol.* 2002 Apr;8(2):375-8.
209. Zavros Y, Rieder G, Ferguson A, Samuelson LC, Merchant JL. Genetic or chemical hypochlorhydria is associated with inflammation that modulates parietal and G-cell populations in mice. *Gastroenterology.* 2002 Jan;122(1):119-33.
210. Jahovic N, Erkanli G, Iseri S, Arbak S, Alican I. Gastric protection by alpha-melanocyte-stimulating hormone against ethanol in rats: involvement of somatostatin. *Life Sci.* 2007 Feb 20;80(11):1040-5.
211. Cervia D, Bagnoli P. An update on somatostatin receptor signaling in native systems and new insights on their pathophysiology. *Pharmacol Ther.* 2007 Nov;116(2):322-41.
212. Yang N, Liu SM, Zheng LF, Ji T, Li Y, Mi XL, et al. Activation of submucosal 5-HT(3) receptors elicits a somatostatin-dependent inhibition of ion secretion in rat colon. *Br J Pharmacol.* 2010 Apr;159(8):1623-5.
213. Li Y, Wu X, Yao H, Owyang C. Secretin activates vagal primary afferent neurons in the rat: evidence from electrophysiological and immunohistochemical studies. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005 Oct;289(4):G745-52.
214. Sekar R, Chow BK. Metabolic effects of secretin. *Gen Comp Endocrinol.* 2013 Jan 15;181:18-24.
215. Walton KL. Teaching the role of secretin in the regulation of gastric acid secretion using a classic paper by Johnson and Grossman. *Adv Physiol Educ.* 2009 Sep;33(3):165-8.
216. Tani S, Suzuki T, Kano S, Tanaka T, Sunaga K, Morishige R, et al. Mechanisms of gastric mucus secretion from cultured rat gastric epithelial cells induced by carbachol, cholecystokinin octapeptide, secretin, and prostaglandin E2. *Biol Pharm Bull.* 2002 Jan;25(1):14-8.
217. Lu Y, Owyang C. Secretin at physiological doses inhibits gastric motility via a vagal afferent pathway. *Am J Physiol.* 1995 Jun.;268(6 ):1012-6.
218. Li P, Chang TM, Chey WY. Neuronal regulation of the release and action of secretin-releasing peptide and secretin. *Am J Physiol.* 1995 Aug.;269(2 ):305-12.
219. Afroze S, Meng F, Jensen K, McDaniel K, Rahal K, Onori P, et al. The physiological roles of secretin and its receptor. *Ann Transl Med.* 2013 Oct;1(3):29.
220. Tepperman BL, Brown JF, Korolkiewicz R, Whittle BJ. Nitric oxide synthase activity, viability and cyclic GMP levels in rat colonic epithelial cells: effect of endotoxin challenge. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994 Dec;271(3):1477-82.
221. Guth PH. Current concepts in gastric microcirculatory pathophysiology. *Yale J Biol Med.* 1992 Nov-Dec;65(6):677-88.

222. Abdel-Kader M, Berger JM, Slebodnick C, Hoch J, Malone S, Wisse JH, et al. Isolation and absolute configuration of ent-Halimane diterpenoids from *Hymenaea courbaril* from the Suriname rain forest. *Journal of Natural Products*. 2002 Jan;65(1):11-5.
223. Sorbye H, Svanes K. The role of blood flow in gastric mucosal defence, damage and healing. *Dig Dis*. 1994 Sep-Oct;12(5):305-17.
224. Cnubben NH, Rietjens IM, Wortelboer H, van Zanden J, van Bladeren PJ. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2001 Sep;10(4):141-52.
225. Gate L, Paul J, Ba GN, Tew KD, Tapiero H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother*. 1999 May;53(4):169-80.
226. Devi RS, Narayan S, Vani G, Shyamala Devi CS. Gastroprotective effect of *Terminalia arjuna* bark on diclofenac sodium induced gastric ulcer. *Chem Biol Interact*. 2007 Apr 5;167(1):71-83.
227. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother*. 2003 May-Jun;57(3-4):145-55.
228. Hernandez-Munoz R, Montiel-Ruiz C, Vazquez-Martinez O. Gastric mucosal cell proliferation in ethanol-induced chronic mucosal injury is related to oxidative stress and lipid peroxidation in rats. *Lab Invest*. 2000 Aug;80(8):1161-9.
229. Bayir H. Reactive oxygen species. *Crit Care Med*. 2005 Dec.;33(12 ):498-501.
230. Szabo S, Pihan G. Mechanisms of gastric cytoprotection. *J Clin Gastroenterol*. 1987;9 Suppl 1:8-13.
231. Kwiecien S, Brzozowski T, Konturek SJ. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. *J Physiol Pharmacol*. 2002 Mar;53(1):39-50.
232. Mejia A, Kraft WK. Acid peptic diseases: pharmacological approach to treatment. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2009 May;2(3):295-314.
233. Sheen E, Triadafilopoulos G. Adverse effects of long-term proton pump inhibitor therapy. *Dig Dis Sci*. 2011 Apr;56(4):931-50.
234. Wang YK, Hsu WH, Wang SS, Lu CY, Kuo FC, Su YC, et al. Current pharmacological management of gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterol Res Pract*. 2013;2013:983653.
235. McCarthy DM. Sucralfate. *N Engl J Med*. 1991 Oct 3;325(14):1017-25.
236. Arab HH, Salama SA, Omar HA, Arafa el SA, Maghrabi IA. Diosmin Protects against Ethanol-Induced Gastric Injury in Rats: Novel Anti-Ulcer Actions. *PLoS One*. 2015;10(3):e0122417.
237. Whittle BJ. Mechanisms underlying intestinal injury induced by anti-inflammatory COX inhibitors. *Eur J Pharmacol*. 2004 Oct.;500(1-3):427-39.
238. Thorsen K, Soreide JA, Kvaloy JT, Glomsaker T, Soreide K. Epidemiology of perforated peptic ulcer: age- and gender-adjusted analysis of incidence and mortality. *World J Gastroenterol*. 2013 Jan.;19(3):347-54.
239. Sanchez-Mendoza ME, Reyes-Ramirez A, Cruz Antonio L, Martinez Jimenez L, Rodriguez-Silverio J, Arrieta J. Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer compound, tagitinin C, from *Tithonia diversifolia*: role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. *Molecules*. 2011 Jan.;16(1):665-74.
240. Burci LM, Pereira IT, da Silva LM, Rodrigues RV, Facundo VA, Militao JS, et al. Antiulcer and gastric antisecretory effects of dichloromethane fraction and pirlartine obtained from fruits of *Piper tuberculatum* Jacq. in rats. *J Ethnopharmacol*. 2013 Jun 21;148(1):165-74.
241. Santin JR, Lemos M, Klein Junior LC, Niero R, de Andrade SF. Antiulcer effects of *Achyrocline satureoides* (Lam.) DC (Asteraceae) (Marcela), a folk medicine plant, in different experimental models. *J Ethnopharmacol*. 2010 Jul 20;130(2):334-9.
242. Martins JLR, Souza FB, Fajemiroye JO, Ghedini PC, Ferreira PM, E.A. C. Anti-ulcerogenic and antisecretory effects of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent hexane leaf extract *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2014 Apr./Jun.;16(2):250-5.
243. Bagetti M, Facco EMP, Rodrigues DB, Vizzotto M, Emanuelli T. Antioxidant capacity and composition of pitanga seeds. *Cienc Rural*. 2009;39(8):2504-10.
244. Sung JJ, Kuipers EJ, El-Serag HB. Systematic review: the global incidence and prevalence of peptic ulcer disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009 May 1;29(9):938-46.

245. Calixto JB. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005 Aug 22;100(1-2):131-4.
246. Turolla MSR, ES. N. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Rev Bras Cienc Farm* 2006 apr./jun.;42(2):289-306.
247. Blumenthal M, Goldberg A, J. B. Herbal medicine - Expanded Comission e Monographs.: American Botanical Council; 2000.
248. Mauro RA, Aguiar LMS, Silva MP, Pott A. Fauna e Flora do Cerrado. 2004;2012.
249. Irwin S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia*. 1968 Sep 20;13(3):222-57.
250. Carlini EA. [Pharmacological screening of Brazilian plants]. *Rev Bras Biol*. 1972 Aug;32(2):265-74.
251. Mattei R, CIF. F. Testes gerais para confirmar a ação central. 1 ed. RN A, editor. Rio de Janeiro 2006.
252. Geis G. Update on clinical developments with celecoxib, a new specific COX-2 inhibitor: what can we expect? *J Rheumatol Suppl*. 1999 Apr.;56(1):31-6.
253. Geis GS, Stead H, Wallemark CB, Nicholson PA. Prevalence of mucosal lesions in the stomach and duodenum due to chronic use of NSAID in patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis, and interim report on prevention by misoprostol of diclofenac associated lesions. *J Rheumatol Suppl*. 1991 Mar.;28(1):11-4.
254. Peng S, Duggan A. Gastrointestinal adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Expert Opin Drug Saf*. 2005 Mar;4(2):157-69.
255. Sandoval M, Okuhama NN, Clark M, Angeles FM, Lao J, Bustamante S, et al. Sangre de grado *Croton palanostigma* induces apoptosis in human gastrointestinal cancer cells. *J Ethnopharmacol*. 2002 May;80(2-3):121-9.
256. Shafiq N, Malhotra S, Pandhi P, Nada R. Comparative gastrointestinal toxicity of selective cyclooxygenase (COX-2) inhibitors. *Indian J Exp Biol*. 2005 Jul;43(7):614-9.
257. Krumholz HM, Ross JS, Presler AH, Egilman DS. What have we learnt from Vioxx? *BMJ*. 2007 Jan 20;334(7585):120-3.
258. Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, Bolognese JA, Oxenius B, Horgan K, et al. Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med*. 2005 Mar 17;352(11):1092-102.
259. Barozzi N, Tett SE. What happened to the prescribing of other COX-2 inhibitors, paracetamol and non-steroidal anti-inflammatory drugs when rofecoxib was withdrawn in Australia? *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2007 Nov;16(11):1184-91.
260. Suzuki K, Araki H, Komoike Y, Takeuchi K. Permissive role of neutrophils in pathogenesis of indomethacin-induced gastric lesions in rats. *Med Sci Monit*. 2000 Sep-Oct;6(5):908-14.
261. Hawkey CJ, Karrasch JA, Szczepanski L, Walker DG, Barkun A, Swannell AJ, et al. Omeprazole compared with misoprostol for ulcers associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs. Omeprazole versus Misoprostol for NSAID-induced Ulcer Management (OMNIUM) Study Group. *N Engl J Med*. 1998 Mar 12;338(11):727-34.
262. Chen CY, Kuo TL, Sheu SY, Kuo TF. Preventive effects of Chinese herb *chai-hu-gui-zhi-tang* extract on water immersion restraint stress-induced acute gastric ulceration in rats. *J Vet Med Sci*. 2010 Jun;72(6):679-85.
263. Bonamin F, Moraes TM, Dos Santos RC, Kushima H, Faria FM, Silva MA, et al. The effect of a minor constituent of essential oil from *Citrus aurantium*: the role of beta-myrcene in preventing peptic ulcer disease. *Chem Biol Interact*. 2014 Apr 5;212:11-9.
264. Coelho-de-Souza AN, Lahlou S, Barreto JE, Yum ME, Oliveira AC, Oliveira HD, et al. Essential oil of *Croton zehntneri* and its major constituent anethole display gastroprotective effect by increasing the surface mucous layer. *Fundam Clin Pharmacol*. 2013 Jun;27(3):288-98.
265. de Barros MP, Sousa JP, Bastos JK, de Andrade SF. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. *J Ethnopharmacol*. 2007 Apr 4;110(3):567-71.

266. Mota CS, Freitas RB, Athayde ML, Boligon AA, Augusti PR, Somacal S, et al. Effect of *Vernonia cognata* on oxidative damage induced by ethanol in rats. *Human & experimental toxicology*. 2011;30:675-84.
267. Konturek PC, Brzozowski T, Sliwowski Z, Pajdo R, Stachura J, Hahn EG, et al. Involvement of nitric oxide and prostaglandins in gastroprotection induced by bacterial lipopolysaccharide. *Scand J Gastroenterol*. 1998 Jul;33(7):691-700.
268. Wolff Cordeiro K, Aparecida Pinto L, Nazari Formagio AS, Faloni de Andrade S, Leite Kassuya CA, de Cassia Freitas K. Antiulcerogenic effect of *Croton urucurana* Baillon bark. *J Ethnopharmacol*. 2012 Aug.;143(1):331-7.
269. Martins JL, Rodrigues OR, da Silva DM, Galdino PM, de Paula JR, Romao W, et al. Mechanisms involved in the gastroprotective activity of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent on gastric lesions in mice. *J Ethnopharmacol*. 2014 Sep.;155(3):1616-24.
270. Kaunitz JD. Barrier function of gastric mucus. *Keio J Med*. 1999 Jun;48(2):63-8.
271. Hiruma-Lima CA, Santos LC, Kushima H, Pellizzon CH, Silveira GG, Vasconcelos PCP, et al. *Qualea grandiflora*, a Brazilian "Cerrado" medicinal plant presents an important antiulcer activity. *J Ethnopharmacol*. 2006 Mar.;104(1-2):207-14.
272. Salim AS. Sulfhydryls protect patients against complications of erosive gastritis. *Dig Dis Sci*. 1990 Nov;35(11):1436-7.
273. Bilici D, Suleyman H, Banoglu ZN, Kiziltunc A, Avci B, Ciftcioglu A, et al. Melatonin prevents ethanol-induced gastric mucosal damage possibly due to its antioxidant effect. *Dig Dis Sci*. 2002 Apr;47(4):856-61.
274. Kanter M, Coskun O, Gurel A. Effect of black cumin (*Nigella sativa*) on cadmium-induced oxidative stress in the blood of rats. *Biol Trace Elem Res*. 2005 Dec;107(3):277-87.
275. Puurunen J, Huttunen P, Hirvonen J. Is ethanol-induced damage of the gastric mucosa a hyperosmotic effect? Comparative studies on the effects of ethanol, some other hyperosmotic solutions and acetylsalicylic acid on rat gastric mucosa. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 1980 Nov;47(5):321-7.
276. Pihan G, Regillo C, Szabo S. Free radicals and lipid peroxidation in ethanol- or aspirin-induced gastric mucosal injury. *Dig Dis Sci*. 1987 Dec;32(12):1395-401.
277. El-Missiry MA, El-Sayed IH, Othman AI. Protection by metal complexes with SOD-mimetic activity against oxidative gastric injury induced by indomethacin and ethanol in rats. *Ann Clin Biochem*. 2001 Nov;38(Pt 6):694-700.
278. Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Aug 1;90(15):7240-4.
279. Falcao Hde S, Maia GL, Bonamin F, Kushima H, Moraes TM, Hiruma Lima CA, et al. Gastroprotective mechanisms of the chloroform and ethyl acetate phases of *Praxelis clematidea* (Griseb.) R.M.King & H.Robinson (Asteraceae). *J Nat Med*. 2013 Jul;67(3):480-91.
280. Takeuchi K, Ogawa Y, Kagawa S, Ukawa H. Gastric ulcerogenic responses following barrier disruption in knockout mice lacking prostaglandin EP1 receptors. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002 Apr;16 Suppl 2:74-82.
281. Takeuchi K, Koyama M, Hayashi S, Aihara E. Prostaglandin EP receptor subtypes involved in regulating HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion from gastroduodenal mucosa. *Curr Pharm Des*. 2010;16(10):1241-51.
282. Takahashi S, Takeuchi K, Okabe S. EP4 receptor mediation of prostaglandin E2-stimulated mucus secretion by rabbit gastric epithelial cells. *Biochem Pharmacol*. 1999 Dec 15;58(12):1997-2002.
283. Kato S, Aihara E, Yoshii K, Takeuchi K. Dual action of prostaglandin E2 on gastric acid secretion through different EP-receptor subtypes in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005 Jul;289(1):G64-9.
284. Jesus NZ, Falcao HS, Lima GR, Caldas Filho MR, Sales IR, Gomes IF, et al. *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae), a medicinal plant protects the stomach against several gastric ulcer models. *J Ethnopharmacol*. 2013 Dec 12;150(3):982-8.

285. Toma W, Gracioso Jde S, de Andrade FD, Hiruma-Lima CA, Vilegas W, Souza Brito AR. Antiulcerogenic activity of four extracts obtained from the bark wood of *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). *Biol Pharm Bull.* 2002 Sep;25(9):1151-5.
286. Lapa AJ, Souccar C, Lima-Landman MTR, Castro MSA, TCM. L. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. Metrópole, editor. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais; 2003.