



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

ANA ROSELI SILVA RIBEIRO

**EFEITO GASTROPROTETOR DA BAICALEÍNA NA
MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS**

SÃO CRISTÓVÃO

2017

ANA ROSELI SILVA RIBEIRO

**EFEITO GASTROPROTETOR DA BAICALEÍNA NA
MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de
Sergipe como requisito à obtenção do grau de doutora
em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Profa. Dra. Sara Maria Thomazzi

SÃO CRISTÓVÃO

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

R484e Ribeiro, Ana Roseli Silva
 Efeito gastroprotetor da baicaleína na mucosa gástrica de
camundongos / Ana Roseli Silva Ribeiro ; orientadora Sara Maria
Thomazzi. – São Cristovão, 2017.
 84 f. : il.

 Tese (doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade
Federal de Sergipe, 2017.

 1. Úlcera gástrica. 2. Flavonoídes. 3. Baicaleína – Uso
terapêutico. I. Thomazzi, Sara Maria, orient. II. Título.

CDU 612.326:615.243

ANA ROSELI SILVA RIBEIRO

**EFEITO GASTROPROTETOR DA BAICALEÍNA NA
MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de
Sergipe como requisito à obtenção do grau de doutora
em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof. Dra. Sara Maria Thomazzi

1º Examinador: Prof. Dr. Josemar Sena Batista

2º Examinador: Prof. Dra. Renata Grespan

3º Examinador: Prof. Dr. Márcio Roberto Viana dos Santos

4º Examinador: Prof. Dr. Danilo Lustrino Borges

DEDICATÓRIA

À minha amada mãe Rosilda que sempre
me incentivou e investiu em minha
educação.

Ao meu filho Davi que faz os meus dias
serem melhores.

AGRADECIMENTOS

Deus, “hoje as lágrimas que rolam do meu rosto são para dizer o quanto és maravilhoso”!

Prof. Sara Maria Thomazzi, pela orientação magistral, pelas cobranças que muito me ensinaram e pelos ensinamentos que me fizeram amadurecer profissionalmente.

Colegas do LAFID pelos experimentos realizados até tarde, pelo apoio e pelas gargalhadas.

Prof. Ricardo Albuquerque, pela colaboração no trabalho e por fazer do LMBE minha outra casa.

A todos do Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural (LMBE) pelos momentos de descontração e trabalho, a presença de vocês fazia o tempo voar.

Prof. Sérgio e a Luisa pela colaboração mais que necessária que fez esse trabalho ficar muito melhor.

Meus primeiros orientadores, Adriana Karla, Juliana Cordeiro, Francine Padilha, Francisco Prado Reis e Ricardo Albuquerque por permitirem minha entrada no universo da pesquisa científica que tanto amo. Desde daquela época eu esperava por esse título.

A minha mãe Rosilda sempre abdicando de si para dá o melhor aos filhos. Eu não tenho palavras para lhe agradecer por TUDO que fez por mim.

Meu filho Davi, minha benção, esse título é meu e seu! Você esteve comigo durante esses 5 anos e meio e me mostrou que era possível.

Ao meu marido Thiago pela sua compreensão, companheirismo e amor.

A todos meus familiares por acreditarem no meu potencial e de alguma forma terem me ajudado nesta jornada.

A minha amiga Poliana pela ajuda nos experimentos, pela amizade construída e ensinamentos. Gosto muito de ti! Foi uma grande benção nos encontrarmos naquele corredor...

Ao coordenador do PROCFIS, Prof. Enilton e ao secretário Renivan pelo esforço em fazer deste programa de pós-graduação excelente, por sempre estarem dispostos a ajudar.

Professores da banca de qualificação e defesa pelas críticas e sugestões que fizeram este trabalho ser melhor.

Ao animais de experimentação que “doaram” suas vidas em prol da tentativa de se obter novos medicamentos.

A CAPES e CNPQ pelo apoio financeiro.

"Não te mandei eu? Seja forte e corajoso; não temas, nem te espantes, porque o SENHOR, teu Deus, é contigo por onde quer que andares." Josué 1:9

RESUMO

Efeito gastroprotetor da baicaleína na mucosa gástrica de camundongos. Ana Roseli Silva Ribeiro, São Cristovão, 2017.

A úlcera gástrica é uma doença caracterizada por sangramentos, estenoses e perfurações da mucosa gástrica podendo levar o paciente à morte. Muitos flavonoides demonstraram ser promissores para o tratamento dessas lesões gástricas. A baicaleína, um flavonoide presente na raiz da *Scutellaria baicalensis* Georgi (Lamiaceae), planta medicinal bastante utilizada pela medicina chinesa para tratamento das úlceras pépticas, possui propriedades farmacológicas como anti-inflamatória, antinociceptiva, anticancerígena, antioxidante e antimicrobiana, entretanto o efeito da baicaleína sobre a mucosa gástrica ainda não foi relatado. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades protetora e antissecretória da baicaleína sobre a mucosa gástrica de camundongos. O modelo de úlcera induzida por etanol acidificado (etanol a 60%/HCl a 0,3 M) foi utilizado para avaliar o efeito protetor da baicaleína (10, 30 e 100 mg/kg) sobre a mucosa gástrica. A participação dos receptores α_2 -adrenérgicos, compostos sulfidrílicos não proteicos (NP-SH), óxido nítrico (NO), prostaglandina (PG), canais K^+ ATP no efeito gastroprotetor da baicaleína (30 mg/kg) e os níveis de glutathiona (GSH) e a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no tecido gástrico também foram avaliados através do modelo de úlcera induzida por etanol acidificado. O efeito antissecretório da baicaleína sobre o ácido gástrico da baicaleína (10, 30 e 100 mg/kg) foi avaliado no modelo de ligadura do piloro, em que os parâmetros da secreção gástrica (volume, $[H^+]$ e pH) na presença ou ausência do agente secretagogo histamina, bem como muco no conteúdo gástrico foram avaliados. A atividade *in vitro* da H^+ , K^+ -ATPase (bomba de prótons) também foi determinada. A baicaleína (10-100 mg/kg) apresentou efeito gastroprotetor dose-dependente ($p < 0,001$) contra as lesões gástricas induzidas pelo etanol acidificado. O pré-tratamento pela via intraperitoneal com um antagonista dos receptores α_2 -adrenérgicos (ioimbina, 2 mg/kg), um bloqueador dos grupamentos sulfidrílicos não proteicos (N-etilmaleimida, NEM, 10 mg/kg), um inibidor não seletivo da sintase do NO (Nw-nitro- L-arginina, L-NAME, 10 mg/kg), um inibidor não seletivo da ciclo-oxigenase (indometacina, 10 mg/kg) ou um bloqueador de canais para potássio sensíveis a ATP (glibenclamida, 10 mg/kg) inibiram a resposta gastroprotetora causada pela baicaleína (30 mg/kg) ($p < 0,001$). Este flavonoide aumentou a concentração de GSH e diminuiu a atividade da MPO no tecido estomacal exposto ao efeito deletério do etanol acidificado. O tratamento com baicaleína (30 e 100 mg/kg) aumentou significativamente ($p < 0,05$) a secreção do muco gástrico, assim como reduziu (30 e 100 mg/kg, $p < 0,05$) o volume de secreção e secreção ácida total, e também aumentou (10, 30 e 100 mg/kg, $p < 0,001$) o valor do pH. A baicaleína (30 mg/kg) também foi eficaz na inibição dos efeitos da histamina na secreção gástrica (volume, $[H^+]$ e pH, $p < 0,001$). A baicaleína 10 e 30 μ g/mL demonstrou atividade inibitória da H^+ , K^+ -ATPase. Os resultados apresentados fornecem evidências de que a baicaleína pode ser utilizada como um agente citoprotetor e antissecretório no tratamento das úlceras gástricas.

Palavras-chave: úlceras gástricas, gastroproteção, flavonoides e baicaleína.

ABSTRACT

Gastroprotective effects of baicalein in gastric mucosa of mice. Ana Roseli Silva Ribeiro, São Cristovão, 2017.

Gastric ulcer is a disease characterized by bleeding, stenosis and perforations of the gastric mucosa that can lead the patient to death. Many flavonoids have been shown to be promising for the treatment of these gastric lesions. Baicalein, a flavonoid present in *Scutellaria baicalensis* Georgi root (Lamiaceae), a medicinal plant widely used by Chinese medicine to treat peptic ulcers, has pharmacological properties, such as anti-inflammatory, antinociceptive, anticancer, antioxidant and antimicrobial. However, the effect of baicalein on gastric mucosa has not yet been reported. The objective of this study was to evaluate the protective and antisecretory properties of baicalein on the gastric mucosa of mice. The ethanol/HCl-induced ulcer model (60% ethanol/0.3 M HCl) was used to evaluate the protective effect of baicalein (10, 30 and 100 mg/kg) on the gastric mucosa. The participation of α_2 -adrenoreceptors, non-protein sulfhydryl compounds (NP-SH), nitric oxide (NO), prostaglandin (PG), ATP-sensitive K^+ channels in the gastroprotective effect of baicalein (30 mg/kg), levels of glutathione (GSH) and myeloperoxidase (MPO) activity in gastric tissue were also evaluated through the acidified ethanol induced ulcer model. The antisecretory effect of gastric acid of baicalein (10-100 mg/kg) was evaluated through the pylorus ligation model, in which the parameters of gastric secretion (volume, $[H^+]$ and pH) were evaluated in the presence or absence of the secretagogue agent histamine and mucus in the gastric contents. The in vitro activity of H^+ , K^+ -ATPase (proton pump) was also determined. Baicalein (10-100 mg/kg) presented a dose-dependent gastroprotective effect ($p < 0.001$) against gastric lesions induced by acidified ethanol. Pretreatment by the intraperitoneal route with an α_2 -adrenoreceptor antagonist (yohimbine, 2 mg/kg), a non-protein sulfide compounds blocker (N-ethylmaleimide, NEM, 10 mg/kg), a non-selective inhibitor of the NO synthase (Nw-nitro-L-arginine, L-NAME, 10 mg/kg), a non-selective cyclooxygenase inhibitor (indomethacin, 10 mg/kg) or an ATP-dependent potassium channel blocker (glibenclamide, 10 mg/kg) inhibited the gastroprotective response caused by baicalein (30 mg/kg) ($p < 0.001$). Baicalein (30 mg/kg, $p < 0.05$) was able to increase GSH levels and decrease MPO activity in stomach tissue exposed to the deleterious effect of acidified ethanol. Treatment with baicalein (30 and 100 mg/kg) significantly increased ($p < 0.05$) gastric mucus secretion. In addition, treatment with baicalein reduced the volume of secretion and total acid secretion (30 and 100 mg/kg, $p < 0.05$) and also increased (10, 30 and 100 mg/kg, $p < 0.001$) the value of pH. Baicalein (30 mg/kg) was also effective to inhibit the effects of histamine on gastric secretion (volume, $[H^+]$ and pH, $p < 0.001$). Baicalein 10 and 30 $\mu\text{g/mL}$ demonstrated anti- H^+ , K^+ -ATPase activity. The present results provide convincing evidence that baicalein can be used as a cytoprotective agent (preventive effect) and anti-ulcer (antisecretory effect) in gastric ulcers treatment.

Key words: gastric ulcer, gastroprotection, flavonoids and baicalein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação anatômica e histológica do estômago.....	03
Figura 2: Representação fisiológica da secreção gástrica.....	05
Figura 3: Fases da secreção gástrica.....	07
Figura 4: Representação da troca de íons na célula parietal.....	08
Figura 5: Estrutura química da baicaleína.....	14
Figura 6: Efeito gastroprotetor da baicaleína em úlceras induzidas por etanol acidificado.....	26
Figura 7: Efeito protetor da baicaleína no tecido estomacal. (A) Lesões estomacais provocadas pela administração de etanol acidificado. (B) e (C) Seções histológicas coradas por Hematoxilina-Eosina (HE). (B) Desorganização das células epiteliais da camada mucosa. (C) Edema da camada submucosa.....	28
Figura 8: Efeito da baicaleína na atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no tecido gástrico exposto ao etanol acidificado.....	34
Figura 9: Efeito da baicaleína na concentração de glutathione reduzida (GSH) no tecido gástrico exposto ao etanol acidificado.....	35
Figura 10: Efeito da baicaleína na produção de muco gástrico.....	36
Figura 11: Efeito <i>in vitro</i> da baicaleína na atividade da bomba de prótons (H^+ , K^+ -ATPase).....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Alterações histológicas provocadas pelo etanol acidificado no tecido estomacal.....	27
Tabela 2: Envolvimento dos receptores α_2 -adrenérgicos no efeito gastroprotetor da baicaleína.....	30
Tabela 3: Envolvimento dos grupamentos sulfidrílicos e do óxido nítrico na gastroproteção da baicaleína.....	31
Tabela 4: Envolvimento das prostaglandinas no efeito gastroprotetor da baicaleína.....	32
Tabela 5: Envolvimento dos canais para potássio sensíveis ao ATP no efeito gastroprotetor da baicaleína.....	33
Tabela 6: Efeito da baicaleína sobre a secreção ácida gástrica basal.....	37
Tabela 7: Efeito da baicaleína sobre a secreção gástrica estimulada pela histamina.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

AINES	-----	Anti-inflamatório não esteroideal
AMP _c	-----	Adenosina Monofosfato Cíclico
ANOVA	-----	Análise de variância
ATP	-----	Adenosina trifosfato
CAT	-----	Catalase
CCK -2	-----	Receptor 2 de colecistocinina
CEPA	-----	Comitê de ética em pesquisa animal
CLAE	-----	Cromatografia Liquida de Alta Eficiência
COX	-----	Ciclooxigenase
D.O	-----	Densidade óptica
DAG	-----	Diacilglicerol
DDF	-----	3,6-dimetoxi-6'', 6''-dimetil-[2'',3'':7,8]-cromenoflavona
DMSO	-----	Dimetil sulfóxido
DTNB	-----	5,5 – ditiobis 2-ácido nitrobenzóico
E.P.M	-----	Erro padrão da média
ECL	-----	Células enterocromafins
EP	-----	Receptor para prostaglandina
EROS	-----	Espécies reativas de oxigênio
GMPc	-----	Monofosfato cíclico de guanosina

GPX	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduced
GST	Glutathione transferase
HE	Hematoxylin/Eosin
HS	Sulfide of hydrogen
HTAB	Bromo hexadecylmethylammonium
IP3	Inositol triphosphate
L-NAME	N-nitro-L-arginine methyl ester
MPO	Myeloperoxidase
NEM	N-ethylmaleimide
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase
NP-SH	Non-proteinic sulfhydryl groups
PC12	Lineage of pheochromocytoma cells of the adrenal medulla
PG	Prostaglandin
PGE	Prostaglandin E
PGI	Prostacyclin
Pi	Inorganic phosphorus
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
SNC	Central Nervous System

SOD ----- Superóxido dismutase

TMB ----- Tetrametilbenzidina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	03
2.1 Anatomia e fisiologia gástrica.....	03
2.2 Regulação da secreção gástrica.....	05
2.3 Fatores protetores da mucosa gástrica.....	09
2.4 Etiologia e farmacoterapia da úlcera gástrica.....	11
2.5 Baicaleína.....	13
3 OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo geral.....	15
3.2 Objetivos específicos	15
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 Obtenção e utilização da baicaleína.....	16
4.2 Animais de experimentação.....	16
4.3 Avaliação da atividade gastroprotetora da baicaleína em úlceras gástricas induzidas por etanol acidificado	16
4.3.1 Análise histológica do tecido gástrico dos animais submetidos a administração de etanol acidificado.....	17
4.4 Investigação de mecanismos de gastroproteção da baicaleína em úlceras gástricas induzidas por etanol acidificado	18
4.4.1 Avaliação do papel dos $\alpha 2$ -adrenoreceptores no efeito gastroprotetor da baicaleína.....	18
4.4.2 Avaliação do papel dos grupamentos sulfidrílicos não proteicos e do óxido nítrico no efeito gastroprotetor da baicaleína.....	19
4.4.3 Avaliação do papel das prostaglandinas no efeito gastroprotetor da baicaleína.....	19
4.4.4 Avaliação do papel dos canais para potássio ATP-dependentes no efeito gastroprotetor da baicaleína.....	20
4.4.5 Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) e da concentração de glutathiona reduzida (GSH) no tecido gástrico.....	20
4.4.5.1 Preparação do homogenato estomacal.....	20
4.4.5.2 Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no tecido gástrico.....	21

4.4.5.3 Determinação da concentração de glutathione reduzida (GSH) no tecido gástrico.....	21
4.5 Avaliação do efeito da baicaleína na produção de muco gástrico.....	22
4.6 Avaliação do efeito da baicaleína sobre a secreção gástrica.....	22
4.6.1 Investigação de mecanismos antissecretórios de ácido gástrico da baicaleína.....	23
4.6.1.1 Efeito da baicaleína sobre a secreção gástrica estimulada por histamina.....	23
4.6.1.2 Efeito da baicaleína sobre a atividade enzimática da H^+ , K^+ -ATPase.....	23
4.7 Análise estatística	24
5 RESULTADOS	25
5.1 Efeito gastroprotetor da baicaleína em úlceras gástricas induzidas por etanol acidificado	25
5.1.1 Análise histológica do tecido gástrico dos animais submetidos a administração de etanol acidificado.....	26
5.1.2 Mecanismos de gastroproteção da baicaleína em úlceras gástricas induzidas por etanol acidificado.....	29
5.1.2.1 Envolvimento dos $\alpha 2$ -adrenoreceptores no efeito gastroprotetor da baicaleína.....	29
5.1.2.2 Envolvimento dos grupamentos sulfidrilicos não proteicos e do óxido nítrico no efeito gastroprotetor da baicaleína.....	30
5.1.2.3 Envolvimento das prostaglandinas no efeito gastroprotetor da baicaleína.....	31
5.1.2.4 Envolvimento dos canais para potássio ATP-dependentes no efeito gastroprotetor da baicaleína.....	32
5.1.2.5 Efeito da baicaleína na atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no tecido gástrico.....	33
5.1.2.6 Efeito da baicaleína na concentração de glutathione reduzida (GSH) no tecido gástrico.....	34
5.2 Efeito da baicaleína na produção de muco gástrico.....	35
5.3 Efeito da baicaleína sobre a secreção gástrica.....	36
5.3.1 Mecanismos antissecretórios de ácido gástrico da baicaleína.....	37
5.3.1.1 Efeito da baicaleína sobre a secreção gástrica estimulada por histamina.....	37
5.3.1.2 Efeito da baicaleína sobre a atividade enzimática da H^+ , K^+ -ATPase.....	38
6 DISCUSSÃO.....	40
7 CONCLUSÃO.....	46
8 PERSPECTIVAS.....	47

9 REFERÊNCIAS	48
10 ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL (CEPA).....	65
10 ANEXO 2 – ARTIGO PUBLICADO.....	66

1 INTRODUÇÃO

A úlcera gástrica é uma doença caracterizada por sangramentos, estenoses e perfurações da mucosa gástrica podendo levar o paciente à morte (KANGWAN et al., 2014). O desequilíbrio entre os fatores agressores [grande quantidade de ácido e pepsina e a presença da bactéria *Helicobacter pylori* no estômago; consumo de álcool, fumo e uso prolongado dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs)] e os fatores protetores da mucosa gástrica [muco, bicarbonato, prostaglandinas, óxido nítrico, sulfeto de hidrogênio, glutatona e enzimas antioxidantes] é responsável por causar lesões gástricas (KANGWAN et al., 2014; YANDRAPU e SAROSIEK, 2015). Os AINEs e o álcool são as principais substâncias exógenas causadoras de dano ao tecido estomacal tanto em humanos como em animais (STERMER, 2002; YANDRAPU e SAROSIEK, 2015).

Os fármacos inibidores da secreção de ácido gástrico, cimetidina (antagonista dos receptores H₂ de histamina) e omeprazol (inibidor da bomba de prótons) são bastante utilizados para o tratamento das úlceras gástricas. Estas drogas além de ocasionarem sérios efeitos colaterais (acloridria, ginecomastia e risco de câncer gástrico) com o uso prolongado, não promovem a cicatrização da úlcera definitivamente (BRUNTON, CHABNER e KNOLLMANN, 2012; SCHUBERT, 2016).

Os produtos naturais têm sido considerados como uma base útil de novas moléculas potencialmente bioativas e uma estratégia na busca de novas terapias para o tratamento e prevenção de muitas doenças. Os flavonoides são uma diversificada classe de metabólitos secundários encontrados em plantas medicinais que possuem vários efeitos biológicos (HAVSTEEN, 2002), como anti-inflamatório (VEZZA et al., 2016), antioxidante (CHOBOT et al., 2016), anticancerígeno (ORFALI et al., 2016), citoprotetor gástrico e antissecretório (DE BARROS et al., 2016). Estes compostos protegem a mucosa gástrica de lesões provocadas por diferentes agentes ulcerogênicos através do aumento dos mecanismos de defesa e/ou inibindo a secreção de ácido gástrico em vários modelos experimentais de úlcera gástrica (MOTA et al., 2009).

A baicaleína (5,6,7-trihidroxiflavona) possui diversas ações biológicas, como anti-inflamatória (HE et al., 2015; PATWARDHAN et al., 2016; YANG et al., 2009), antioxidante

(CZAPSKI, CZUBOWICZ e STROSZNAJDER, 2012; LEE et al., 2011), antinociceptiva (HU et al., 2015), antifúngica (SERPA et al., 2012), antiviral (SITHISARN et al., 2013), antimicrobiana (GOC, NIEDZWIECKI e RATH, 2015), anticancerígena (CHEN et al., 2013; WU et al., 2011) e anti-*H. pylori* (MATSUMOTO, TAKAHASHI e YAMADA, 2008). Este flavonoide é encontrado principalmente nas raízes da *Scutellaria baicalensis*, planta medicinal bastante utilizada na medicina popular chinesa para tratamento de diversas afecções (Li-WEBER, 2009). A raiz da *S. baicalensis* possui efeito gastroprotetor (TAKASE et al., 1989) e é um dos componentes da formulação fitoterápica, Ban-Xia-Xie-Xin-Tang, frequentemente prescrita pela medicina tradicional chinesa para pacientes com úlcera péptica (HUANG et al., 2015).

Embasado na problemática dos gastos com saúde pública devido a ocorrência de úlceras gástricas e a necessidade da descoberta de novas substâncias para tratamento desta doença, assim como, o efeito anti-*H. pylori* da baicaleína e os dados etnofarmacológicos da *S. baicalensis* sobre o trato gastrointestinal, o presente trabalho propôs avaliar o efeito gastroprotetor da baicaleína sobre a mucosa gástrica de camundongos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA GÁSTRICA

O estômago é um órgão em forma de saco localizado abaixo, do diafragma, entre o esôfago e o duodeno, podendo conter até dois litros de alimento e líquido. O estômago é dividido em três partes: fundo (parte superior), corpo (parte central) e antro (parte inferior), sendo limitado pelo esfíncter esofágiano (parte superior) e pelo esfíncter pilórico (parte inferior) (**figura 1**) (HOGBEN et al., 1974; SILVERTHORN, 2010).

O tecido gástrico estomacal possui quatro camadas (**figura 1**): mucosa, camada voltada para o lúmen responsável pelo revestimento interno do estômago; submucosa, camada de tecido conectivo com vasos sanguíneos e vasos linfáticos; muscular externa, camada revestida de musculatura lisa; e serosa, camada coberta de tecido conectivo que é uma continuação da membrana peritoneal. A camada mais interna do estômago, a camada mucosa é recoberta por células epiteliais que secretam muco e protegem o epitélio; lâmina própria revestida de tecido conectivo subepitelial que mantém o epitélio no lugar e muscular da mucosa revestida por uma fina camada de músculo liso. Na camada submucosa encontra-se o plexo de Meissner ou plexo submucoso formado por uma rede de neurônios que controlam a secreção gastrointestinal e o fluxo sanguíneo local (HOGBEN et al., 1974; SILVERTHORN, 2010).

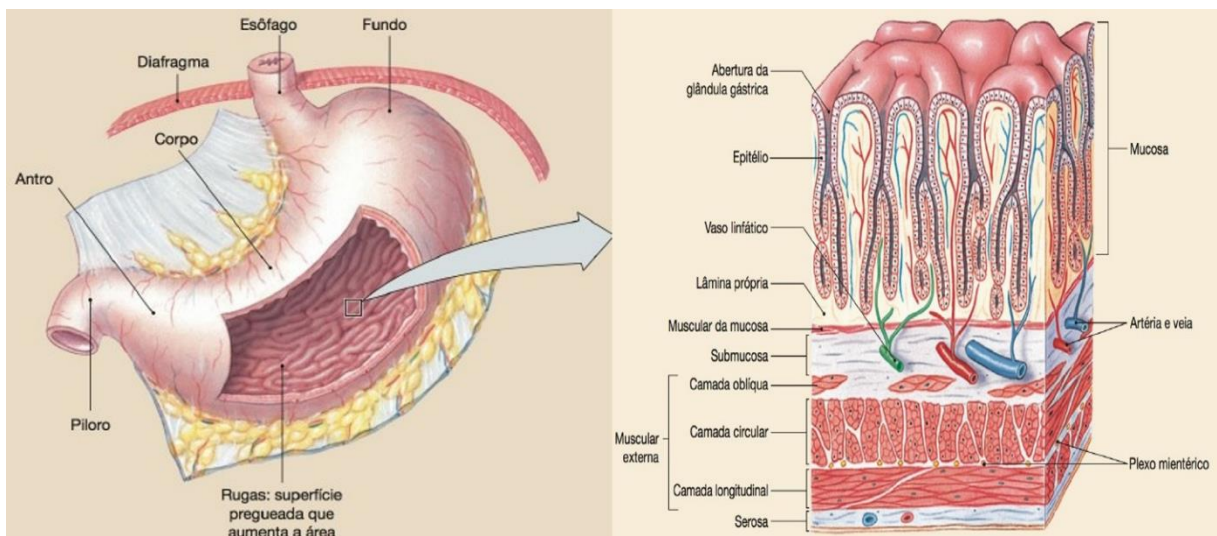


Figura 1. Representação anatômica e histológica do estômago.

(Fonte: Silverthorn, 2010)

A mucosa gástrica pode ser dividida em três regiões glandulares: porção glandular cardíaca localizada abaixo do esfíncter esofágico inferior que contém primariamente células secretoras de muco gástrico; porção glandular oxíntica localizada entre o corpo e fundo, abrangendo aproximadamente 80% do estômago, possui as células parietais secretoras de ácido clorídrico, células principais produtoras de pepsinogênio, células D produtoras de somatostatina e células do tipo enterocromafins (ECL) que liberam histamina; porção glandular pilórica localizada na região antral do estômago, apresenta células parietais, células D, células enterocromafins e células G produtoras de gastrina (RAMSAY e CARR, 2011; SCHUBERT, 2015).

As células principais são responsáveis pela síntese e secreção de pepsinogênio que é convertido em pepsina, a qual juntamente com o ácido gástrico irá facilitar o processo de digestão. A acetilcolina, histamina e gastrina estimulam a secreção de pepsinogênio, enquanto que a somatostatina inibe a secreção desta proenzima (RAMSAY e CARR, 2011).

A célula parietal é regulada por mecanismos neurais, hormonais e parácrinos, assim como, por estímulos mecânicos e químicos para secreção de ácido gástrico. A histamina, gastrina e acetilcolina são as principais substâncias estimulantes da secreção ácida. A histamina liberada pelas células ECL estimula a célula parietal diretamente através da ligação aos receptores H_2 presentes na membrana basolateral destas células (via parácrina). As células G durante o processo de digestão secretam o hormônio gastrina, o qual estimula as células parietais a secretarem ácido gástrico através da ligação da gastrina ao receptor de colecistocinina2 (CCK-2) (via endócrina) e indiretamente, via receptor CCK-2 presente nas células ECL liberando histamina. A acetilcolina liberada dos neurônios parassimpáticos pós-ganglionares estimula a secreção gástrica diretamente via receptor M_3 na célula parietal e indiretamente via receptor M_1 nas células ECL estimulando a secreção de histamina (via neuronal). Os receptores M_2 e M_4 também estimulam a secreção gástrica através da inibição da secreção de somatostatina (hormônio inibidor da secreção gástrica) (via neuronal) (SHUBERT, 2016).

As células D secretam somatostatina para que esta atue inibindo a secreção de ácido gástrico diretamente sobre as células parietais e indiretamente através da inibição da liberação de histamina das células ECL e pela inibição da secreção de gastrina das células G (RAMSAY e CARR, 2011; SHUBERT, 2016).

O controle da secreção ácida gástrica pode ser dividido em três fases: cefálica, gástrica e intestinal (**figura 3**). A fase cefálica é a responsável pela iniciação da secreção, ocorrendo em resposta à estímulos visuais, olfatórios e gustativos, relacionados à antecipação e ao contato com o alimento (RAMSAY e CARR, 2011). Nesta fase, estímulos oriundos do córtex cerebral, da amígdala e do hipotálamo são transmitidos através do núcleo motor dorsal do nervo vago para o estômago e são responsáveis por cerca de um quinto da secreção gástrica.

Na fase gástrica, a secreção de ácido é amplificada por estímulos mecânicos e físicos que se originam pela presença de alimento no lúmen gástrico. Grande parte da liberação de ácido ocorre nesta fase devido ao processo de digestão. A distensão da parede estomacal decorrente da chegada do alimento ao lúmen gástrico, ativa receptores de estiramento que intensificam a liberação de gastrina através das células G (distensão do antro gástrico), assim como o aumento da distensão do fundo gástrico promove ainda mais a secreção de ácido gástrico diretamente pela liberação de acetilcolina nas proximidades das células parietais e indiretamente pelo aumento da liberação de gastrina e histamina, pelas células G e pelas células enterocromafins, respectivamente (RAMSAY e CARR, 2011). Nesta fase, ainda que as taxas secretoras de ácido estejam altas, o pH do lúmen estomacal aumenta e alcança valores próximos a 5 em decorrência do efeito tampão de algumas proteínas, oligopeptídeos e aminoácidos da dieta. Este mecanismo assegura que a taxa de secreção ácida durante a fase gástrica não seja atenuada por uma diminuição da produção de gastrina, pois valores menores de pH estimulam as células D a liberarem somatostatina (CAMILLERI, 2006).

A fase intestinal é responsável pela diminuição da atividade secretória através da ação de hormônios e reflexos nervosos em decorrência da chegada do quimo às primeiras porções do intestino delgado (FARRÉ e TACK, 2013). O duodeno executa uma função inibitória através do envio de sinais para o estômago (por meio do sistema nervoso entérico) e para a medula que inibem os núcleos vagais e estimulam os neurônios simpáticos para o envio de sinais inibitórios ao estômago. O quimo também estimula a liberação de secretina e colecistoquinina no duodeno, o que também suprime a secreção gástrica (RAMSAY e CARR, 2011).

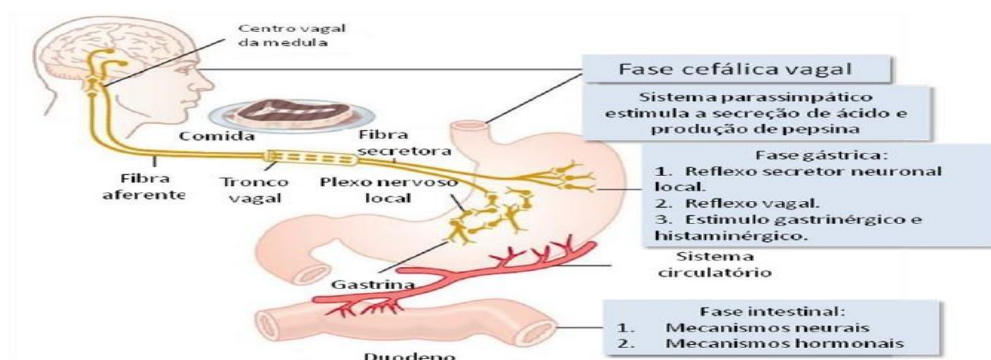


Figura 3: Fases da secreção gástrica.

(Fonte: http://www.tokresource.org/tok_clases/biobiobio/biomenue/digestion/index.htm
Acesso em 10 de janeiro de 2017.

As células parietais possuem uma extensa rede de canalículos, que em resposta a estímulos da acetilcolina, histamina e gastrina secretam ácido clorídrico através de um transporte ativo para o lúmen estomacal. A estimulação da secreção gástrica ocorre por um efeito cascata, que usa vias endócrinas, parácrinas e neurais. A ativação de neurônios intrínsecos, por ativação eferente vagal, promove a liberação de acetilcolina dos terminais nervosos ativando as células parietais presentes no epitélio gástrico a secretarem H^+ . Em resposta a ativação parassimpática, o peptídeo liberador de gastrina age nas células G localizadas no antro gástrico promovendo a liberação de gastrina que estimula as células parietais, via receptores de colecistocinina tipo 2 (CCK2), a secretarem ainda mais H^+ (mecanismo endócrino). A histamina é também secretada em resposta à estimulação vagal, e células enterocromafins (ECL) expressam receptores para gastrina. Dessa forma, a gastrina induz a liberação de histamina, que potencializa os efeitos da gastrina e da acetilcolina sobre as células parietais. A ligação da histamina a receptores H_2 , na membrana plasmática das células parietais, ativa a adenilato ciclase e eleva a concentração citosólica do AMPc. Esses eventos estimulam a secreção de H^+ , por meio da ativação do trocador de K^+ basolaterais e pelo trocador apical de Cl^- . A acetilcolina ao se ligar a receptores muscarínicos M_3 , induz a abertura de canais de Ca^{++} na membrana plasmática apical ocasionando o aumento da secreção de H^+ , pela ativação do trocador de K^+ basolaterais, e por fazer com que mais moléculas de H^+ , K^+ -ATPase e trocador de Cl^- sejam inseridos na membrana plasmática apical (BERNE e LEVY, 2009; BRUNTON, CHABNER e KNOLLMANN, 2012).

A inibição da secreção de ácido gástrico ocorre pela ação da somatostatina e prostaglandinas E_2 (PGE_2). A presença de ácido no antro ativa uma alça de retroalimentação para inibir a célula parietal de secretar mais ácido gástrico em resposta a digestão, então, quando

a concentração de H^+ no lúmen alcança pH abaixo de 3, a somatostatina é liberada das células D endócrinas na mucosa do antro. A somatostatina tem ação parácrina sobre as células G vizinhas, reduzindo a liberação de gastrina e consequentemente a secreção gástrica ácida. As PGE_2 inibem a secreção de ácido gástrico através da ligação ao seu receptor EP_3 (ativação G_i) na célula parietal (BERNE e LEVY, 2009; TAKEUCHI, 2014).

A enzima $H^+/K^+-ATPase$ (bomba de prótons) é formada por duas subunidades, a subunidade α que realiza as funções catalíticas e de transporte da enzima, enquanto que a subunidade β é extremamente glicosilada e protege a enzima da degradação e é necessária para o deslocamento da enzima entre o citoplasma e a membrana da célula parietal (SCHUBERT, 2016).

A célula parietal possui a membrana apical revestindo o lúmen das glândulas gástricas e a membrana basolateral em contato com o fluido intersticial, uma rede de canalículos se estendem desde a membrana apical para dentro da célula (RAMSAY e CARR, 2011). Quando as células parietais são estimuladas, as estruturas túbulo-vesiculares se direcionam à membrana apical e se fusionam a ela, inserindo muitas moléculas de $H^+/K^+-ATPase$ na membrana (URUSHIDANI et al., 1997). A bomba $H^+/K^+-ATPase$ promove a secreção do H^+ no lúmen gástrico, trocando-o por K^+ , o Cl^- também é expelido através de seus canais ativados por AMPc, o HCO_3^- , formado pela dissociação do H_2CO_3 é expelido por antiporte na membrana basolateral das células parietais que trocam o HCO_3^- principalmente por Cl^- (**figura 4**) (RAMSAY e CARR, 2011).

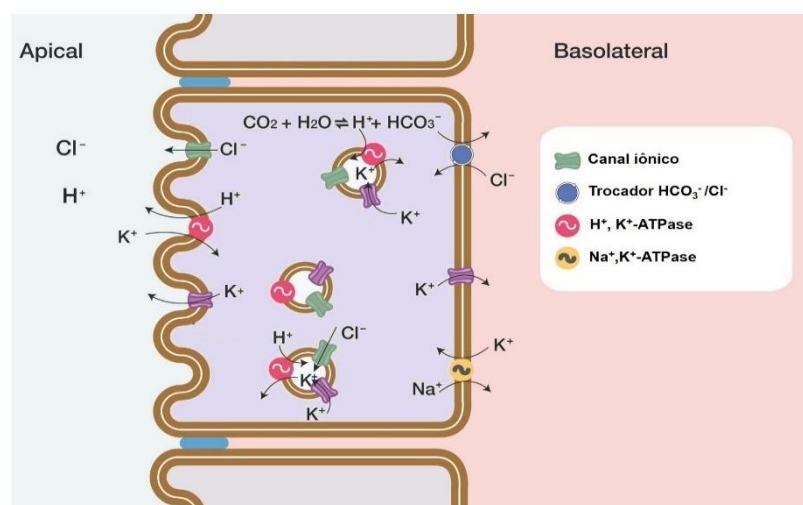


Figura 4. Representação da troca de íons na célula parietal.

(Fonte: Han et al., 2016)

2.3 FATORES PROTETORES DA MUCOSA GÁSTRICA

O estômago, órgão responsável pela digestão dos alimentos, possui mecanismos de proteção que agem impedindo que a mucosa estomacal seja “digerida” pelo suco gástrico. Estes mecanismos de proteção incluem secreção de muco gástrico e bicarbonato, aumento do fluxo sanguíneo, inibição da secreção de ácido gástrico, renovação das células epiteliais, geração de prostaglandinas, óxido nítrico e mecanismos antioxidantes (YANDRAPU e SAROSEIK, 2015).

O muco gástrico secretado pelas células superficiais da mucosa gástrica é um gel transparente viscoso composto por 95% de água e 5% de glicoproteínas. A camada de muco possui espessura entre 200 – 300 μm conferindo uma eficiente proteção a mucosa gástrica. As glicoproteínas presentes no muco são responsáveis pelo sequestro das espécies reativas de oxigênio (EROs), fornecendo ao muco efeito antioxidante e protetor da mucosa gástrica contra a ação deletéria de agentes citotóxicos, como o etanol e AINEs (REPETTO e LLESEUY, 2002; YANDRAPU e SAROSEIK, 2015).

A camada de muco funciona como uma barreira física protetora entre o epitélio e o lúmen contra agentes nocivos, microorganismos e pepsina presentes no lúmen. Além disso, mantém o gradiente de pH próximo a neutralidade, impedindo danos a mucosa gástrica. O muco é secretado em todo o trato gastrointestinal desde o estômago até o cólon. A secreção de muco é estimulada por hormônios gastrointestinais, incluindo gastrina e secretina, bem como PGE_2 e agentes colinérgicos (YANDRAPU e SAROSEIK, 2015).

A secreção de bicarbonato pode ser estimulada pelo óxido nítrico e prostaglandinas gerando um gradiente de pH perto da neutralidade na superfície das células epiteliais, o qual promove a primeira linha de defesa da mucosa do estômago contra o ácido secretado no lúmen (KIM, 2014; YANDRAPU e SAROSEIK, 2015).

As células parietais quando liberam íon H^+ , simultaneamente transportam o íon bicarbonato pela membrana basolateral através da troca de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, resultando numa maior disponibilidade de bicarbonato. Além disso, para cada íon de H^+ secretado pela célula parietal, uma molécula de CO_2 é convertida em bicarbonato, provocando o que se conhece como maré alcalina após a secreção de ácido gástrico (SCHUBERT, 2016).

A manutenção do fluxo sanguíneo protege a mucosa permitindo a chegada de uma quantidade adequada de oxigênio, nutrientes, bicarbonato, além de remover substâncias tóxicas. As células endoteliais dos microvasos geram potentes vasodilatadores como o óxido nítrico e prostaglandinas, os quais se opõem à ação danosa de vários agentes vasoconstritores como os leucotrienos C4, tromboxano A2 e endotelina (YANDRAPU e SAROSEIK, 2015).

As prostaglandinas protegem a mucosa gástrica através da inibição da secreção ácida, estimulação da secreção de muco e bicarbonato, manutenção do fluxo sanguíneo gástrico e controle da motilidade gástrica (TAKEUCHI, 2014; TARNAWSKI, AHLUWALIA e JONES, 2013). Estes prostanóides podem se ligar a diferentes receptores e exercer diversas ações na mucosa gástrica. A ligação das prostaglandinas ao receptor EP₁ diminui a motilidade gástrica e aumenta o fluxo sanguíneo gástrico e a secreção de bicarbonato e ao receptor EP₃ inibe a secreção de ácido gástrico (TAKEUCHI et al., 2014).

O óxido nítrico é um importante mediador de proteção da mucosa gástrica através do aumento do fluxo sanguíneo, secreção de muco e bicarbonato e de sua habilidade em inibir a aderência dos neutrófilos às células endoteliais (MAGIEROWSKI et al., 2015; SANTIN et al., 2013). Este mediador gasoso está envolvido no mecanismo de secreção de bicarbonato em conjunto com a PGE₂. Quando há aumento da secreção ácida, o NO estimula a síntese de PGE₂, a qual é responsável pela inibição da secreção de ácido e aumento da secreção de bicarbonato (TAKEUCHI et al., 2011; KIM, 2014).

Os grupamentos sulfidrílicos agem como antioxidantes endógenos e produtores de muco. Estes se ligam aos radicais livres formados durante o processo inflamatório da úlcera gástrica, protegendo a mucosa gástrica dos efeitos deletérios dos radicais livres (AVILA et al., 1996).

A proteção da mucosa gástrica também envolve fatores bioquímicos, como um sistema antioxidante constituído por vitaminas, flavonoides da dieta, carotenoides, ácido úrico, glutathione reduzida (GSH) e as enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione S-transferase (GST), protegendo a mucosa gástrica dos efeitos do ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio (KWIECIEN et al., 2014; YANDRAPU e SAROSEIK, 2015).

2.4 ETIOLOGIA E FARMACOTERAPIA DA ÚLCERA GÁSTRICA

A úlcera gástrica é uma lesão que pode atingir a camada mucosa, submucosa e, algumas vezes, a muscular externa, causando perfuração da parede estomacal podendo levar o indivíduo à morte. Esta doença atinge uma grande parcela da população mundial gerando elevados gastos com saúde pública (KANGWAN et al., 2014).

Vários mecanismos estão implicados na patogênese das lesões gástricas agindo sinergicamente ou não na produção das lesões. Assim, o aumento da secreção de ácido gástrico e pepsina, diminuição do fluxo sanguíneo, supressão da produção de prostaglandinas endógenas, inibição do crescimento e proliferação celular da mucosa, alteração da motilidade gástrica, presença de agentes infecciosos e radicais livres são alguns dos mecanismos envolvidos na ulcerogênese (KANGWAN et al., 2014; SZABO, 2014).

A presença da bactéria *H. pylori* na mucosa gástrica é a principal causa de inflamação do tecido estomacal, sendo responsável por 80% dos casos de úlceras gástricas. O *H. pylori* provoca lesão à mucosa gástrica devido a destruição das células epiteliais, dano ao DNA celular, apoptose, produção e proliferação de citocinas inflamatórias (ALZAHIRANI et al., 2014; TYTGAT, 2011) e aumento da secreção ácida gástrica por inibir os efeitos antissecretórios da somatostatina (BRUNTON, CHABNER e KNOLLMANN, 2012).

O uso prolongado dos AINEs também é uma das principais causas de danos a mucosa gástrica devido a inibição da síntese das prostaglandinas (PGE₂ e PGI₂). Os AINEs também causam danos à mucosa pelo aumento da produção de citocinas inflamatórias (KOIZUMI et al., 2009), diminuição da expressão da eNOS e por aumentar liberação de ERO e a peroxidação lipídica (NAITO et al., 2006). As PGE₂ e PGI₂ são responsáveis pela secreção de muco e bicarbonato e pela inibição da secreção gástrica. Sua diminuição acarreta em perda da citoproteção e redução do fluxo sanguíneo local (ROBERT et al., 1979).

No início do século XX o único tratamento para as úlceras gástricas consistia na remoção do nervo vago (vagotomia), com altas taxas de morbimortalidade e a utilização dos antiácidos que neutralizam a acidez gástrica. Na década de 70 surgiram os antagonistas dos receptores H₂ que inibem a produção de ácido gástrico pela competição reversível com a histamina pelos receptores H₂ presentes nas células parietais. A cimetidina, um antagonista dos receptores H₂ de histamina possui afinidade por receptores andrógenos ocasionando impotência

sexual e ginecomastia como efeito colateral, além de náuseas e sonolência em idosos (BRUNTON, CHABNER e KNOLLMANN, 2012; SCHUBERT, 2016).

Com a descoberta da bomba de prótons em 1967 (FORTE et al., 1967), a classe dos fármacos inibidores da bomba de prótons (omeprazol, lansoprazol, rabeprazol, pantoprazol e esomeprazol) foi desenvolvida para melhora do tratamento das úlceras gástricas. Estes fármacos se acumulam nos canalículos secretórios de ácido, sendo ativados por um processo de catalisação resultando na formação de uma sulfonamida tetracíclica. Esta forma ativada reage por ligação covalente com o grupo sulfidril da cisteína 813 de domínio extracelular da bomba de prótons promovendo à inibição da secreção do ácido clorídrico (SCHUBERT, 2016; STRAND, KIM e PEURA 2016). A secreção de ácido gástrico somente retorna após a síntese de novas moléculas da bomba e inserção na membrana luminal, esse efeito proporciona uma supressão prolongada da secreção gástrica (24-48 h) (BRUNTON, CHABNER e KNOLLMANN, 2012).

A inibição da secreção de ácido gástrico não é suficiente para cicatrização da mucosa gástrica, sendo necessária a utilização de medicamentos que aumentem os fatores de proteção da mucosa como a carbenoxolona, sucralfato, rebamipida e ecabete. A carbenoxolona é um fármaco derivado do ácido glicirrízico encontrado na raiz do alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*) e tem sido utilizada na Europa para tratamento das úlceras gástricas. Seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente elucidado, mas acredita-se que pode alterar a composição e a quantidade do muco gástrico. O sucralfato em pH abaixo de 4 produz um polímero viscoso e pegajoso (semelhante ao muco gástrico) que adere as células epiteliais e as úlceras por até 6 horas da sua administração, além de estimular a produção local de prostaglandina e fator de crescimento epidérmico. A rebamipida e ecabete são fármacos bastante utilizados em alguns países do continente asiático devido ao seu efeito citoprotetor por aumentar a produção de PGE₂ e PGI₂ na mucosa gástrica (BRUNTON, CHABNER e KNOLLMANN, 2012).

2.5 BAICALEÍNA

A baicaleína (5,6,7-trihidroxiflavona) é um flavonoide encontrado nas plantas medicinais *Oroxylum indicum* (Bignoniaceae) (CHEN et al., 2003) e *S. baicalensis* (Lamiaceae), sendo a baicaleína seu principal constituinte químico (HEO et al., 2004; HUANG et al., 2005; KIMURA et al., 1997).

A *S. baicalensis* Georgi (Lamiaceae) é bastante utilizada na medicina popular chinesa para tratamento de diversas afecções (Li-WEBER, 2009). Ban-Xia-Xie-Xin-Tang é um complexo fitoterápico que contém a raiz da *S. baicalensis* em sua composição, sendo frequentemente prescrito para pacientes com úlcera péptica pela medicina tradicional chinesa (HUANG et al., 2015).

Vários são os efeitos biológicos da baicaleína, anti-inflamatório (HE et al., 2015; PATWARDHAN et al., 2016; YANG et al., 2009), antioxidante (CZAPSKI, CZUBOWICZ e STROSZNAJDER, 2012; LEE et al., 2011), antinociceptivo (HU et al., 2015), antifúngico (SERPA et al., 2012), antiviral (SITHISARN et al., 2013), antimicrobiano (GOC, NIEDZWIECKI e RATH, 2015), anticancerígeno (CHEN et al., 2013; WU et al., 2011) e anti-*H. pylori* (MATSUMOTO, TAKAHASHI e YAMADA, 2008).

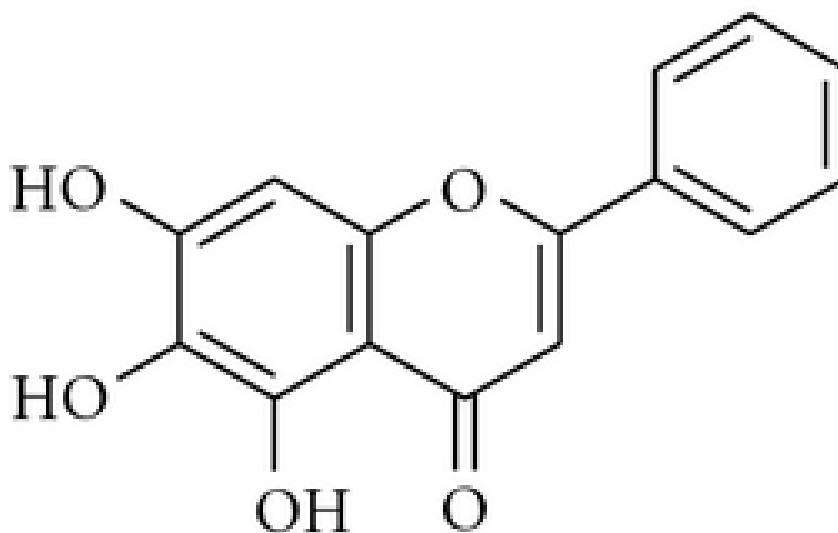
A administração de baicaleína por 30 dias reduziu a hiperglicemia induzida por estreptozotocina em ratos (WAISUNDARA et al., 2009) através do aumento da secreção de insulina e promoção da sobrevivência das células β -pancreáticas (FU et al., 2014).

Este flavonoide apresenta potente efeito no sistema cardiovascular devido a sua ação sequestradora de radicais livres e inibidora da xantina oxidase, mostrando efeito protetor aos danos cardiovasculares induzidos pelo estresse oxidativo. O efeito antioxidante desta substância é semelhante ao ácido ascórbico (BOCHORAKOVA et al., 2003). A baicaleína também é responsável pela redução da pressão arterial, sendo este efeito atribuído, em partes, a sua atividade inibidora da lipoxigenase, tendo como resultado menor síntese e liberação de produtos vasoconstritores da cadeia do ácido araquidônico (HUANG et al., 2005).

Em estudo utilizando o peptídeo β -amiloide foi possível observar que após tratamento crônico com a baicaleína os déficits de memória causados por este peptídeo foram diminuídos,

demonstrando o potencial terapêutico da baicaleína para doença de Alzheimer (WANG et al., 2002). Ainda sobre seu efeito neuroprotetor, Mu et al. (2009) demonstraram seu efeito neuroprotetor para o parkinsonismo induzido experimentalmente pela 6-hidroxidopamina, tanto *in vivo* como *in vitro*, protegendo culturas de células PC12 de apoptose e protegendo ratos dos tremores induzidos pela 6-hidroxidopamina.

Os efeitos antitumorais desse composto contra diferentes tipos de câncer tem sido bastante investigados, câncer de pulmão (WANG et al., 2010), carcinoma hepatocelular (LIANG et al., 2012), leucemia (WANG et al., 2009) e osteosarcoma (ZHANG et al., 2014). Mu et al. (2016) observaram que a baicaleína possui efeito sobre o câncer gástrico *in vivo* e *in vitro* suprimindo o crescimento gástrico, induzindo as células cancerígenas a fase estacionária e promovendo apoptose das células cancerígenas.



Peso molecular=270,24

Figura 5. Estrutura química da baicaleína

Fonte: TAIMING e XUEHUA, 2006.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos citoprotetor e antissecretório da baicaleína na mucosa gástrica de camundongos em modelo de úlcera gástrica induzida por etanol acidificado.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Avaliar, macro e microscopicamente, o efeito gastroprotetor da baicaleína em mucosas gástricas de camundongos expostas ao etanol acidificado;
- b. Investigar a participação de receptores α_2 -adrenérgicos, compostos sulfidrílicos não proteicos, óxido nítrico, prostaglandinas e canais para K^+ sensíveis a ATP no efeito gastroprotetor da baicaleína na a mucosa gástrica exposta ao etanol acidificado;
- c. Avaliar o efeito da baicaleína no infiltrado neutrofílico em mucosa gástrica exposta ao etanol acidificado;
- d. Avaliar o efeito da baicaleína na concentração de glutathione em mucosa gástrica exposta ao etanol acidificado;
- e. Avaliar o efeito da baicaleína na produção de muco gástrico;
- f. Mensurar o efeito da baicaleína nos parâmetros da secreção de ácido gástrico;
- g. Investigar a ação da baicaleína nos efeitos do agente secretagogo histamina após ligadura de piloro.
- h. Mensurar *in vitro* o efeito da baicaleína na atividade da bomba de prótons, H^+ , K^+ -ATPase.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E UTILIZAÇÃO DA BAICALEÍNA

A baicaleína utilizada foi obtida da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA) com grau de pureza $\geq 97,5\%$ (CLAE). O tensoativo polissorbato 80 (Tween 80) a 0,2% foi utilizado para solubilização, emulsificação da baicaleína em água (para via oral) ou solução de NaCl a 0,9% (para as demais vias de administração).

A escolha das doses da baicaleína para avaliação do efeito gastroprotetor foi baseada em ensaios farmacológicos prévios do grupo de pesquisa.

4.2 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Para avaliação do efeito gastroprotetor da baicaleína foram utilizados camundongos *Mus musculus*, ambos sexos, da linhagem swiss (28-32 g), provenientes do biotério setorial do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, em sala com temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro (12 h/12 h), tendo ração e água *ad libitum*.

Este trabalho foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) da Universidade Federal de Sergipe sob o protocolo nº 09/2015 (Anexo 1).

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DA BAICALEÍNA EM ÚLCERAS GÁSTRICAS INDUZIDA POR ETANOL ACIDIFICADO

Para avaliação da atividade gastroprotetora da baicaleína foi utilizado o método descrito previamente por Mizui e Doteuchi (1983). Após 12 horas de jejum alimentar, os animais (n=6) foram submetidos a administração pela via oral (gavagem) de veículo (Tween 80 a 0,2% em água, 10 mL/kg, v.o.), omeprazol (droga padrão, 30 mg/kg, v.o.) ou baicaleína nas doses de 10,

30 e 100 mg/kg (v.o.). Após 45 minutos, os camundongos receberam por via oral (gavagem) etanol a 60% contendo HCl a 0,3 M (10 mL/kg). Transcorrido o período de indução da lesão gástrica (60 minutos), os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical (sob anestesia prévia com halotano pela via inalatória), tendo seus estômagos retirados e abertos pela grande curvatura. As imagens dos estômagos foram capturadas e analisadas através do *software* de análise de imagens EARP (desenvolvido pelo Dr. Eros Comunello, Universidade Vale do Itajaí, SC, Brasil) para determinação das áreas de lesão. Os resultados foram expressos como área total de lesão ulcerativa (mm²) e área relativa de lesão ulcerativa (área total de lesão em relação a área total do estômago, %)

4.3.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO GÁSTRICO DOS ANIMAIS SUBMETIDOS A ADMINISTRAÇÃO DE ETANOL ACIDIFICADO

Após a captura das imagens, os estômagos foram armazenados em frascos contendo formol a 10% por um período mínimo de 24 horas e em seguida realizado o processamento histológico (imersão em várias concentrações de álcool e em xilol) para inclusão em parafina. Em micrótomo, cortes de 5 µm de espessura foram realizados para confecção das lâminas histológicas. As lâminas foram coradas com hematoxilina/eosina (HE) para observação e quantificação das alterações no tecido gástrico (n=6/grupo, 4 cortes histológicos/estômago), como descamação e perda das células epiteliais (desorganização) e edema intersticial da camada submucosa. Escores foram utilizados para quantificar as alterações morfológicas ocorridas no tecido estomacal: 0 = sem alteração; 1 = rara alteração (alterações focais, limitadas ao terço superior); 2 = moderada alteração (alterações focais, além do terço superior); e 3 = grave alteração (alterações difusas no terço superior). As alterações histológicas foram apresentadas como mediana. Toda avaliação histopatológica foi realizada através de estudo cego por patologista experiente.

4.4 INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS DE GASTROPROTEÇÃO DA BAICALEÍNA EM ÚLCERAS GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ETANOL ACIDIFICADO

Na investigação de possíveis mecanismos envolvidos na gastroproteção da baicaleína, escolhemos a menor dose eficaz deste flavonoide (30 mg/kg), a qual diminuiu a área total e a área relativa de lesão de forma significativa.

4.4.1 AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS α_2 -ADRENORECEPTORES NO EFEITO GASTROPROTETOR DA BAICALEÍNA

Este experimento foi realizado segundo método proposto por Balogun, Damazo e De Oliveira Martins (2015). Em jejum alimentar de 12 horas, os camundongos (n=6/grupo) foram submetidos a administração pela via intraperitoneal de veículo (Tween 80 a 0,2% em solução de NaCl a 0,9%) ou ioimbina (2 mg/kg), um antagonista dos receptores α_2 -adrenérgicos. Após 45 minutos, foi administrado pela via oral veículo (Tween 80 a 0,2% em água, 10 mL/kg) ou baicaleína (30 mg/kg), e depois de mais 45 minutos foi realizada a indução das úlceras gástricas por etanol acidificado, conforme descrito anteriormente (sessão 4.3).

4.4.2 AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS GRUPAMENTOS SULFIDRÍLICOS NÃO PROTEICOS E DO ÓXIDO NÍTRICO NO EFEITO GASTROPROTETOR DA BAICALEÍNA

Este experimento foi realizado segundo método descrito por Balogun, Damazo e De Oliveira Martins. (2015) e Batista et al. (2015). Os camundongos (n=6/grupo) em jejum alimentar de 12 horas, foram submetidos a administração pela via intraperitoneal de veículo (Tween 80 a 0,2% em solução de NaCl a 0,9%), NEM (*N*-etilmaleimida, 10 mg/kg), um agente que promove a alquilação e inativação dos grupamentos sulfidrílicos não proteicos ou L-NAME (*N*-nitro-*L*-arginina metil éster, 10 mg/kg), um inibidor não seletivo da sintase do óxido nítrico. Após 45 minutos, foi administrado pela via oral veículo (Tween 80 a 0,2% em água, 10 mL/kg) ou baicaleína (30 mg/kg) e depois de mais 45 minutos foi realizada a indução de úlceras gástricas por etanol acidificado, conforme descrito anteriormente (sessão 4.3).

4.4.3 AVALIAÇÃO DO PAPEL DAS PROSTAGLANDINAS NO EFEITO GASTROPROTETOR DA BAICALEÍNA

Este experimento foi descrito previamente por Balogun, Damazo e De Oliveira Martins (2015). Em jejum alimentar de 12 horas, os animais foram separados em grupos (n=6/grupo) e submetidos a administração pela via intraperitoneal de indometacina (10 mg/kg, v.o.), inibidor não seletivo da enzima ciclo-oxigenase, ou bicarbonato de sódio a 5% em NaCl a 0,9% (10 mL/kg, v.o.). Após 45 minutos, foi administrado pela via oral veículo (Tween 80 a 0,2% em água, 10 mL/kg) ou baicaleína (30 mg/kg), e transcorridos outros 45 minutos foi realizada a indução de úlceras agudas por etanol acidificado, conforme descrito anteriormente (sessão 4.3).

4.4.4 AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS CANAIS PARA POTÁSSIO ATP-DEPENDENTES NO EFEITO GASTROPROTETOR DA BAICALEÍNA

Este experimento foi realizado segundo método descrito por Silva et al. (2009). Os camundongos (n=6/grupo) em jejum alimentar de 12 horas, foram submetidos a administração pela via intraperitoneal de veículo (Tween 80 a 0,2% em solução de NaCl a 0,9%) ou glibenclamida (10 mg/kg), um bloqueador dos canais para potássio sensíveis ao ATP. Após 45 minutos, foi administrado pela via oral veículo (Tween 80 a 0,2% em água, 10 mL/kg) ou baicaleína (30 mg/kg) e depois de mais 45 minutos foi realizada a indução de úlceras gástricas por etanol acidificado, conforme descrito anteriormente (sessão 4.3).

4.4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO) E DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) NO TECIDO GÁSTRICO

4.4.5.1 PREPARAÇÃO DO HOMOGENATO ESTOMACAL

O tecido gástrico dos animais (n=6/grupo) submetidos à administração de baicaleína (30 mg/kg), omeprazol (30 mg/kg) e veículo (Tween 80 a 0,2% em água) pela via oral e expostos aos efeitos deletérios do etanol acidificado (v.o.) foi utilizado para realização de dosagens bioquímicas. Imediatamente após a eutanásia dos animais, os estômagos foram pesados e homogeneizados com tampão fosfato de potássio a 200 mM (pH 6,5) na proporção 1:3. Uma parte do homogenato estomacal foi utilizado para determinação da concentração de GSH e o restante foi centrifugado à 11.000xg por 20 minutos à 4 °C. A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) foi determinada através do *pellet* resultante. A dosagem proteica foi realizada de acordo com o método de Bradford como sugerido pelo fabricante (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A albumina bovina foi utilizada para elaboração da curva padrão (2,5-15,0 µg/mL).

4.4.5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO) NO TECIDO GÁSTRICO

Este ensaio foi realizado conforme método descrito previamente por Bradley et al. (1982) e De Young et al. (1989). O precipitado obtido conforme descrito na sessão 4.4.5.1 foi ressuspenso em 1 mL de tampão fosfato de potássio a 80 mM na presença de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) a 0,5%. Após homogeneização, as amostras foram novamente centrifugadas (12.000xg, 20 min, 4 °C) e 30 µL do sobrenadante de cada amostra ou água destilada (branco) foram acrescidos à 200 µL de uma solução reacional (100 µL de tampão fosfato a 80 mM, 85 µL de tampão fosfato a 22 mM e 15 µL de H₂O₂ a 0,017%) em placas de 96 poços. A reação foi iniciada com a adição de 20 µL de tetrametilbenzidina (TMB), um substrato enzimático que resulta num produto colorido, em cada poço. As amostras foram então incubadas por 3 min à 37 °C, e a reação foi interrompida pela adição de 30 µL de acetato de sódio a 1,46 M (pH 3,0) em cada poço. A atividade enzimática foi determinada em leitor de placas à 620 nm. Os resultados foram expressos como unidade de densidade óptica (D.O.)/mg de proteína/3 minutos.

4.4.5.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) NO TECIDO GÁSTRICO

A concentração de GSH na mucosa gástrica dos camundongos submetidos à administração de etanol acidificado (v.o.) foi determinada pelo método de Sedlak e Lindsay (1968). Em 50 µL do homogenato, obtido conforme descrito na sessão 4.4.5.1, foram adicionados 40 µL de ácido tricloroacético a 12,5% e então submetidos a centrifugação por 15 min a 3.000xg. Posteriormente, 10 µL do sobrenadante ou água destilada (branco) foram adicionados à 290 µL de tampão TRIS a 0,4 M (pH 8,9) em placa de 96 poços. A reação foi iniciada com a adição de 5 µL de 5,5-ditiobis 2-ácido nitrobenzóico (DTNB) a 1 mM, 5 min antes da leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 415 nm. Os valores da absorbância foram interpolados em uma curva padrão de GSH (0,375–3,0 µg), com os valores expressos em µg de GSH/g de tecido.

4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA BAICALEÍNA SOBRE A PRODUÇÃO DE MUCO GÁSTRICO

Este experimento foi realizado de acordo com o método descrito por Sun et al. (1991). Em jejum alimentar de 12 horas, e após comprovação da anestesia (halotano a 1,5% pela via inalatória através de vaporizador), foi realizada uma incisão abdominal para ligadura do esfíncter pilórico e administração de: veículo (Tween 80 a 0,2% em solução de NaCl a 0,9%, 10 mL/kg, i.d.), droga padrão (carbenoxolona, 200 mg/kg, i.d.) e baicaleína (10-100 mg/kg, i.d.). A região abdominal foi suturada, administrada morfina (2 mg/kg, s.c.) para alívio da dor pós-operatória e após 4 horas os animais foram submetidos a eutanásia por deslocamento cervical (anestesia prévia com halotano). Os estômagos foram removidos, pesados e acondicionados em 10 mL de solução de Alcian Blue [Alcian Blue a 0,02%; sacarose a 0,16 M; acetato de sódio a 0,05 M (pH 5,8)] por 24 horas. O tecido estomacal foi descartado e a solução submetida à centrifugação a 3000xg por 10 minutos. A leitura do sobrenadante foi realizada em leitor de placas à 620 nm. Os resultados foram expressos em quantidade de corante (mg) aderido ao muco por grama (g) de tecido, com valores interpolados sobre curva-padrão de Alcian Blue (6,25-200 mg/mL).

4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA BAICALEÍNA NA A SECREÇÃO GÁSTRICA

Este experimento foi realizado de acordo com o método descrito por Shay et al. (1945). Em jejum alimentar de 12 horas, e após comprovação da anestesia (halotano a 1,5% pela via inalatória através de vaporizador), foi realizada uma incisão abdominal para ligadura do esfíncter pilórico e administração de: veículo (Tween 80 a 0,2% em solução de NaCl a 0,9%, 10 mL/kg, i.d.), droga padrão (cimetidina, 100 mg/kg, i.d.) e baicaleína (10-100 mg/kg, i.d.). A região abdominal foi suturada, administrada morfina (2 mg/kg, s.c.) para alívio da dor pós-operatória e após 4 horas os animais foram submetidos a eutanásia por deslocamento cervical (anestesia prévia com halotano). A incisão abdominal foi reaberta e após pinçamento da cárdia, para evitar a perda do conteúdo gástrico, o estômago foi retirado e lavado em água. O conteúdo gástrico foi centrifugado por 10 minutos à 3000xg e o sobrenadante utilizado para determinação do volume, pH e concentração de íons hidrogênio. O volume de secreção foi determinado

através de proveta volumétrica graduada, o pH através de pHmetro digital e a concentração de íons hidrogênio na secreção gástrica através de titulação com NaOH a 0,01 M utilizando fenolftaleína a 1% como indicador ácido-base. Os resultados foram expressos como volume de secreção gástrica (mL), pH e concentração do íons hidrogênio (mEq/L/4 h).

4.6.1 INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS ANTISSECRETÓRIOS DE ÁCIDO GÁSTRICO DA BAICALEÍNA

4.6.1.1. EFEITO DA BAICALEÍNA SOBRE A SECREÇÃO GÁSTRICA ESTIMULADA POR HISTAMINA

Este experimento foi realizado de acordo com o método descrito previamente por Shay et al. (1945) e Burci et al. (2013). A ligadura do esfíncter pilórico foi realizada conforme descrito anteriormente (sessão 4.6), com algumas modificações. Os animais foram distribuídos em grupos (n=6/grupo) e após a ligadura do esfíncter pilórico, pela via intraduodenal foi administrado veículo (Tween 80 a 0,2% em solução de NaCl a 0,9%, 10 mL/kg) ou baicaleína (30 mg/kg). Seguidamente, a parede abdominal foi suturada e para alívio da dor pós-operatória foi administrado morfina (2 mg/kg, s.c.). Após 1 hora, os animais receberam o estímulo secretagogo, histamina (20 mg/kg, s.c.) ou veículo (Tween 80 a 0,2% em solução de NaCl a 0,9%, 10 mL/kg, s.c.). Quatro horas após a ligadura do esfíncter pilórico, os animais foram submetidos à eutanásia, sendo os estômagos removidos e feita a análise dos parâmetros relacionados a secreção ácida gástrica como descrito anteriormente (sessão 4.6).

4.6.1.2 EFEITO DA BAICALEÍNA SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA $H^+,K^+,ATPase$

A atividade da enzima $H^+,K^+,ATPase$ obtida de microssomas estomacais de coelho, foi determinada mediante a quantificação do fósforo inorgânico (Pi) liberado da hidrólise de ATP

exógeno, na presença de K^+ , conforme descrito previamente por Kubo et al. (1995). A reação foi iniciada pela adição de 100 μ L da enzima H^+ , K^+ ATPase a 50 μ L de solução de reação (tampão Tris HCl a 50 mM (pH 7,4), $MgCl_2$ a 2,5 mM, KCl a 20 mM e ATP a 1 mM), na ausência e na presença de veículo (DMSO a 0,5% em água), baicaleína (3-30 μ g/mL), omeprazol (100 μ g/mL) ou ouabaína (100 μ g/mL). A reação foi interrompida após 20 min de incubação à 37 °C, pela adição de 50 μ L de ácido tricloroacético a 50% e esfriamento rápido em banho de gelo. A atividade da bomba de prótons foi determinada pela quantificação do fosfato inorgânico liberado da hidrólise do ATP através de leitura espectrofotométrica à 820 nm. Este experimento foi realizado em triplicata e a atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção do P_i ($\epsilon = 11000/M/cm$) e expresso em μ MPi/mg de proteína/min.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os dados paramétricos foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. Para os dados não-paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal–Walis seguido do teste de Dunn. Para todas as análises foram considerados valores significativos quando $p < 0,05$. O programa GraphPad Prism 5 foi utilizado para realização dos testes estatísticos.

5 RESULTADOS

5.1 EFEITO GASTROPROTETOR DA BAICALEÍNA EM ÚLCERAS GÁSTRICAS INDUZIDA POR ETANOL ACIDIFICADO

A administração de baicaleína pela via oral protegeu a mucosa gástrica dos efeitos deletérios do etanol acidificado de maneira dose-dependente como pode ser observado através dos valores da área total de lesão (13,17 mm², 7,98 mm² e 4,76 mm² para baicaleína nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, respectivamente) e a área relativa de lesão (5,75% e 3,14% para baicaleína nas doses de 30 e 100 mg/kg, respectivamente) quando comparado com o veículo (16,56 mm² e 10,68% para área total de lesão e área relativa de lesão, respectivamente; **figura 6**). De forma similar, a administração pela via oral de omeprazol (Omeprazol; 30 mg/kg) também protegeu a mucosa gástrica [área total de lesão e área relativa de lesão diminuídas (5,73 mm² e 3,39% para área total de lesão e área relativa de lesão, respectivamente; $p < 0,001$; **figura 6**].

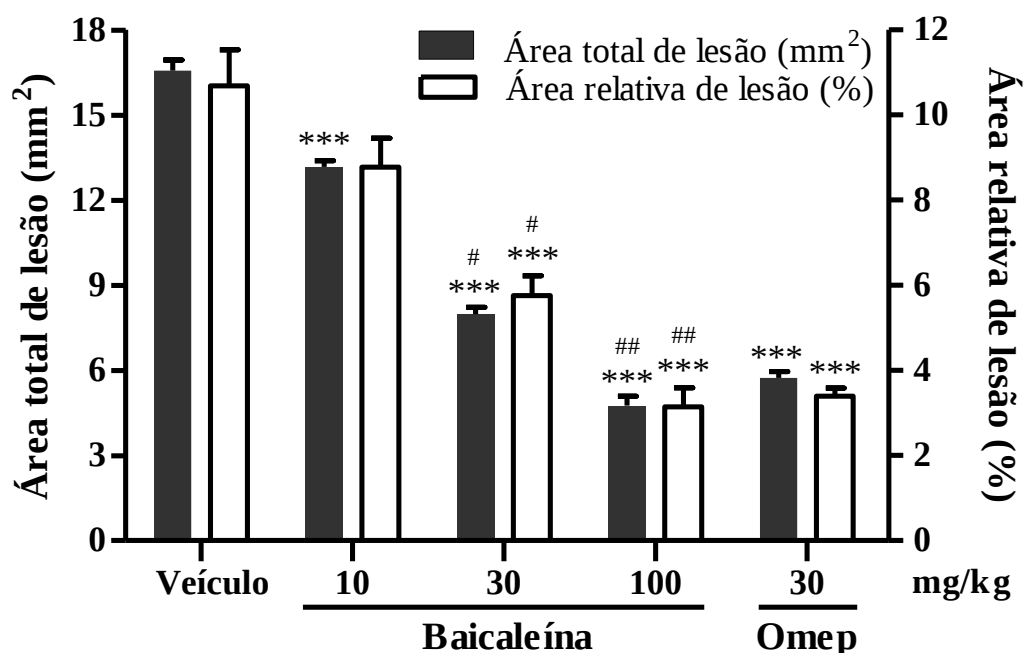


Figura 6. Efeito gastroprotetor da baicaleína em úlceras induzidas por etanol acidificado.

Os camundongos submetidos a administração pela via oral de veículo, baicaleína (10-100 mg/kg; v.o.) e omeprazol (Omeprazole; 30 mg/kg; v.o.) 45 min antes da administração pela via oral de etanol acidificado. A área total de lesão (mm²) e a área relativa de lesão (%) foram determinadas 1 h após a indução das lesões gástricas. Resultados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) (n= 6). ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. ***p<0,001 vs. veículo; #p<0,05 vs. baicaleína na dose de 10 mg/kg; ##p<0,01 vs. baicaleína nas doses de 10 e 30 mg/kg.

5.1.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO GÁSTRICO DOS ANIMAIS SUBMETIDOS A ADMINISTRAÇÃO DE ETANOL ACIDIFICADO

A administração oral de etanol acidificado provocou alterações histológicas compatíveis com lesão gástrica (grupo veículo), expressas morfológicamente como: descamação e perda das células epiteliais da mucosa (desorganização) e edema na camada submucosa (**figura 7**). A análise quantitativa destas alterações morfológicas revelou que o grupo veículo apresentou escores de desorganização e edema da submucosa significativamente

mais intensos que omeprazol (30 mg/kg) e a baicaleína nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg ($p < 0,05$, **tabela 1**).

Tabela 1. Alterações histológicas provocadas pelo etanol acidificado no tecido estomacal.

Grupo	Dose	Desorganização	Edema
	(mg/kg)	(Escore 0-3)	(Escore 0-3)
Veículo	-	3,0 (2,0-3,0)	3,0 (2,0-3,0)
Baicaleína	10	2,0 (1,0-2,0)*	2,0 (1,0-2,0)*
	30	1,0 (1,0-2,0)***	1,0 (1,0-2,0)***
	100	1,0 (1,0-2,0)***	1,0 (0,0-1,0)***
Omeprazol	30	1,0 (1,0-2,0)***	1,0 (1,0-2,0)***

Resultados expressos como mediana dos escores com mínimo e máximo. Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ vs. veículo. Seções histológicas em quadriplicata (n=6).

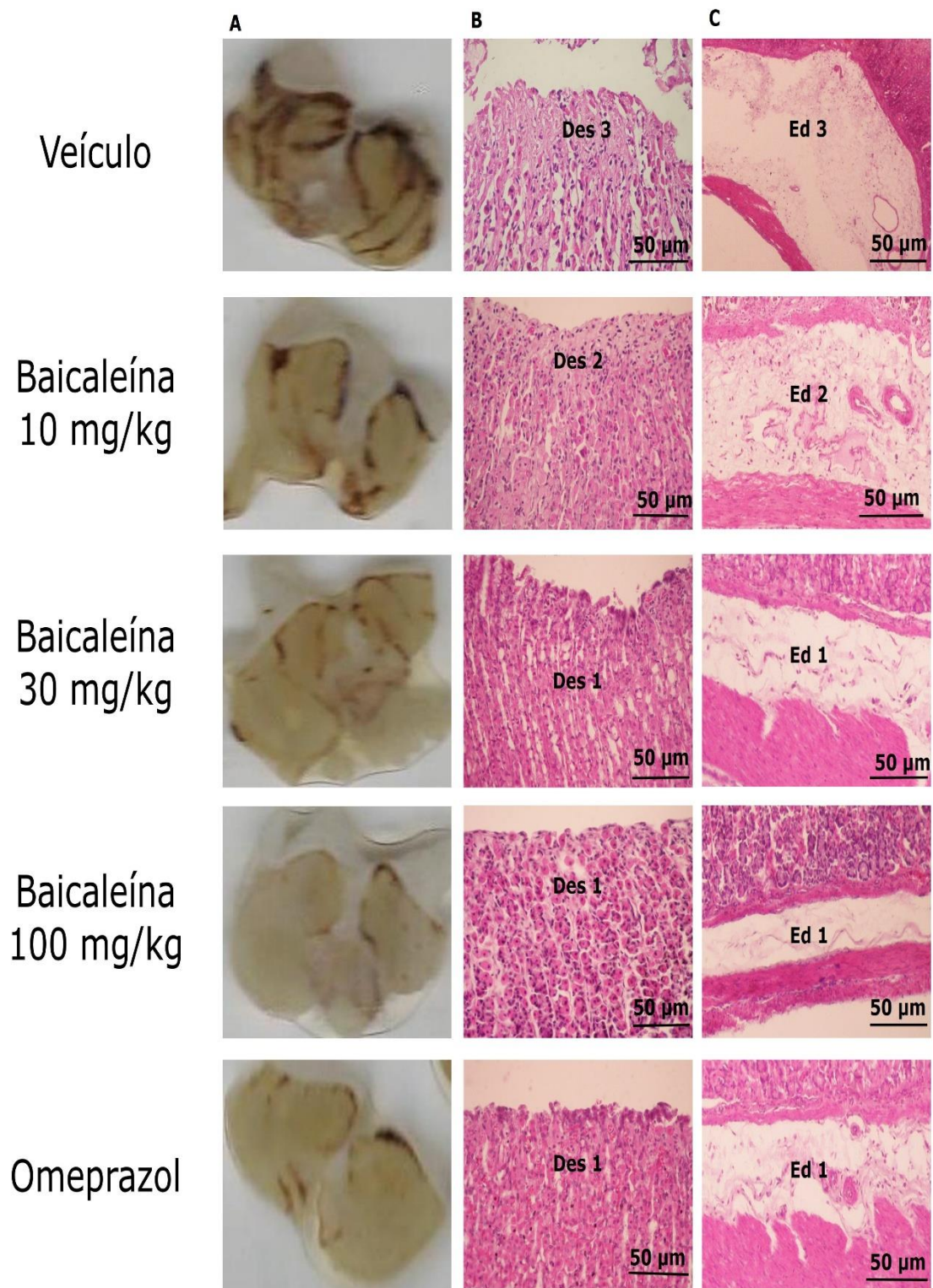


Figura 7. Efeito protetor da baicaleína no tecido estomacal. (A) Lesões estomacais provocadas pela administração de etanol acidificado. (B) e (C) Seções histológicas coradas por Hematoxilina-Eosina (HE). (B) Desorganização das células epiteliais da camada mucosa. (C) Edema da camada submucosa. O grupo veículo apresentou perda das células epiteliais da mucosa (des3) e pronunciado edema na submucosa (ed3); baicaleína na dose de 10

mg/kg apresentou epitélio gástrico menos lesionado (des2) e menor edema da submucosa (ed2); baicaleína nas doses de 30 e 100 mg/kg e omeprazol apresentaram epitélio gástrico preservado (des1) e discreto edema da submucosa (ed1).

5.1.2 MECANISMOS DE GASTROPROTEÇÃO DA BAICALEÍNA EM ÚLCERAS GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ETANOL ACIDIFICADO

5.1.2.1 ENVOLVIMENTO DOS α_2 -ADRENORECEPTORES NO EFEITO GASTROPROTETOR DA BAICALEÍNA

A **tabela 2** mostra os resultados obtidos na avaliação do papel dos receptores α_2 -adrenérgicos na gastroproteção da baicaleína. Os animais submetidos à administração de veículo (i.p) e veículo (v.o) apresentaram extensa área de lesão da mucosa gástrica ($14,74 \pm 0,87 \text{ mm}^2$). A administração de baicaleína (v.o)) reduziu de forma significativa ($4,36 \pm 0,40 \text{ mm}^2$; $p < 0,001$) a área total de lesão em comparação com o veículo. A administração de ioimbina (i.p), antagonista seletivo dos receptores α_2 adrenérgicos, e veículo (v.o) aumentou a área total de lesão ($p < 0,001$) quando comparado com o veículo. O efeito gastroprotetor da baicaleína foi diminuído na presença da ioimbina.

Tabela 2. Envolvimento dos receptores α_2 -adrenérgicos no efeito gastroprotetor da baicaleína.

Grupo (i.p.)	Grupo (v.o.)	Área total de lesão (mm ²)
Veículo	Veículo	14,74 ± 0,87
Veículo	Baicaleína	4,36 ± 0,40***
Ioimbina (2 mg/kg)	Veículo	21,55 ± 1,18***
Ioimbina (2 mg/kg)	Baicaleína	21,23 ± 0,96***###

Resultados expressos como média e erro padrão da média (E.P.M.). ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. ***p<0,001 vs. veículo (i.p.) + veículo (v.o); ###p<0,001 vs. veículo (i.p.) + baicaleína.

5.1.2.2 ENVOLVIMENTO DOS GRUPAMENTOS SULFIDRÍLICOS NÃO PROTEICOS E DO ÓXIDO NÍTRICO NO EFEITO GASTROPROTETOR DA BAICALEÍNA

Os animais submetidos a administração de veículo (i.p) e baicaleína (v.o) tiveram área total de lesão ($3,47 \pm 0,54 \text{ mm}^2$) diminuída em relação aos animais submetidos a administração de veículo (i.p) e veículo (v.o) ($13,32 \pm 0,95 \text{ mm}^2$). As lesões gástricas foram mais intensas quando os animais foram submetidos a administração de NEM (10 mg/kg, i.p.), inibidor dos grupamentos sulfidrílicos, ou L-NAME (10 mg/kg, i.p.), inibidor não seletivo da sintase do óxido nítrico (NOS), quando comparados com o veículo conforme pode ser observado na **tabela 3**.

Tabela 3. Envolvimento dos grupamentos sulfidrílicos e do óxido nítrico na gastroproteção da baicaleína.

Grupo (i.p.)	Grupo (v.o.)	Área total de lesão (mm ²)
Veículo	Veículo	13,32 ± 0,95
Veículo	Baicaleína	3,47 ± 0,54***
NEM (10 mg/kg)	Veículo	24,27 ± 0,55***
NEM (10 mg/kg)	Baicaleína	15,26 ± 0,72 ^{###&&&}
L-NAME (10 mg/kg)	Veículo	18,33 ± 0,90*
L-NAME (10 mg/kg)	Baicaleína	16,91 ± 1,26 ^{###}

NEM: *N*-etilmaleimida; L-NAME: *N_w*-nitro-*L*-arginina metil éster. Resultados expressos como média e erro padrão da média (E.P.M.). ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. **p*<0,05 e ****p*<0,001 vs. veículo (i.p.) + veículo (v.o); ^{###}*p*<0,001 vs. veículo (i.p.) + baicaleína; ^{&&&}*p*<0,001 vs. NEM + veículo.

5.1.2.3 ENVOLVIMENTO DAS PROSTAGLANDINAS NO EFEITO GASTROPROTETOR DA BAICALEÍNA

Os animais que foram submetidos a administração de veículo (i.p.) (NaHCO₃ a 5% em solução de NaCl a 0.9%, i.p.) e veículo (v.o.) apresentaram extensas áreas de lesões ulcerativas (13,29 ± 0,95 mm²). A administração de baicaleína diminuiu a área total de lesão (4,04 ± 0,41 mm², *p*<0,001) em relação ao veículo. A indometacina (10 mg/kg), um AINE que atua inibindo as ações da enzima ciclo-oxigenase (COX), quando foi administrada pela via intraperitoneal aumentou a área total de lesão (16,33 ± 0,67 mm²) em relação a área total de lesão dos animais submetidos à administração de veículo (i.p.) (NaHCO₃ a 5% em solução de NaCl a 0.9%; 13,29 ± 0,95 mm²). O efeito gastroprotetor da baicaleína foi diminuído quando os animais foram submetidos a administração de indometacina (10 mg/kg, i.p.) conforme pode ser observado na **tabela 4.**

Tabela 4. Envolvimento das prostaglandinas no efeito gastroprotetor da baicaleína.

Grupo (i.p.)	Grupo (v.o.)	Área total de lesão (mm ²)
Veículo	Veículo	13,29 ± 0,95
Veículo	Baicaleína	4,04 ± 0,41***
Indometacina (10 mg/kg)	Veículo	16,33 ± 0,67*
Indometacina (10 mg/kg)	Baicaleína	11,95 ± 1,26###&&

Resultados expressos como média e erro padrão da média (E.P.M.). ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. *p<0,05 e ***p<0,001 vs. veículo (i.p.) + veículo (v.o.); ###p<0,001 vs. veículo (i.p.) +baicaleína; &&p<0,01 vs. indometacina (i.p.) + veículo (v.o.).

5.1.2.4 ENVOLVIMENTO DOS CANAIS PARA POTÁSSIO ATP-DEPENDENTES NO EFEITO GASTROPROTETOR DA BAICALEÍNA

Os resultados obtidos na avaliação do papel dos canais para potássio dependentes ao ATP no efeito gastroprotetor da baicaleína podem ser observados na **tabela 5**. Os animais que foram submetidos a administração de veículo (i.p) e veículo (v.o) apresentaram área total de lesão de 10,86 ± 0,52 mm². A administração de baicaleína reduziu de forma significativa (2,79 ± 0,39 mm²; p<0,001) a área total de lesão em comparação com o veículo. A administração de glibenclamida (i.p) (10 mg/kg), bloqueador dos canais para potássio ATP-dependentes aumentou a área total de lesão (p<0,05) quando comparado com o veículo. O efeito gastroprotetor da baicaleína foi abolido na presença da glibenclamida.

Tabela 5. Envolvimento dos canais para potássio sensíveis ao ATP no efeito gastroprotetor da baicaleína.

Grupo (i.p.)	Grupo (v.o.)	Área total de lesão (mm ²)
Veículo	Veículo	10,86 ± 0,52
Veículo	Baicaleína	2,79 ± 0,39***
Glibenclamida (10 mg/kg)	Veículo	13,74 ± 0,78*
Glibenclamida (10 mg/kg)	Baicaleína	13,10 ± 0,27###

Resultados expressos como média e erro padrão da média (E.P.M.). ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. *p<0,05 e ***p<0,001 vs. veículo (i.p) + Veículo (v.o.); ###p<0,001 vs. veículo (i.p) + baicaleína.

5.1.2.5 EFEITO DA BAICALEÍNA NA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO) NO TECIDO GÁSTRICO

A mucosa gástrica lesionada pela administração de etanol acidificado apresentou elevada atividade da enzima MPO (123,13 ± 16,86 mD.O./mg de proteína; **figura 8**) em relação a mucosa gástrica não lesionada (grupo naive, 22,08 ± 1,80 mD.O./mg de proteína; p<0,01; **figura 8**). A baicaleína (30 mg/kg) inibiu a atividade da MPO, a qual é um marcador da migração de neutrófilos para a área inflamada, quando comparada ao grupo veículo (p<0,05).

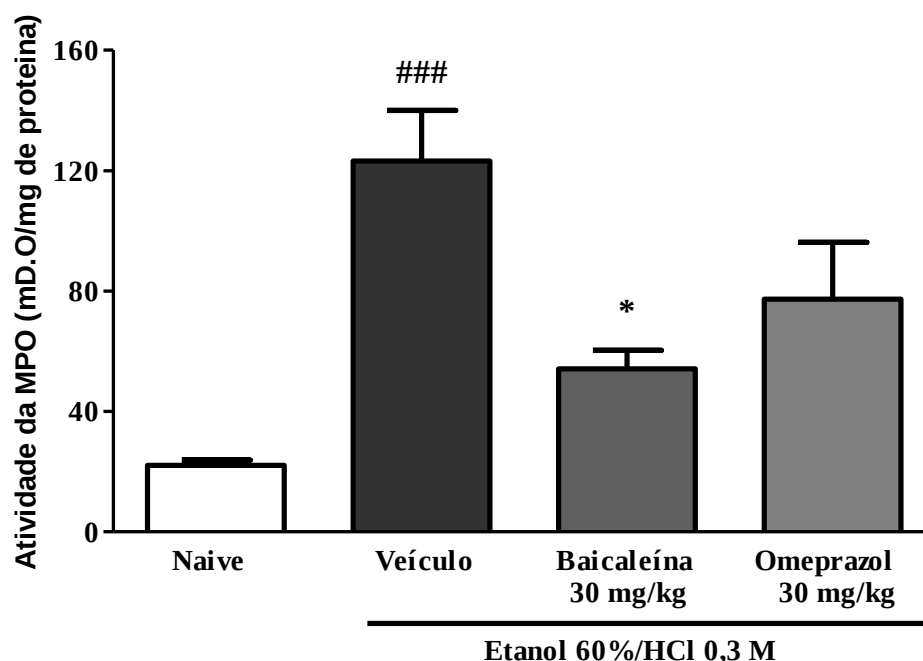


Figura 8. Efeito da baicaleína na atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no tecido gástrico exposto ao etanol acidificado. Os camundongos foram submetidos a administração pela via oral de veículo (Tween 80 a 0,2% em água; v.o.), baicaleína (30 mg/kg; v.o.) ou omeprazol (30 mg/kg; v.o.) 45 min antes da administração pela via oral de etanol acidificado. A determinação da atividade da enzima MPO foi realizada 1 h após a indução das lesões gástricas. Naive = animais que não foram submetidos a administração de etanol acidificado. Resultados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) (n= 6). ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs. veículo; ## $p < 0,001$ vs. naive.

5.1.2.6 EFEITO DA BAICALEÍNA NA CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) NO TECIDO GÁSTRICO

O efeito direto do etanol acidificado sobre a mucosa gástrica reduziu a concentração de GSH ($458,41 \pm 50,65$ mg/g de tecido; $p < 0,01$) no tecido gástrico em relação ao grupo naive ($1.163,40 \pm 57,94$ mg/g de tecido). A administração de baicaleína (30 mg/kg) e omeprazol (30 mg/kg) pela via oral aumentou a concentração de GSH ($782,28 \pm 8,24$ e $928,65 \pm 63,33$ mg/g de tecido para baicaleína e omeprazol, respectivamente) quando comparado com o grupo veículo ($p < 0,05$), conforme apresentado na **figura 9**.

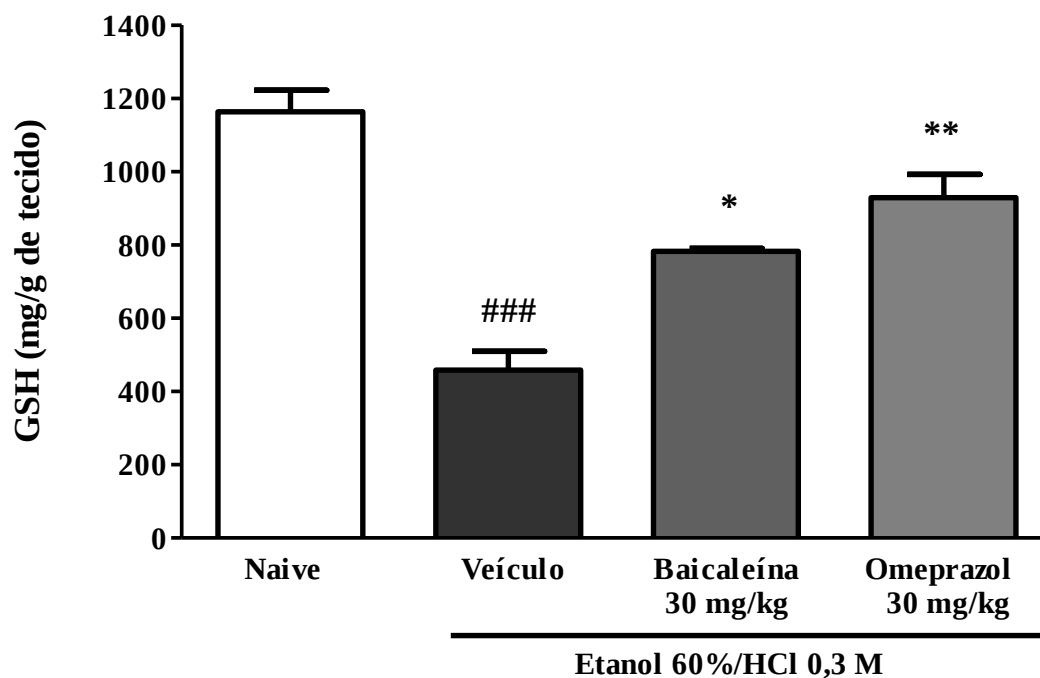


Figura 9. Efeito da baicaleína na concentração de glutathiona reduzida (GSH) no tecido gástrico exposto ao etanol acidificado. Os camundongos foram tratados com veículo, baicaleína (30 mg/kg;) ou omeprazol (30 mg/kg) 45 min antes da administração de etanol acidificado. A determinação da concentração de GSH foi realizada 1 h após a indução das lesões gástricas. Naive = animais que não foram submetidos a administração de etanol acidificado. Resultados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) (n= 6). ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs. veículo; ### $p < 0,001$ vs. naive.

5.2 EFEITO DA BAICALEÍNA NA PRODUÇÃO DE MUCO GÁSTRICO

A produção de muco gástrico foi aumentada com o tratamento com baicaleína nas doses de 30 mg/kg (38,2%) e 100 mg/kg (52,5%) em relação ao tratamento com veículo (**figura 10**). A carbenoxolona (Carb; 200 mg/kg) também aumentou a produção de muco gástrico (61,3%).

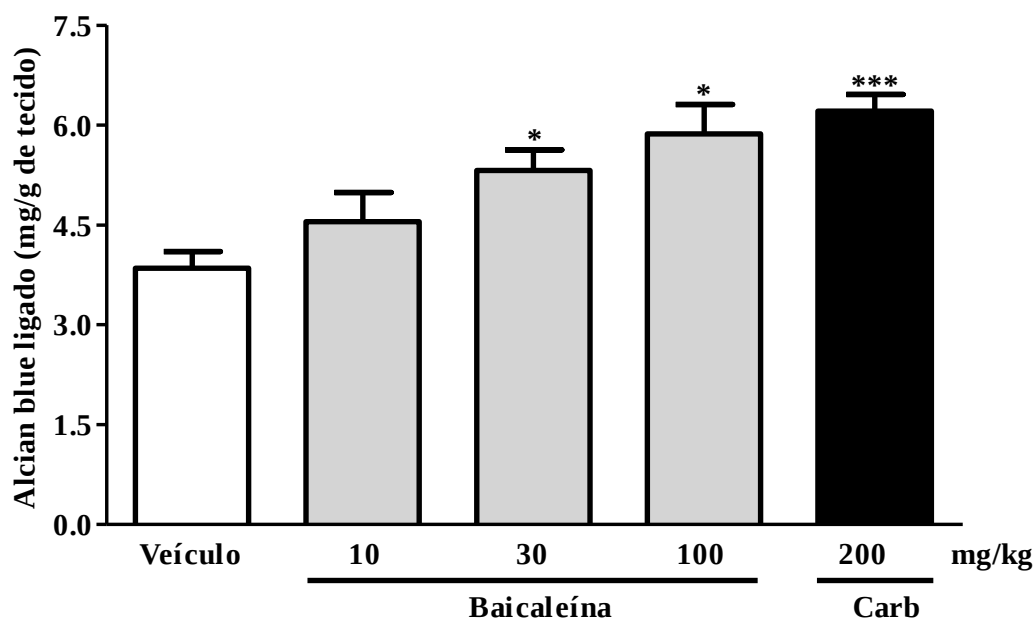


Figura 10. Efeito da baicaleína na produção de muco gástrico. Após a ligadura do esfíncter pilórico foram administrado no duodeno veículo (Tween 80 a 0,2% em solução de NaCl a 0,9%), baicaleína (10-100 mg/kg) ou carbenoxolona (Carb; 200 mg/kg). Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M) (n=6). ANOVA seguida do teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ vs. veículo.

5.3 EFEITO DA BAICALEÍNA SOBRE A SECREÇÃO GÁSTRICA

O tratamento com baicaleína reduziu significativamente o volume da secreção gástrica (26,3% e 64,0% para baicaleína nas doses de 30 e 100 mg/kg, respectivamente; $p < 0,05$) e a concentração de H^+ (53,9%, 56,2% e 57,5% para baicaleína nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, respectivamente; $p < 0,001$; **tabela 6**). A baicaleína também aumentou ($p < 0,001$) o pH da secreção gástrica em todas as doses (10, 30 e 100 mg/kg) quando comparado com o veículo. A cimetidina também diminuiu o volume de secreção gástrica (75,4%), a concentração de H^+ (37,8%) e elevou o pH da secreção gástrica ($p < 0,001$; **tabela 6**).

Tabela 6. Efeito da baicaleína sobre a secreção ácida gástrica basal.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Volume (mL)	pH	[H ⁺] mEq/L/4 h
Veículo	-	1,14 ± 0,11	4,07 ± 0,26	14,35 ± 1,24
Baicaleína	10	0,89 ± 0,05 [#]	6,77 ± 0,28***	6,62 ± 0,76***
	30	0,84 ± 0,05*	6,22 ± 0,18***	6,28 ± 0,33***
	100	0,41 ± 0,04***	6,03 ± 0,23***	6,10 ± 0,68***
Cimetidina	100	0,28 ± 0,04***	6,00 ± 0,32***	8,93 ± 0,69***

Resultados apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M.) (n=6). ANOVA seguida do teste de Bonferroni. *p<0,05 e ***p<0,001 vs. veículo; [#]p<0,001 vs. baicaleína nas doses de 30 e 100 mg/kg.

5.3.1 MECANISMOS ANTISSECRETÓRIOS DE ÁCIDO GÁSTRICO DA BAICALEÍNA

5.3.1.1 EFEITO DA BAICALEÍNA SOBRE A SECREÇÃO GÁSTRICA ESTIMULADA POR HISTAMINA

A **tabela 7** apresenta os parâmetros da secreção gástrica estimulada por histamina. A administração de baicaleína (30 mg/kg) diminuiu a concentração de H⁺ e o volume da secreção gástrica e aumentou o pH da secreção gástrica em relação a secreção gástrica basal (veículo). A histamina (20 mg/kg), agonista dos receptores H₂ presentes nas células parietais, aumentou o volume da secreção gástrica basal e a concentração de H⁺ e diminuiu o valor de pH. A baicaleína administrada 1 hora antes do estímulo secretagogo, inibiu os efeitos da histamina sobre o volume da secreção gástrica, concentração de H⁺ e pH.

Tabela 7. Efeito da baicaleína sobre a secreção gástrica estimulada pela histamina.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Volume (mL)	pH	[H ⁺] mEq/L/4 h
Veículo	-	0,66 ± 0,04	4,48 ± 0,44	13,16 ± 0,37
Baicaleína	30	0,35 ± 0,03****	6,62 ± 0,48*	8,05 ± 0,54**
Histamina	20	1,00 ± 0,08****	2,46 ± 0,38*	20,82 ± 0,68****
Baicaleína+ Histamina	30 + 20	0,49 ± 0,05###	6,05 ± 0,59###	12,33 ± 1,59###

Resultados apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M.) (n=6). ANOVA seguida do teste de Bonferroni. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 vs. veículo; ###p<0,001 vs. histamina.

5.3.1.2 EFEITO DA BAICALEÍNA SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA H⁺,K⁺,ATPase

A baicaleína (10 e 30 µg/mL) diminuiu a liberação de fósforo inorgânico (37,8% e 48,9%, respectivamente; p<0,001). O omeprazol (inibidor da H⁺, K⁺-ATPase) também diminuiu a atividade da bomba de prótons (39,5%, p<0,001), enquanto a ouabaína (inibidor da Na⁺,K⁺-ATPase) não interferiu na atividade da enzima. A **figura 11** demonstra o efeito inibitório da baicaleína sobre a atividade da H⁺, K⁺-ATPase.

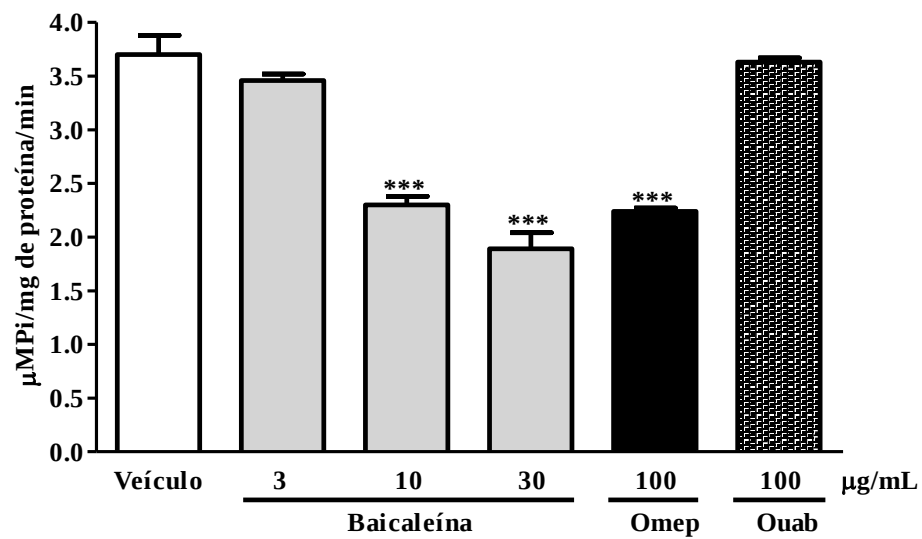


Figura 11. Efeito *in vitro* da baicaléina na atividade da bomba de prótons (H^+,K^+ -ATPase).

A enzima obtida de vesículas gástricas de estômago de coelho foi incubada com veículo (DMSO a 0,5% em água), baicaléina (3, 10 e 30 $\mu\text{g/mL}$), omeprazol (Omeprazol; 100 $\mu\text{g/mL}$) ou ouabaína (Ouabáina; 100 $\mu\text{g/mL}$). ANOVA seguida do teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$ vs. veículo. Pi=fósforo inorgânico.

6 DISCUSSÃO

A úlcera gástrica é uma doença que afeta cerca de 4 milhões de pessoas e sua chance de cura é elevada quando tratada, porém, casos de reincidência são recorrentes promovendo elevados gastos na saúde pública (KANGWAN et al., 2014; SONE et al., 2008). Os fármacos utilizados para seu tratamento são os antagonistas dos receptores H_2 de histamina e os inibidores da bomba de prótons. Estes fármacos além de gerarem diversos efeitos colaterais, eles agem somente através de um mecanismo de ação, inibindo a secreção de ácido gástrico pelas células parietais. A supressão da secreção gástrica isolada é insuficiente para o processo cicatricial completo (KANGWAN et al., 2014; STRAND, KIM e PEURA, 2016) e a busca por substâncias que possam atuar na defesa da mucosa gástrica é frequente. A baicaleína, flavonoide utilizado neste trabalho, demonstrou efeito não somente sobre a secreção de ácido gástrico, como também efeito gastroprotetor, provavelmente devido ao seu efeito antioxidante, anti-inflamatório e produtor de muco gástrico. Esses dados corroboram outros estudos em que foi observado o efeito antiúlcera de vários flavonoides, entre eles a wogonina (flavonoide com estrutura química semelhante a baicaleína e também encontrado nas raízes da planta medicinal *S. baicalensis*) (PARK et al., 2004), rutina (ABDEL, 2010; LA CASA et al., 2000), afzelina, quercitrina (DE BARROS et al., 2016), diosmina (ARAB et al., 2015) e pinostrobina (ABDELWAHAB et al., 2011), sobre a mucosa gástrica devido às suas ações antissecretória, citoprotetora, anti-inflamatória e antioxidante.

O modelo de úlcera gástrica induzida por etanol acidificado é bastante utilizado para avaliação de novas substâncias com potencial efeito gastroprotetor em camundongos. A administração de etanol acidificado à mucosa gástrica ocasiona lesões gástricas acompanhadas de área de hemorragia intensa, aumento da permeabilidade vascular com infiltração de neutrófilos e consequente liberação de EROs, diminuição na concentração de GSH e enzimas antioxidantes e perda das células do epitélio gástrico (REPETTO e LLESUY, 2002; RIBEIRO et al., 2016; SANTIN et al., 2013). A baicaleína demonstrou um efeito gastroprotetor dose-dependente em que a área de lesão ulcerativa (mm^2), alterações morfológicas (perda das células epiteliais e edema na submucosa), depleção da concentração de glutatona e infiltração de neutrófilos no tecido gástrico (atividade da enzima mieloperoxidase) foram diminuídos.

Considerando o efeito de flavonoides na úlcera gástrica induzida por etanol acidificado, Barros et al. (2016) também observaram que a afzelina e quercitrina reduziram o aparecimento

de lesões na mucosa gástrica de camundongos pela inibição da atividade da enzima MPO e inibição da redução da concentração de GSH na mucosa gástrica.

Santin et al. (2013) observaram que as lesões gástricas induzidas por etanol acidificado produziram acúmulo de neutrófilos no tecido gástrico, e animais depletados de neutrófilos através da administração de anticorpo anti-granulótico (i.p.) apresentaram área de lesão ulcerativa reduzida. A inibição do recrutamento de neutrófilos pode ser também um importante alvo na terapia antiúlcera. No presente estudo, a atividade da MPO, enzima marcadora da migração de neutrófilos, foi diminuída quando os animais foram submetidos a administração de baicaleína, sugerindo uma inibição na migração de neutrófilos para o tecido estomacal e, conseqüentemente, menor dano a mucosa gástrica, como pode ser observado em relação a área de lesão ulcerativa e na avaliação histológica. Os efeitos anti-inflamatório e inibitório da baicaleína sobre a atividade da MPO já foram observado em outros tecidos e modelos experimentais (HE et al., 2015; SHEN et al., 2003; TSAI et al., 2014).

A ativação dos neutrófilos resulta na liberação do ânion superóxido (O_2^-) (CARLSON et al., 2002; KWIECIEN et al., 2014) e este efeito tem sido investigado em diversos modelos de lesão gástrica (KWIECIEN et al., 2014; SANTIN et al., 2013). A membrana celular dos neutrófilos possui um complexo enzimático denominado NADPH oxidase, que quando ativado, gera grandes quantidades de EROs (FIALKOW et al., 2007; KWIECIEN et al., 2014). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), gerado a partir do ânion superóxido, participa no processo de formação do radical hidroxila ($OH^\cdot$), o qual é extremamente reativo e responsável por gerar lesão em alguns sistemas orgânicos (KWIECIEN et al., 2014). O peróxido de hidrogênio formado é convertido em água e oxigênio molecular pela atividade da enzima catalase (CAT). A glutathione reduzida, tripeptídeo com potente atividade antioxidante, também é responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio através da enzima glutathione peroxidase (GPX) (KWIECIEN et al., 2014). Neste estudo foi possível observar que a baicaleína possui efeito gastroprotetor devido a sua propriedade antioxidante *in vivo* através do aumento da concentração de GSH na mucosa gástrica, possuindo papel importante contra os efeitos tóxicos do radical hidroxila. A administração de compostos sulfidrílicos, como a L-cisteína, N-acetilcisteína, penicilamina e glutathione, protege a mucosa gástrica através do seu potencial antioxidante e por formar pontes de dissulfeto entre as subunidades do muco, impedindo a sua dissociação (LAINE e WEINSTEIN, 1988; SZABO, 2014). Inversamente, a administração de NEM, agente que promove a inativação dos grupamentos sulfidrílicos não proteicos (NP-SH), reverte os efeitos protetores de compostos tióis (SZABO, 2014). O aumento

da concentração dos compostos sulfidrílicos e a formação de GSH constituem mecanismos de defesa contra as lesões induzidas por etanol (KAPLAN et al., 2012; SZABO, 2014).

O efeito gastroprotetor da baicaleína foi revertido quando os animais foram submetidos à administração de N-etilmaleimida (NEM). Este dado sugere que a disponibilidade de tais compostos é primordial para o efeito gastroprotetor da baicaleína. Como comentado anteriormente, a baicaleína na dose de 30 mg/kg foi capaz de impedir a redução da concentração de GSH na mucosa gástrica após administração de etanol acidificado, confirmando que o efeito citoprotetor da mucosa gástrica da baicaleína é dependente dos grupamentos sulfidrílicos. Campos et al. (2008) observaram que o efeito gastroprotetor da 3,6-dimetoxi-6'',6''-dimetil-[2'',3'':7,8]-cromenoflavona (DDF) também foi abolido quando houve a inibição dos grupamentos sulfidrílicos pelo NEM e a concentração de GSH na mucosa gástrica com o tratamento com DDF foram mantidos e, conseqüentemente, as lesões gástricas amenizadas.

O óxido nítrico é um mediador gasoso que está intimamente envolvido na manutenção da integridade da mucosa gástrica através da regulação da secreção de muco, bicarbonato e ácido gástrico e manutenção do fluxo sanguíneo, além de atuar como citoprotetor e anti-inflamatório, inibindo a aderência dos leucócitos ao endotélio vascular e a agregação de neutrófilos e como complemento aos efeitos protetores das prostaglandinas no estômago (MAGIEROWSKI et al., 2015; SANTIN et al., 2013;).

Para avaliar o papel do óxido nítrico no efeito gastroprotetor da baicaleína, os animais foram submetidos a administração de L-NAME (i.p), um inibidor da sintase do óxido nítrico, e baicaleína (v.o) (30 mg/kg) 45 minutos antes da administração oral de etanol acidificado. Foi observado que a inibição da síntese do óxido nítrico inibiu o efeito gastroprotetor da baicaleína, sugerindo que o óxido nítrico está relacionado com o efeito da baicaleína sobre a mucosa gástrica. Santin et al. (2013) observaram que o óxido nítrico diminui a agregação de neutrófilos no tecido gástrico inflamado; este efeito também pode ser observado no presente estudo em que a migração de neutrófilos para a mucosa gástrica lesionada foi diminuída (determinação da atividade da MPO) com a baicaleína (v.o) (30 mg/kg), possivelmente devido a participação do óxido nítrico. O aumento na expressão de eNOS e liberação de óxido nítrico é responsável pela promoção do efeito gastroprotetor de alguns flavonoides (ABDEL, 2010; ARAB et al., 2015; ZAYACHKIVSKA et al., 2005).

O óxido nítrico e as prostaglandinas agem conjuntamente na proteção da mucosa gastrintestinal aumentando a secreção de muco e bicarbonato e inibindo a migração de

neutrófilos (KIM, 2014; TAKEUCHI, 2014; WALLACE, 1996). Hristovska et al. (2007) demonstraram que a prostaglandina E_2 causa vasodilatação através da ativação de eNOS.

As prostaglandinas são primordiais para manutenção da mucosa gástrica devido a sua ação sobre a secreção de muco e bicarbonato, por favorecer o fluxo sanguíneo e por inibir a adesão dos leucócitos ao endotélio vascular (PALILEO e KAUNITZ, 2011; TARNAWSKI, AHLUWALIA e JONES, 2013). A PGE_2 age protegendo a mucosa da ação lesiva do etanol devido ao aumento de guanosina-3-5'-monofosfato cíclica (GMPc) intracelular e pela produção de óxido nítrico. O GMPc, gerado da ativação da guanilato ciclase, pode ativar diversos alvos moleculares, como os canais para potássio sensíveis ao ATP. A ativação dos canais para potássio ATP-dependentes aumenta a entrada de K^+ para o interior, alterando o potencial de membrana da célula, provocando o fechamento dos canais de cálcio voltagem dependentes. Este fechamento nas células endoteliais bloqueia a entrada de cálcio na célula levando a vasodilatação (GLAVIN et al., 1996; SAKAI et al., 1995).

Os canais para K^+_{ATP} estão envolvidos em várias funções fisiológicas do estômago, como regulação do fluxo sanguíneo, secreção de ácido gástrico e contratilidade do estômago (TOROUDI et al., 1999) e o efeito das prostaglandinas sobre a mucosa gástrica é devido à ativação destes canais (MEDEIROS et al., 2008; PESKAR et al., 2002; SILVA et al., 2009).

O efeito gastroprotetor da baicaleína possui o envolvimento das prostaglandinas com ativação dos canais para potássio sensíveis ao ATP, devido a inibição do efeito gastroprotetor da baicaleína pela administração de indometacina pela via intraperitoneal, inibidor da síntese das prostaglandinas, e com glibenclamida, um bloqueador dos canais para potássio sensíveis ao ATP.

A produção do muco gástrico é a primeira linha de proteção da mucosa gástrica contra agentes ulcerogênicos (NIV e BANIC, 2014). O muco apresenta importante relação com o processo de cura em lesões agudas pela formação de uma capa mucoide que permite a re-epitelização do local lesionado (SZABO, 2014). O tratamento dos animais com baicaleína após ligadura do esfíncter pilórico promoveu aumento do muco gástrico. A baicaleína além de possuir efeito citoprotetor devido as suas ações anti-inflamatória e antioxidante, também apresenta importante papel no processo de cura através do aumento da produção de muco. Como comentado anteriormente, os grupamentos sulfidrilícos, prostaglandinas e óxido nítrico estão envolvidos nos mecanismos de ação da baicaleína sob a proteção da mucosa gástrica e, provavelmente, a secreção de muco gástrico através do tratamento com a baicaleína está relacionada com a síntese dos grupamentos sulfidrilícos, prostaglandinas e óxido nítrico.

Os receptores α_2 -adrenérgicos possuem importante papel na modulação da secreção e motilidade gástrica; quando estimulados pré-sinápticamente nos terminais colinérgicos do nervo vago promovendo a inibição da secreção de acetilcolina e consequente inibição da secreção de ácido gástrico pelas células parietais (GYIRES, TOTH e ZÁDORI, 2015; ZÁDORI et al., 2011). A ativação dos receptores α_2 -adrenérgicos tem sido descrita por inibir a secreção de ácido gástrico e diminuir o dano a mucosa gástrica em diferentes modelos de lesão gástrica (BALOGUN, DAMAZO e DE OLIVEIRA MARTINS, 2015; CHENG et al., 1981; KUNCHANDY, KHANNA, KULKARNI, 1985). Com o intuito de avaliar a participação destes receptores no efeito gastroprotetor da baicaleína, foi possível observar que quando os animais foram pré-tratados com ioimbina, um antagonista dos receptores α_2 -adrenérgicos não-seletivo, ocorreu redução do efeito protetor da baicaleína sob a mucosa gástrica. Este resultado evidencia que, provavelmente, a baicaleína esteja agindo nestes receptores, contribuindo para inibição da secreção gástrica, conferindo efeito protetor sobre a mucosa gástrica.

A participação dos receptores α_2 -adrenérgicos no efeito gastroprotetor de outras substâncias também já fora investigada (BALOGUN, DAMAZO e DE OLIVEIRA MARTINS, 2015; DE LACERDA NETO et al., 2016; LIRA et al., 2009; RIBEIRO et al., 2016b). De Lacerda Neto et al. (2016) demonstraram que o efeito gastroprotetor do extrato hidroalcoólico da *Caryocar coriaceum*, o qual possui como constituintes químicos os flavonoides rutina e quercetina, foi diminuído quando os receptores α_2 -adrenérgicos foram bloqueados pela ioimbina. O flavonoide quercetina, presente no extrato alcoólico da *Caryocar coriaceum*, age ativando estes receptores (KAUR, CHOPRA e SINGH, 2007), explicando o envolvimento dos receptores α_2 -adrenérgicos no mecanismo de gastroproteção deste extrato.

A secreção ácida gástrica constitui um dos fatores agressores da mucosa gástrica e juntamente com a pepsina contribui para o desenvolvimento de lesões gástricas. Por este motivo, os medicamentos comercializados e utilizados atualmente para o tratamento das úlceras gástricas são os fármacos antissecretórios, como os antagonistas dos receptores H_2 de histamina e os inibidores da bomba de prótons (SCHUBERT, 2016; SYED e NAQVI, 2016). A baicaleína além de apresentar efeito protetor da mucosa gástrica em úlceras gástricas induzidas por etanol acidificado, também apresentou efeito antissecretório de ácido gástrico, sendo responsável pela diminuição do volume de secreção e concentração de H^+ e aumento do pH da secreção gástrica, no modelo de ligadura de piloro.

O mecanismo antissecretório da baicaleína foi investigado no modelo de ligadura de piloro estimulado por histamina. A baicaleína inibiu a secreção ácida gástrica quando

estimulada por histamina, indicando que o efeito antissecretório da baicaleína envolve, provavelmente, o bloqueio da via histaminérgica das células parietais. A baicaleína também inibiu, parcialmente, a atividade da bomba de prótons *in vitro* (H^+,K^+ -ATPase), confirmando o efeito desta sobre as células parietais, inibindo a secreção de ácido gástrico.

Os flavonoides afzelina, quercitrina (DE BARROS et al., 2016), kolaviron (ONASANWO et al., 2011) e rutina (DUBEY et al., 2013), assim como a baicaleína, inibem a atividade *in vitro* da bomba de prótons, podendo ser comparados com os medicamentos da classe dos Inibidores da Bomba de Prótons (IBP). Estes são considerados os medicamentos mais eficazes para inibição da secreção gástrica e também os mais utilizados para tratamento de distúrbios secretórios gástricos (SCHUBERT, 2016; SYED e NAQVI, 2016).

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que a baicaleína:

- ✓ Previniu, de maneira dose-dependente, a formação de úlceras gástricas provocada pela administração de etanol acidificado, sendo esse efeito dependente dos grupamentos sulfidrílicos não-proteicos, óxido nítrico, prostaglandinas, canais para potássio sensíveis ao ATP e receptores α_2 -adrenérgicos;
- ✓ Inibiu o influxo de neutrófilos para o foco de lesão no tecido gástrico;
- ✓ Impediu a redução da concentração de glutathiona reduzida;
- ✓ Aumentou a produção de muco gástrico
- ✓ Diminuiu a secreção de ácido gástrico

Desta forma, a baicaleína demonstra ser uma substância promissora para prevenção das úlceras gástricas. A associação dos dados encontrados com o relato da literatura de que a baicaleína possui ação antibacteriana contra o *H. pylori* destaca a baicaleína como uma opção de monoterapia para tratamento das úlceras gástricas.

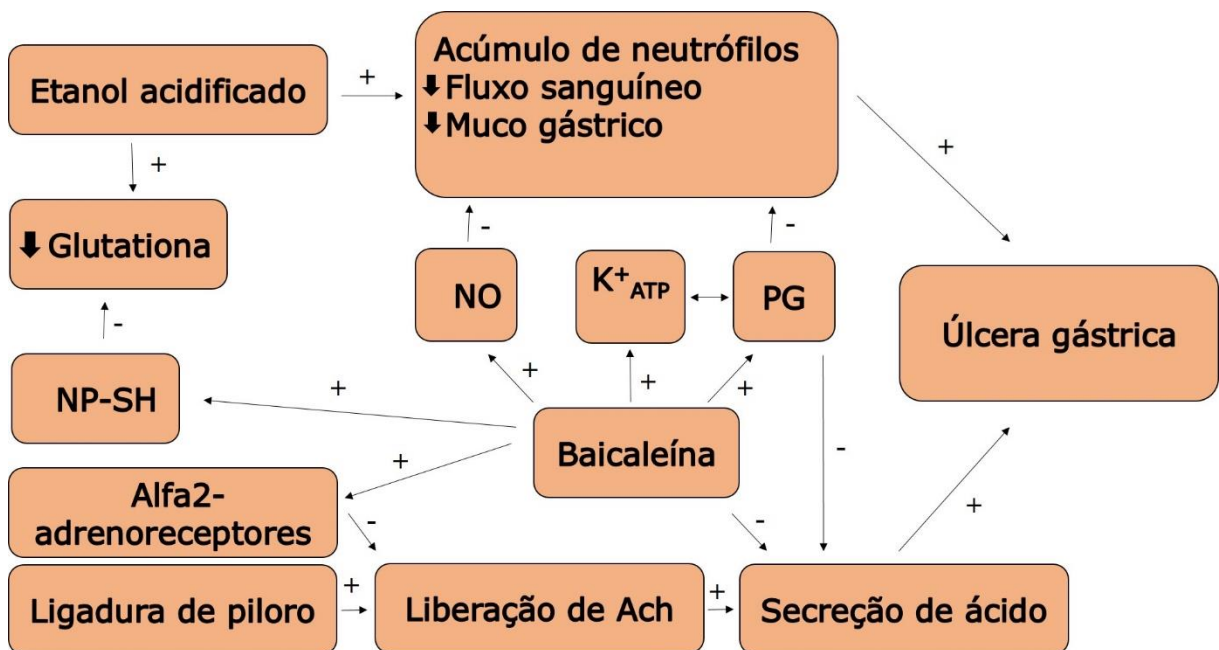


Figura 12. Esquema dos efeitos da baicaleína na mucosa gástrica.

8 PERSPECTIVAS

Estudos posteriores serão necessários com o intuito de avaliar o efeito curativo da baicaleína para tratamento das úlceras gástricas crônicas (úlceras induzidas por ácido acético), as quais são semelhantes a úlceras em humanos, assim como avaliar o efeito do tratamento com a baicaleína sobre a colonização da bactéria *H. pylori* no tecido gástrico.

9 REFERÊNCIAS

ABDEL, I.T.R. Gastroprotective effect of rutin against indomethacin-induced ulcers in rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 107, p. 742-750, 2010.

ABDELWAHAB, S.I.; MOHAN, S.; ABDULLA, M.A.; SUKARI, M.A.; ABDUL, A.B.; TAHA, M.M. The methanolic extract of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. and its major compound pinostrobin induces anti-ulcerogenic property in vivo: possible involvement of indirect antioxidant action. **J Ethnopharmacol**, v. 137, p. 963-970, 2011.

ALZHRANI, S.; LINA, T.T.; GONZALEZ, J.; PINCHUK, I.V.; BESWICK, E.J.; REYES, V.E. Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cells **World J Gastroenterol**, v. 20, p. 12767-12780, 2014.

ARAB, H.H.; SALAMA, S.A.; OMAR, H.A.; ARAFA, E.S.; MAGHRABI, I.A. Diosmin protects against ethanol-induced gastric injury in rats: novel anti-ulcer actions. **PLoS One**, v. 10, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0122417.

AVILA, J. R.; DE LA LASTRA, C. A.; MARTIN, M. J.; MOTILVA, V.; LUQUE, I.; DELGADO, D. Role of endogenous sulphhydryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. **Inflamm Res**, v. 45, p. 83-88, 1996.

BALOGUN, S.O.; DAMAZO, A.S.; DE OLIVEIRA MARTINS, D.T. *Helicteres sacarolha* A. St.- Hil. et al.: gastroprotective and possible mechanism of actions in experimental animals. **J Ethnopharmacol**, v. 166, p. 176-184, 2015.

BATISTA, L.M.; LIMA, G.R.; DE ALMEIDA, A.B.; MAGRI, L.P.; CALVO, T.R.; FERREIRA, A.L. Ulcer healing and mechanism(s) of action involved in the gastroprotective

activity of fractions obtained from *Syngonanthus arthrotrichus* and *Syngonanthus bisulcatus*. **BMC Complement Altern Med**, v.15, p. 391-400, 2015.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. Fisiologia: 6ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

BLANDIZZI, C. ; NATALE, G. ; COLUCCI, R.; CARIGNANI, D.; LAZZERI, G.; TACCA, M.D. Characterization of α_2 -adrenoceptor subtypes involved in the modulation of gastric acid secretion. **Eur J Pharmacol**, v. 278, p. 179-182, 1995.

BOCHORAKOVA, H.; PAULOVA, H.; SLANINA, J.; MUSIL, P.; TABORSKA, E. Main flavonoids in the root of *Scutellaria baicalensis* cultivated in Europe and their comparative antiradical properties. **Phytother Res**, v.17, p.640-644, 2003.

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

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. in Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 12ª Edição. United States of America: Mc Graw-Hill Companies, Inc., 2012.

BRZOZOWSKI, T., KONTUREK, P. C., DROZDOWICZ, D., KONTUREK, S. J., ZAYACHIVSKA, O., PAJDO, R., KWIECIEN, S., PAWLIK, W. W., HAHN, E. G. Grapefruit-seed extract attenuates ethanol- and stress-induced gastric lesions via activation of prostaglandin, nitric oxide and sensory nerve pathways. **World J Gastroenterol**, v.11, p. 6450–6458, 2005.

BURCI, L.M.; PEREIRA, I.T.; DA SILVA, L.M.; RODRIGUES, R.V.; FACUNDO, V.A.; MILITÃO, J.S.; SANTOS, A.R.; MARQUES, M.C.; BAGGIO, C.H.; WERNER, M.F.

Antiulcer and gastric antisecretory effects of dichloromethane fraction and piplartine obtained from fruits of *Piper tuberculatum* Jacq. in rats. **J Ethnopharmacol**, v. 21, p. 165-174, 2013.

CAMILLERI, M. Integrated upper gastrointestinal response to food intake. **Gastroenterol**, v. 131, p. 640-658, 2006.

CAMPOS, D. A.; DE LIMA, A.F.; RIBEIRO, S.R.; SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.; RAO, V.S.; SANTOS, F.A. Gastroprotective effect of a flavone from *Lonchocarpus araripensis* Benth. (Leguminosae) and the possible mechanism. **J Pharm Pharmacol**, v. 60, p. 391-397, 2008.

CARLSON, M.; RAAB, Y.; SEVEUS, L.; XU, S.; HALLGREN, R.; VENGE, P. Human neutrophil lipocalin is a unique marker of neutrophil inflammation in ulcerative colitis and proctitis, **Gut**, v. 50, p. 501-506, 2002.

CHEN, J.; LI, Z.; CHEN, A.Y.; YE, X.; LUO, H.; RANKIN, G.O.; CHEN, Y.C. Inhibitory effect of baicalin and baicalein on ovarian cancer cells. **Int J Mol Sci**, v. 14, p. 6012-6025, 2013.

CHEN, K.; ZHANG, S.; JI, Y.; LI, J.; AN, P.; REN, H.; LIANG, R.; YANG, J.; LI, Z. Baicalein inhibits the invasion and metastatic capabilities of hepatocellular carcinoma cells via down-regulation of the ERK pathway. **PLoS One**, v. 8, e72927, 2013.

CHEN, L. J.; GAMES, D. E.; JONES, J. Isolation and identification of four flavonoids constituents from the seeds of *Oroxylum indicum* by high-speed counter-current chromatography. **J Chromatogr**, v.988, p.95-105, 2003.

CHENG, H.C.; GLEASON, E.M.; NATHAN, B.A.; LACHMANN, P.J.; WOODWARD, J.K. Effects of clonidine on gastric acid secretion in the rat. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 217, p. 121-126, 1981.

CHOBOT, V.; HADACEK, F.; BACHMANN, G.; WECKWERTH, W.; KUBICOVA, L. Pro- and Antioxidant Activity of Three Selected Flavan Type Flavonoids: Catechin, Eriodictyol and Taxifolin. **Int J Mol Sci**, v.17, 2016. DOI:10.3390/ijms17121986

CZAPSKI, G.A.; CZUBOWICZ, K.; STROSZNAJDER, R.P. Evaluation of the antioxidative properties of lipoxygenase inhibitors. **Pharmacol Rep**, v. 64, p. 1179-1188, 2012.

DE BARROS, M.; DA SILVA, L.M.; BOEING, T.; SOMENSI, L.B.; CURY, B.J.; BURCI, L.M. Pharmacological reports about gastroprotective effects of methanolic extract from leaves of *Solidago chilensis* (Brazilian arnica) and its components quercitrin and afzelin in rodents. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 389, p. 403-417, 2016.

DE LACERDA NETO, L.J.; RAMOS, A.G.; SANTOS SALES, V.; DE SOUZA, S.D.; DOS SANTOS, A.T.; DE OLIVEIRA, L.R.; KERNTOPF, M.R.; DE ALBUQUERQUE, T.R.; COUTINHO, H.D.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; WANDERLEY, A.G.; DE MENEZES, I.R. Gastroprotective and ulcer healing effects of hydroethanolic extract of leaves of *Caryocar coriaceum*: Mechanisms involved in the gastroprotective activity. **Chem Biol Interact**, v. 261, p. 56-62, 2016.

DE YOUNG, L.M.; KHEIFETS, J.B. ; BALLARON, S.J.; YOUNG, J.M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents Actions**, v. 26, p. 335-341, 1989.

DUBEY,S.; GANESHPURKAR, A.; SHRIVASTAVA, A.; BANSAL, D.; DUBEY, N. Rutin exerts antiulcer effect by inhibiting the gastric proton pump. **Indian J Pharmacol**, v.45, p. 415-417, 2013.

FARRÉ, R.; TACK, J. Food and symptom generation in functional gastrointestinal disorders: physiological aspects. **Am J Gastroenterol**, v. 108, p. 698-706, 2013.

FIALKOW, L.; WANG, Y.; DOWNEY, G.P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. **Free Radic Biol Med**, v. 42, p. 153-164, 2007.

FONG, S.Y.; WONG, Y.C.; XIE, C.; ZUO, Z. Herb-drug interactions between *Scutellariae Radix* and mefenamic acid: Simultaneous investigation of pharmacokinetics, anti-inflammatory effect and gastric damage in rats. **J Ethnopharmacol**, v. 170, p. 106-116, 2015.

FORTE, J.G.; FORTE, G.M.; SALTMAN, P. K. + -stimulated phosphatase of microsomes from gastric mucosa. **J Cell Physiol**, v. 69, p. 293- 304, 1967.

FU, Y.U., LUO, J., JIA, Z., ZHEN, W., ZHOU, K., GILBERT, E., LIU, D. Baicalein Protects against Type 2 Diabetes via Promoting Islet β -Cell Function in Obese Diabetic Mice. **Int J Endocrinol**, 2014. DOI: 10.1155/2014/846742.

GLAVIN, G.B.; SZABO, S.; JOHNSON, B.R.; XING, P.L.; MORALES, R.E.; PLEBANI, M.; NAGY, L. Isolated rat gastric mucosal cells: optimal conditions for cell harvesting, measures of viability and direct cytoprotection. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 276, p. 1174-1179, 1996.

GOC, A.; NIEDZWIECKI, A.; RATH, M. In vitro evaluation of antibacterial activity of phytochemicals and micronutrients against *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia garinii*. **J Appl Microbiol**, v. 119, p. 1561-1572, 2015.

GYIRES, K.; TOTH, V.E.; ZADORI, Z.S. Gastric mucosal protection: from the periphery to the central nervous system. **J Physiol Pharmacol**, v.66, p. 319-329, 2015.

HAN, J.; LEE, S.H.; GIEBISCH, G.; WANG, T. Potassium Channelopathies and Gastrointestinal Ulceration. **Gut Liver**, v. 10, p. 881-889, 2016.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol Ther**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HE, X.; WEI, Z.; ZHOU, E.; CHEN, L.; KOU, J.; WANG, J. Baicalein attenuates inflammatory responses by suppressing TLR4 mediated NF- κ B and MAPK signaling pathways in LPS-induced mastitis in mice. **Int Immunopharmacol**, v. 28, p. 470-476, 2015.

HEO, H.J.; KIM, D.O.; CHOI, S.J.; SHIN, D.H.; LEE, C.Y. Potent inhibitory effect of flavonoids in *Scutellaria baicalensis* on amyloid beta protein-induced neurotoxicity. **J Agric Food Chem**, v.52, p.4128-4132, 2004.

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

HRISTOVSKA, A.M.; RASMUSSEN, L.E.; HANSEN, P.B.; NIELSEN, S.S.; NÜSING, R.M.; NARUMIYA, S.; VANHOUTTE, P.; SKOTT, O.; JENSEN, B.L. Prostaglandin E2 induces vascular relaxation by E-prostanoid 4 receptor-mediated activation of endothelial nitric oxide synthase. **Hypertension**, v. 50, p. 525-530, 2007.

HU, S.; CHEN, Y.; WANG, Z.F.; MAO-YING, Q.L.; MI, W.L.; JIANG, J.W. The Analgesic and Antineuroinflammatory Effect of Baicalein in Cancer-Induced Bone Pain. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2015. DOI: 10.1155/2015/973524

HUANG, C.Y., LAI, W.Y.; SUN, M.F.; LIN, C.C.; CHEN, B.C.; LIN, H.J.; CHANG, C.M.; YANG, C.H.; HUANG, K.C.; YEN, H.R. Prescription patterns of traditional Chinese medicine

for peptic ulcer disease in Taiwan: A nationwide population-based study. **J Ethnopharmacol**, v. 24, p. 311-320, 2015.

HUANG, Y.; TSANG, S.Y.; YAO, X.; CHEN, Z.Y. Biological properties of baicalein in cardiovascular system. **Curr Drug Targets Cardivasc Disord**, v.5, p.177-184, 2005.

KANGWAN, N.; PARK,J.M.; KIM, E.H.; HAHM, K.B. Quality of healing of gastric ulcers: Natural products beyond acid suppression. **World J Gastrointest Pathophysiol**, v. 5, p. 40-47, 2014.

KAPLAN, K.A.; ODABASOGLU, F.; HALICI, Z.; HALICI, M.; CADIRCI, E.; ATALAY, F. AYDIN, O.; CAKIR,A. Alpha-lipoic acid protects against indomethacin-induced gastric oxidative toxicity by modulating antioxidant system. **J Food Scie**, v.77, p. H224-H230, 2012.

KATO, S.; AIHARA, E.; NAKAMURA, A.; XIN, H.; MATSUI, H.; KOHAMA, K.; TAKEUCHI, K. Expression of vanilloid receptors in rat gastric epithelial cells: role in cellular protection. **Biochem Pharmacol**, v. 15, p. 1115-1121, 2003.

KAUR, R.; CHOPRA, K.; SINGH, D.Role of $\alpha 2$ receptors in quercetin-induced behavioral despair in mice, **J Med Food**, v.10, p. 165-168, 2007.

KIM, S.F. The nitric oxide-mediated regulation of prostaglandin signaling in medicine. **Vitam Horm**, v. 96, p.211-245, 2014.

KIMURA, Y.; MATSUSHITA, N.; OKUDA, H. Effects of baicalein isolated from *Scutellaria baicalensis* on interleukin 1 beta- and tumor necrosis factor alpha-induced adhesion molecule expression in cultured human umbilical vein endothelial cells. **J Ethnopharmacol**, v.57, p.63-67, 1997.

KOIZUMI, S.; ODASHIMA, M.; OTAKA, M.; JIN, M.; LINDEN, J.; WATANABE, S.; Ohnishi, H. Attenuation of gastric mucosal inflammation induced by indomethacin through activation of the A_{2A} adenosine receptor in rats. **J Gastroenterol**, v. 44, p. 419-425, 2009.

KUBO, K.; UEHARA, H.; KUBOTA, T.; NOZU, T.; MORUYA, M.; WATANABE, Y.; SHOJI, E.; SANTOS, S. B.; HARADA, K.; KONGO, Y. Effects of ranitidine on gastric vesicles containing H⁺, K⁺ - ATPase adenosine triphosphatase in rats. **Scand J Gastroenterol**, v. 30, p. 944-951, 1995.

KUNCHANDY, J.; KHANNA, S.; KULKARNI, S.K. Effect of α_2 agonists clonidine, guanfacine and B-HT 920 on gastric acid secretion and ulcers in rats. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 275, p. 123-138, 1985.

KWIECIEN, S.; JASNOS, K.; MAGIEROWSKI, M.; SLIWOWSKI, Z.; PAJDO, R.; BRZOZOWSKI, R.; MACH, T.; WOJCIK, D.; BRZOZOWSKI, T. Lipid peroxidation, reactive oxygen species and antioxidative factors in the pathogenesis of gastric mucosal lesions and mechanism of protection against oxidative stress - induced gastric injury. **J Physiol Pharmacology**, v. 65, p. 613-622, 2014.

KYO, R.; NAKAHATA, N.; SAKAKIBARA, I.; KUBO, M.; OHIZUMI, Y. Baicalin and baicalein, constituents of an important medicinal plant, inhibit intracellular Ca²⁺ elevation by reducing phospholipase C activity in C6 rat glioma cells. **J Pharm Pharmacol**, v. 50, p. 1179-1182, 1998.

LA CASA, C.; VILLEGAS, I.; ALARCÓN DE LA LASTRA, C.; MOTILVA, V.; CALERO, M.J.M. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **J Ethnopharmacol**, v. 71, p. 45-53, 2000.

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

LEE, I.K.; KANG, K.A.; ZHANG, R.; KIM, B.J.; KANG, S.S.; HYUN, J.W. Mitochondria protection of baicalein against oxidative damage via induction of manganese superoxide dismutase, **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 31, p. 233-241, 2011.

LIANG, R.R.; ZHANG, S.; QI, J.A.; WANG, Z.D.; LI, J.; LIU, P.J.; HUANG, C.; LE, X.F.; YANG, J.; LI, Z.F. Preferential inhibition of hepatocellular carcinoma by the flavonoid baicalein through blocking MEK-ERK signaling. **Int j Oncol**, v. 41, p. 969–978, 2012.

LIRA, S.R.S.; RAO,V.S.; CARVALHO,A.C.S.; GUEDES, M. M.; DE MORAIS, T. C. ; LIMA, A. F.; SANTOS, F. A. Gastroprotective effect of lupeol on ethanol-induced gastric damage and the underlying Mechanism. **Inflammopharmacol**, v.17, p. 221–228, 2009.

LI-WEBER, M. New therapeutic aspects of flavones: the anticancer properties of *Scutellaria* and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin. **Cancer Treat Rev**, v. 35, p. 57-68, 2009.

LUO, X.J.; LIU, B.; DAI, Z.; YANG, Z.C.; PENG, J. Stimulation of calcitonin gene-related peptide release through targeting capsaicin receptor: a potential strategy for gastric mucosal protection. **Dig Dis Sci**, v. 58, p. 320-325, 2013.

MAGIEROWSKI, M.; MAGIEROWSKA, K.; KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI,T. Gaseous Mediators nitric oxide and hydrogen sulfide in the mechanism of gastrointestinal integrity, protection and ulcer healing. **Molecules**, v.20, 9099-9123, 2015.

MATSUMOTO, T.; TAKAHASHI, T.; YAMADA, H. A novel approach for screening of new anti-*Helicobacter pylori* substances. **Biol Pharm Bull**, v. 31, p. 143-145, 2008.

MEDEIROS, J.V.R., GADELHA, G.G., LIMA, S.J., GARCIA, J.A., SOARES, P.M.G., SANTOS, A.A., BRITO, G.A.C., RIBEIRO, R.A., SOUZA, M.H.L.P. Role of the NO/cGMP/KATP pathway in the protective effects of sildenafil against ethanol-induced gastric damage in rats. **Br J Pharmacol**, v.153, p. 721–727, 2008.

MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. **Jpn J Pharmacol**, v. 33, p. 939-945, 1983.

MOTA, K.S.L.; DIAS, G.E.N.; PINTO, M.E.F.; LUIZ-FERREIRA, A.; A.R.M. SOUZA-BRITO, A.; HIRUMA-LIMA, C.A. Flavonoids with gastroprotective activity. **Molecules**, v. 14, p. 979-1012, 2009.

MU, J.; LIU, T.; JIANG, L.; WU, X.; CAO, Y.; LI, M.; DONG, Q.; LIU, Y.; XU, H. The Traditional Chinese Medicine Baicalein Potently Inhibits Gastric Cancer Cells. **J Cancer**, v.7, p. 453-461, 2016.

MU, X.; He, G.; CHENG, Y.; LI, X.; Xu B.; Du G. Baicalein exerts neuroprotective effects in 6- hydroxydopamine-induced experimental parkinsonism *in vivo* and *in vitro*. **Pharmacol Biochem Behav**, v.92, p.642-648, 2009.

NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Oxidative stress involvement and gene expression in indomethacin-induced gastropathy. **Redox Rep**, v. 11, p.243-253, 2006.

NIV, Y.; BANIĆ, M. Gastric barrier function and toxic damage. **Dig Dis**, v. 32, p.235–242, 2014.

ONASANWO, S.A.; SINGH, N.; OLALEYE, S.B.; PALIT, G. Anti-ulcerogenic and proton pump (H⁺, K⁺ ATPase) inhibitory activity of Kolaviron from *Garcinia kola* Heckel in rodents. **Indian J Exp Biol**, v.49, p.461-468, 2011.

ORFALI, G.D.; DUARTE, A.C.; BONADIO, V.; MARTINEZ, N.P.; DE ARAÚJO, M.E.; PRIVIERO, F.B. Review of anticancer mechanisms of isoquercitin. **World J Clin Oncol**, v. 7, p. 189-199, 2016.

PALILEO, C.; KAUNITZ, J.D. Gastrointestinal defense mechanisms. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 27, p. 543-548, 2011.

PARK, S.; HAHM, K.B.; OH, T.Y.; JIN, J.H.; CHOUE, R. Preventive effect of the flavonoid, wogonin, against ethanol-induced gastric mucosal damage in rats, **Dig Dis Sci**, v.49, p. 384-394, 2004.

PATWARDHAN, R.S.; SHARMA, D.; THOH, M.; CHECKER, R.; SANDUR, S.K. Baicalein exhibits anti-inflammatory effects via inhibition of NF- κ B transactivation. **Biochem Pharmacol**, v. 108, p. 75-89, 2016.

PESKAR, B.M.; EHRLICH, K.; PESKAR, B.A. Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in the rat, **J Pharmacol Exp Ther**, v. 301, p. 969-974, 2001.

RAMSAY, P.T. ; CARR, A. Gastric acid and digestive physiology. **Surg Clin North Am**, v. 91, p. 977-982, 2011.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. Farmacologia. 8^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

REPETTO, M. G.; LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, p. 523-534, 2002.

RIBEIRO, A.R.; DINIZ, P.B.; PINHEIRO, M.S.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R.L.; THOMAZZI, S.M. Gastroprotective effects of thymol on acute and chronic ulcers in rats: The role of prostaglandins, ATP-sensitive K(+) channels, and gastric mucus secretion. **Chem Biol Interact**, v. 244, p. 121-128, 2016.

RIBEIRO, K.A.; CHAVES, H.V.; FILHO, S.M.; PINTO, I.R.; MONTEIRO, D.A.; MATOS, S.O.; SANTI-GADELHA, T.; GADELHA, C.A.; LACERDA, J.T.; AGUIAR, L.M.;

PEREIRA, K.M.;BENEVIDES, N.M.; PINTO, V.P.; FILHO, G.C.; BEZERRA, M.M.; SILVA, A.A. Alpha-2 adrenergic and opioids receptors participation in mice gastroprotection of abelmoschus esculentus lectin. **Curr Pharm Des**, v.22, p. 4736-4742, 2016.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J.E.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A.J. Cytoprotection by prostaglandins in rats.Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. **Gastroenterol**, v. 77, p. 433–443, 1979.

SAKAI, H.; KUMANO, E.; IKARI, S.; TAKEGUCHI, N. A gastric housekeeping Cl⁻ channel activated via prostaglandin EP3 receptor-mediated Ca²⁺/nitric oxide/cGMP pathway. **J Biol Chem**, v.270, p. 18781-18785, 1995.

SANTIN, J.R.; DAUFENBACK MACHADO, I.; RODRIGUES, S.F.; TEIXEIRA, S.; MUSCARÁ, M.N.; LINS GALDINO, S.; DA ROCHA PITTA, I.; FARSKY, S.H. Role of an indole-thiazolidine molecule PPAR pan-agonist and COX inhibitor on inflammation and microcirculatory damage in acute gastric lesions. **PLoS One**, v.8, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0076894

SCHUBERT, M. Gastric acid secretion. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 32, p. 452–460, 2016.

SCHUBERT, M.L. Functional anatomy and physiology of gastric secretion. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 31, p. 479-485, 2015.

SEDLAK, J., LINDSAY, R.H. Estimation of total prote in bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissues with Ellman’s reagent. **Anal Biochem**, v. 25, 192–205, 1968.

SERPA, R.; FRANÇA, E.J.; FURLANETO-MAIA, L.; ANDRADE, C.G.; DINIZ, A.; FURLANETO, M.C. In vitro antifungal activity of the flavonoid baicalein against *Candida* species. **J Med Microbiol**, v. 61, p. 1704-1708, 2012.

SHAY, H.; KOMAROV, S. A.; FELLS, S.S.; MERANZE, D.; GRUENSTEIN, M.; SIPLET, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. **Gastroenterol**, v. 5, p. 43-61, 1945.

SHEN, Y.C.; CHIOU, W.F.; CHOU, Y.C.; CHEN, C.F. Mechanisms in mediating the anti-inflammatory effects of baicalin and baicalein in human leukocytes. **Eur J Pharmacol**, v. 465, p. 171-181, 2003.

SILVA, M.I.; MOURA, B.A.; NETO, M.R.; ADA, R.T. ROCHA, N.F.; DE CARVALHO, A.M. Gastroprotective activity of isopulegol on experimentally induced gastric lesions in mice: investigation of possible mechanisms of action, **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 380, p. 233-245, 2009.

SILVERTHORN, D.U. Fisiologia humana: uma abordagem integrada. 5ªed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

SITHISARN, P.; MICHAELIS, M.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; CINATL, J.JR. Differential antiviral and anti-inflammatory mechanisms of the flavonoids biochanin A and baicalein in H5N1 influenza A virus-infected cells. **Antiviral Res**, v. 97, p. 41-48, 2013.

SONE, Y., KUMADA, T., TOYODA, H., YOKOYAMA, M., KATO, M., ASAKA, M. Eradicating *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease reduces medical costs in the community. **Helicobacter**, v.13, p. 346-351, 2008.

STERMER E. Alcohol consumption and the gastrointestinal tract. **Isr Med Assoc J**, v. 4, p. 200-202, 2002.

STRAND, D.S.; KIM, D.; PEURA, D.A. 25 Years of Proton Pump Inhibitors: A Comprehensive Review. **Gut Liver**, 2016. DOI: 10.5009/gnl15502

SUN, S.B.; MATSUMOTO, T.; YAMADA, H. Effects of a polysaccharide fraction from the roots of *Bupleurum folcatum* L. on experimental gastric ulcer models in rats and mice. **J Pharm Pharmacol**, v.43, p.699-704, 1991.

SYED, A. A.; NAQVI, S. H. A. Proton pump inhibitors use; beware of side-effects. **J Pak Med Assoc**, v. 66, p. 1314-1318, 2016.

SZABO, S."Gastric cytoprotection" is still relevant. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 29, p.124-132, 2014.

TAIMING, L.; XUEHUA, J. Investigation of the absorption mechanisms of baicalin and baicalein in rats. **J Pharm Sci**, v. 95, p. 1326-1333, 2006.

TAKASE, H.; IMANISHI, MIURA, O.; YUMIOKA, E.; WATANABE, H. Features of the anti-ulcer effects of Oren-gedoku-to (a traditional Chinese medicine) and its component herb drugs. **Jpn J Pharmacol**, v. 49, p. 301-308, 1989.

TAKEUCHI, K. Gastric cytoprotection by prostaglandin E₂ and prostacyclin: relationship to EP1 and IP receptors. **J Physiol Pharmacol**, v. 65, p. 3-14, 2011.

TARNAWSKI, A.; AHLUWALIA, A.; JONES, M.K. Gastric cytoprotection beyond prostaglandins: cellular and molecular mechanisms of gastroprotective and ulcer healing actions of antacids. **Curr Pharm Des**, v. 19, p. 126-132, 2013.

TOROUDI, H.P.; RAHGOZAR, M.; BAKHTIARIAN, A.; DJAHANGUIRI, B. Potassium channel modulators and indomethacin-induced gastric ulceration in rats. **Scand J Gastroenterol**, v.34, p. 962-966, 1999.

TSAI, C.L.; LIN, Y.C.; WANG, H.M.; CHOU, T.C. Baicalein, an active component of *Scutellaria baicalensis*, protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats, **J Ethnopharmacol**, v. 153, p. 197-206, 2014.

TYTGAT, G.N. Etiopathogenetic principles and peptic ulcer disease classification. **Dig Dis**, v. 29, p. 454-458, 2011.

UEDA, S.; YOSHIKAWA, T.; TAKAHASHI, S.; ICHIKAWA, H.; YASUDA, M.; OYAMADA, H.; TANIGAWA, T.; SUGINO, S.; KONDO, M. Role of free radicals and lipid peroxidation in gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. **Scand J Gastroenterol Suppl**, v. 162, p. 55-58, 1989.

URUSHIDANI, T.; MUTO, Y.; NAGAO, T.; YAO, X.; FORTE, J.G. ME-3407, a new antiulcer agent, inhibits acid secretion by interfering with redistribution of H(+)-K(+)-ATPase. **Am J Physiol**, v. 272, p. G1122-G1134, 1997.

USTUN, O.; ELIK, B. O.; AKYON, Y.; ABBASOGLU, U.; YESILADA, E. Flavonoids with anti- *Helicobacter pylori* activity from *Cistus laurifolius* leaves. **J Ethnopharmacol**, v. 108, p. 457–46, 2006.

VEZZA, T.; RODRÍGUEZ-NOGALES, A.; ALGIERI, F.; UTRILLA, M.P.; RODRIGUEZ-CABEZAS, M.E.; GALVEZ, J. Flavonoids in Inflammatory Bowel Disease: A Review. **Nutrients**, 2016. DOI: 10.3390/nu8040211.

WAISUNDARA, V. Y.; TAN, B. K.; HUANG, D. Baicalin reduces mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 25, p. 671–677, 2009.

WALLACE, J.L. Cooperative modulation of gastrointestinal mucosal defence by prostaglandins and nitric oxide. **Clin Invest Med**, v. 19, p. 346-351, 1996.

WANG, A.M.; KU, H.H.; LIANG, Y.C.; CHEN, Y.C.; HWU, Y.M.; YEH, T.S. The autonomous notch signal pathway is activated by baicalin and baicalein but is suppressed by niclosamide in K562 cells. **J Cell Biochem**, v. 106, p. 682–692, 2009.

WANG, H.; HUI, K. M.; CHEN, Y.; XU, S.; WONG, J. T.; XUE, H. Structure-activity relationships of flavonoids, isolated from *Scutellaria baicalensis*, binding to benzodiazepine site of GABA(A) receptor complex. **Planta Med.**, v.68, n.12, p.1059-62, 2002.

WANG, L.; LING, Y.; CHEN, Y. Flavonoid baicalein suppresses adhesion, migration and invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cells. **Cancer Lett**, v. 297, p. 42–48, 2010.

WU, B.; LI, J.; HUANG, D.; WANG, W.; CHEN, Y.; LIAO, Y. Baicalein mediates inhibition of migration and invasiveness of skin carcinoma through Ezrin in A431 cells. **BMC Cancer**, v. 11, p. 527, 2011.

YANDRAPU, H.; SAROSIEK, J. Protective Factors of the Gastric and Duodenal Mucosa: An Overview. **Curr Gastroenterol Rep**, v. 17, p. 24, 2015.

YANG, L.P.; SUN, H.L.; WU, L.M.; GUO, X.J.; DOU, H.L.; TSO, M.O. Baicalein reduces inflammatory process in a rodent model of diabetic retinopathy. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 50, p. 2319-2327, 2009.

ZÁDORI, Z.S.; SHUJAA, N.; BRANCATI, S.B.; HEIN, L.; GYIRES, K. Both $\alpha 2B$ - and $\alpha 2C$ adrenoceptor subtypes are involved in the mediation of centrally induced gastroprotection in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 669, p. 115-120, 2011.

ZAYACHKIVSKA, O. S., KONTUREK, S. J., DROZDOWICZ, D., KONTUREK, P. C., BRZOZOWSKI, T., GHEGOTSKY, M. R. Gastroprotective effects of flavonoids in plant extracts. **J Physiol Pharmacol**, v. 56, p. 219–231, 2005.

ZHANG, X.; ZHU, Y.; CHEN, X.; ZHANG, Y.; JIA, Y.; LIU, Y.; XIAO, L. Effects of baicalein on apoptosis, cell cycle arrest, migration and invasion of osteosarcoma cells. **In immunopharmacol**, v. 21, p. 301–308, 2014.

10 ANEXO 1

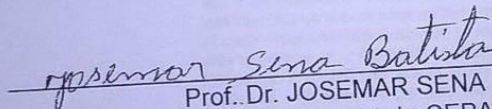


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES PROTETORA E CICATRIZANTE DA BAICALEÍNA NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS NORMOGLICÊMICOS E HIPERGLICÊMICOS" Sob Coordenação da Prof.^a Dr.^a Sara Maria Thomazzi (protocolo CEPA 09/2015) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe, em reunião realizada dia 25/08/2015.

São Cristóvão, 25 de agosto de 2015.



Prof.^a Dr.^a JOSEMAR SENA BATISTA
Coordenador do CEPA/UFS

Cidade Universitária "Prof. Aloísio de Campos"
Jardim Rosa Elze - São Cristóvão - SE
49100-000
Fones: 3212 6661/6606

11 ANEXO 2



The effects of baicalein on gastric mucosal ulcerations in mice:
Protective pathways and anti-secretory mechanisms



Ana Roseli S. Ribeiro^a, José Diego do Nascimento Valença^a, Jeferson da Silva Santos^a,
Thaise Boeing^b, Luisa Mota da Silva^b, Sérgio Faloni de Andrade^b,
Ricardo L.C. Albuquerque-Júnior^c, Sara Maria Thomazzi^{a,*}

^a Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe, Av. Marechal Rondon, Cidade Universitária, CEP 49100-000 São Cristóvão, Sergipe, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Rua Uruguai, 458, CEP 88302-202 Itajaí, Santa Catarina, Brazil

^c Instituto de Tecnologia e Pesquisa-ITP, Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas, 300, CEP 49032-490 Aracaju, Sergipe, Brazil