



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

**POLYANA BORGES FRANÇA DINIZ**

**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NA  
GASTROPROTEÇÃO INDUZIDA PELO EXTRATO  
ETANÓLICO DA ENTRECASCA DA *Caesalpinia  
pyramidalis* TUL.**

**SÃO CRISTÓVÃO  
2013**

**POLYANA BORGES FRANÇA DINIZ**

**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NA  
GASTROPROTEÇÃO INDUZIDA PELO EXTRATO  
ETANÓLICO DA ENTRECASCA DA *Caesalpinia  
pyramidalis* TUL.**

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

**Orientador:** Profa. Dra. Sara Maria Thomazzi  
**Co-orientador:** Profa. Dra. Cristiane Bani Corrêa

**SÃO CRISTÓVÃO**  
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

D585a      Diniz, Polyana Borges França  
Avaliação de mecanismos envolvidos na gastroproteção induzida pelo extrato etanólico da entrecasca da *Caesalpinia pyramidalis* Tul. / Polyana Borges França Diniz ; orientadora Sara Maria Thomazzi. – São Cristóvão, 2013.  
62 f.

Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Sergipe, 2013.

1. Gastroproteção. 2. Úlcera gástrica. 3. *Caesalpinia pyramidalis*. 4. Sulfeto de hidrogênio. 5. Óxido nítrico. I. Thomazzi, Sara Maria, orient. II. Título.

CDU 612.235/.326

**POLYANA BORGES FRANÇA DINIZ**

**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NA  
GASTROPROTEÇÃO INDUZIDA PELO EXTRATO  
ETANÓLICO DA ENTRECASCA DA *Caesalpinia  
pyramidalis* TUL.**

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

**Orientadora: Profa. Dra. Sara Maria Thomazzi**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Cristiane Bani Corrêa**

**1º Examinador: Josemar Sena Batista**

**2º Examinador: Enilton A. Camargo**

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, irmãos, ao meu esposo e amigo Jonh e a minhas filhas Iza e Leka que compreenderam a minha ausência de muitos dias, amo vocês.

A amiga Rose, que em todos os momentos esteve presente, incansavelmente. Esse trabalho mais uma vez É NOSSO!!!

## AGRADECIMENTOS

Nenhuma obra é fruto do trabalho individual. Por isso sou reconhecida aos coautores que participaram, pois sem a ajuda de todos este trabalho não seria realidade.

A Deus, por ter permitido a realização de mais um sonho na minha vida, sem ele não somos nada.

Profa. Sara Maria Thomazzi, por todos os conselhos pela oportunidade e pela magistral orientação. Agradeço pela acolhida e incentivo. Deus a abençoe sempre!!!

Aos professores em especial, Enilton Camargo e Charles Estevam, Cristiane Bani, pelas conversas e conselhos e principalmente pelo apoio de um ombro amigo que me colheu muitas vezes, nunca os esquecerei, como exemplo de professores.

A Cristiane Bani, a moça calada que entrou em nosso laboratório se fazendo de tímida, mas, com grande capacidade profissional, apaixonada pela pesquisa me envolveu com seu canto que não é da “sereia”, mas nos envolve e prende para esse mundo maravilhoso da descoberta que terminei por me apaixonar, acho que ganhei muito com sua vinda. Obrigada pelas sabatinas, pela paciência, pelo carinho em querer nos ensinar os longos experimentos. Sempre me lembrarei dela como exemplo de orientadora e professora.

Aos amigos de laboratório, em especial ao Jandson, Clio, Gabi, Eró e ao Ricardo, que sempre estiveram comigo ajudando-me nas ocasiões em que mais precisei obrigada pelo companheirismo e amizade.

Rose, a coisa não acontece por acaso principalmente quando nos encontramos no corredor da UFS... obrigada, AMIGA! Por tentar me explicar os experimentos, por todo apoio, durante toda essa jornada, foi muito gratificante a realização de todos os nossos trabalhos, mesmo com algumas dificuldades, rimos, choramos, lemos salmos... O bom disso tudo é que aprendemos juntas não só o que envolve a pesquisa mais muitas lições de vida. Não te esquecerei...

Aos meus familiares, irmãos que se resume no total de sete, tias, Adeilda, agradeço a todos pelo incentivo e carinho.

Aos amigos que fiz na UFS, incluindo professores e alunos pelas boas idéias e incentivo.

Aos colaboradores, Gilmara e Renivan da secretaria do PROCFIS, o meu muitíssimo obrigado por todos os gestos de carinho e amizade ao longo dessa jornada, vocês são pessoas especiais deste programa.

Aos animais que de certa forma doaram suas vidas para a realização de todo esse projeto.

Aos coordenadores Prof. Enilton Camargo e Daniel Badauê por incentivar os alunos no âmbito da pesquisa, parabéns! pelo esforço em fazer desse o programa de nível excelente, vocês vão longe!!

Ao Sr. Galego, pela dedicação no cuidado aos nossos animais, bem como a solicitude e presteza em nos ajudar sempre que necessário.

A CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

“Dizem que o tempo muda tudo, mas não é verdade”. “Fazer coisas é que muda algo, não fazer nada deixa as coisas do jeito que estão.”

*Dr House*

“Seja a mudança que você deseja ver no mundo”

*Mahatma Gandhi*

## LISTA DE FIGURAS

Fígura 1: Estômago dividido nas respectivas camadas .....	03
Fígura 2: <i>Caesalpinia pyramidalis</i> Tul. (Fabaceae) .....	18
Fígura 3: Modelo de úlcera gástrica induzida por etanol .....	27
Fígura 4: Determinação do papel do óxido nítrico .....	28
Fígura 5: Determinação do papel do sulfeto de hidrogênio .....	29
Fígura 6: Cortes histológicos tecido gástrico ulcerado corado com hematoxilina e eosina .....	32
Fígura 7: Imagens representativa de cortes histológicos de mastócitos mucosos no tecido gástrico ulcerado corados com safranina/alcian blue/azul toluidina .....	34
Fígura 8: Expressão de IL-4 no tecido gástrico ulcerado .....	36
Fígura 9: Expressão de iNOS no tecido gástrico ulcerado .....	37
Fígura 10: Análise por citometria de fluxo da expressão de iNOS e IL-4 no tecido gástrico ulcerado .....	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos de tratamento utilizados para a avaliação do papel do óxido nítrico .....	22
Tabela 2: Grupos de tratamento utilizados para a avaliação do papel do sulfeto de hidrogênio .....	24
Tabela 3: Análise quantitativa das alterações morfológicas do tecido gástrica ulcerado .....	31
Tabela 4: Percentual dos diferentes tipos de mastócitos no tecido gástrico .....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	.....	alcian blue
AINES	.....	Anti-inflamatório não esteroidal
AMPc	.....	adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	.....	Análise de variância
AT	.....	azul toluidina
CAT	.....	catalase
CBS	.....	cistatonina beta sintetase
CD34	.....	célula hematopoiética
CEPA	.....	Comitê de ética em pesquisa animal
COX	.....	ciclo-oxigenase
CSE	.....	cistationina alfa liase
CTMC	.....	Mastócitos do tecido conjuntivo
E.P.M	.....	Erro padrão da média
EARP	.....	Programa de Imagens
ECL	.....	Células enterocromafins
EEE	.....	Extrato etanólico da entrecasca
eNOS	.....	óxido nítrico sintase endotelial
EP3	.....	receptor prostaciclina
EROS	.....	Espécies reativas de oxigênio
GCs	.....	guanilato ciclase solúvel
GM-CSF	.....	fator estimulação de macrófago
GMPc	.....	guanosinmonofosfato cíclico
GSH	.....	glutathiona
GTP	.....	guanilato trifosfato
H <sub>2</sub> S	.....	sulfeto de hidrogênio
IFN- $\gamma$	.....	interferon gama
IL	.....	Interleucina
ILU	.....	índice de lesão ulcerativa
iNOS	.....	óxido nítrico sintase induzível
IP3	.....	Trifosfato de inositol
L-NAME	.....	N-nitro-L-arginina metil éster
MMC	.....	Mastócitos mucosos
NaOH	.....	Hidróxido de sódio
nNOS	.....	óxido nítrico sintase neuronal
NO	.....	óxido nítrico
OMS	.....	Organização Mundial de Saúde
PAF	.....	fator de ativação plaquetário

PAG	.....	Propagilglicina
PG	.....	prostaglandina
PGE	.....	prostaglandina E
PGI	.....	prostaciclina
PKG	.....	proteína quinase
S	.....	Safranina
SBACAL	.....	sociedade brasileira de cuidados com animais de laboratório
SCF	.....	fator célula tronco
SOD	.....	superóxido dismutase
SUS	.....	Sistema único de saúde
TH-1	.....	células T helper tipo 1
TNF- $\alpha$	.....	fator de necrose tumoral alfa

## RESUMO

AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NA GASTROPROTEÇÃO INDUZIDA PELO EXTRATO ETANÓLICO DA ENTRECASCA DA *Caesalpinia pyramidalis* TUL. DINIZ, P.B.F.; São Cristóvão, 2013.

A *Caesalpinia pyramidalis*, planta endêmica da região do Nordeste é utilizada popularmente para tratamento de diversos distúrbios patológicos e possui ação anti-inflamatória, anti-nociceptiva e gastroprotetora. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito gastroprotetor do extrato da entrecasca da *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) em modelos de úlcera aguda induzidas por etanol em ratos Wistar. Os animais ulcerados foram tratados com EECp na dose de 100 mg/kg, com L-NAME (bloqueador de óxido nítrico) e Propargilglicina (bloqueador de sulfeto de hidrogênio). Para todos os tratamentos foi avaliado o papel de mediadores gasosos como óxido nítrico (NO) e sulfeto de hidrogênio H<sub>2</sub>S, e também a participação de mastócitos e de moléculas envolvidas no processo inflamatório como a iNOS e a citocina IL-4. Na avaliação dos de NO observamos que o tratamento com L-NAME não foi capaz de reverter o efeito inibitório da EECp sobre as úlceras induzidas por etanol, demonstrando que o EECp não age pela via do NO. Contudo o H<sub>2</sub>S pode estar atuando na gastroproteção do EECp pois o seu bloqueio impediu o efeito gastroprotetor sobre as úlceras induzidas por etanol. Para avaliação de mastócitos cortes histológicos foram corados com azul de toluidina/ alcian blue/ safranina onde observamos diferentes fenótipos de mastócitos. Observamos um predomínio de mastócitos mucosos em todos os tratamentos. Para a avaliação de IL-4 e de iNOS foram utilizadas as técnicas de imunofluorescência e citometria de fluxo. Observamos que os animais ulcerados tratados com EECp apresentaram alta expressão de IL-4 e baixa expressão de iNOS, sugerindo uma atividade anti-inflamatória da EECp. Pode-se concluir que o efeito gastroprotetor do EECp e o possível mecanismo de ação, está relacionado ao H<sub>2</sub>S na diminuição do estresse oxidativo, diminuição do NO sintase induzível e com o efeito imunomodulatório positivo para IL-4, como a diminuição de mastócitos mucosos durante o processo inflamatório.

Palavras chave: *Caesalpinia Pyramidalis*, sulfeto de hidrogênio, óxido nítrico, gastroproteção, antiúlcera

## ABSTRACT

EVALUATION OF MECHANISMS INVOLVED IN GASTROPROTECTION INDUCED BY THE ETHANOL EXTRACT OF *Caesalpinia pyramidalis* TUL BARK. DINIZ, P.B.F, São Cristóvão, 2013.

*Caesalpinia pyramidalis*, is an endemic plant from the North east of Brazil which present scientifically proven anti-inflammatory, antinociceptive, and gastroprotective activities. This work aimed at evaluating the gastroprotective effect of the extract of *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) bark in acute gastric ulcers induced by ethanol in Wistar rats. The ulcerated animals were treated with a dose of 100mg/kg of EECp and L-NAME (nitric acid blocker) and Propargylglycine (hydrogen sulfide blocker). It was evaluated, in all treatments, the role of the gas mediators such as nitric oxide (NO) and hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) and also the participation of mast cells and molecules involved in the anti-inflammatory process as iNOS and citocin IL-4. It was observed in the NO evaluation that the treatment with L-NAME was not able to revert the inhibitory effect of EECp on the ulcers induced by ethanol, showing that the EECp does not operate via NO. However, the H<sub>2</sub>S can operate in the gastro protection of the EECp as its block hindered the gastroprotective effect on the ulcers induced by ethanol. In order to evaluate the mast cells, histological cuts were made with toluidine blue/alcian blue/safranin where different mast cells phenotypes were observed. In all treatments a prevalence of mucous mast cells was observed. The techniques of immunofluorescence and flow cytometry were used to evaluate IL-4 and iNOS. The ulcerated animals treated with EECp presented high expression of IL-4 and low expression of iNOS, suggesting an anti-inflammatory activity of EECp. In conclusion, the gastroprotective effect of EECp and its action mechanism are related to H<sub>2</sub>S in diminishing the oxidative stress, the induced NO synthase, and the positive immunomodulatory effect for IL-4, with the diminution of mucous mast cells during the inflammatory process.

Key words: *Caesalpinia pyramidalis*, Hydrogen sulfide, nitric oxide, gastroprotection, antiulcer.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>03</b>
2.1 Anatomia e fisiologia gástrica .....	03
2.2 Úlcera gástrica .....	04
2.3 Fatores protetores da mucosa gástrica .....	05
2.3.1 Muco e bicarbonato .....	06
2.3.2 Prostaglandinas .....	06
2.3.3 Mediadores gasosos envolvidos na gastroproteção .....	07
2.3.3.1 Óxido nítrico .....	07
2.3.3.2 Sulfeto de hidrogênio .....	09
2.4 Inflamação .....	11
2.4.1 Mediadores do processo inflamatório .....	12
2.4.2 Citocinas e resposta imune celular .....	13
2.4.3 Mastócitos .....	15
2.5 Gênero <i>Caesalpinia</i> .....	16
2.5.1 <i>Caesalpinia pyramidalis</i> .....	17
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
3.1 Objetivo geral .....	19
3.2 Objetivos específicos .....	19
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
4.1 Coleta .....	20
4.2 Preparação do extrato etanólico .....	20
4.3 Animais .....	20
4.4 Modelo de úlcera aguda induzida por etanol .....	21
4.5 Determinação do papel do óxido nítrico .....	22
4.6 Determinação do papel do sulfeto de hidrogênio .....	23
4.7 Análise histopatológica .....	24
4.8 Imunohistoquímica para iNOS e IL-4 .....	25
4.9 Citometria de fluxo .....	25
4.10 Coloração dos mastócitos .....	26
<b>5 RESULTADO .....</b>	<b>27</b>

5.1 Modelo de úlcera aguda induzida por etanol .....	27
5.2 Determinação do papel do óxido nítrico .....	28
5.3 Determinação do papel do sulfeto de hidrogênio .....	29
5.4 5.4 Análise histopatológica do estômago dos animais submetidos à administração oral do etanol absoluto .....	30
5.5 Coloração dos mastócitos .....	33
5.6 Expressão da citocina IL-4 na mucosa na gástrica .....	35
5.7 Expressão da enzima iNOS na mucosa gástrica .....	36
5.8 Citometria de fluxo .....	37
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>47</b>
<b>ANEXO I- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA/UFS .....</b>	<b>63</b>

## 1 Introdução

A elevada incidência de indivíduos com distúrbios gastrintestinais, como gastrite, úlceras gástricas e duodenais e a ineficácia de tratamentos farmacológicos tem incentivado a pesquisa de novas substâncias que possuam ação gastroprotetora e/ou antimicrobiana contra o agente etiológico da úlcera gástrica, *Helicobacter pylori* (BARROS et al., 2008). A fisiopatologia da úlcera gástrica envolve o desequilíbrio entre os fatores defensivos inerentes a mucosa do estômago, a manutenção do fluxo sanguíneo, a barreira de muco e a regeneração celular, e os fatores agressores representados por mau hábito alimentar, estresse, ingestão de álcool, infecção pela bactéria *Helicobacter pylori*, distúrbios na secreção de ácido gástrico e pepsina e também a utilização de anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) (KLEIN-JR et al., 2010; ZANATTA et al., 2009).

Milhões de pessoas da população mundial são acometidas por úlceras gástricas. Esta tem sido há bastante tempo uma das causas mais importantes de morbidade e mortalidade. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) relatam que cerca de 70% a 90% da população mundial utilizam plantas para curar suas enfermidades. As plantas são amplamente utilizadas no âmbito da Atenção Primária à Saúde (WHO, 1993, 2011). Os fitoterápicos têm sido usados em países em desenvolvimento como uma alternativa no tratamento para a úlcera gástrica sobre o trato gastrointestinal (GUIMARÃES et al., 2006; CARVALHO et al., 2008). Muitos extratos e óleos essenciais isolados de plantas apresentam atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*, o que justifica pesquisas baseadas no conhecimento da medicina popular (QUEIROZ et al., 2009).

A *Caesalpinia pyramidalis* Tul., conhecida como “catingueira”, é uma espécie de planta medicinal endêmica da região Nordeste do Brasil, principalmente da caatinga. As folhas, frutos e cascas da *C. pyramidalis* são utilizados pela população em infecções catarrais e diarreicas e no tratamento de afecções digestivas (BAHIA et al., 2005; DANTAS et al., 2008; MATOS, 1997).

Estudos prévios com o extrato etanólico da *Caesalpinia pyramidalis* demonstraram ações anti-inflamatória, antioxidante, antinociceptiva e gastroprotetora (RIBEIRO et al., 2013; SANTANA et al., 2012; SANTOS et al., 2011; SILVA et al., 2011). Ribeiro et al. (2013) demonstraram que o extrato etanólico da entrecasca da *C. pyramidalis* possui

atividade antiulcerogênica em modelos de úlceras induzidas por etanol e por AINES (indometacina) e ação gastroprotetora, aumentando a produção de muco, no modelo de ligadura de piloro em ratos. Embasado no conhecimento científico do extrato etanólico da entrecasca da *Caesalpinia pyramidalis* em desordens gástricas, o presente trabalho objetivou avaliar os possíveis mecanismos de ação deste extrato em úlceras gástricas agudas induzidas por etanol absoluto em ratos.

## 2. Revisão da Literatura

### 2.1 Anatomia e fisiologia gástrica

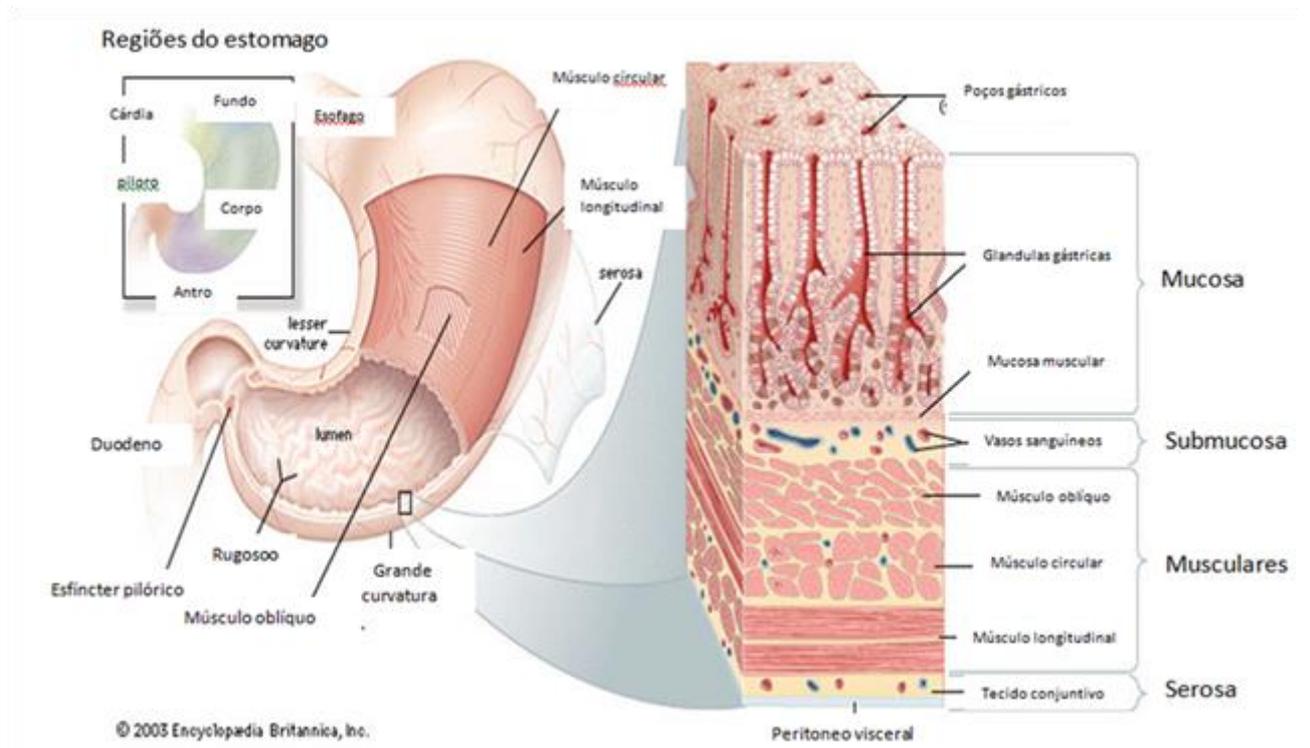
O estômago é dividido anatomicamente em três partes: fundo, corpo e antro. O fundo está situado na região superior, próximo à junção esofagogástrica; o corpo corresponde à maior parte do órgão; e o antro situa-se na região proximal ao canal pilórico (SCHUBERT et al., 2008). A parede do estômago apresenta várias camadas teciduais que são compreendidas pela serosa, pela muscular externa, pela submucosa e pela mucosa (Figura 1).

**Serosa** - é a camada tecidual que reveste a maior parte do órgão, exceto em uma pequena porção da parte posterior do estômago (região cárdia).

**Submucosa** - constituída de tecido conjuntivo frouxo e contém uma rica rede vascular e um plexo nervoso, conhecido como plexo submucoso.

**Mucosa** - é a camada da parte interna do estômago que abriga numerosas glândulas gástricas.

**Muscular externa** – constituída por três camadas: camada oblíqua, circular interna e longitudinal e um plexo miotérico (DANGELO e FATTINI, 2007).



**Figura 1:** O esquema demonstra as respectivas camadas do estômago: mucosa, submucosa, muscular e serosa.

Há uma variabilidade de glândulas no trato gastrointestinal. As glândulas oxínticas e as glândulas pilóricas secretam diversas substâncias responsáveis pelos processos digestivos e homeostáticos do estômago. As glândulas oxínticas localizam-se nas superfícies internas do corpo e do fundo do estômago; estas são compostas por células mucosas que são responsáveis pela secreção do muco. As glândulas pilóricas residem na porção antral do estômago e são compostas por células mucosas (produtoras de muco). Outras glândulas como as células G são responsáveis em liberar o hormônio gastrina, que tem papel importante na secreção ácida gástrica, bem como as células D (SCHUBERT e PEURA, 2008). A somatostatina é secretada por células D e a histamina é oriunda das células enterocromafins (ECL). As células pépticas ou principais são responsáveis pela secreção do pepsinogênio que na presença do ácido clorídrico é convertido em pepsina exercendo o papel de enzima proteolítica. As células parietais são secretoras de ácido clorídrico (SHUBERT, 2011).

A superfície estomacal possui células mucosas superficiais que secretam grandes quantidades de um muco viscoso e alcalino, por cerca de um milímetro de espessura, proporcionando uma barreira física de proteção contra as secreções ácidas que são produzidas pelas células parietais, além de contribuir com a lubrificação ao transportar o alimento (SCHUBERT e PEURA, 2008).

O Processo de secreção ácida envolve basicamente uma elevação inicial de cálcio intracelular e/ou adenosina monofosfato cíclico (AMPC), seguido pela ativação da cascata da proteína quinase dependente de AMPC, que leva à translocação e inserção da bomba de próton ( $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase) da membrana apical das células parietais (YAO e FORTE, 2003).

## **2.2 Úlceras gástricas**

Mesmo com a marcante redução na incidência de úlceras gástricas verificadas nas últimas décadas, a doença ulcerosa gástrica ainda permanece como uma das doenças de maior prevalência em todo mundo, sendo que algumas de suas complicações, como sangramento e perfuração, ainda são causas importantes de morbimortalidade (SUNG et al., 2010).

A etiologia da doença gástrica é influenciada por vários fatores que envolvem agentes defensivos (fluxo sanguíneo, barreira da mucosa e regeneração celular), agentes protetores endógenos (prostaglandinas, óxido nítrico, grupamentos sulfidrílicos e fator de

crescimento da epiderme) e agentes agressores endógenos (ácido clorídrico e pepsina) (WALLACE, 2001, KLEIN-JR et al., 2010). Fatores endógenos como secreção ácida e a pepsina, em níveis elevados podem contribuir para lesionar a mucosa gástrica, bem como, fatores exógenos como: estresse, fumo, deficiência nutricional e uso contínuo de drogas anti-inflamatórias não esteroidais. podem induzir doenças gástricas. Além desses fatores, a presença da bactéria *Helicobacter pylori* ativa a gastrite crônica desempenha um papel importante no desenvolvimento de úlceras gástricas (WALLACE, 2001; WOLFE et al., 1988; SANTIN et al., 2011).

Dados epidemiológicos sugerem que o uso crônico de anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) lesiona a mucosa gástrica ocasionando em torno de 10% a 25% de úlceras (LEONG, 2009). Os AINES, uma classe de drogas mais amplamente utilizadas, atuam principalmente suprimindo a síntese de prostaglandinas (PG), especialmente as PGE<sub>1</sub> e PGE<sub>2</sub>, e prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) endógenas (protetoras da mucosa gástrica), favorecendo o desenvolvimento das ulcerações gástricas (WALLACE, 2008). Vários estudos têm demonstrado que uso de inibidores seletivos de COX-2 provocam ulceração gastrointestinal tanto em experimentos com animais como em humanos (WALLACE, 2001). A farmacoterapia tem se voltado com grande atenção para a produção de anti-inflamatórios que sejam desprovidos deste efeito adverso (WALLACE, 2001).

O álcool, uma substância tóxica, lipossolúvel, que atravessa facilmente a barreira da mucosa gástrica, agredindo a camada epitelial gástrica ocasionando lesão. A gastrite aguda provocada pelo álcool é caracterizada por edema, hemorragia epitelial, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias na mucosa gástrica (JAHOVIC et al., 2007; MATSUHASHI et al., 2007). O álcool é utilizado em modelos de úlcera gástrica em animais, visto que, quando administrado oralmente, induz sérios danos na mucosa gástrica de ratos (AL-SHABANAH et al., 2000; GAZZIERI et al., 2007).

### **2.3 Fatores protetores da mucosa gástrica**

A mucosa gástrica se encontra constantemente exposta a fatores nocivos, porém existem mecanismos de defesa que incluem fatores pré-epiteliais, barreira epitelial que envolve fluxo sanguíneo contínuo, secreção de muco e bicarbonato, PGs, óxido nítrico (NO) e sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), além de mecanismos antioxidantes capazes de proteger a integridade dos tecidos da mucosa (LAINE et al., 2008).

### **2.3.1 Muco e Bicarbonato**

A produção de ácidos e enzimas proteolíticas pela mucosa gástrica é necessária durante a digestão de proteínas e absorção de vitaminas, bem como funcional como uma barreira protetora contra bactérias no organismo. A mucosa pode ser prejudicada pelo desequilíbrio dos mecanismos homeostáticos, que possivelmente superam as defesas gástricas, atingindo a sua própria integridade (SCHUBERT, 2004).

O muco recobre todas as células da superfície epitelial da mucosa gastrointestinal; o mesmo contém fosfolipídios bipolares que devido à elevada polaridade impede a retrodifusão de ácidos, como o ácido clorídrico (HCl), da luz do estômago ao interior da mucosa. O muco forma uma camada contínua de gel transparente solúvel, porém torna-se rapidamente um gel insolúvel que reveste toda a superfície da mucosa gástrica, impedindo a invasão de agentes que possam atingir a integridade do tecido da mucosa. A espessura do muco é de 0,1 mm, sendo constituído de água (95%) e de glicoproteínas (5%) que aderem à superfície da mucosa juntamente com o bicarbonato secretado pelo epitélio. O muco auxilia na barreira contra a autodigestão causada pelo ácido e pela pepsina (ALLEN e FLEMSTROM, 2005). O muco é capaz de agir como antioxidante e reduzir danos da mucosa promovidos por radicais livres (REPETTO et al., 2002). O muco intracelular é liberado no tecido gástrico auxiliando contra danos, protegendo a mucosa gástrica graças à presença das glicoproteínas, sendo os açúcares potentes sequestradores de espécies reativas do oxigênio (EROs) (MOJZIS et al., 2000).

### **2.3.2 Prostaglandinas**

As PG (em especial a PGE<sub>2</sub>) apresentam um papel importante na defesa da mucosa gástrica (MAITY et al., 2003). Elas são sintetizadas a partir do ácido araquidônico por ação das enzimas ciclo-oxigenases (COX) (GIERSE et al., 2008). Está bem estabelecido que existam pelo menos duas isoformas distintas das COX, denominadas COX-1 e COX-2, ambas encontradas no retículo endoplasmático e na membrana nuclear. A expressão constitutiva nos tecidos da COX-1 é maior em relação à COX-2. A isoforma COX-1 promove a produção de PG protetoras da mucosa gástrica e participante da manutenção da homeostase (RODRÍGUEZ-TÉLLEZ et al., 2001). A COX constitutiva (COX-1) atua na

manutenção da função celular e está presente em todo tipo de célula (ANDRADE et al., 2007). A COX-2 tem sua expressão induzida por estímulos inflamatórios em diferentes tipos de células, sendo amplamente expressa em macrófagos e mastócitos quando estimulados por citocinas pró-inflamatórias ou por lipopolissacarídeo. Uma variante da enzima COX-1 é a COX-3, que foi vista no córtex cerebral e no coração (CHANDRASEKHARAN et al., 2002). Em condições fisiopatológicas há um aumento da expressão da isoforma COX-2 (PESKAR, 2001).

A PGE<sub>2</sub> e a PGI<sub>2</sub> regulam o aumento da secreção de bicarbonato de cálcio (Ca (HCO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) através da interação com receptores específicos prostanóides (EP<sub>3</sub>) nas células parietais, e através da estimulação da proteína G inibitória (Gi) minimiza os níveis de AMPc intracelular e a secreção de ácido gástrico. A PGE<sub>2</sub> diminui a ocorrência de lesões gastrintestinais através de fatores citoprotetores, via estimulação da secreção de muco e bicarbonato e um melhor aporte do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica (AIHARA et al., 2007).

### **2.3.3 Mediadores gasosos envolvidos na gastroproteção**

#### **2.3.3.1 Óxido nítrico**

No trato gastrointestinal, o NO atua na manutenção da homeostase, sendo responsável por múltiplas funções fisiológicas, bem como na integridade do epitélio gástrico e da barreira de muco. Além disso, atua como vasodilatador e, portanto, regula o fluxo sanguíneo gástrico, este mediador vem sendo pesquisado por diversos grupos de pesquisa e é reconhecido como componente importante na defesa gástrica devido a sua capacidade de aumentar o fluxo sanguíneo e impedir a aderência dos neutrófilos às células endoteliais (CORUZZI et al., 2000; TULASSAY et al., 2010).

O NO é um gás volátil, sintetizado através de uma série de etapas de transferência de elétrons a partir da enzima óxido nítrico sintase (NOS), do oxigênio e L-arginina. Existem três isoformas independentes de NOS que tem a capacidade de gerar o NO por mecanismos regulatórios complementares e distintos. Três genes codificam as NOS (BREDET et al., 1991) uma isoforma induzível (NOS induzível, iNOS, ou inflamatória, enzima cálcio-independente) que é expressa em macrófagos e células de Kupffer, neutrófilos, fibroblastos, músculo liso e células endoteliais em resposta a estímulos patológicos como microrganismos invasores, e duas ditas constitutivas, dependentes de cálcio, que estão presentes em

condições fisiológicas no endotélio (NOS endotelial, eNOS) e nos neurônios (NOS neuronal, nNOS) (CHO, 2001; UCHIDA et al., 2001). O NO é derivado da L-arginina por ação da NOS, possuindo potente ação vasodilatadora, o que leva a um aumento da permeabilidade vascular. Além disso, este mediador atua como regulador do recrutamento de leucócitos e exerce ação citotóxica contra microrganismos. Quando gerado, o NO difunde-se facilmente através da membrana celular devido a sua natureza lipofílica. Além disso, o NO liga-se ao grupo heme da guanilato ciclase solúvel (GCs), que catalisa a conversão de guanosina trifosfato (GTP) para guanosina-3'5'-monofosfato cíclico (GMPc), aumentando, por conseguinte, a concentração de GMPc intracelular, que por sua vez ativa proteínas quinases dependentes de proteína G (PKG), iniciando uma cascata de fosforilação para obter a função efetora (DENNINGER et al., 2001).

Recentes estudos demonstram que o NO atua de maneira bifásica na resposta ulcerogênica da mucosa gastrintestinal, dependendo da isoforma de NOS, ou seja, o NO produzido pela eNOS apresentaria um efeito protetor, e o NO originário da iNOS teria um efeito pró-ulcerogênico (NISHIO et al., 2006). Estímulos apropriados, tais como respostas inflamatórias durante a presença de úlcera gástrica, aumentam a atividade da iNOS (KRISTJANSSON et al., 2005). O bloqueio do NO aumenta o estresse oxidativo, ativando mastócitos, que são células encontradas em grandes quantidades no trato gastrointestinal, e que liberam mediadores como histamina e fator ativador de plaquetas, causando aumento da permeabilidade epitelial. No entanto, em condições fisiopatológicas e, provavelmente, durante certas condições fisiológicas, a sinalização mediada pelo NO pode ser independente da ativação da GCs. O NO, por exemplo, regula diretamente a função de canais iônicos, enzimas e várias proteínas (STAMLER et al., 2001). Esta regulação parece ser, ao menos em parte, pela nitrosilação de grupamentos tióis do resíduo de cisteína presentes nas proteínas (JAFFREY et al., 2001).

Vários estudos reconhecem o NO como um mediador fundamental na proteção gástrica. Lesões na mucosa gástrica induzidas por agentes químicos podem ser minimizadas pela administração de NO, bem como agravadas com sua remoção (LOPEZ BELMONTE et al., 1996; ANDREWS et al., 1994; CALATAYUD et al., 1999). Este efeito é devido ao aumento do fluxo sanguíneo na mucosa promovido pelo NO (Revisado por WALLACE e GRANGER, 1996), ou ainda devido a um aumento na liberação de muco gástrico (BROWN et al., 1992). A administração de N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, inibidor não seletivo das NOS) acentua as lesões gástricas induzidas por etanol e aumenta a atividade da

H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase; em contrapartida, doadores de NO (por exemplo: nitroprussiato de sódio) reparam as lesões induzidas por etanol e inibem a atividade ATPase em ratos (BULUT et al., 1999).

O organismo possui também um sistema de defesa celular, o ambiente redox (oxidação-redução) do interior das células que previne contra lesões causadas pelos radicais livres que ocorrem durante o processo normal do metabolismo celular e nos estados patogênicos das doenças que envolvem vários processos fisiológicos como síntese de PGs e infiltração de leucócitos polimorfonucleares (AGNIHOTRI et al., 2007). Este ambiente redox é mantido pela ação de enzimas antioxidantes, que promovem a primeira linha de defesa contra o O<sub>2</sub> e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a exemplo incluem-se as proteínas enzimáticas e não enzimáticas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona (GSH),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno (pró-vitamina A) e ácido ascórbico (vitamina C) (ODABASOGLU et al., 2006; KOC et al., 2008). Estas enzimas antioxidantes possuem uma função importante em prevenir lesões gástricas. As EROs estão presentes em vários modelos experimentais de lesão gástrica aguda induzida por estresse, etanol e AINES (ELLIOT e WALLACE, 1998; TANAS et al., 2010).

### 2.3.3.2 Sulfeto de hidrogênio

O sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) é mediador gasoso envolvido com muitas funções fisiológicas, geralmente o H<sub>2</sub>S se torna tóxico quando apresentado em altos níveis de concentração. É um gás incolor, com odor próprio, que pode ser produzido no meio ambiente. O sulfeto de hidrogênio é sintetizado a partir de um aminoácido (L-cisteína) que é uma das principais fontes de enxofre necessário para a síntese de H<sub>2</sub>S (UBUKA, 2002). A L-cisteína é o substrato para duas enzimas piridoxal 5-fosfato dependentes: cistationina  $\gamma$ -liase (CSE) e cistationina  $\beta$ -sintetase (CBS) (MOORE et al., 2003); e de outra, de menor importância biológica, a 3-mercaptopiruvato sultransferase (3-MST) (SHIBUYA et al., 2009).

As enzimas CBS e CSE são importantes para o metabolismo de aminoácidos contendo enxofre, bem como para a produção de H<sub>2</sub>S, amônia e piruvato, utilizando como principal substrato a L-cisteína. A CBS é um polipeptídeo de 63 quilodaltons, predominantemente no sistema nervoso central (SNC), e a CSE é uma proteína de 43 quilodaltons, com expressão maior nos tecidos periféricos (WANG, 2002). No entanto,

ambas são expressas na mucosa gástrica (FIORUCCI et al., 2005). Em particular, a 3-MST, também é expressa no fígado, rim, pulmão, coração, timo, testículos, aorta torácica e cérebro (NAGAHARA et al., 1998; SHIBUYA et al., 2009). No entanto, o papel das isoformas na biossíntese do H<sub>2</sub>S é desconhecido (MUNKE et al., 1988).

O H<sub>2</sub>S pode ser produzido endogenamente e desempenha importantes funções em parte dos órgãos e tecidos (LI et al., 2011). Com potente ação anti-inflamatória no sistema digestivo, ele está envolvido em muitas funções fisiológicas como: resposta inflamatória, controle da integridade da mucosa gástrica, tônus vascular e o controle da motilidade gastrintestinal, promovendo o reparo de úlceras (FIORUCCI et al., 2006; WALLACE et al., 2010).

Como o NO, o H<sub>2</sub>S é um importante mediador na proteção gástrica, visto que sua síntese, quando inibida pode trazer sérios danos à mucosa, aumentando a suscetibilidade a graves lesões após exposição à drogas como, os AINES ou até mesmo ao etanol (FIORUCCI et al., 2005; WALLACE et al., 2010). Em contrapartida, drogas que aumentam a síntese de H<sub>2</sub>S na mucosa melhoram a resistência e a integridade da mucosa minimizando o dano tissular (FIORUCCI et al., 2006). Ise et al. (2011) demonstraram que a redução do dano ao tecido gástrico por qualquer fator externo é devido a ação do H<sub>2</sub>S endógeno, que de certa forma, associado aos fatores pré-existentes na mucosa gástrica, facilita uma recuperação mais rápida da mucosa lesionada. A síntese do H<sub>2</sub>S em mamíferos é realizada pelo menos por três vias enzimáticas através da transfulação do essencial aminoácido a L-metionina à homocisteína. A homocisteína reage com a serina durante a reação de catalisação pela CBS, que originará a cistationina, que por sua vez é subsequentemente hidrolisada pela CSE em cisteína. A hidrólise pela CBS forma H<sub>2</sub>S e o produto L-serina ou reação de hidrólise, catalisada pela CSE pode gerar o H<sub>2</sub>S e os seus produtos piruvato e amônia. Outras duas vias alternativas vêm sendo sugeridas pela literatura para a formação do H<sub>2</sub>S. São elas: a via na qual a cistina após sofrer hidrólise pela CSE em cisteína origina o H<sub>2</sub>S; e a via do 3-mercapto-sultransferase (MPST), na qual a cisteína reage com o cetoácido formando o 3-mercapto-sultransferase, gerando H<sub>2</sub>S e piruvato (HUGHES et al., 2009). No entanto, a maior parte dos estudos sugere que CSE e CBS são as principais vias da para a geração desse mediador, sendo as demais enzimas de menor importância na biossíntese do H<sub>2</sub>S.

Vários estudos vêm analisando a função do H<sub>2</sub>S, e de forma similar a outros mediadores gasosos (NO e CO<sub>2</sub>), o H<sub>2</sub>S parece ter um papel duplo no que diz respeito a processos inflamatórios, com características tanto pró-inflamatórias, causando danos na

mucosa gástrica, migração leucocitária e edema, quanto anti-inflamatórias, minimizando todos esses efeitos inflamatórios na mucosa gástrica (FIORUCCI et al., 2006; CUNHA et al., 2008).

A expressão das enzimas CSE e CBS na mucosa gástrica é responsável pela geração do H<sub>2</sub>S. No entanto, a CSE é a principal enzima que modula o H<sub>2</sub>S na mucosa gástrica. Estudos demonstram que o mesmo possui uma função importante na regulação do fluxo sanguíneo gástrico, bem como na aderência dos leucócitos ao endotélio vascular. Além disso, o H<sub>2</sub>S pode contribuir para a defesa da mucosa gástrica contra lesões causadas por drogas anti-inflamatórias não esteroidais, evidenciando o envolvimento deste mediador na manutenção da integridade da mucosa gástrica em ratos expostos a indometacina ou diclofenaco, (AINES) (FIORUCCI et al., 2005). Entretanto, estas propriedades anti-inflamatórias do H<sub>2</sub>S ainda não estão totalmente elucidadas. Em estudo prévio reportado na literatura verificou a participação dos canais de potássio sensíveis a ATP na proteção da mucosa gástrica (FIORUCCI et al., 2006). Contrariamente, Wallace et al. (2007), mostraram que a proteção da mucosa gástrica em ratos promovido pelo H<sub>2</sub>S possivelmente não envolve os canais de potássio sensíveis a ATP, considerando-se as drogas glibenclamida (antagonista dos canais de potássio) e a pinacidil (ativador canais potássio) que não afetaram o reparo das úlceras gástricas.

Diante do exposto, observamos que os mecanismos pelos quais os mediadores gasosos, sulfeto de hidrogênio e óxido nítrico, participam da gastroproteção não estão totalmente elucidados.

## **2.4 Inflamação**

O processo inflamatório é a causa de inúmeras doenças que podem ser desencadeadas por vários estímulos, dentre eles infecções por micro-organismos, trauma, agentes físicos e químicos, necrose tissular, corpos estranhos e reações imunológicas (WEISS, 2008). A formação das úlceras na mucosa ocorre devido ao desequilíbrio dos fatores gastroprotetores que são acompanhados de um processo inflamatório, o qual gera mediadores inflamatórios agravantes (LAINE et al., 2008). Este processo inflamatório é a resposta de um organismo vivo a um estímulo nocivo, cujo agente agressor pode ser de origem química, física ou biológica. O agente agressor atinge a barreira primária da mucosa gástrica que envolve a camada epitelial e/ou endotelial e suas estruturas especializadas. O

trato gastrointestinal responde a agentes luminiais potencialmente prejudiciais, no processo de defesa da mucosa (WALLACE e DEVCHAND, 2005). Durante a inflamação o tecido da mucosa gástrica lesado necessita ser reparado, portanto, a homeostasia deve ser restabelecida. No decorrer do processo inflamatório o organismo recruta mecanismos específicos, correspondendo aos processos advindos das células efetoras e seus produtos (citocinas e anticorpos), e não específicos da imunidade, atuando como, por exemplo, na captura do agente agressor por células fagocíticas, bem como na secreção de mediadores, que migram para o local sítio da lesão (GALLIN et al., 1992; PAUL, 1998).

#### **2.4.1 Mediadores dos processos inflamatórios**

A resposta fisiológica observada no processo inflamatório está relacionada com a liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios, como aminas vasoativas (histamina e serotonina), cininas (bradicinina), prostanóides (prostaglandinas), citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), fator de ativação plaquetária (PAF) e substância P (KIM et al., 2007; O'SHEA e MURRAY, 2008). Os mediadores inflamatórios exercem suas funções quando ligados a receptores específicos presentes nas células-alvo, dependendo dos tecidos atingidos podem ter efeitos diferentes. O funcionamento celular pode vir a ser prejudicado devido ao efeito nocivo dos mediadores (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Durante os eventos inflamatórios, surgem estímulos para a produção de substâncias capazes de interferir na morfologia e integridade celular. A cascata dos eventos inflamatórios é efetuada por células especializadas entre as quais se pode destacar os mastócitos (que podemos ressaltar como objeto de importância neste estudo), os quais sintetizam substâncias e estocam no interior dos seus grânulos alguns mediadores como: serotonina, histamina, leucotrienos, prostaglandinas, bem como proteases. A resposta fisiológica observada no processo inflamatório está relacionada com a liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios, como citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), PAF e substância P (KIM et al., 2007; O'SHEA e MURRAY, 2008).

Os leucotrienos são sintetizados a partir do ácido araquidônico por ação da lipoxigenase. Estes metabólitos são responsáveis pelo recrutamento dos leucócitos para o local injuriado, mediando a quimiotaxia e a aderência ao endotélio vascular (RADOMSKI et al., 1987). Os leucócitos participam ativamente do processo inflamatório, fagocitando os agentes agressores, impedindo a proliferação de um eventual microrganismo patogênico,

retirando resíduos celulares da área afetada, eliminando assim o tecido necrótico para iniciar a reparação tecidual (FORD-HUTCHINSON, 1992).

O PAF, um derivado lipídico da ação das fosfolipases (PLA<sub>2</sub>), possui receptores localizados nas plaquetas, leucócitos e células endoteliais (SCHOLMERICH, 1996). O PAF esta envolvido em muitos eventos inflamatórios, incluindo aumento da permeabilidade vascular e migração de neutrófilos (FORMELA; GALLOWAY; KINGSNORTH, 1995).

#### **2.4.2 Citocinas e resposta imune celular**

As citocinas desempenham um papel central na regulação do sistema imune da mucosa e são importantes na sua defesa. A IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  são liberados no início de uma reação inflamatória. Elas contribuem para a resposta sistêmica a inflamação ou infecção. Tem sido demonstrado que a administração de IL-1 $\beta$  pode aumentar a resistência à lesão e reduzir a gravidade das lesões gastroduodenais em vários modelos experimentais. Os mecanismos responsáveis pelas ações de proteção de IL-1 $\beta$  não são totalmente compreendidos, mas esta citocina é um potente inibidor da secreção de ácido gástrico, podendo deste modo minimizar as lesões gastroduodenais através da estimulação da secreção de PGs e NO e da inibição de mediadores produzidos por mastócitos que podem agravar a úlcera (MARTIN et al., 2006, BAETCHEWSKY et al., 2009). O TNF- $\alpha$  é uma citocina produzida durante a lesão da mucosa gástrica. O TNF- $\alpha$  parece ser um fator chave para muitas formas de lesão gástrica da mucosa, incluindo a associada com a infecção por *H. pylori* e a utilização de AINES. O TNF- $\alpha$  pode promover a reparação da mucosa pela estimulação da proliferação de células epiteliais (PLAYFORD et al., 2005, LUO et al., 2005). As PGs aumentam a resistência das células epiteliais a lesão induzida por citotoxinas ao suprimir o recrutamento de leucócitos na mucosa. As PGs podem também regular negativamente a liberação de alguns mediadores inflamatórios que contribuem para a geração de lesão da mucosa. Por exemplo, a PGE<sub>2</sub> é um potente inibidor de TNF- $\alpha$  e IL-1, bem como IL-8 (MARTIN et al., 2006).

Na mucosa do trato gastrointestinal, os linfócitos estão presentes em grandes quantidades em três regiões principais: na camada epitelial, espalhados pela lâmina própria e em coleções organizadas na lâmina própria chamadas placas de Peyer. As células de cada região apresentam propriedades fenotípicas e funcionais distintas. A maioria dos linfócitos

intraepiteliais é constituída por células T. A lâmina própria intestinal contém uma população mista de células que inclui os linfócitos T, que são em sua maioria CD4<sup>+</sup> e possuem o fenótipo de células ativadas. Esta também apresenta uma grande quantidade de linfócitos B e plasmócitos ativados, assim como macrófagos, células dendríticas, eosinófilos e mastócitos (KUMAR et al., 2005).

Durante o processo inflamatório na mucosa gástrica há uma grande ativação das células CD4 T *helper* (Th) tipo 1 como resposta a agressão à mucosa (ITOH et al., 1999, ECK et al., 2000). As células Th1 liberam várias citocinas como TNF e IFN durante o processo inflamatório (SAWAI et al., 1999); a diferenciação em linfócitos CD4 Th tipo 2 (Th2) ocorre na presença de IL-4, IL-5 e IL-10 que determinam um perfil anti-inflamatório (ANSEL et al., 2003). Diversos trabalhos tem demonstrado o efeito protetor de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  no desenvolvimento da úlcera gástrica (YADAV et al., 2009). A úlcera gástrica induzida por indometacina aumenta os níveis de citocinas inflamatórias como IL-1 $\beta$  e IL-6 e diminui os níveis de citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e TGF- $\beta$  na mucosa (YADAV et al., 2009).

A IL-4 é produzida por mastócitos, basófilos ativados, eosinófilos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> do tipo Th2 (ABBAS e LICHTMANN, 2005; CALDER et al., 1999). O tratamento de úlceras gástricas com fármacos com potencial anti-inflamatório pode aumentar os níveis de IL-4 para a restauração do dano. Durante a agressão por *H. pylori*, a IL-4 inibe a progressão da inflamação e ao mesmo tempo diminui a expressão do IFN- $\gamma$ , que é produzido pelas células Th1 (OPAL et al., 2000). YADAV et al. (2009) mostraram que o tratamento com o fármaco alipilpirocatecol em úlcera induzida por indometacina diminuiu os níveis de citocinas inflamatórias e aumentou os níveis de citocinas anti-inflamatórias como a IL-4, que apresenta uma participação importante em outras doenças relacionadas a mucosa. Vale ressaltar que a IL-4 produzida por mastócitos na infecção da mucosa por helmintos é crucial para a expulsão do parasita (IERNA et al., 2008).

### 2.4.3 Mastócitos

Os mastócitos são células que participam do processo inflamatório e são responsáveis por processos fisiológicos que envolvem o remodelamento dos tecidos, a angiogênese e a cicatrização de feridas de pele (WEDENMEYER et al., 2000; METZ e MAURER, 2007). Os mastócitos participam da migração de neutrófilos para o local da lesão, através da vasodilatação promovida pelos constituintes dos seus grânulos (THEOHARIDES et al., 2012). Além disso, estes são responsáveis por regular a resposta imunológica, liberando mediadores químicos e os produtos de oxidação do ácido araquidônico, presente no interior de seus grânulos, frente a estímulos apropriados (AMIN, 2012). Os mastócitos quando estimulados, liberam uma série de mediadores pré-formados com atividade pró-inflamatória como a histamina, heparina, serotonina, proteinases neutras, além dos fatores neo-formados como PAF e derivados do ácido araquidônico, os leucotrienos e as prostaglandinas. Dentre os neo-formados, destacam-se uma série de interleucinas sintetizadas após a sua desgranulação (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-14, IL-16), assim como fator de crescimento de fibroblastos, TNF- $\alpha$ , fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e fator de célula tronco (SCF) (WEDENMEYER et al., 2000).

Os mastócitos podem interagir com componentes teciduais de vários órgãos e estão associados a vasos e nervos, que expressaram uma atividade em resposta a reações inflamatórias agudas (SOTER et al., 1983). Nas células epiteliais, mucosas respiratórias, trato geniturinário e gastrointestinal são expressos proeminentemente os mastócitos. Além disso, há uma larga participação dos mastócitos em uma variedade de doenças, podendo-se observar um aumento do número de mastócitos em doenças fibrosantes (STEAD et al., 1990), neurofibromatose e psoríase (GRUBER, KAPLAN, 1993; SCHULMAN, 1993; ROTHER et al., 1990), e alguns tipos de tumores (MENINGER, ZETTER, 1992). Na lesão ulcerativa pode-se observar a importância dos mastócitos. Camundongos deficientes em mastócitos submetidos a lesão de mucosa induzida por AINES apresentam um alto dano na mucosa. Isso sugere a participação de mastócitos no reparo da lesão ulcerativa (HAMPTON e HALE, 2011).

Os mastócitos podem ser classificados de acordo com a sua localização, coloração histoquímica, conteúdo de proteases e proteoglicanos. Dois subtipos principais de mastócitos foram descritos em roedores, mastócitos do tipo mucoso (MMC) e os mastócitos

de tecido conjuntivo (CTMC) (MEUSER-BATISTA et al., 2008; MOON et al., 2010). Os CTMC de camundongos expressam proteases (MMCP)-1 e -2, enquanto que os CTMC expressam MMCP-4, -5, -6, e carboxipeptidase. Os proteoglicanos do MMC são compostos por sulfato de condroitina di-B, A e E enquanto que os dos CTMC são compostos por heparina e sulfato de condroitina E (MOON et al., 2010, MEUSER BATISTA, 2011). Curiosamente, os fenótipos são reversíveis em certas condições e a transdiferenciação entre os dois fenótipos tem sido demonstrada. A heterogeneidade dos subtipos de mastócitos nos tecidos está provavelmente relacionada com as condições do microambiente do tecido (por exemplo, o nível de citocinas, hormônios, espécies reativas, radicais e contato com células adjacentes).

## 2.5 Gênero *Caesalpinia*

Os tratamentos atuais para úlceras gástricas ainda não são satisfatórios devido ao custo elevado e, às vezes, ao tratamento prolongado que dificulta a adesão, causando uma maior recorrência (65-80%) da doença e resultando em elevados gastos na saúde pública. (SONE et al., 2008) O uso indiscriminado dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), medicamentos que causam diversos efeitos colaterais, dentre eles a lesão da mucosa gástrica, também constitui um fator de causa relevante (LEONG, 2009). Nesse contexto, as plantas representam uma alternativa para o tratamento de úlceras gástricas.

A família Leguminosae é predominantemente da Caatinga, possuindo aproximadamente 293 espécies que estão distribuídas dentro de 3 subfamílias: *Faboideae*, *Caesalpinioideae* e *Mimosoideae* (GIULIETTI et al., 2004). O gênero *Caesalpinia* (*Caesalpinioideae*, *Fabaceae*) abrange uma grande variedade de espécies, sendo em torno de 150 em áreas tropicais e subtropicais em todo mundo (BAHIA et al., 2005). A espécie nativa brasileira conhecida por *Caesalpinia minax* é utilizada popularmente no tratamento da infecção pelo vírus da influenza, em disenterias e inflamação decorrente do reumatismo (CHENG et al., 2009). A *Caesalpinia digyna* apresenta atividade antioxidante comprovada bioquimicamente em testes *in vitro* e *in vivo* (SRINIVASAN et al., 2007). A *Caesalpinia cheilanta* é usada contra dores de cabeça e como expectorante e a *Caesalpinia ferrea* utilizada contra doenças renais e labirintite (ALBUQUERQUE, 2006). A *Caesalpinia bonducella* quando analisada fotoquimicamente indica a presença de flavonoides, terpenoides, glicosídeos, saponinas, taninos e alcaloides em sua composição, e testes

farmacológicos demonstraram atividades anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante (ARCHANA et al., 2005).

### 2.5.1 *Caesalpinia pyramidalis*

Atualmente tem-se avaliado a grande importância do bioma da caatinga como uma fonte de descoberta para novas drogas com potencial terapêutico (CARVALHO et al., 2008; BISPO et al., 2010). A *Caesalpinia pyramidalis*, planta que destacamos neste trabalho, pertence à família Fabaceae, classe das Dicotyledoneae. A *Caesalpinia pyramidalis* é nativa endêmica da região nordestina, dotada de grande resistência à seca, chega a atingir 10 metros de altura e poucos centímetros da base, habitando lugares pedregosos (SILVA e MATOS, 1998; DANTAS et al., 2008). Esta espécie (Figura 2) habita as várzeas úmidas como no seridó, semiárido, bem como, na região do sertão e pés de serra, ocupando uma área de aproximadamente 800.000 km<sup>2</sup> (70% de toda região nordestina); ocorrem nos estados do Piauí, Paraíba, Sergipe e Bahia (BRAGA, 1960; UMBUZEIRO, 2005). Conhecida popularmente como “catingueira”, essa espécie nativa brasileira atualmente é classificada como *Poincianella pyramidalis* (Tul.) (QUEIROZ et al., 2009). Na medicina popular, as folhas e flores, bem como as cascas desta planta são utilizadas usadas nos tratamentos das infecções catarrais e diarreias, apresentando ainda ação diurética, antipirética, dispéptica, e atuando como agente bactericida e anti-inflamatório para afecções digestivas (BAHIA et al., 2005; DANTAS et al., 2008). Dos compostos isolados a partir da extração clorofórmica das folhas de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. destacam-se os seguintes: lupeol,  $\beta$  sitosterol, caesalflavona podocarpusflavona, canferol, apigenina, agastisflavone, 4,4'-hidroxi-2'-metil-chalcona, siringaresinol e galato de metila (MENDES et al., 2000; BAHIA et al., 2005; BAHIA et al., 2010).

Os estudos fitoquímicos realizados com a *Caesalpinia pyramidalis* descrevem a presença de metabólitos secundários encontrados nas folhas e frutos da maioria das espécies do gênero *Caesalpinia*, destacando-se os flavonoides, esteroides, taninos e triterpenos (MENDES et al., 2000; ZAKARIA et al., 2007; JUN et al., 2008; CHENG et al., 2009).

O objetivo das pesquisas farmacológicas está em torno das descobertas de novos antioxidantes (MUNTANA e PRASONG, 2010; COSTA-LOTUFO et al., 2010). No estudo de Silva et al. (2011), foi avaliada a atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas e da entrecasca de *Caesalpineia pyramidalis* no qual foi observado um alto conteúdo de

flavonóides totais e uma elevada capacidade de quelação do ferro. Os extratos de *Caesalpinia pyramidalis*, em particular da folha, casca da raiz e flor, apresentam uma ação antimicrobiana frente às linhagens de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* que pode ser justificada pela presença de metabólitos secundários com atividade antioxidante (flavonóides e ácidos fenólicos) (MENDES et al., 2000). Santos et al. (2011) avaliaram o extrato etanólico da entrecasca da *Caesalpinia pyramidalis* e comprovaram que a planta possui atividades anti-inflamatórias e antinoceptiva via inibição de mediadores periféricos e mecanismos centrais. A atividade anti-inflamatória também foi observada com o extrato etanólico da entrecasca da *Caesalpinia pyramidalis* no modelo de pancreatite aguda, induzida pela obstrução do ducto biliopancreático possuindo o flavonóide rutina como possível metabólito responsável por esta ação (SANTANA et al., 2012). Estudo recente, utilizando o mesmo extrato da *Caesalpinia pyramidalis*, demonstrou o envolvimento do sistema glutamatérgico e via L-arginina/óxido nítrico na sua ação antinociceptiva (SANTOS et al., 2013). Ribeiro et al. (2013) demonstraram efeito gastroprotetor do extrato etanólico da entrecasca da *Caesalpinia pyramidalis* em modelos de úlceras induzidas por etanol e AINES. No entanto apesar de vários estudos ter apresentado o efeito anti-inflamatório da *Caesalpinia pyramidalis* seu mecanismo de ação ainda não foi elucidado. Assim, torna-se necessário uma investigação do mesmo. Esta elucidação é de grande relevância para indústria farmacêutica, como para o tratamento da úlcera gástrica.



**Figura 2:** *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Fabaceae). Fonte: CINP, 2011.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivos Gerais**

Avaliar possíveis mecanismos da ação antiúlcera do extrato etanólico da entrecasca da *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Avaliar participação do óxido nítrico (NO) endógeno na proteção gástrica induzida pelo (EECp).

Avaliar participação do sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) na proteção gástrica induzida pelo (EECp).

Avaliar a participação de mastócitos na proteção gástrica induzida pelo (EECp).

Avaliar a expressão de iNOS e IL-4 na proteção gástrica induzida pelo (EECp).

## 4 Material e Métodos

### 4.1 Coleta

A entrecasca do tronco da *Caesalpinia pyramidalis* foi coletada no povoado Xingó, município de Canindé do São Francisco, estado de Sergipe (09°66'00" S, 37°78'94" O) em setembro de 2008. Um espécime foi identificado pela botânica professora Ana Paula Prata do Departamento de Biologia da UFS e depositado no Herbário da Universidade Federal de Sergipe (Av. Marechal Rondon S/N, São Cristóvão - SE 49100-000, Brasil) sob o n° ASE 13.164. Antes da extração a entrecasca foi seca em estufa (Marconi MA 037) a 40°C, com renovação e circulação de ar, durante 48 h.

### 4.2 Preparação do extrato etanólico

A entrecasca seca da *Caesalpinia pyramidalis* (2,840 g) foi inicialmente moída até ser transformada em pó, e posteriormente submetida à extração com etanol a 90% em percolador de aço inoxidável durante cinco dias. Após concentração do solvente em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 45°C, foi obtido o extrato etanólico bruto (rendimento de 2,62%) que foi seco e submetido aos ensaios para avaliação dos possíveis mecanismos de ação da atividade gastroprotetora.

### 4.3 Animais

Nos ensaios biológicos foram utilizados ratos *Novergicus albinus* da linhagem Wistar (180-300 g), fêmeas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe (São Cristóvão, Brasil). Estes foram levados para o biotério local do Departamento de Fisiologia, onde foram mantidos em sala com temperatura controlada ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e ciclos controlados (claro/escuro 12 h cada), tendo ração e água *ad libitum*, durante 02 dias até o manuseio, em caixas plásticas divididos em grupos (8 animais por caixas) aleatoriamente, com troca da serragem diária.

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos durante o período das 7 às 17 h, e de acordo com as normas de procedimentos sobre cuidados com animais para uso em pesquisa do Comitê de Ética da Universidade Federal de Sergipe e da Sociedade Brasileira de Cuidados com Animais de Laboratório (SBCAL). Os animais submetidos à

administração oral do extrato etanólico da *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) e dos controles foram aclimatados no laboratório e colocados em jejum 24 h antes do experimento. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) da Universidade Federal de Sergipe sob o protocolo nº 63/11.

#### 4.4 Modelo de úlcera aguda induzida por etanol

A metodologia utilizada para este experimento foi descrita por Robert et al. (1979), os animais (n = 8/grupo), foram submetidos ao jejum de 24 h e pré-tratados com o EECp (30, 100 ou 300 mg/kg, v.o.), omeprazol (30 mg/kg, v.o.) ou veículo (Tween 80 a 0,2% em água, 10 mL/kg, v.o.). Em estudo prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa encontrou-se efeito gastroprotetor dose dependente do (EECp). A partir deste estudo foi estipulado o uso da dose intermediária de (100 mg/kg, v.o.). Após 1 h da absorção dos tratamentos os animais foram submetidos às úlceras gástricas agudas com a administração de etanol absoluto (4 mL/kg, v.o.). Posteriormente, transcorridos 60 min da indução das úlceras, os animais foram eutanasiados por descolamento cervical e os estômagos retirados para análise do índice de lesões ulcerativas através do programa EARP.

O índice de úlceras calculado através da gravidade das lesões da mucosa gástrica, classificadas como:

- a) tipo 1 (T<sub>1</sub>): área da úlcera  $\leq 1 \text{ mm}^2$ ;
- b) tipo 2 (T<sub>2</sub>): área da úlcera de 1-3  $\text{mm}^2$ .
- c) tipo 3 (T<sub>3</sub>): área da úlcera  $\geq 3 \text{ mm}^2$ .

O índice lesão ulcerativa (ULI) foi determinado macroscopicamente, como:

$$\text{ILU} = (1 \times T_1) + (2 \times T_2) + (3 \times T_3)$$

Os resultados foram expressos em índice de lesão ulcerativa (ILU) e analisados através de análise estatística por análise de variância (ANOVA), seguido de teste posterior de Tukey para comparação das médias por erro padrão  $\pm$  E.P.M. dos grupos testados, sendo que valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

#### 4.5 Determinação do papel do óxido nítrico (NO)

O método utilizado para este experimento foi descrito por Arrieta et al. (2003), com algumas modificações. Após 24 horas de jejum, 16 animais receberam o pré-tratamento com N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, inibidor da NOS não seletivo, 70 mg/kg, i.p.) e 24 animais receberam o pré-tratamento com o veículo (salina a 0,9%, i.p.). Transcorridos 30 minutos, dos 16 animais que receberam o pré-tratamento com L-NAME, 8 animais receberam o tratamento, por via oral, com veículo (tween 80 a 0,2%) e 8 animais foram tratados com o extrato (100 mg/kg, v.o.), e dos 24 animais que receberam o pré-tratamento com o veículo (i.p.) 8 animais foram tratados com veículo (tween 80 a 0,2%, v.o.), 8 animais com o extrato (100 mg/kg v.o.) e 8 animais com a carbenoxolona (200 mg/kg, v.o.), conforme Tabela 1 (n=8/grupo), e após período de absorção (1 h) foi administrado o etanol absoluto (4 mL/kg, v.o.) para indução das úlceras gástricas. Posteriormente, transcorridos os 60 min da indução das úlceras, os animais foram eutanasiados por descolamento cervical e os estômagos retirados para análise do índice de lesões ulcerativas através do programa EARP.

**Tabela 1. Grupos de tratamentos utilizados para avaliação do papel do óxido nítrico**

<b>Grupo (n=8)</b>	<b>Pré-tratamento</b> <b>4 mL, i.p.</b>	<b>Tratamento</b> <b>4 mL/kg, v.o.</b>
<b>Salina + Veículo</b>	(0,9%)	(Tween 80; 0,2%)
<b>Salina + Extrato</b>	(0,9%)	(100 mg/kg)
<b>Salina+ Carbenoxolona</b>	(0,9%)	(200 mg/kg)
<b>L-NAME + Veículo</b>	(70 mg/kg)	(Tween 80; 0,2%)
<b>L-NAME + Extrato</b>	(70 mg/kg)	(100 mg/kg)

Transcorrido o tempo de indução de úlcera aguda por etanol (1 h), os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical sob anestesia prévia com halotano a 3%, e os estômagos retirados, abertos ao longo da grande curvatura e esticados e, através de *scanner*, as imagens foram captadas e analisadas por *software* de análise de imagens EARP, a fim de determinar o número de lesões e o tamanho destas, conforme descrito anteriormente. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. do índice de lesão ulcerativa (ILU) e

analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey sendo  $p < 0,05$  considerado significativo.

#### **4.6 Determinação do papel do sulfeto de hidrogênio**

Para determinação do papel do sulfeto de hidrogênio na mucosa gástrica foi utilizada a metodologia descrita por Medeiros et al. (2009), com algumas modificações. Após 24 horas de jejum, 16 animais receberam o pré-tratamento com propargilglicina (PAG, inibidor da formação de  $H_2S$  endógeno, 25 mg/kg, i.p.) e 24 animais receberam o pré-tratamento com o veículo (salina a 0,9%, i.p.). Após 30 minutos, os 16 animais que receberam o pré-tratamento com PAG receberam os tratamentos, por via oral, sendo 8 animais tratados com veículo (tween 80 a 0,2%) e 8 destes animais tratados com o extrato (100 mg/kg), e os 24 animais que receberam o pré-tratamento com o veículo foram tratados com veículo (tween 80 a 0,2%; 8 animais), extrato (100 mg/kg; 8 animais) ou carbenoxolona (200 mg/kg; 8 animais), conforme Tabela 2 (n=8/grupo), e após período de absorção (1 h) foi administrado o etanol absoluto (4 mL/kg) e posteriormente determinado o índice de lesões ulcerativas como descrito anteriormente no tópico 4.4.

**Tabela 2. Grupos de tratamentos utilizados para avaliação do papel do sulfeto de hidrogênio**

<b>Grupo (n=8)</b>	<b>Pré-tratamento</b> (4 mL, i.p.)	<b>Tratamento</b> (4mL/kg, v.o.)
<b>Salina + Veículo</b>	(0,9%)	(Tween 80; 0,2%)
<b>Salina+ Extrato</b>	(0,9%)	(100 mg/kg)
<b>Salina+ Carbenoxolona</b>	(0,9%)	(200 mg/kg)
<b>PAG + Veículo</b>	(25 mg/kg)	(Tween 80; 0,2%)
<b>PAG + Extrato</b>	(25 mg/kg)	(100 mg/kg)

Transcorrido o tempo de indução de úlcera aguda por etanol (1 h), os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical sob anestesia prévia com halotano a 3%, os estômagos retirados, abertos ao longo da grande curvatura e esticados, e através de *scanner*, as imagens foram captadas e analisadas por software de análise de imagens EARP, a fim de determinar o número de lesões e o tamanho destas, conforme descrito anteriormente. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. do índice de lesão ulcerativa (ILU e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey sendo  $P < 0,05$ ) considerado significativo.

#### **4.7 Análise histopatológica**

Os animais foram eutanasiados e os tecidos foram removidos, congelados em nitrogênio líquido e incluídos em OCT (Sakura, Torrance, EUA). Foram feitos cortes de 10  $\mu$ m para coloração por hematoxilina e eosina (HE) para análise do tecido gástrico ulcerado. Alterações da mucosa gástrica foram observadas e quantificadas (n=4/grupo, 3 cortes histológicos/estômago), como descamação e perda de vilosidades (desorganização) da superfície epitelial glandular e edema intersticial. Escores foram utilizados para quantificar as alterações morfológicas ocorridas no tecido estomacal. Escores: 0, sem alteração; 1, alteração rara; 2, alteração moderada; e 3, alteração grave. As alterações histológicas estão apresentadas como mediana (máximo - mínimo). Para análise estatística foi utilizado o teste

de Kruskal-Wallis com o teste posterior de Dunn, sendo valores de  $p < 0,05$  considerados significativos.

#### **4.8 Imuno-histoquímica para iNOS e IL-4**

Cortes congelados ( $n=3$ /grupo) de tecido gástrico ( $10 \mu\text{m}$ ) foram fixados em acetona e mergulhados em salina tamponada com fosfato (PBS) por 5 min. Os cortes foram incubados em solução de bloqueio com PBS a 2% de albumina bovina (BSA, fração V, Sigma Chem. Co, EUA) por 30 min a  $37^\circ\text{C}$ . Para a marcação de IL-4 os cortes foram incubados com anticorpo para IL-4PE (Biolegend) na concentração de 1:200 por 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ . Para a marcação de iNOS os cortes foram incubados com anticorpo primário iNOS (Sigma) na concentração de 1:500 por 1 h a  $37^\circ\text{C}$ , lavados em PBS e incubados com anticorpo secundário Alexa488 na concentração de 1:2000. Todas as incubações com anticorpos foram feitos sob o abrigo da luz em câmara úmida e logo depois foram efetuadas três lavagens com PBS. Para a marcação de núcleo os cortes foram incubados com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) a 0,1 M por 15 min. Após coloração os cortes foram lavados em PBS e montados em DABCO (-1,4diazabicyclo [2.2.2] octano-(Sigma)) a 2%, para serem visualizadas em microscópio de luz Axioplan 2 Zeiss (Zeiss, Alemanha).

#### **4.9 Citometria de fluxo para IL-4 e iNOS**

Os tecidos gástricos ( $n=3$ /grupo) foram coletados, cortados em fragmentos de 1-2 mm e exaustivamente lavados em PBS a  $4^\circ\text{C}$  para evitar contaminação com células do sangue. Os fragmentos foram transferidos para uma solução de colagenase tipo IA (Sigma) e submetidos a um ciclo único de digestão enzimática em agitação suave por 40 min a  $37^\circ\text{C}$ . As células foram isoladas, centrifugadas e imediatamente transferidas para meio RPMI 1640 (Sigma) contendo 10% de soro fetal bovino. As células foram incubadas por 20 minutos a  $4^\circ\text{C}$  com meio RPMI contendo 10% de soro de carneiro inativado (bloqueio de receptores Fc) e 10% de soro fetal bovino (Gibco). Para a marcação de IL-4 as células foram incubadas com anticorpo para IL-4PE (Biolegend) na concentração de 1:200 por 30 min a  $37^\circ\text{C}$ . Para a marcação de iNOS as células foram incubadas com anticorpo primário iNOS (Sigma) na concentração de 1:500 por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , lavadas em PBS e incubadas com anticorpo secundário Alexa488 na concentração de 1:2000 por 30 min a  $37^\circ\text{C}$ . Após a incubação com

os anticorpos, as amostras foram lavadas duas vezes em meio RPMI, fixadas em formaldeído 2% (Merck) e mantidas em geladeira até a leitura quando foram lavadas duas vezes em PBS.

As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo Attune (Applied Biosystems) e a análise dos dados foi realizada no programa Attune Cytometric Software versão 1.2.5 (Applied Biosystems).

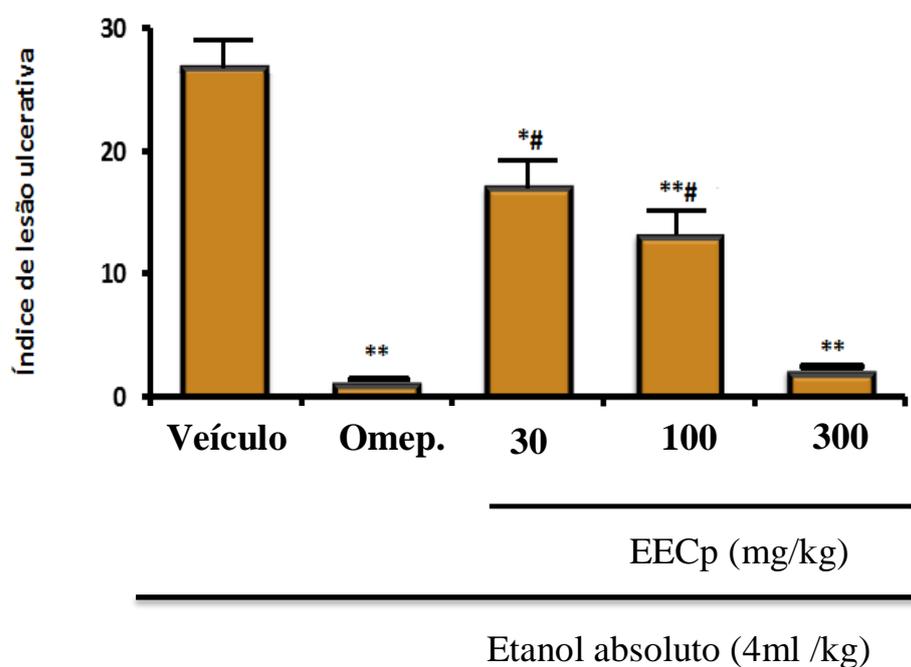
#### **4.10 Coloração dos mastócitos**

A identificação de mastócitos foi feita segundo o protocolo previamente descrito por Meuser-Batista et al. (2008). Os tecidos (n=3/grupo) foram cuidadosamente removidos, congelados em nitrogênio líquido e incluídos -70 °C em OCT (Sakura, EUA). Foram feitos cortes congelados em criostato (LEICA CM 1850). Para a identificação dos diferentes fenótipos de mastócitos foi utilizada uma solução com a combinação de três corantes: 0,02% de alcian blue (coloração azul), 0,01% de safranina (coloração marrom) e 0,36% de azul de toluidina (coloração púrpura). Os mastócitos do tipo mucoso apresentam coloração azul, os mastócitos de tecido conjuntivo apresentaram coloração marrom ou púrpura e mastócitos híbridos apresentam coloração marrom/púrpura/azul. A presença dos subtipos de mastócitos foi observada nos diferentes grupos. As imagens dos tecidos corados para mastócitos foram observados no microscópio óptico (LEICA ICC-50) e foram fotografados para a quantificação do número de mastócitos. A quantificação dos diferentes fenótipos de mastócitos foi feita no programa ImageJ 1.45s. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. dos mastócitos por área (mm<sup>2</sup>) e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey.

## 5 Resultados

### 5.1 Modelo de úlcera aguda induzida por etanol

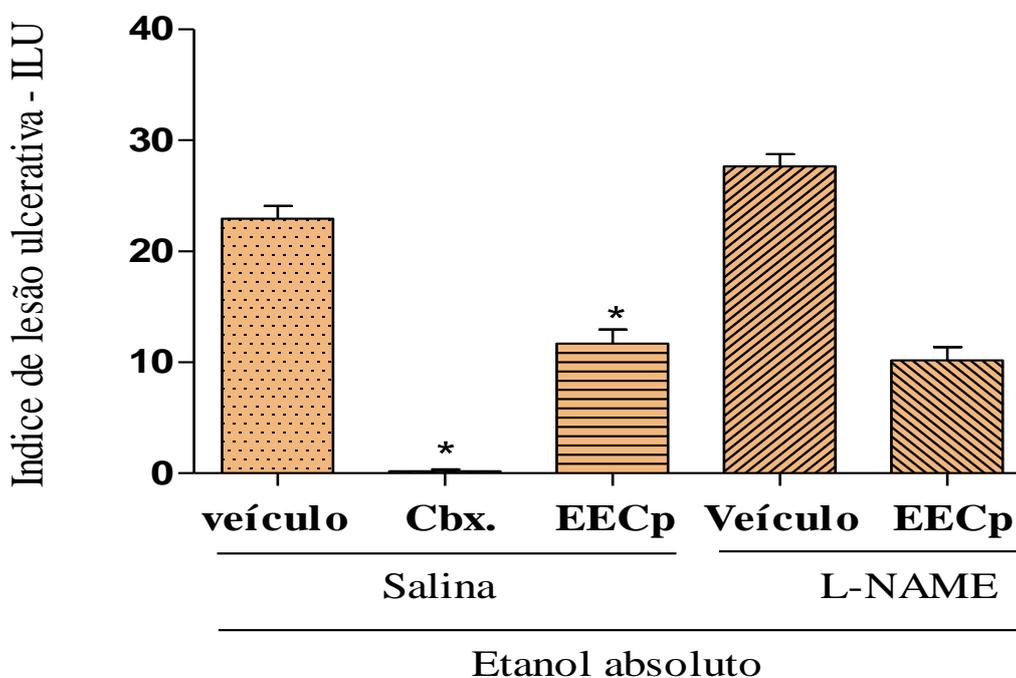
No modelo de úlceras agudas induzidas por etanol observou-se que o pré-tratamento dos animais com o EECp nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg foi capaz de prevenir de forma significativa e dose dependente, o índice de lesões ulcerativas, a área total de lesão e a área relativa de lesão quando comparadas ao veículo ( $p < 0,01$ ). De forma similar, os animais pré-tratados com omeprazol (30 mg/kg), também tiveram menor índice de lesões ulcerativas ( $p < 0,001$ , Fig. 3).



**Figura 3-** Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 8 animais/grupo do índice de lesão ulcerativa (ILU) e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) seguida de (Tukey) \* $p < 0,01$  e \*\*  $p < 0,001$  comparado com o veículo. #  $p < 0,01$  comparado com EECp 300 mg/kg.

## 5.2. Determinação do papel do NO

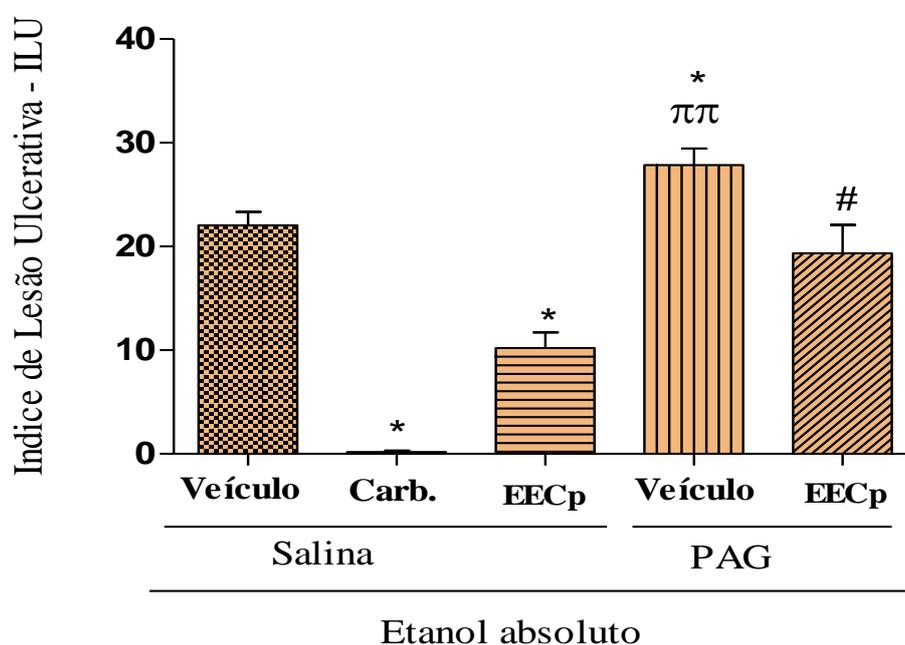
No modelo para determinar o envolvimento do NO na gastroproteção induzida pelo EECp, foi observado que os animais tratados com EECp na dose de (100 mg/kg) foi capaz de prevenir o índice de lesões ulcerativas, quando comparados ao veículo. Porém, os animais pré-tratamento com L-NAME (70 mg/kg, i.p.) não foi capaz de reverter o efeito inibitório deste extrato sobre as úlceras induzidas por etanol absoluto, quando comparado aos animais que foram tratados com o extrato (Fig. 4).



**Figura 4-** O efeito da administração orogástrica do veículo (tween 80 a 0,2% em salina a 0,9%), carbenoxolona (Cbx, 200 mg/kg) e o (EECp, 100 mg/kg) em úlcera induzida por etanol absoluto (4 mL/kg). Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. do índice de lesão ulcerativa (ILU) e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de (Tukey). \* $p < 0,05$  comparado com o grupo veículo + salina.

### 5.3 Determinação do papel do sulfeto de hidrogênio

No modelo para avaliar a contribuição do H<sub>2</sub>S no efeito protetor do EECp observou-se que os animais tratados com EECp na dose de (100 mg/kg) foi capaz de prevenir o índice de lesões ulcerativas, quando comparados ao veículo. Porém, os animais pré-tratamento com PAG (25 mg/kg, i.p.) foi capaz de reverter parcialmente o efeito inibitório deste extrato sobre as úlceras induzidas por etanol absoluto, quando comparado aos animais que foram tratados com o extrato (Fig. 5).



**Figura 5-** O efeito da administração orogástrica do veículo (tween 80 a 0,2% em salina a 0,9%), carbenoxolona (Cbx, 200 mg/kg) e o (EECp, 100 mg/kg) em úlcera induzida por etanol absoluto (4 mL/kg). Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. do índice de lesão ulcerativa (ILU) e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey. \*p < 0,01 comparado ao grupo salina + veículo, # p < 0,01 comparado ao grupo EECp + veículo, \*\* p < 0,01 comparado ao grupo EECp + PAG.

#### **5.4 Análise histopatológica do estômago dos animais submetidos à administração oral de etanol absoluto**

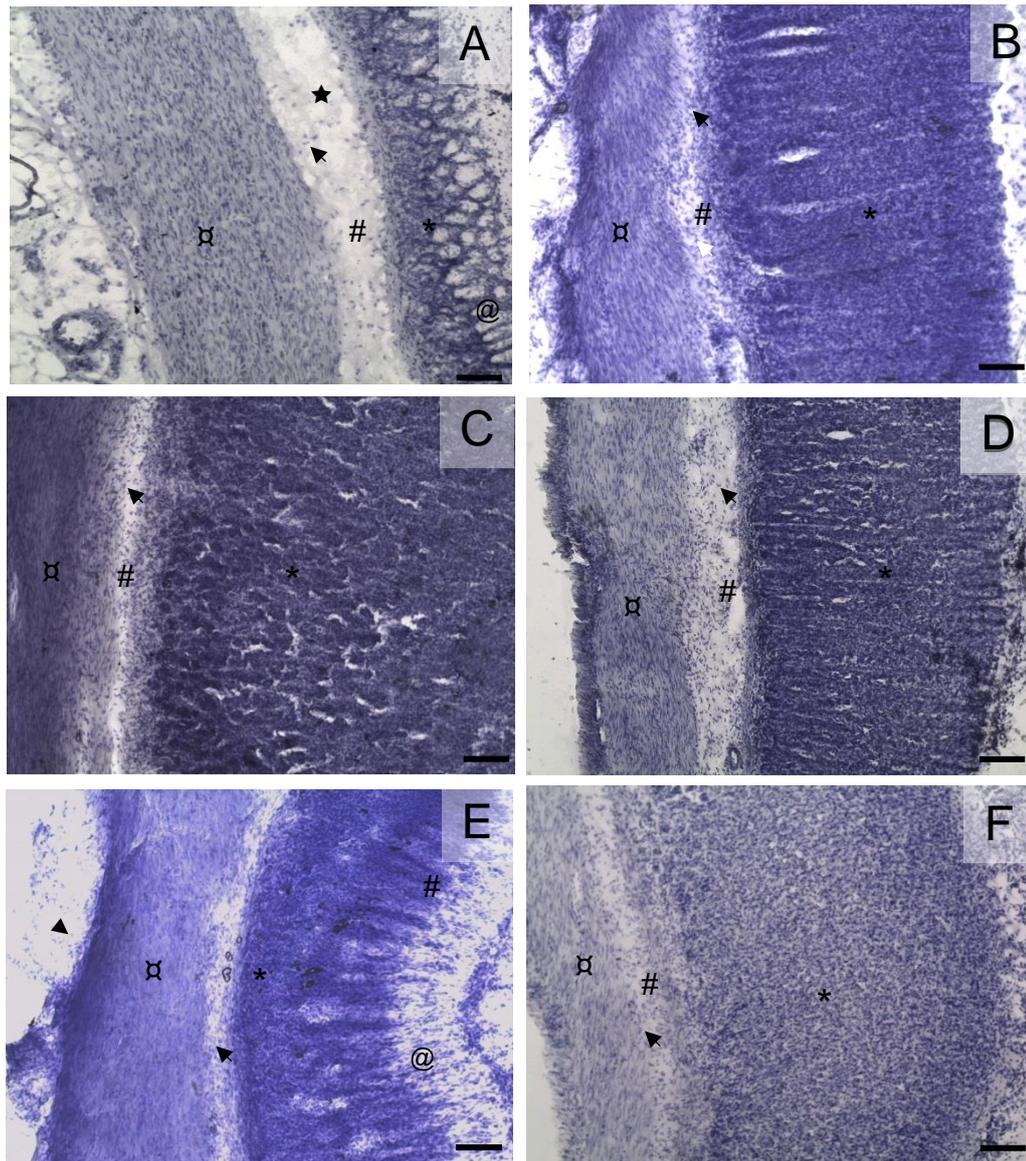
Na análise histopatológica podemos observar que o grupo pré-tratado com salina e tratado com veículo foi muito afetado na indução de gastrite por etanol, demonstrando aumento de edema da submucosa intersticial com perda da vilosidade da superfície da mucosa e destruição de lâmina própria (fig. 6A). O grupo pré-tratado com salina e tratado com EECp apresentou preservação da lâmina própria, com pequeno edema e infiltrações leucocitárias (fig. 6B). Os grupos pré-tratados com bloqueio da síntese de NO e H<sub>2</sub>S que foram tratados com veículo houve uma maior agressão da mucosa gástrica com degradação do tecido e infiltrações linfocitárias na submucosa, bem como presença de edema (fig. 6C e 6E). Porém os grupos pré-tratados com bloqueio de NO e H<sub>2</sub>Se que posteriormente foram tratados com o EECp houve uma melhora da mucosa gástrica ulcerada com diminuição do edema em região da mucosa gástrica e menor dilaceração do tecido da mucosa gástrica (Fig. 6D e 6F).

A análise quantitativa das alterações morfológicas dos grupos com tecido gástrico ulcerado mostrou que o tratamento com o EECp teve um efeito protetor significativo ( $p < 0,05$ ) nos grupos pré-tratados com salina e ou que foram submetidos ao bloqueio da síntese bem como, nos tecidos do grupo tratados com extrato, houve uma melhora do aspecto morfológico do tecido gástrico ulcerado, quando comparado ao grupo somente pré-tratado com salina e tratado com veículo (Tabela 3).

**Tabela 3- Análise quantitativa das alterações morfológicas do tecido gástrico ulcerado.**

<b>Pré-tratamento</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Desorganização</b>	<b>Edema</b>
<b>salina</b>	<b>Veículo</b>	2,0(2,0-3,0)	2,0(2,0-3,0)
<b>salina</b>	<b>EECp</b>	1,0(0,0-1,0)*	0,0(0,0-1,0)*
<b>L-NAME</b>	<b>Veículo</b>	3,0(2,0-3,0)	2,0(2,0-3,0)
<b>L-NAME</b>	<b>EECp</b>	1,0(0,0-2,0)*	1,0(1,0-2,0)*
<b>PAG</b>	<b>Veículo</b>	2,0(2,0-3,0)	2,0(1,0-2,0)
<b>PAG</b>	<b>EECp</b>	2,0(2,0-2,0)	2,0(1,0-2,0)

Resultados expressos como mediana dos escores com mínimo e máximo. Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn. \*p< 0,05 comparado ao grupo salina+ veículo. Seções histológicas em triplicata (n=4/grupo).



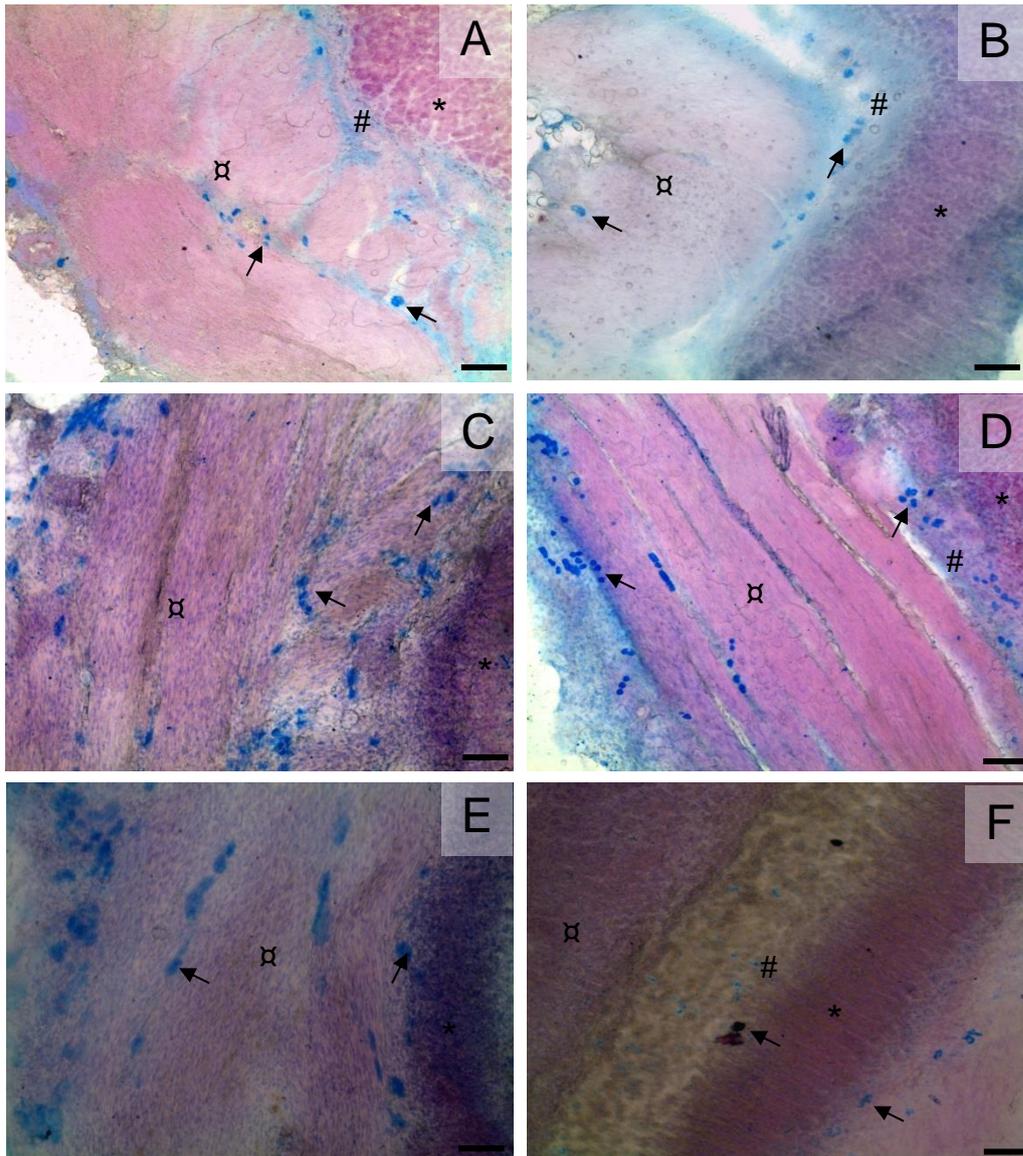
**Figura 6- Cortes histológicos de tecido gástrico ulcerado corado com hematoxilina e eosina.**

Arquitetura geral do tecido gástrico no modelo de úlcera induzida por etanol nos grupos: pré-tratado com salina + tratado com veículo (A), pré-tratado com salina + tratado com EECp (B), pré-tratado com L-NAME + tratado veículo (C), pré-tratado com L-NAME + tratado com EECp (D), pré-tratado com PAG + tratado com veículo (E), pré-tratado com PAG e tratado com EECp (F). Características morfológicas gerais: muscular externa ( $\alpha$ ), submucosa (#), mucosa (\*). Alterações morfológicas: edema de submucosa pronunciado ( $\star$ ), degradação de mucosa (@), infiltrado inflamatório (seta). Os resultados são representativos de quatro animais por grupo, em triplicata. Barra: 1 mm.

## 5.5 Coloração de mastócitos

A análise para a identificação dos mastócitos nos tecidos gástricos dos animais que foram submetidos a úlcera foi avaliada através de coloração com alcian blue/azul de toluidina/safranina e foi demonstrada a presença dos mastócitos na submucosa, bem como a migração dessas células em direção a mucosa gástrica em todos os grupos (Fig. 7). Os mastócitos do tipo mucoso apresentam coloração azul, os mastócitos de tecido conjuntivo apresentaram coloração marrom ou púrpura e mastócitos híbridos apresentam coloração marrom/púrpura/azul. Semelhante ao tecido gástrico normal, podemos observar um predomínio de sub-população dos mastócitos mucosos expressos em diversas áreas como: mucosa, sub-mucosa e músculo liso em todos os grupos do tecido gástrico ulcerado em modelo de lesão induzida por etanol. No grupo pré-tratado com salina e tratados com veículo, houve uma expressão dos mastócitos mucosos na região da mucosa migrando em direção a submucosa e músculo liso (figura 7A), em relação ao grupo pré-tratado com salina e após o tratamento com EECp houve uma maior proliferação dos mastócitos mucosos na área da sub-mucosa, quanto aos grupos pré-tratados com bloqueio das sínteses do NO pelo (L-NAME) e ou H<sub>2</sub>S através do (PAG) de mastócitos mucosos (Fig. 7).

A análise quantitativa do número de mastócitos por mm<sup>2</sup> mostrou diferenças entre o número de mastócitos entre os grupos e diferenças entre os subtipos de mastócitos. Na comparação entre os tratamentos podemos observar um aumento no número de mastócitos mucosos no grupo pré-tratado com L-NAME e tratado com EECp comparado com grupo pré-tratado salina e tratado com veículo (Tabela 4). Na comparação entre os subtipos de mastócitos no mesmo tratamento podemos observar diferenças significativas entre os mastócitos mucosos e mastócitos de tecido conjuntivo no grupo com lesão tratado apenas com veículo. Podemos observar também uma diferença significativa entre os mastócitos mucosos e mastócitos híbridos e entre mastócitos mucosos e mastócitos de tecido conjuntivo nos seguintes tratamentos: pré-tratado com L-NAME e tratado com EECp e com PAG. Também podemos observar que no grupo pré-tratado com PAG e tratado com EECp houve uma diferença entre os mastócitos mucosos e de tecido conjuntivo (Tabela 4).



**Figura 7-** Imagens representativa de cortes histológicos de mastócitos mucosos no tecido gástrico ulcerado, corados com safranina/alcian blue/azul de toluidina. Mastócitos (setas) foram evidenciados nos grupos: pré-tratado com salina + tratado com veículo (A), pré-tratado com salina + tratado com EECp (B), pré-tratado com L-NAME + tratado veículo (C), pré-tratado com L-NAME + tratado com EECp (D), pré-tratado com PAG + tratado com veículo (E), pré-tratado com PAG e tratado com EECp (F). Características morfológicas gerais: muscular externa ( $\alpha$ ), submucosa (#), mucosa (\*). Os resultados são representativos de pelo menos três animais por grupo. Barra: 1mm.

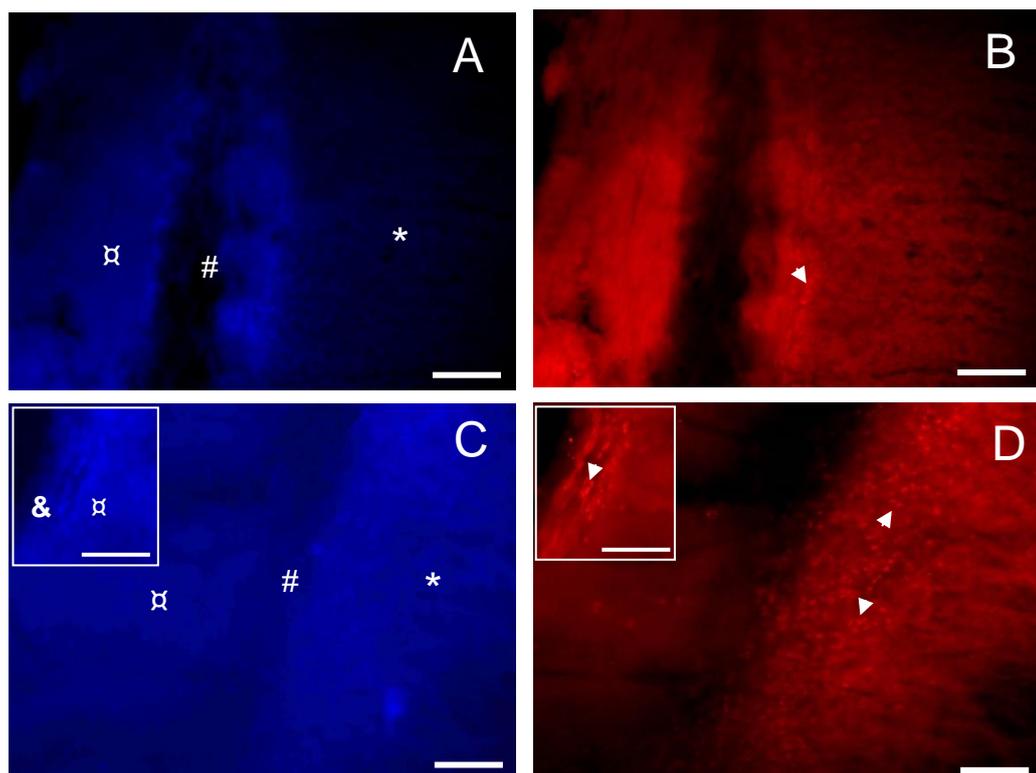
**Tabela 4 - Percentual dos diferentes tipos de mastócitos no tecido gástrico.**

<b>Mastócitos</b>	<b>Mucosos</b>	<b>Híbridos</b>	<b>Conjuntivos</b>
<b>Grupos</b>	<b>Células/mm<sup>2</sup></b>	<b>Células/mm<sup>2</sup></b>	<b>Células/mm<sup>2</sup></b>
<b>Controle/sem lesão</b>	172.7 ± 9.95	19.76 ± 7.12 <sup>#</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>#</sup>
<b>Salina + Veículo</b>	211.55 ± 77.94	48.16 ± 16.61	9.33 ± 4.91
<b>Salina + Extrato</b>	153.67 ± 60.292	8.33 ± 5.60	27.00 ± 9.29
<b>L-NAME + Veículo</b>	478.02 ± 62.37	26.70 ± 5.84 <sup>#</sup>	13.93 ± 12.95 <sup>#</sup>
<b>L-NAME + Extrato</b>	4820.00 ± 1476.50 <sup>*</sup>	17.33 ± 4.84 <sup>#</sup>	4.33 ± 1.45 <sup>#</sup>
<b>PAG + Veículo</b>	211.00 ± 28.84	36.30 ± 6.93 <sup>#</sup>	1.33 ± 1.33 <sup>#</sup>
<b>PAG ± Extrato</b>	208 ± 3.00	35.00 ± 8.00 <sup>#</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>#</sup> <sup>\$</sup>

Resultados expressos como média ± E.P.M. dos mastócitos por área (mm<sup>2</sup>) analisada estatisticamente por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey. Comparação entre os tratamentos: \*p < 0,05 comparado ao grupo salina + veículo. Comparação entre os subtipos de mastócitos do mesmo tratamento, #p < 0,05 comparado aos mastócitos mucosos do mesmo grupo, \$p < 0,05 comparado aos mastócitos híbridos do mesmo grupo.

### 5.6 Expressão da citocina IL-4 na mucosa gástrica

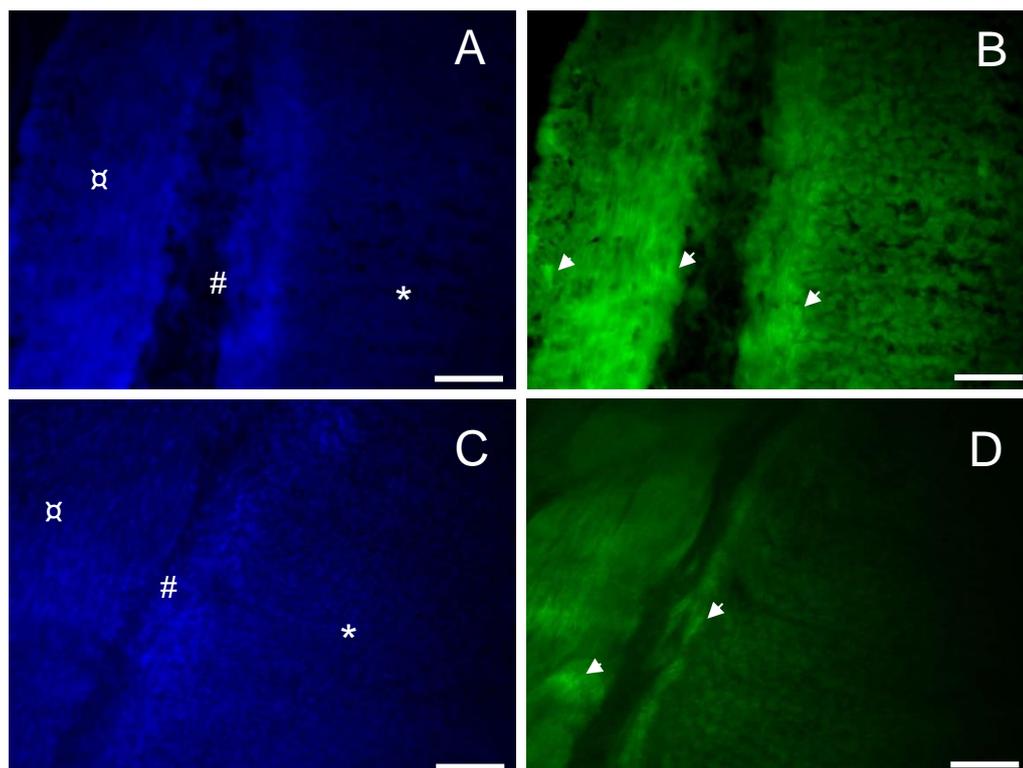
Podemos observar a expressão de IL-4 no pré-tratamento e tratamento com o veículo em células inflamatórias presentes na mucosa. Poucas células inflamatórias foram marcadas com IL-4. Apesar de observamos a marcação de IL-4 para esse tecido, podemos verificar que a expressão dessa citocina nesse grupo foi baixa. Já no grupo que recebeu tratamento com o EECp e foi submetido ao pré-tratamento com o veículo podemos observar um número elevado de células expressando a citocina IL-4 na mucosa e na região serosa do tecido gástrico. Interessante observar que nesse grupo as células inflamatórias apresentaram intensa marcação de IL-4, evidenciando a grande produção dessa citocina no tecido gástrico (Fig. 8).



**Figura 8- Expressão de IL-4 no tecido gástrico ulcerado.** Células inflamatórias expressando a citocina IL-4 (seta) foram evidenciadas no grupo pré-tratado com salina + tratado com veículo (B) e no grupo pré-tratado com salina + tratado com EECp (D). Imagens à esquerda mostram a marcação nuclear do tecido gástrico pela coloração de DAPI, no painel (A) o grupo pré-tratado com salina + tratado com veículo, no painel (C) o grupo pré-tratado com salina+ tratado com extrato. E a direita o mesmo tecido evidenciando marcação de IL-4 (B, D). Características morfológicas gerais: serosa (&), muscular externa (α), submucosa (#), mucosa (\*). Os resultados são representativos de pelo menos três animais por grupo. Barra: 20 um.

### 5.7 Expressão da enzima iNOS na mucosa gástrica

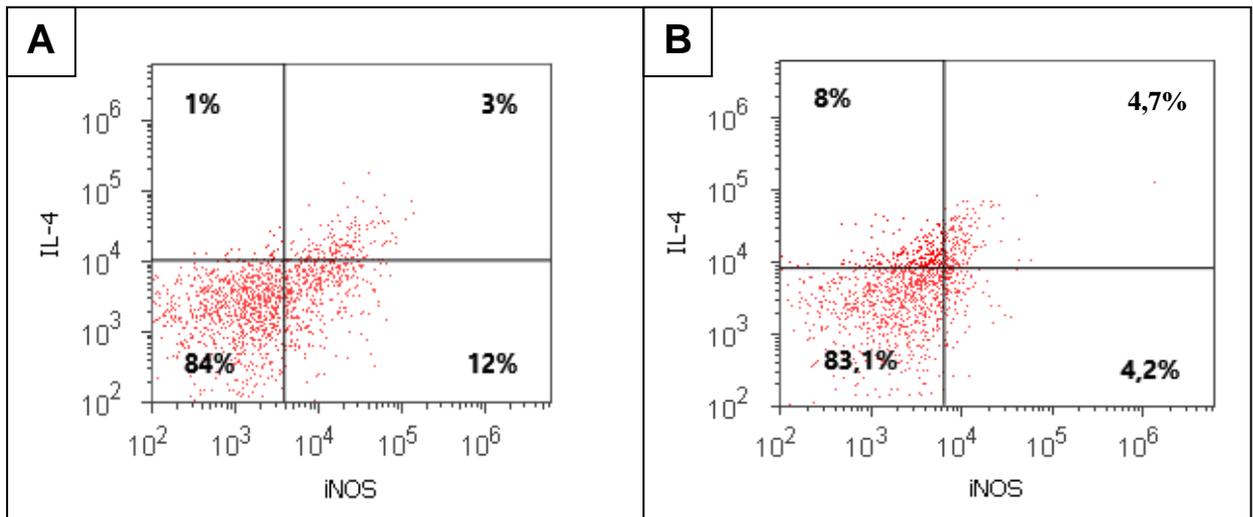
A expressão da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) induzida foi observada no grupo pré-tratado e tratado com veículo na muscular externa e na mucosa gástrica. No grupo pré-tratado com salina e tratado com o EECp observamos a expressão da enzima iNOS em algumas células presentes na muscular externa e na mucosa gástrica. Comparando os dois grupos podem observar que no tratamento com o veículo o tecido gástrico apresentou mais expressão da enzima iNOS comparado ao tratamento com o EECp (Fig.9).



**Figura 9-Expressão de iNOS no tecido gástrico ulcerado.** Células inflamatórias expressando iNOS (seta) foram evidenciadas no grupo pré-tratado com salina + tratado com veículo (B) e no grupo pré-tratado com veículo + tratado com EECp (D). Imagens à esquerda mostram a marcação nuclear do tecido gástrico pela coloração de DAPI, no painel A (controle) o grupo pré-tratado com salina + tratado com veículo, no painel (C) o grupo pré-tratado com salina + tratado com extrato. E a direita o mesmo tecido evidenciando marcação de iNOS (B e D). Características morfológicas gerais: muscular externa (α), submucosa (#), mucosa (\*). Os resultados são representativos de pelo menos três animais por grupo. Barra: 20 um.

## 5.8 Citometria de fluxo

A análise por citometria de fluxo mostrou que no pré-tratamento e tratamento com o veículo, cerca de 12% das células inflamatórias do tecido gástrico expressam iNOS e apenas 1% expressa IL-4. Cerca de 3% das células inflamatórias expressam tanto a IL-4 quanto a enzima iNOS. Já no grupo pré-tratado com salina e tratado com EECp podemos observar um número menor de células expressando iNOS (4,2%) e um maior número de células expressando IL-4 (8%). Cerca de 4,7% de células expressam tanto iNOS quanto IL-4 (Figura 10).



**Figura 10-Análise por citometria de fluxo da expressão de iNOS e IL-4 no tecido gástrico ulcerado.** Células inflamatórias iNOS<sup>+</sup>, IL-4<sup>+</sup> e iNOS<sup>+</sup>/IL-4<sup>+</sup> foram evidenciadas no grupo pré-tratado com salina + tratado com veículo (A) e no grupo pré-tratado com salina + tratado com EECp (B). Os resultados são representativos de pelo menos três animais por grupo.

## 6 Discussão

A espécie *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae) é utilizada na medicina popular para tratamento de infecções catarrais e como agente anti-inflamatório, diurético, dispéptico, digestivo, antipirético (SILVA; MATOS, 1998; MENDES et al., 2000; BAHIA et al., 2005).

Neste trabalho, demonstramos pela primeira vez, os possíveis mecanismos envolvidos na gastroproteção do EECp em lesão gástrica por etanol em ratos.

O EECp nas doses de (30, 100, 300 mg/kg) no modelo de úlceras induzidas por etanol diminuiu significativamente e de maneira dose-dependente as lesões ulcerativas em comparação com o veículo (Ribeiro et al., 2013). Isto indica que, provavelmente, o EECp esteja promovendo um efeito protetor sobre a mucosa, podendo estar relacionado com o aumento de síntese de PG ou do NO os quais estimulam a secreção de muco e bicarbonato e promove a manutenção do fluxo sanguíneo.

Estudo prévio do nosso grupo de pesquisa utilizando o EECp demonstrou que esta espécie possui ação gastroprotetora em úlceras gástricas induzidas por etanol e por indometacina (AINE) e efeito sob a secreção de muco gástrico (RIBEIRO et al., 2013), ações anti-inflamatória *in vivo* (SANTOS et al., 2011; SANTANA et al., 2012) e antioxidante (SANTOS et al., 2011), tornando-se assim de grande importância farmacológica.

O EECp possui atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e gastroprotetora comprovadas cientificamente. Estas ações podem ser atribuídas provavelmente devido à presença dos constituintes químicos como flavonóides rutina, apigenina, baicaleína, lupeol e canferol presentes nas folhas e na entrecasca da *Caesalpinia pyramidalis* (BAHIA et al., 2005; MENDES et al., 2000). Foi verificado por Santana et al. (2012) a possível presença do flavonóide rutina no EECp e estes autores atribuem a este flavonóide a ação anti-inflamatória demonstrada no modelo de pancreatite aguda. Portanto, sugere que o efeito gastroprotetor do EECp, pode ser devido a este flavonóide, que possuem atividade antiulcerogênica e previne a mucosa gástrica de lesões produzidas por vários métodos de indução de úlcera por etanol (LA CASA et al., 2000) e AINE (RABEEM, 2010).

A integridade da mucosa gástrica depende do equilíbrio entre os fatores protetores e agressores. Portanto, o tratamento farmacológico para inibir a secreção ácida não é o único

fator importante; faz-se também necessário um aumento dos fatores que protejam a integridade da mucosa gástrica (DAJANI e KLAMUT, 2000).

O modelo clássico de úlcera por etanol é frequentemente usado para avaliar a atividade de drogas anti-ulcerogênicas. A úlcera por etanol produz espécies reativas de oxigênio que causam um desequilíbrio entre o processo antioxidante e redução dos níveis do grupo sulfrídílico e prostaglandinas (LÓPEZ et al., 1996). A úlcera por etanol reduz os níveis de NO na mucosa gástrica (MASUDA et al., 1995). O óxido nítrico é sintetizado pela enzima NOS a partir da L-arginina (TAKAHASHI et al., 1998); o mesmo tem um papel importante em reparar danos na mucosa gastrointestinal com a participação do bicarbonato e a presença do muco, regulação do fluxo sanguíneo através da ativação dos canais de  $K_{ATP}$  na parede do estômago (MURPHY e BRAYDEN, 1995).

A produção de NO é realizada pelas enzimas óxido nítrico sintase (NOS). As isoformas constitutivas (NOSc e NOSe) e induzível (iNOS) tem a função em manter a integridade da mucosa gástrica (ALDERTON, 2001). O aumento da geração do NO a partir do iNOS durante o estresse é conhecido para exercer efeitos citostático e citotóxicos (SUDHIR et al., 2009) e devido à inflamação pode promover danos epitelial na mucosa gástrica (MEURS et al., 2003). Estudos indicam que o NO está envolvido na preservação da mucosa em modelos experimentais de úlcera gástrica por promover vasodilatação, redução da peroxidação lipídica e também por uma ação anti-inflamatória nos tecidos (CHO, 2001; KWIECIÉN et al., 2008). Porém, o papel do NO na regulação e na manutenção das funções da mucosa gástrica ainda não é totalmente conhecido (KHATTAB et al., 2001). O L-NAME bloqueia a produção de NO através da inibição das enzimas NOS. Outro estudo foi para avaliar o papel do NO na gastroproteção do EECp e os resultados deste presente estudo mostram que a administração deste agente o L-NAME (70 mg/kg) não interferiu na ação gastroprotetora do EECp, (100 mg/kg) sugerindo que a atividade do EECp em proteger a mucosa gástrica não está relacionada com o NO. A indução de iNOS pode ser suprimida por IL-4, IL-10 sozinha ou sinergicamente com macrófagos e por IL-8 (DAVIES et al., 1995). As citocinas inflamatórias regulam da síntese do NOS e a atividade da arginase *in vivo* (MODOLLEL et al., 1995). O bloqueio da síntese de NO aumenta o estresse oxidativo, levando a ativação de mastócitos que nesse estudo em específico, se encontram em grande quantidade no trato digestório, mais precisamente na região da submucosa. O NO exerce seus efeitos atuando sobre a guanilato ciclase, na via da GMPc, ou atuando diretamente sobre canais de potássio dependentes de cálcio, gerando hiperpolarização nas células

endoteliais dos vasos que resulta em vasodilatação. Essas células são responsáveis pela liberação de mediadores que causam o aumento da permeabilidade epitelial (ODABASOGLU et al., 2006; LAPA et al., 2008).

O NO tem um importante papel na modulação da defesa da mucosa gástrica, através dos fatores fisiológicos inerentes à mucosa; este mediador é um grande inibidor da agregação de neutrófilo e auxilia no processo de reparo cicatrização da úlcera gástrica (KWIECIEŃ et al., 2008).

Outra análise feita neste estudo refere-se ao mecanismo de ação anti-úlcera através do mediador gasoso H<sub>2</sub>S em lesões gástricas induzidas por etanol absoluto. A mucosa gástrica quando agredida por agentes endógenos como ácido gástrico, bile, enzimas digestivas, bem como por agentes exógenos como anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e etanol, promovem a formação de úlceras como respostas inflamatórias fisiológicas (SZABO et al., 1985; PESKAR et al., 1986), diminuindo assim a resistência da mucosa gástrica que fica susceptível a lesões caracterizadas por perda epitelial, edema da mucosa e hemorragia subepitelial (GUSLANDI, 1987; MEDEIROS et al., 2008). A mucosa gástrica depende de fatores defensivos que são modulados por mediadores solúveis, mais notavelmente pelo NO e prostaglandinas. Além desses, podemos ressaltar através de estudos recentes o efeito gastroprotetor do H<sub>2</sub>S (WALLACE, 2008).

Ao longo do tempo o H<sub>2</sub>S foi reconhecido como poluente ambiental, porém este mediador gasoso vem se destacando com uma grande importância como mediador em vários processos fisiológicos como, por exemplo, um neuromodulador (WANG, 2002) e um grande controlador endógeno de processos inflamatórios agudos (ZANARDO et al., 2006; DAL-SECCO et al., 2008). Um dos seus primeiros efeitos fisiológicos é o relaxamento do músculo liso vascular, resultando em vasodilatação, uma condição presente na inflamação (ZHAO et al., 2002; ZHONG et al., 2003).

O H<sub>2</sub>S é um mediador gasoso que se assemelha a outros mediadores como NO e CO durante processos inflamatórios. O H<sub>2</sub>S apresenta efeitos paradoxais; evidências demonstram que o sulfeto de hidrogênio pode estar envolvido em prevenir danos ao tecido gástrico, migração leucocitária, formação de edema e nocicepção, bem como, também pode ser um agente de efeito contrário, causando danos ao tecido (FIORUCCI et al., 2006; CUNHA et al., 2008). Em estudos de Bathia et al. (2005a), em modelo de edema de pata induzido por carragenina, observa-se que houve um aumento da síntese do H<sub>2</sub>S por parte dos tecidos (*in vitro*); quando houve a inibição da enzima CSE através da administração do PAG

nos animais, o efeito como formação de edema e minimizado devido ao tratamento com PAG. Em estudos sobre a pancreatite induzida pela ceruleína, quando inibiu a CSE com PAG, observou-se redução das lesões neuromuscular e pancreáticas observadas na pancreatite (BATHIA et al., 2005b). Contrariamente, estudos com AINES associados à molécula de H<sub>2</sub>S, por exemplo: mesalamina, ATB-343 e ATB-337, mostram que esses agentes anti-inflamatórios apresentam efeitos potencializados quando comparados aos AINES comuns. Esta associação demonstra que a molécula do H<sub>2</sub>S melhora a atividade anti-inflamatória desses componentes (WALLACE, 2007), além de proporcionar menor toxicidade gástrica (WALLACE, 2010).

Os resultados deste trabalho demonstram que a inibição endógena do H<sub>2</sub>S pelo agente bloqueador PAG, inibidor irreversível da CSE, reverteu parcialmente a gastroproteção da *Caesalpinia pyramidalis* sobre a lesão gástrica induzida pelo etanol quando comparado ao grupo que recebeu apenas o extrato desta planta. Essa observação sugere que o extrato da *Caesalpinia pyramidalis* provavelmente esteja agindo pela via deste mediador gasoso. Apesar de vários autores comprovarem papel duplo do H<sub>2</sub>S, como pró-inflamatório na endotoxemia induzida por lipopolissacarídeo (LPS), administração do H<sub>2</sub>S agravou a lesão pulmonar (LI et al., 2005) e como anti-inflamatório após a inibição irreversível da CSE através do PAG reduz a pancreatite (COLLIN et al., 2005). Pesquisas futuras com o EE da *Caesalpinia pyramidalis* e doador do H<sub>2</sub>S, reagente de Lawesson, necessitam ser realizadas para que haja melhor compreensão quanto ao mecanismo deste mediador gasoso em vários aspectos, tanto fisiopatológico como fisiológico no que diz respeito às afecções gástricas.

A literatura relata que há uma grande participação dos mastócitos durante os processos inflamatórios. Estes são células derivadas de progenitores hematópoéticos CD34<sup>+</sup> na medula óssea (KITAMURA et al., 1987) residentes em tecidos (KULKA e BEFUS, 2003) que liberam mediadores como as IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-14 e IL-16, as quais são ativas e pré-formadas e estocadas em seus grânulos durante a patogenia aguda (BOCHSLER e SLAUSON, 2002). A liberação desses mediadores induz a migração de células inflamatórias (neutrófilos e macrófagos), aumento da permeabilidade vascular, secreção de muco, aumento da motilidade gastrintestinal e broncoconstrição que constituem os sinais e sintomas de alergia e anafilaxia (METCALFE, 2008). Vários estudos histológicos têm relatado a presença de mastócitos na sinóvia normal humana e expansão dessa população na artrite reumatoide, gota, osteoartrose e outras doenças (NIGROVIC e LEE, 2007).

Assim como encontrado em outros trabalhos que estudam a mucosa (MEUSER BATISTA, et al., 2011), houve um predomínio de mastócitos de fenótipo mucoso em todos os grupos estudados neste trabalho. Os proteoglicanos dos MMC são compostos por sulfato de condroitina di-B, A e E enquanto que os dos CTMC são compostos por heparina e sulfato de condroitina E (MOON et al., 2010; MEUSER BATISTA, et al., 2011). Curiosamente, os fenótipos são reversíveis em certas condições e a diferenciação entre os dois fenótipos tem sido demonstrada. A heterogeneidade dos subtipos de mastócitos nos tecidos está provavelmente relacionada com as condições do microambiente do tecido (por exemplo, o nível de citocinas, hormônios, espécies reativas, radicais e contato com células adjacentes) (MOON et al., 2010). Podemos observar que os mastócitos híbridos só aparecem quando o tecido gástrico é submetido a lesão por etanol. É provável que os mastócitos mucosos e os mastócitos de tecido conjuntivo tenham mudado seu fenótipo para mastócitos híbridos devido ao estímulo de lesão na mucosa.

Interessante observar que no grupo pré-tratado com L-NAME e tratado com EECp o número de mastócitos mucosos foi maior do que nos outros tratamentos, sugerindo que o bloqueio do óxido nítrico antes da lesão por etanol em conjunto com a ação do extrato estimulou a proliferação de mastócitos nesse fenótipo. Com exceção do grupo tratado com o EECp, todos os tratamentos no modelo de lesão ulcerativa por etanol demonstraram um aumento significativo no número de mastócitos mucosos. No tratamento com a EECp não houve diferença significativa entre os subtipos de mastócitos. A relação da melhora da lesão ulcerativa pelo tratamento com EECp pode ser devido à presença e ação conjunta dos três subtipos de mastócitos. No trabalho de Hampton e Hale (2010) observamos que animais deficientes de mastócitos são mais sensíveis a úlcera péptica. Os mastócitos possuem um papel central no progresso da lesão ulcerativa.

O estudo dos diferentes fenótipos de mastócitos no músculo cardíaco de camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi* mostrou um predomínio de mastócito mucoso com a diminuição após alguns dias de infecção (MEUSER-BATISTA et al., 2008). No nosso modelo, o número de mastócitos não foi alterado com a lesão ulcerativa. Apesar de não termos observado um aumento de mastócitos com a indução da lesão, os mastócitos presentes no tecido gástrico podem possuir uma ação gastroprotetora pela liberação de IL-4. A produção de IL-4 por mastócitos na infecção da mucosa por helmintos é crucial para a expulsão de parasitas (IERNA et al., 2008).

Estudos de afecções das vias aéreas relatam que a IL-4 possui um papel pró-inflamatórias (CORREN, 2011). Contudo, os trabalhos que estudam a mucosa gástrica mostram a participação dessas citocina como anti-inflamatória (OPAL et al., 2000; YADAV et al., 2009) Yadav et al. (2009) mostraram que o tratamento com o fármaco alipilrocatecol em úlcera induzida por indometacina diminuiu os níveis de citocinas inflamatórias e aumenta os níveis de citocinas anti-inflamatórias como a IL-4. Na agressão da mucosa por *H. pylori* a IL-4 inibe a progressão da inflamação e ao mesmo tempo diminui a expressão do IFN- $\gamma$ , que é produzido pelas células CD4 de perfil Th1 (OPAL et al., 2000). No nosso trabalho, podemos observar que no tratamento com EECp em úlcera induzida por etanol houve um aumento de IL-4. Considerando o papel da IL-4 como agente anti-inflamatório na úlcera gástrica, é provável que o efeito protetor da EECp seja por ativação de citocinas anti-inflamatórias como a IL-4.

Na mucosa do trato gastrointestinal, os linfócitos estão presentes em grandes quantidades em três regiões principais: na camada epitelial, espalhados pela lâmina própria e em coleções organizadas na lâmina própria chamadas placas de Peyer. As células de cada região apresentam propriedades fenotípicas e funcionais distintas. A lâmina própria intestinal contém uma população mista de células que inclui os linfócitos T, que são em sua maioria CD4+ e possuem o fenótipo de células ativadas (KUMAR et al., 2005). Quando há um trauma na mucosa gástrica por agentes agressores há um desequilíbrio entre as células CD4 de perfil Th1 e Th2 com predomínio de células de perfil Th2 que induz o aumento das citocinas tais como IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  (SHEARER et al., 1997; YADAV et al., 2009). A grande quantidade de células IL-4+ observadas na região da mucosa e na região serosa no grupo tratado com EECp pode ser células CD4 ativadas. É provável que o EECp tenha propriedades imunomodulatórias tendo atividade na ativação de expressão de citocinas de perfil Th2.

Depois do trauma, o balanço entre Th1 e Th2 com predomínio de Th2 é refletido no aumento de citocinas como IL-4 e IL-10 induzidas por arginase (SHEARER et al., 1997). O metabolismo da arginina pode ser catalisado pela arginase e o NOS tem um papel importante na úlcera gástrica e sua cura. O papel da arginase na inflamação aguda e reparo dos tecidos tem sido demonstrado (SATRIANO, 2004; YADAV et al., 2009). Observamos que houve diminuição na expressão da enzima iNOS durante a úlcera gástrica no grupo pré-tratado com o veículo e tratado com EEE da *Caesalpinia pyramidalis*. Estudos de outros autores relatam que o NO tem papel duplo na resposta ulcerogênica na mucosa gástrica em que a enzima

iNOS, via NO, apresenta ação anti-ulcerogênica e pró-ulcerogênica (WHITTLE et al., 1995; TANAKA et al., 1999). O catabolismo da L-arginina pela NOS produz NO, que pode desempenhar um papel dúbio na defesa da mucosa gástrica e lesões. A menor concentração de NO produzido pelas isoformas, eNOS e a cNOS auxilia na cicatrização das úlceras devido o aumento do fluxo sanguíneo (WHITTLE et al., 1995) e angiogênese (MA, LI e WALLACE, 2000) na mucosa gástrica que se encontra lesionada. No entanto, a elevada produção do NO pela iNOS pode contribuir para a patogênese de várias desordens gastrointestinais incluindo úlcera péptica (SOUZA et al., 2004; JAISWAL et al., 2001). Um aumento na atividade de iNOS e um decréscimo da atividade de eNOS na mucosa gástrica estão intimamente relacionadas no desenvolvimento de lesões na mucosa gástrica. Isto define a correlação entre a iNOS e a atividade da arginase *in vivo* que decide a ulceração e cicatrização da mucosa gástrica lesionada (MODOLLEL et al., 1995; YADAV et al., 2009).

Estudos tem demonstrado a ação anti-inflamatória do NO quando liberado através de medicamentos como AINES para tratamento de afecções do estômago, com a ação de minimizar as lesões gástricas, que consideravelmente aumentam a eficácia desses tratamentos (WALLACE, 2008).

## 7 Conclusão

Os resultados obtidos permitem concluir que os efeitos gastroprotetores do extrato etanólico da entrecasca da *Caesalpinia pyramidalis* se dá, ao menos em parte, devido ao aumento do mediador gasoso  $H_2S$ , diminuição da expressão INOS e aumento da expressão de IL-4. Porém, de modo adicional observamos que o extrato não induziu um aumento de mastócitos mucosos, o que pode ter contribuído para seu efeito protetor.

## **Bibliografia**

- ABBAS, A. K.; LICHTMANN, A. H. Citocinas. In: Imunologia celular e molecular. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, Cap. 11, p. 251-282, 2005.
- AGNIHOTRI, N.; KAUR, H.; KAUR, N.; SAROTRA, P. Role of oxidative stress in lansoprazole-mediated gastric and hepatic protection in wistar rat. Indian Journal of Gastroenterology, v.26, p.118-121, 2007.
- AIHARA, E.; NOMURA, Y.; SASAKI, Y.; ISE, F.; KITA, K.; TAKEUCHI, K. Involvement of prostaglandin E receptor EP3 subtype in duodenal bicarbonate secretion in rats. Life Sciences, v. 80, p. 2446-2453, 2007.
- ALBUQUERQUE UP, MEDEIROS PM, ALMEIDA ALS et al (2007) Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. J Ethnopharmacol 114:325–354.
- ALLEN, A., FLEMSTRON, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. American Journal of Physiology, Cell Physiology 288, 1-19, 2005.
- AL-SHABANAH, O.A., RAZA, M., AL-HARBI, M.M., AL-BEKAIRI, A.M., Effect of ninhydrin on the biochemical and histopathological changes induced by ethanol in gastric mucosa of rats. Life Sci. 67, 559-566, 2000.
- ALVES, A. U.; GALINDO, E. A.; JUNIOR, J. M. B. Superação da dormência em sementes de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. Revista Árvore, v. 31, n. 3, p. 405-415, 2007.
- ALDERTON, W. K. C. E.; COOPER, R. G. Knowles, Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition, Biochem. J. 357 593-615 (2001).
- AMIN, K. The role of mast cells in allergic inflammation. Respiratory Medicine, v. 106, n. 1, p. 9-14, 2012.
- ANDRADE, S. F.; CARDOSO, L. G. V.; CARVALHO, J. C. T.; BASTOS, J. K. Antiinflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populous acid from bark Wood of *Austroplenckia populnea*. Journal of Ethnopharmacology, v.109, p464-471, 2007.
- ANDREWS, F. J.; MALCONTENTI-WILSON, C.; O'BRIEN, P. E. Protection against gastric ischemia-reperfusion injury by nitric oxide generators. Dis. Sci., v. 39, p. 366-373, 1994.
- ANSEL, KM.; LEE, DU.; RAO, A. An epigenetic view of helper T cell differentiation. Nat Immunol. 2003; 4:616-623.

- ARRIETA, J.; BENITEZ, J.; FLORES, E.; CASTILHO, C.; NAVARRETE, A. Purification of gastroprotective triterpenoids from stem bark of *Amphipterygium adstringens*; roles of prostaglandins, sulphidryls, nitric oxide and capsaicin neurons. *Planta Médica*, v. 69, p. 905-909, 2003.
- ARCHANA, P.; TANDAN, S. K.; CHANDRA, S.; LAL, J. Antipyretic and analgesic activities of *Caesalpinia bonducella* seed kernel extract. *Phytotherapy Research*, 19, 376-381, 2005.
- BAHIA, M. V.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Occurrence of biflavones in leaves of *Caesalpinia pyramidalis* specimens. *Química Nova*, v. 33, n. 6, p. 1297-1300, 2010.
- BAHIA, M. V.; SANTOS, J. B.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Biflavonoids and other phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae). *Journal of Brazilian Chemistry Society*, v. 16, n. 6B, p. 1402-1405, 2005.
- BARTCHEWSKY, W.; MARTINI, MR.; MASEIRO, M. Effect of *Helicobacter pylori* infection on IL-8, IL-1beta and COX-2 expression in patients with chronic gastritis and gastric cancer. *Scand J Gastroenterol*; 156: 97-101, 2009.
- BARROS, M. P.; LEMOS, M.; MAISTRO, E. L.; LEITE, M. F.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J.K.; ANDRADE, S. F. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 120, p. 372-377, 2008.
- BHATIA, M.; SIDHAPURIWALA, J.; MOOCHHALA, SM.; MOORE, PK. Hydrogen sulphide is a mediator of carrageenan-induced hindpaw edema in the rat. *Br J Pharmacol* 145: 141-144, 2005a.
- BHATIA, M.; WONG, F.L.; FU, D.; LAU, H.Y.; MOOCHHALA, S. M.; MOORE, P. K. Role of hydrogen sulphide in acute pancreatitis and associated lung injury. *FASEB J.*, V.19 n.6, p.623-628. 2005b.
- BISPO, P.C.; VALERIANO, M.M.; KUPLICH, T.M. Relação da vegetação de caatinga com a condição geomorfométrica local. *Rev. Bras. Eng. Agric. Ambient.*, 14, 523-530, 2010.
- BOCHSLER P.N.; SLAUSON, D. O. Inflammation and repair of tissue. In: SLAUSON, D.O.; COOPER, B.J. *Mechanisms of disease: a textbook of comparative pathology*. 3. ed. St Louis: Mosby,. Cap. 4. p. 140-245, 2002.

- BULUT, R.; UNLUCERCI, Y.; BEKPINAR, S.; KUNTSAL, L. Nitric oxide-mediated regulation of gastric H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -ATPase and alcohol dehydrogenase following ethanol induced injury in rats. *Dig. Dis. Sci.*, v. 7, p. 1417-1422, 1999.
- BRAGA, R. *Plantas do Nordeste – Especialmente do Ceara*. Editora Universitaria da UFRN, 4.ed., Natal-RN, 1960.
- BREDT, D.S.; HWANG, P.M.; GLATT, C.E.; LOWENSTEIN, C.; REED, R.R.; SNYDER, S.H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, v. 351, p. 714-718, 1991.
- BROWN, J. F.; TEPPERMAN, B. L.; HANSON, P. J.; WHITTLE, B. J. R.; MONCADA, S. Differential distribution of nitric oxide synthase between cell fractions isolated from the rat gastric mucosa. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 184, 680-685, 1992.
- CALATAYUD, S.; SANZ, M. J.; CANET, A.; BELLO, R.; DE ROJAS, F. D.; ESPLUGUES, J. V. Mechanisms of gastroprotection by transdermal nitroglycerin in the rat. *British Journal of Pharmacology*, v. 127, p. 1111-1118, 1999.
- CALDER, V. L.; JOLLY, G.; HINGORANI, M.; ADAMSON, P.; LEONARDI, A.; SECCHI, A. G.; BUCKLEY, R. J.; LIGHTMAN, S. Cytokine production and RNAm expression by conjuntival T-cell lines in chronic allergic eye disease. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 29, p. 1214-1222, 1999.
- CARVALHO, A. C. B., BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, p. 314-319, 2008.
- CALIXTO, J. B. twenty live yearsol research on medicinal plants in latin America A personal view. *J. Ethnopharmacol*, v. 100, p31-134, 2005.
- CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. COX-3, a cicloxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. *Proccedings of the National Academy Sciences*, v. 99, p. 13926-13931, 2002.
- CHENG, Y.; MA, L. Y.; MIAO, J. H.; XU, X. D.; YUAN, J. Q.; YANG, J. S. A new cassane diterpenoid lactone from the seed of *Caesalpinia minax*”. *Chinese Chemical Letters*, v. 20, p. 444-446, 2009.
- CHO, C. H. Current roles of nitric oxide on gastrointestinal disorders. *Journal of Physiology-Paris*, v. 95, p. 253-256, 2001.

- COLLIN, M., ANUAR, F.B.M., MURCH, O., BHATIA, M., MOORE, P.K., THIEMERMANN, C., Inhibition of endogenous hydrogen sulfide formation reduces the organ injury caused by endotoxemia. *Br. J. Pharmacol.* 146, 498-505, 2005.
- CORUZZI, G.; ADAMI, M.; MORINI, G.; POZZOLI, C.; CENA, C.; BERTINARIA, M., GASCO, A. Antisecretory and gastroprotective activities of compounds endowed with H<sub>2</sub> antagonistic and nitric oxide (NO) donor properties. *Journal of Physiology-Paris*, v. 94(1), p. 5-10, 2000.
- CORREN, J. Cytokine inhibition in severe asthma: current knowledge and future directions. *Cur opinion pulm med.* 17(1): 29:33, 2011.
- COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. *Rev. Virtual Quim.*, 2, 47-58, 2010.
- CUNHA, T.M.; DAL-SECCO, D.; VERRI, W.A. JR.; GUERRERO, A.T.; SOUZA, G.R.; VIEIRA, S.M.; LOTUFO, C.M.; NETO, A.F.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Dual role of hydrogen sulfide in mechanical inflammatory hypernociception. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 590, n. 1/3, p. 127-135, 2008.
- DAJANI, E. Z. KLAMUT, E. Z. Novel therapeutic approaches to gastric and duodenal ulcers: an update. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 9, 1537-1544, 2000.
- DAL-SECCO, D.; CUNHA, TM.; FREITAS, A.; ALVES-FILHO, JC, SOUTO FO, FUKADA SY, GRESPAN R, ALENCAR NM, NETO AF, ROSSI MA, FERREIRA H. S.; HORTHORSALL, S. J.; CUNHA, Q. F. Hydrogen sulfide augments neutrophil migration through enhancement of adhesion molecule expression and prevention of CXCR2 internalization: role of ATP-sensitive potassium channels. *J Immunol* 181:4287-4298 (2008).
- DAVIES, M. G.; FULTON, G. J.; HAGEN, P. O. *Clinical Biology OF Nitric Oxide.* BR J SURG, 82:1598-1610, 1995.
- DANGELO, J.G.; FATTINI, C. A. *Anatomia humana sistêmica e segmentar.* São Paulo: Editora Atheneu, 2007.

- DANTAS, B.F; CORREIA, J.S; MARINHO, L.B.; ARAGÃO, C.A. Alterações bioquímicas durante a embebição de sementes de catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* tul.) Revista Brasileira de Sementes, V. 30, p.221-227, 2008.
- DENNINGER, J.; MARLETTA, M. Guanylate cyclase and the NO/cGM signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411:334-350.
- ECK M, SCHMAUSSER B, SCHELLER K, TOKSOY A.; KRAUS M.; MENZEL T.; MULLER-HERMELINK, K. H.; GILLITZER, R. CXC chemokines Gro $\alpha$ /IL-8 and IP-10/MIG in *Helicobacter pylori* gastritis. *Clinical and Experimental Immunology*. 122(2): 192-199, 2000;.
- ELLIOT, SN.; WALLACE, JL.; Neutrophil-mediated gastrointestinal injury. *Can J Gastroenterol* 12:559-568, 1998.
- FIORUCCI, S.; ANTONELLI. E.; DISTRUTTI. Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. *Gastroenterology* 129:1210-1224, 2005.
- FIORUCCI, S.; DISTRUTTI, E.; CIRINO, G.; WALLACE, J. L. The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. *Gastroenterology* 131:259-271, 2006.
- FORD-HUTCHINSON, A. W. Activation of leukotriene production in granulocytes: effects on cell activation. *Immunol. Ser.*, v. 57, p. 87-106, 1992.
- FORMELA, L. J.; GALLOWAY, S. W.; KINGSNORTH, A. N. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *Brazilian Journal of Surgery*, v. 82, p. 6-13, 1995.
- GALLIN, J. I.; GOLDSTEIN, I. M.; SNYDERMAN, R. *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. New York: Raven Press, 1992.
- GAZZIERI, D.; TREVISANI, M.; SPRINGER, J.; HARRISON, S.; COTTRELL, G.S.; ANDRE, E.; NICOLETTI, P.; MASSI, D.; ZECCHI S.; NOSI, D.; SANTUCCI, M.; GERAD, N. P.; LUCATTELLI, M.; LUNGARELLA, G.; FISCHER, A.; GRADY, E. T.; BUNNET, N. W.; GEPPETTI, P. Substance P released by TRPV-1 expressing neurons produces reactive oxygen species that mediate ethanol-induced gastric injury. *Free Radic.Biol. Med.* 15;43, 581-589, 2007.
- GIULIETTI, A. M.; DU BOCAGE NETA, A. L.; CASTRO, A. A. J. F. GAMARRA-ROJAS, C. F. L.; SAMPAIO, E. V. S. B.; VIRGÍNIO, J. F.; QUEIROZ, L. P.; FIGUEIREDO, M. A.; RODAL, M. J. N.; BARBOSA, M. R. V.; HARLEY, R. M. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. In *Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação* (SILVA, J.M.C.; TABARELLI, M.; FONSECA, M.T.;

- LINS, L.V., org.). MMA, UFPE, Conservation International do Brasil, Fundação Biodiversitas, Embrapa Semi-Árido, Brasília, p.48-90 (2004).
- GRUBER, B. L.; KAPLAN, A. P. Mast cells and rheumatic diseases. *Arthritis and Allied Conditions.*, p. 417-436, 1993.
- GUIMARÃES, J.; MEDEIROS, J.C.; VIEIRA, L. A. Programa fitoterápico farmácia viva no SUS-Betim, Minas Gerais. *Divulgação em Saúde Pública para Debate* 36:41-47, 2006.
- GUSLANDI, M. Effect of ethanol on the gastric mucosa. *Dig. Disg.*, v. 5, p. 21-32, 1987.
- HAMPTON, D. D.; HALE, L. P. Mast Cells Are Critical for Protection against Peptic Ulcers Induced by the NSAID Piroxicam. *PLoS ONE* 6(8): -Volume 6, Issue 8, e 23669, 2011.
- HUGHES, M. N.; CENTELLES, M. N.; MOORE, K. P. Making and working with hydrogen sulfide the chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: a review. *Free Radical Biology & Medicine*, v, 47, n. 10, p.1346-1353, 2009.
- IERNA, M. X.; SCALES, H. E.; SAUNDERS, K. L.; LAWRENCE. C.E. Mast cell production of IL-4 and TNF may be required for protective and pathological responses in gastrointestinal helminth infection *mucosal immunology* 1, 147-155 (2008).
- ISE, F.; TAKASUKA, H.; HAYASHI, S.; TAKAHASHI, K.; KOYAMA, M.; AIHARA, E.; TAKEUCHI, K.; Stimulation of duodenal HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion by hydrogen sulphide in rats: relation to prostaglandins, nitric oxide and sensory neurons. *Acta Physiol*; 201:117-126, 2011.
- ITOH T.; WAKATSUKI Y.; YOSHIDA M.; USUI T.; MATSUNAGA Y.; KANEKO S.; CHIBA T.; KITA T. The vast majority of gastric T cells are polarized to produce T helper 1 type cytokines upon antigenic stimulation despite the absence of *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Gastroenterology*. 1999; 34(5):560-570.
- JAHOVIC, N.; ERKANLI, G.; ISERI, S.; ARBAK, S.; ALICAN, I. Gastric protection by  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone against ethanol in rats: Involvement of somatostatina. *Life Sciences*, v. 80, p. 1040-1045, 2007.
- JAISWAL, M.; LARUSSO, N. F.; GORES, G. J. Nitric oxide in gastrointestinal epithelial cell carcinogenesis: linking inflammation to oncogenesis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 281, G626-G634, 2001.

- JUN, H.; XIAOLING, Y.; WEI, W.; HAO, W. LEI, H.; LIJUN, D. Antioxidant activity in vitro of three constituents from *Caesalpinia sappan* L. Tsinghua Science and Technology, v. 13, n. 4, p. 474-479, 2008.
- KIM, Y.; SO, H. S.; YOUN, M. J.; WOO, W. H.; SHIN, S. H.; LEE, I.; MONN, B. S.; CHO, K. H.; PARK, R. Anti-inflammatory effect of Sasim extracts in PHA-stimulated THP-1 and peripheral blood mononuclear cells from cerebral infarction patients. Journal of Ethnopharmacology, v.112, p. 32-39, 2007.
- KITAMURA, Y.; KANAKURA, Y.; FUJITA, J.; NAKANO, T. Differentiation and transdifferentiation of mast cells: a unique member of the hemapoietic cell family. Int J Cell Cloning 3:108-121, 1987.
- KITAMURA, Y.; MIYOSHI, I. Development and differentiation of mast cell and basophils. Acta Haem. Jap., v. 41, p. 1251-1259, 1978.
- KHATTAB, M. M.; GAD, M. Z.; ABDALLA, D. Protective role of nitric oxide in indomethacin induced gastric ulceration by a mechanism independent of gastric secretion. Pharmacological Research, 43, 463-467, 2001.
- KLEIN-JR, LC.; GANDOLFI, RB.; SANTIN, JR.; LEMOS, M.; CECHINEL-FILHO, V.; ANDRADE, S. F. Antiulcerogenic activity of extract, fractions, and some compounds obtained from *Polygala cyparissias* St. Hillaire & Moquin (Poligalaceae). Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 381:121-126 (2010).
- KOC, M.; IMIK, H.; ODABASOGLU, F. Gastroprotective and anti-oxidative properties of ascorbic acid on indomethacin-induced gastric injuries in rats. Biol Trace Elem Res 126(1-3):222-236, 2008.
- KRISTJANSSON, G.; HOGMAN, M.; VENGE, P.; HALLGREN, R. Gut mucosal granulocyte activation precedes nitric oxide production: studies in celiac patients challenged with gluten and corn. Gut, 54 (6): 769-774, 2005.
- KULKA, M.; BEFUS, A. D. The dynamic and complex role of mast cells in allergic disease. Arch Immunol Ther Exp (Warz) 51: 111-120, 2003.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. R.; FAUSTO, N. Inflamação aguda e crônica. In: ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. Patologia – Bases Patológicas das Doenças. 7. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 2, p. 65-66, 2005.

- KWIECIEN, S.; PAWLIK, M. W.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P. C.; LIWOWSKI, W.W.; PAWLIK, S.J.; KONTUREK : Nitric oxide (no)-releasing aspirin and (no) donors in protection of gastric mucosa against stress. *J Physiol Pharmacol*; 59:103-115,2008.
- LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterology*, v. 135, p. 41-60, 2008.
- LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; CASTRO, M S. A.; LIMA, T. C. M. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. Campinas: Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais – SBPM, UNIFESP-SP, p. 7-43, 2008.
- LA CASA, C.; VILLEGAS, I.; LA LASTRA, C.A.; MOTILVA, V.; CALERO, M.J.M.,. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 45-53,2002.
- LEONG, R.W. Differences in peptic ulcer between the East and the West. *Gastroenterology. Clinics North America*, 38, 363-379, 2009.
- LI, L., BHATHIA, M.; ZHY, Y. Z.; ZHU, Y.C. et al: Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *FASEB J.*, V. 19, n.9, p. 1196-1198, 2005.
- LOPEZ-BELMONTE, J.; WHITTLE, B.J.; MONCADA, S. The actions of nitric oxide donors in the prevention or induction of injury to the rat gastric mucosa. *Br. J. Pharmacol.*, v. 108, p. 73-8, 1996.
- LUO, J. C.; SHIN, V. Y.; WU, W. K. Tumor necrosis factor-alpha stimulates gastric epithelial cell proliferation *AmJ Physiol Gastrokintest Liver Physiol* 2005; 288:G32-38.
- MAITY, P.; BISWAS, K.; ROY, S.; BANERJEE, R. K.; BANDYOPADHYAY, U. Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer recent mechanism update. *Mollecular and Cellular Biochemistry*, 253, 329-338, 2003.
- MA, LI.; WALLACE, J. L. Endothelial nitric oxide synthase modulates gastric ulcer healing in rats. *Am J. Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G341-G346, 2000.
- MARTIN, G. R.; WALLACE. J. L. Gastrointestinal inflammation: a central component of mucosal defense and repair. *Exp Biol Med*; 231:130-137, 2006.
- MASUDA, E.; KAWANOP, S.; NOGAN, K.; TSUY, S.; TAKEY, Y.; TSUJI, M.; OSHILA, M.; MICHIDA,T; KOBASHI,L.; NAKAWA, A.; FUSAMOTO, H.; KAMADA, T. Endogenous nitric oxide modulates ethanol-induced gastric mucosal Injury in rats. *Gastroentorology*, v.108, p.58-64, 1995.

- MATOS, F.J.A. Introdução a fotoquímica experimental. 2. ed. Fortaleza: UFC. 1997.
- MATSUHASHI, T.; OTAKA, M.; ODASHIMA, M.; JIN, M.; KOMATSU, K.; WADA, I.; HORIKAWA, Y.; OHBA, R.; OYAKE, J.; HATAKEYAMA, N.; WATANABE, S. Protective effect of a novel rice extract against ethanol-induced gastric mucosal injury in rat. *Digestive Diseases and Sciences*, v. 52, p. 434-441, 2007.
- MENDES, C. C.; BAHIA, M. V.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Constituents of *Caesalpinia pyramidalis*. *Fitoterapia*, v. 71, p. 205-207, 2000.
- MEDEIROS, J. V.; GADELHA, G. G.; LIMA, S. J.; GARCIA, J. A. SOARES, P. M.; SANTOS, A. A.; BRITO, G. A.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. Role of the NO/cGMP/KATP, pathway in the protective effects of sildenafil against ethanol-induced gastric damage in rats. *Br J Pharmacol* 153:721-727 (2008).
- MEDEIROS, J. V. R.; BEZERRA, V. H.; GOMES, A. S.; BARBOSA, A. L. R.; JÚNIOR, R. C. P. L.; SOARES, P. M. G.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A.; CUNHA, F. Q.; SOUZA, M. H. L.; Hydrogen Sulfide Prevents Ethanol-Induced Gastric Damage in Mice: Role of ATP-Sensitive Potassium Channels and Capsaicin-Sensitive Primary Afferent Neurons P. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* vol. 330, no. 3 JPET 330:764-770, 2009.
- MENINGER, C.J.; ZETTER, B. R. Mast cells and angiogenesis. *Semin. Cancer Biol.*, v. 3, p. 73-79, 1992.
- METCALFE, D. D. Mast cells and mastocytosis. *Blood*; 112: 946-956, 2008.
- METZ, M.; MAURER, M. Mast cells—key effector cells in immune responses. *Trends Immunol.* 28 (5), 234-241, 2007.
- MEURS, H.; MAARSINGH, H.; ZAAGSMA, J. RESPONSE TO RICCIARDOLO: the functional significance of arginase in asthma is supported by gene expression. *trends pharmacol. sci.* 11, 562-563, 2003.
- MEUSER-BATISTA, M.; CORREA, J. R.; SOARES, M. J.; HENRIQUES-PONS, A. Isolation of cardiac mast cells in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Tissue Cell* 40: 309-316, 2008.
- MEUSER-BATISTA, M.; CORRÊA J. R.; CARVALHO V. F.; DE CARVALHO BRITTO, C. F. P.; MOREIRA, O. C.; BATISTA, M. M.; SOARES, M. J.; FILHO, F. A.; E. SILVA, P. M.; LANNES-VIEIRA, J.; SILVA, R. C. HENRIQUES –PONS, A.; Mast Cell Function and Death in *Trypanosoma cruzi* Infection. *The American Journal of Pathology*, Volume 179, Issue 4, October 2011, Pages 1894–1904, 06.014, 2011.

- MODOLLEL, M.; CORRALIZA, I.M.; LINK, F.; SOLER, E. K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow derived macrophages by Th1 and Th2 cytokines. *Eur. J. Immunol.* 25, 1101-1104, 1995.
- MOJZIS, J.; HEGEDUSOVA, R.; MIROSSAY, L. Role of mucus in ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal injury in rats. *Physiol Res*; 49(4): 441-446, 2000.
- MOON, TC.; LAURENT, C. D. ST.; MORRIS, KE.; MARCET, C.; YOSHIMURA, T.; SEKAR, Y. BEFUS, A. D. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function *Immunology* vol-3/2: 111-128 march, 2010.
- MOORE, P. K.; BHATIA, M.; MOOCHHALA, S. Hydrogen sulfide: from the smell of the past to the mediator of the future? *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 24, p. 609-611, 2003.
- MUNTANA, N.; PRASONG, S. Study on total phenolic contents and their antioxidant activities of Thai white, red and black rice bran extracts. *Pak. J. Biol. Sci.* 2010, 13, 170-174.
- MUNKE, M.; KRAUS, J. P.; OHURA, T.; FRANKE, U. The gene for cystathionine beta. Synthase (CBS) maps to the subtelomeric region on human chromosome 21q and to proximal mouse chromosome 17. *Am. J. Hum. Gene*, v.42, n.4, p.550, 1988.
- MURPHY, E. M.; BRAYDEN, J. E. Nitric oxide hyperpolarized rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. *Journal of Physiology London* 658 486, 47-58, 1995.
- NAGAHARA, N.; ITO, T.; KITAMURA, H.; NISHINO, T. Tissue and subcellular distribution of mercaptopyruvate sulfurtransferase in the rat: confocal laser fluorescence and immunoelectron microscopic studies combined with biochemical analysis. *Histochem Cell Biol* 110:243-250 (1998).
- NIGROVIC, PA.; LEE, D .M. Synovial mast cells: role in acute and chronic arthritis. *Immunol Rev* 217:19-37, 2007.
- NISHIO, H.; HAYASHI, Y.; TERASHIMA, S.; TAKEUCHI, K. Role of endogenous nitric oxide in mucosal defense of inflamed rat stomach following iodoacetamide treatment. *Life Sciences*, v. 79, p. 1523-1530, 2006.
- ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; SULEYMAN, H.; ASLAN, A.; BAYIR, Y.; HALICI, M.; KAZAZ. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 103, p. 59-65, 2006.

- OPAL, S. M.; DE PALO V. A. Anti-inflammatory cytokines. *Cest.* 2000; 117: 1162-1172.
- O'SHEA, J. J.; MURRAY, P. J. Cytokine Signaling Modules in Inflammatory Responses. *Immunity Review*, v.28, p. 477-487, 2008.
- PASRICHA, P. J. Procinéticos, antieméticos e agentes usados na síndrome do intestino irritável. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. *As bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro: Mac Graw Hill, 2006.
- PAUL, W. E. *Fundamental Immunology*. New York: Lippincott-Raven, 1998.
- PESKAR, B. M. Neural aspects of prostaglandin involvement in gastric mucosal defense. *J. Physiol. Pharmacol.*, v. 52 (4), p. 555-568, 2001.
- PESKAR, B.M.; LANGE, K.; HOPPE, U.; PESKAR, B. A. Ethanol stimulates formation of leukotriene C4 in rat gastric mucosa. *Prostaglandins* 31:283–293, 1986.
- PLAYFORD, R. J.; GHOSH, S. Cytokines and growth factor modulators in intestinal inflammation and repair. *J Pathol*; 250:417-425,2005.
- QUEIROZ, L. P. *Leguminosas da caatinga*. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana. 467p (2009).
- RABEEM, I. T. A. Gastroprotective effect of rutin against indomethacin ulcers in rats. *Basic and clinical pharmacology and toxicology*, 107, 742-750, 2010.
- RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 148, p. 1482-1489, 1987.
- REPETTO, M. G.; LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 35, n. 5, p.523-534, 2002.
- RIBEIRO S. A. R.; DINIZ P. B.F.; ESTEVAM C. S.; MALONE S. P.; RICARDO L.C. A.J.; THOMAZZI S. M.; Gastroprotective activity of the ethanol extract from the inner bark of *Caesalpinia pyramidalis* in rats, *Journal of Ethnopharmacology*,v.147/5, p. 383-388 2013.
- ROBERT, A.; NEZAMIS, J. E. LANCASTER, C.; HANCHAR, A. J. Cytoprotection by prostaglandins in rats.Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. *Gastroenterology* 77, 433-443, 1979.

- RODRÍGUEZ-TÉLLEZ, M.; ARGÜELLES, F.; HERRERÍAS, J. M. Jr.; LEDRO, D.; ESTEBAN, J.; HERRERÍAS, J. M. Antiinflammatory agents less dangerous for gastrointestinal tract. *Current Pharmaceutical Design*, v. 7, p. 951-976, 2001 .
- ROTHER, M.J.; NOWAK, M.; KERDEL, F.A. The mast cell in health and disease. *J.Am. Acad. Dermatol.*, v. 23, p. 615-624, 1990.
- SAWAI, N.; KITA M.; KODAMA, T.; TANAHASHI. T.; YAMAOKA, Y.; TAGAWA, Y.; IWAKURA, Y.; IMANISHI, J.. Role of gamma interferon in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. *Infect. Immun.* 67:279-285, 1999.
- SANTANA, D. G.; SANTOS, C. A.; SANTOS, A. D. C.; NOGUEIRA, P. C. L.; THOMAZZI, S. M.; ESTEVAM, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; CAMARGO, E. A. Beneficial effects of the ethanol extract of *Caesalpinia pyramidalis* on the inflammatory response and abdominal hyperalgesia in rats with acute pancreatitis. *Journal of Ethnopharmacology* 142, 445-455, 2012.
- SANTIN J. R.; LEMOS,M.; KLEIN, L. C.; MACHADO, I. D; COSTA, P.; OLIVEIRA, A. P.; TILIA,C.; SOUZA, J. P.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; ANDRADE, S. F. Gastroprotective activity of essential oil of the *Syzygium aromaticum* and its major component eugenol in different animal models. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 383,149-158, 2011.
- SANTOS, C. A.; SANTOS D. S.; SANTANA D. G.; THOMAZZI, S. M. Evaluation of mechanisms involved in the antinociception of the ethanol extract from the inner bark of *Caesalpinia pyramidalis* in mice *Journal of Ethnopharmacology*148: 205-209 (2013).
- SANTOS, C. A.; PASSOS, A. M. P. R.; ANDRADE, F. C.; CAMARGO, E. A.; ESTEVAM, C. S.; SANTOS, M. R. V.; THOMAZZI, S. M. 2011. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Fabaceae) in rodents. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol.21 no.6, 1077-1083, 2011.
- SATRIANO, J.D. Interregulation of nitric oxide and polyamines. *Amino Acids* 26,321-329, 2004.
- SCHOLMERICH, J. Interleukins in acute pancreatitis. *Scandinavian Journal Of Gastroenterology Supplement*, v. 219, p. 37-42, 1996.
- SCHUBERT, M.L. Gastric Secretion. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, v. 20, p. 519-20, 2004.
- SCHUBERT, M. L.; PEURA, D.A. Control of gastric acid secretion in health and disease. *Gastroenterology*, v. 134, p. 1842-1860, 2008.

- SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. *Current Opinion in Gastroenterology*, v. 27, p. 536-542, 2011.
- SCHULMAN, E.S. The role of mast cells in the inflammatory responses in the lung. *Crit. Rev. Immunol.*, v. 131, p. 35-70, 1993.
- SHEARER, J. D.; RICHARDS, J. R.; MILLS, C. D.; CALDWELL, M. D. Differential regulation of macrophage arhinine metabolism: a proposed role in wound healing. *Am. J. Physiol.* 272, E181, 1997.
- SHIBUYA, N.; MIKAMI, Y.; KIMURA, Y.; NAGAHARA, N.; KIMURA, H. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. *J Biochem* 146:623-626 (2009).
- SOUZA, M. H. L. P.; LEMOS, H. P.; OLIVEIRA, R. B.; CUNHA, F. Q. Gastric damage and granulocyte infiltration induced by indomethacin in tumour necrosis factor receptor 1 (TNF-R1) or inducible nitric oxide synthase (iNOS) deficient mice. *Gut* 53, 791-796, 2004.
- STEAD, R. H.; FRANKS, A. J.; GOLDSMITH, C.H.; BIENENSTOCK, J.; DIXON, M. F. Mast cells, nerves and fibrosis in the appendix: A morphological assessment. *J. Pathol.*, v. 16, p. 209-219, 1990.
- SILVA, H.; SOBRINHO, T. J.; CASTRO, V. T.; LIMA, D.; AMORIM, E. L. Antioxidant Capacity and Phenolic Content of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. *Sapium glandulosum* (L.) Morong from Northeastern Brazil. *Molecules*, v. 16, p. 4728-4739, 2011.
- SILVA, L. M. M.; MATOS, V. P. Morfologia de frutos, sementes e plantulas de catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul. - Caesalpinaceae) e de juazeiro (*Zizyphus joazeiro* Mart. - Rhamnaceae). *Revista Brasileira de Sementes*, Brasilia, v. 20, n. 2, p. 263-269, 1998
- 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* 13: 346-351, 2008.
- SOTER, NA. Mast cell in cutaneous inflammatory disorders. *J Invest Dermatol*; 80: Suppl:22s-25s, 1983.
- SRINIVASAN, R.; CHANDRASEKAR, M. J. N.; NANJAN, M. J.; SURESH, B. Antioxidant activity of *Caesalpinia digyna* root. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 113, p. 284-291, 2007.

- STAMLER, JS.; LAMAS, S.; FANG FC. Nitrosylation: the prototypic redox based signaling mechanism. *Cell* 106: 675- 683, 2001.
- SUNG JJ.; TSOI KK.; MA TK. Causes of mortality in patients with peptic ulcer bleeding: a prospective cohort study of 10,428 cases. *Am J Gastroenterol*; 105:849, 2010.
- SZABO S.; TRIER JS.; BROWN A.; SCHNOOR J. Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. *Gastroenterology* 88:228-236, (1985).
- TANAKA, A.; KUNIKATA, T.;KONAKA, A.; KATO, S.; TAKEUCHI, K. Dual action of nitric oxide in pathogenesis of indomethacin-induced small intestinal ulceration in rats. *Journal of Physiology and Pharmacology* 50, 405-417, 1999.
- TAKAHASHI M.; MAEDA S.; OGURA K.; TERANO A.; OMATA M. The possible role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in gastric ulcer healing: effect of sofalcone on VEGF release in vitro. *J Clin Gastroenterol* 27: S178-S182, 1998.
- TANAS, S.; ODABASOGLU F.; HALICI Z.; AYGUN H.; ASLAN A.; CAKIR A.;SULEYMAN H. Evaluation of anti-inflammatory and antioxidant activities of *Peltigera rufescens* lichen species on acute and chronic inflammation models. *J Nat Med* 64:42-49, 2010.
- THEOHARIDES, T. C.; ALYSANDRATOS, K.D.; ANGELIDOU, A.; DELIVANIS, D.A.; SISMANOPOULOS N.; ZHANG B.; ASADI S.; , VASIADI, M.; WENG, ZUYI. MINIATI, ALEXANDRA.; KALOGEROMITROS, D. Mast cells and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1822, n. 1, p. 21-33, 2012.
- TULASSAY, Z.; HERSZENYI, L. Gastric mucosal defense and cytoprotection. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v. 24, p. 99-108, 2010.
- UBUKA, T. Assay methods and biological roles of labile sulfur in animal tissues. *J.Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, v. 781, p. 227-249, 2002.
- UCHIDA, M.; MATSUEDA, K.; SHODA, R.; MURAOKA, A.;YAMATO, S. Nitric oxide donating compounds inhibit HCl-induced gastric mucosal lesions mainly via prostaglandin. *Jpn. J. Pharmacol.*, v. 85, p. 133-138, 2001.
- UMBUZEIRO: Checklist das plantas do nordeste. *Caesalpinia pyramidalis*, versao I – Disponivel na internet: <http://umbuzeiro.cnip.org.br/db/pnechk/taxa/1329>, 2005.

WALLACE JL.; CALIENDO G.; SANTAGADA V.; CIRINO G. Markedly reduced toxicity of a hydrogen sulfide-releasing derivative of naproxen (ATB-346). *Br J Pharmacol.* 159:1236-1246, 2010.

WALLACE, J.L.; DEVCHAND, P.R. Emerging roles for COX-2 in gastrointestinal mucosal defense – Review. *British J of Pharmacology*, v.145, p. 275-282 (2005).

WALLACE JL.; DICAY M.; MCKNIGHT W.; MARTIN GR. Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats. *FASEB J* 21:4070-4076 (2007).

WALLACE JL.; CALIENDO G.; SANTAGADA V.; CIRINO G.; FIORUCCI S. Gastrointestinal safety and anti-inflammatory effects of a hydrogen sulfide-releasing diclofenac derivative in the rat. *Gastroenterology* 132: 261-271, 2007.

WALLACE JL. Physiological and pathophysiological roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract. *Antioxid Redox Signal*; 12:1125-1133, 2010.

WALLACE JL. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? *Physiol Rev*88: 1547-1565, 2008.

WALLACE, J. L.; GRANGIER, N. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. *FASEB J.*, v. 10, p. 731–740, 1996.

WALLACE, J.L. Mechanisms of Protection and Healing: Current Knowledge and Future Research. *American Journal Medicine*, v. 110, p. 19-23, 2001.

WALLACE JL.; VONG L. NSAID-induced gastrointestinal damage and the design of gisparing ns aids. *curr opin investig drugs.* 2008; 9(11):1151-1156.

WANG, R. Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J.* 16, 1792-1798 (2002).

WEDEMEYER J.; TSAI M.; GALLI SJ. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr Opin Immunol* 12: 624-631, 2000.

WEISS, U. Inflammation. *Nature*, n. 454, p. 427, 2008.

WHITTLE, B.J.R.; LASZLO, F.; EVANS, S.M.; MONCADA, S. Induction of nitric oxide synthase and injury in the rat jejunum provoked by indomethacin. *British Journal of Pharmacology* 116, 2286-2290, 1995.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Regional office for the Western Pacific. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. Manila: WHO, 86 p. 1993.

WHO, The world medicines situation: traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva: 12p 2011.

WOLFE, M.M.; SOLL, A.H. The physiology of gastric acid secretion. *New England Journal Medicine*, v.319, n. 26, p. 1707-1715, 1988.

YAO, X.; FORTE, J. G. Cell Biology of acid secretion by the parietal cell. *Annu Ver Physiol*, 65, p. 103-131, 2003.

YADAV, S. K.; ADHIKARY B.; MAITY B.; BANDYOPADHYAY S. K.; CHATTOPADHYAY S.; The gastric ulcer-healing action of allylpyrocatechol is mediated by modulation of arginase metabolism and shift of cytokine balance. *European Journal of Pharmacology* 614 106-113 (2009).

ZAKARIA, Z. A.; WEN, L. Y.; RAHMAN, N. I. A.; AYUB, A. H. A.; SULAIMAN, M. R.; GOPALAN, H. K. Antinociceptive, anti-inflammatory and antypiretic properties of the aqueous extract of *Bauhinia purpurea* leaves in experimental animals. *Medical Principles and Practice*, v. 16, p. 443-449, 2007.

ZANARDO RC.; BRANCALEONE V.; DISTRUTTI E.; FIORUCCI S.; CIRINO G.; WALLACE JL. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte mediated inflammation. *FASEB J* 20:2118-2120, 2006.

ZANATTA F.; GANDOLFI R. B.; LEMOS M.; TICONA J. C.; GIMENEZ A.; CLASEN B. K.; CECHINEL-FILHO V.; ANDRADE SF. Gastroprotective activity of alkaloid extract and 2-phenylquinoline obtained from the bark of *Galipea longiflora* Krause (Rutaceae). *Chem-Biol Interact* 180:312-317, 2009.

ZHAO W.; WANG R. H<sub>2</sub>S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *Am J Physiol* 283: H474-H480, 2002.

ZHONG G. Z.; CHEN RF.; CHENG YQ.; TANG CS.; DU JB. The role of hydrogen sulfide generation in the pathogenesis of hypertension in rats induced by inhibition of nitric oxide synthase. *J Hypertens* 21: 1879-1885, 2003.



**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 DA ATIVIDADE CITOPROTETORA GÁSTRICA DO EXTRATO ETANÓLICO DA CAESALPINIA PYRAMIDALIS: PAPEL DOS MEDIADORES GASOSOS (NO e H<sub>2</sub>S)**”, sob coordenação da **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. SARA MARIA THOMAZZI** (protocolo **CEPA 63/2011**) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe, em reunião realizada dia 24/11/2011.

São Cristóvão, 29 de novembro de 2011.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Teixeira Silva  
Presidente do CEPA/UFS

