

ALEXANDRA ALLEMAND

**EFEITO CICATRIZANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Salvia
officinalis* L. EM ÚLCERAS GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO
EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Michel F Otuki
Co-orientadoras: Prof^a. Dr^a. Eunice André e Prof^a. Dr^a. Maria Fernanda de Paula Werner.

**CURITIBA
2009**

*“O futuro pertence àqueles que acreditam
na beleza de seus sonhos”.*

Elleanor Roosevelt

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná.

Ao orientador Prof. Dr. Michel Otuki, co-orientadoras Dr^a Eunice André e Maria Fernanda Werner e Prf^a Dr^a Maria Consuelo Andrade Marques pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Moacir G. Pizzolatti pela preparação do extrato.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos colegas Daniel Bueno Mendes, Fernanda Lapa e Renata pela imensa ajuda que contribuiu decisivamente para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas de laboratório Francine Bittencourt Potrich, Bárbara Mayer, Cristiane Hatsuko Baggio, Cristina Setim Freitas e Ana Cristina dos Santos pela contribuição nos experimentos.

Aos colegas vizinhos de laboratório Thiago e Deborah pelos experimentos paralelos, pelas conversas e risadas.

Aos estagiários Alan, Daiane e Isabela pela enorme ajuda na fase final do trabalho.

Á colega e amiga Luisa Mota, pelo apoio profissional, emocional e pela amizade conquistada.

Agradeço à minha família, meu pai João Antônio, minha mãe Rosana, meus irmãos Otávia e João Pedro, meus avós Sylvio, Maria Cleusa e Léa e ao meu noivo Gustavo.

Família que me deu suporte emocional, pois me fez acreditar que apesar de todos os percalços no fim tudo ia dar certo.

Família que mesmo estando longe SEMPRE me fez sentir muito perto de todos.

Agradeço aos meus tios Dudu e Regina, primos Adrien, Gustavo e Maria Eduarda que me acolheram em Curitiba.

Agradeço a Deus pela Família que tenho e por mais uma etapa conquistada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Anatomia e fisiologia gástrica.....	20
1.1.1 Secreção gástrica.....	21
1.1.2 Mecanismos de agressão e proteção da mucosa gástrica.....	28
1.2 Úlcera péptica.....	35
1.3 <i>Salvia officinalis</i>	39
2 OBJETIVO GERAL.....	46
2.1 Objetivos específicos.....	46
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.1 Material botânico.....	49
3.2 Animais.....	49
3.3 Métodos fitoquímicos.....	49
3.4 Métodos farmacológicos <i>in vivo</i>	50

3.4.1	Lesões gástricas induzidas por ácido acético.....	50
3.5	Métodos bioquímicos <i>in vitro</i>.....	52
3.5.1	Determinação da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO)	53
3.5.2	Determinação <i>in vitro</i> da atividade enzimática de mieloperoxidase (MPO).....	54
3.5.3	Determinação da atividade enzimática da N-acetilglucosaminidase (NAG).....	54
3.5.4	Determinação <i>in vivo</i> da migração leucocitária: modelo <i>air pouch</i>	55
3.5.5	Determinação intracelular de radicais livres (RL).....	56
3.5.6	Determinação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH).....	57
3.5.7	Quantificação de grupos sulfidrílicos não protéicos (GSH-glutationa).....	57
3.5.8	Determinação da atividade enzimática da Glutathione S-Transferase (GST).....	58
3.5.9	Determinação da atividade enzimática da Superóxido dismutase (SOD).....	59
3.5.10	Determinação da atividade enzimática da catalase (CAT).....	59
3.6	Análise histológica.....	60
3.7	Análise estatística.....	60

4	RESULTADOS.....	62
4.1	Avaliação temporal da cicatrização das úlceras gástricas induzidas por ácido acético.....	62
4.2	Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>Salvia officinalis</i> em úlcera crônica induzida por ácido acético.....	63
4.3	Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>Salvia officinalis</i> sobre a atividade enzimática da Mieloperoxidase (MPO) em úlceras gástricas induzidas por ácido acético.....	66
4.4	Efeito da incubação <i>in vitro</i> do extrato hidroalcoólico de <i>Salvia officinalis</i> sobre a atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) em úlceras gástricas induzidas por ácido acético.....	67
4.5	Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>Salvia officinalis</i> sobre a atividade enzimática da N-acetilglucosaminidase (NAG) em úlceras gástricas induzidas por ácido acético.....	68
4.6	Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>Salvia officinalis</i> sobre a migração leucocitária no modelo de bolha de ar (<i>air pouch</i>).....	69
4.7	Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>Salvia officinalis</i> sobre a quantidade intracelular de radicais livres (RL) em úlceras gástricas induzidas por ácido acético.....	70
4.8	Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>Salvia officinalis</i> sobre os níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em úlceras gástricas	

	induzidas por ácido acético.....	71
4.9	Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>Salvia officinalis</i> sobre as enzimas antioxidantes (GST, SOD, CAT) e níveis de glutathiona reduzida (GSH) em úlceras gástricas induzidas por ácido acético.....	72
5	DISCUSSÃO.....	74
6	CONCLUSÕES.....	88
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Anatomia do estômago.....	20
Figura 2.	Esquema de secreção de HCl pela célula parietal.....	22
Figura 3.	Regulação neural, parácrina e hormonal da secreção ácida gástrica.....	23
Figura 4.	Representação esquemática da úlcera gástrica e seus dois maiores componentes envolvidos na cicatrização.....	37
Figura 5.	Flores e folhas da <i>Salvia officinalis</i> L.....	40
Figura 6.	Estrutura química do ácido carnósico (CA) e carnosol (CS), encontrados na <i>Salvia officinalis</i>	42
Figura 7.	Metodologia de indução de úlcera por ácido acético.....	51
Figura 8.	Avaliação da úlcera gástrica (mm ²) por 13 dias depois da indução por ácido acético	62
Figura 9.	Fotos representativas do desenvolvimento e cicatrização espontânea das úlceras.....	63
Figura 10.	Efeitos do extrato hidroalcolico de <i>Salvia</i> em úlceras crônicas induzidas por ácido acético.....	64
Figura 11.	Fotos representativas das avaliações macroscópica e microscópica das lesões gástricas induzidas por ácido acético	65
Figura 12.	Efeitos do extrato hidroalcolico de <i>Salvia officinalis</i> sobre a atividade da MPO em ratos fêmeas após a indução lesões gástricas por ácido acético.....	66
Figura 13.	Efeito da incubação do extrato hidroalcolico de <i>Salvia officinalis</i> - EHS, sobre a atividade da enzima MPO em	

	úlceras gástricas após a indução por ácido acético.....	67
Figura 14.	Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>Salvia officinalis</i> sobre a atividade enzimática da N-acetilglucosaminidase (NAG) em úlceras gástricas induzidas por ácido acético.....	68
Figura 15.	Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>Salvia officinalis</i> sobre a quantidade intracelular de radicais livres (RL) em úlceras gástricas induzidas por ácido acético.....	70
Figura 16.	Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>Salvia officinalis</i> sobre os níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em úlceras gástricas induzidas por ácido acético.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>Salvia officinalis</i> sobre a migração leucocitária no modelo de bolha de ar (“air pouch”).....	69
Tabela 2.	Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>Salvia officinalis</i> sobre as enzimas antioxidantes (GST, SOD, CAT) e níveis de glutathiona reduzida (GSH) e hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em úlceras gástricas induzidas por ácido acético.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Ácido carnósico
ACh	Acetilcolina
Al (OH)₃	Hidróxido de alumínio
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANP	Peptídeo natriurético atrial
ATC	Ácido tricloroacético
ATP	Adenosina trifosfato
BHT	Butilhidroxitolueno
CaCO₃	Carbonato de cálcio
CAMs	Moléculas de adesão celular
CAT	Catalase
CCK	Colecistocinina
5-LPO	5-lipoxigenase
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
Cl-	Cloro
CO₂	Gás carbônico
COX	Ciclooxigenase
CS	Carnosol
DCFH	2',7'-diclorfluoresceína
DCFH-DA	2',7'-diclorfluoresceína-diacetato
DEXA	Dexametasona
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil

DTNB	5,5'-ditiobis 2-ácido nitrobenzóico
ECL	Célula enterocromafim
DE50	Dose 50% efetiva
EGF	Fator de crescimento epidermal
EHS	Extrato hidroalcoólico de <i>Salvia officinalis</i>
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FeSO₄	Sulfato ferroso
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GRP	Peptídeo liberador de gastrina
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
HCO₃	Ácido carbônico
HOCl	Ácido hipocloroso
HTAB	Hexadeciltrimetilamônio
IL-1β	Interleucina 1-beta
IL-8	Interleucina 8
IL-6	Interleucina 6
IP3	Inositol trifosfato
IBP	Inibidor de bomba de prótons
LBT4	Leucotrieno B4

LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
MCP	Proteína quimiotática de monócitos
Mg(OH)₂	Hidróxido de magnésio
MPO	Mieloperoxidase
N₂O₃	Trióxido de nitrogênio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NaH₂CO₃	Bicarbonato de sódio
NF- Kβ	Fator nuclear kappa B
NH₄	Hidróxido de amônio
NO	Óxido nítrico
O₂^{•-}	Ânion superóxido
OH[•]	Radical hidroxil
Omep	Omeprazol
ONOO⁻	Peroxinitrito
PACAP	Peptídeo ativador de adenilato-ciclase ptuitária
PAF	Fator de Ativação Plaquetária
PBS	Tampão fosfato-salina
PGE₂	Prostaglandina E2
PGI₂	Prostaciclina
PLM	Polimorfonucleares
PPARγ	Receptor de proliferação de peroxissomo
PYY	Peptídeo YY
RLs	Radicais livres
SOD	Superóxido dismutase
SST	Somatostatina

TGF-α	Fator de crescimento
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

RESUMO

Salvia officinalis L. (Lamiaceae), popularmente conhecida como sálvia, é usada na medicina tradicional para o tratamento de distúrbios gastrointestinais. Este estudo avaliou o efeito cicatrizante do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* (EHS) em úlceras crônicas induzidas por ácido acético em ratos fêmeas. O efeito do EHS na cicatrização foi analisado macroscopicamente e microscopicamente. O processo inflamatório foi avaliado pela atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglucosaminidase (NAG) e pela determinação “in vivo” da migração leucocitária através do modelo de bolha de ar (“air pouch”) induzido pela carragenina. Além disso, a atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase – SOD, catalase – CAT, glutathione-S-transferase - GST), a quantidade de grupos sulfidrílicos não protéicos - GSH (glutathione reduzida), níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e determinação de radicais livres (RL) também foram avaliados nas úlceras gástricas induzidas por ácido acético. O tratamento com EHS nas doses de 0,003; 0,03; 0,3 e 3,0 mg/Kg duas vezes ao dia por sete dias cicatrizou a úlceras gástrica induzida por ácido acético em 18,2%, 30,0%, 49,0% e 65,0% respectivamente. No ensaio da MPO e NAG, o tratamento com EHS (3,0 mg/Kg) preveniu totalmente o aumento da atividade das enzimas promovido pelo ácido acético 80%. O total de leucócitos recrutados no “air pouch” foi diminuído em 71,0% pelo tratamento com EHS, o qual reduziu significativamente a infiltração de neutrófilos e monócitos em 78,1% e 56,5%. Nos ensaios antioxidantes, EHS preveniu o aumento de SOD, GST e níveis de LOOH, mas não foi capaz de reverter totalmente os níveis de CAT e GSH nos estômagos ulcerados pelo ácido acético. No ensaio de fluorescência o EHS reverteu completamente o aumento de RL provocados pelo ácido acético. Estes resultados indicam que o EHS possui potente efeito cicatrizante em úlceras gástricas induzidas por ácido acético 80%, principalmente pela inibição do processo inflamatório e em parte pela sua atividade antioxidante.

Palavras Chave: *Salvia officinalis*, úlcera gástrica, antiinflamatório, antioxidante

ABSTRACT

Salvia officinalis L. (Lamiaceae), popularly known as sage, is used in traditional medicine to treat gastric disturbances. This study has evaluated the healing effect of hydroalcoholic extract of *Salvia officinalis* (EHS) on chronic gastric ulcer induced by acetic acid in female rats. The effect of EHS on the inflammatory process was evaluated by activity of myeloperoxidase (MPO) and N-acetylglucosaminidase (NAG) assays and determination in vivo leukocyte migration by air pouch model. In addition, the antioxidant activities (superoxide dismutase – SOD, catalase – CAT, glutathione-S-transferase - GST), the amount of non-proteic sulphhydryl groups (glutathione reduced), levels of lipid hydroperoxides (LOOH) and intracellular free radicals were evaluated. with EHS at doses 0.003; 0.03; 0.3 and 3.0 mg/kg twice each day p.o for 7 days healed the gastric ulcer induced by acetic acid in 18.2%, 30.0%, 49.0% and 65.0% respectively. Treatment with EHS (3.0 mg/Kg) prevented the MPO and NAG augment. In the “air pouch” model, the total number of leukocytes/pouch recruited was diminished in 71.0% by the treatment with EHS, which inhibited significantly neutrophil and monocytes extravasation in 78.1% and 56.5%. In the antioxidant assays, EHS prevented the increase of SOD, GST and LOOH levels but not affect the increase of CAT activity and decrease of glutathione levels in the stomach ulcerated by acetic acid. In the fluorescence assay, acetic acid increased in 60% the free radical generation, while the EHS treatment was able to prevent this increase. These results indicate that EHS has a potent gastric healing activity mainly through inhibition of inflammatory process and partial antioxidant activity.

Key Words: *Salvia officinalis*, inflammation, gastric ulcer

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as lesões gastrointestinais como úlceras pépticas refluxo gastro-esofágico, síndrome de Zollinger-Ellison e gastrite, vêm tornando-se um dos principais focos de investigações experimentais e clínicas, adquirindo ênfase comercial para desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (WHITTLE, 2004).

Dentro deste contexto, é possível observar grande avanço científico envolvendo estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas para inúmeras enfermidades inclusive doenças gastrointestinais. Isto pode ser claramente observado pelo aumento de trabalhos publicados nesta área, tanto em congressos como em periódicos nacionais e internacionais (CECHINEL, YUNES, 1998). Em relação ao mercado mundial, cerca de 80% da população utiliza plantas para curar suas enfermidades, de acordo com dados divulgados em 1990 pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (VEIGA, PINTO, MACIEL, 2005). Apesar do crescente aumento de pesquisas com produtos naturais, estudos nessa área revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (MATU e VAN STADEN, 2003).

Existem inúmeras razões para se validar uma planta medicinal, como razões sociais, terapêuticas, botânicas e empresariais. Além disso, os produtos naturais podem ser a fonte mais imediata e com melhores chances de se obter protótipos para o desenvolvimento de novos medicamentos (YUNES e CALIXTO, 2001).

O programa de Pós-Graduação do Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da UFPR contribui para o uso seguro de plantas medicinais, através da pesquisa científica com metodologias internacionalmente padronizadas, buscando a validação das plantas medicinais com atividade sobre o trato

gastrointestinal. Os estudos realizados em nosso laboratório visam demonstrar a eficácia, segurança e o mecanismo de ação de plantas medicinais.

1.1 Anatomia e fisiologia gástrica

O estômago é dividido anatomicamente em 3 regiões (fundo, corpo, e antro) (Figura1). As porções do fundo, corpo e antro pilórico são limitadas por dois sistemas de esfíncteres: o esfíncter esofágiano inferior, na parte superior ou proximal do estômago e o esfíncter pilórico ou piloro, na parte inferior ou distal do estômago (HOGBEN et al, 1974).

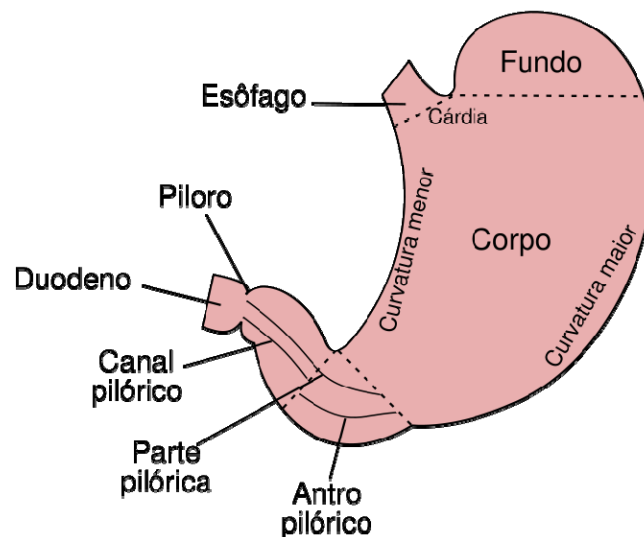


Figura1. Anatomia do estômago

Fonte: <http://reforcociencias.blogspot.com/2008/04/doenas-relacionadas-ao-estomago.html>

O trato gastrointestinal é um tubo muscular que se estende desde a faringe posterior até o ânus. Além de serem responsáveis pela digestão, absorção e excreção das substâncias ingeridas, os órgãos que pertencem ao trato

gastrointestinal também coordenam um grande número de células endócrinas e imunes do organismo (ALHMAN et al, 2001).

Funcionalmente, a mucosa gástrica pode ser dividida em três regiões glandulares, com base nas estruturas das glândulas presentes (região glandular cardíaca, glandular oxíntica e glandular pilórica (JAIN et al, 2006).

Glandular cardíaca: localizada logo abaixo do esfíncter esofágico inferior, contém primariamente células glandulares secretoras de muco (JAIN et al, 2006).

Glandular oxíntica: compreende as células parietais secretoras de ácido clorídrico e abrange 80% do estômago (fundo e corpo). Compreende também células principais (produtoras de pepsinogênio), células produtoras de somatostatina (células D) e células do tipo enterocromafins (ECL) que liberam histamina (JAIN et al, 2006).

Glandular pilórica: compreende os mesmos tipos celulares que as glândulas oxínticas, exceto as células principais e incluem as células G produtoras de gastrina. Abrange 20% da área total do estômago (antro) (JAIN et al, 2006).

1.1.1 Secreção gástrica

O suco gástrico é uma mistura das secreções das células epiteliais superficiais gástricas e das glândulas gástricas e compreende: ácido clorídrico (HCl), pepsinas, fator intrínseco, muco, bicarbonato, água e sais (BERNE et al, 2004).

A regulação da secreção ácida gástrica é um processo complexo, regulada por mecanismos neurais, hormonais, parácrinos e autócrinos em níveis central e periférico os quais convergem para a etapa final da secreção de HCl: a atividade da

enzima H^+,K^+ ATPase nas células parietais gástricas (Figura 2) (SCHUBERT, 2005).

Os principais estimulantes parácrinos, hormonais e neuronais da secreção ácida são, respectivamente: histamina, liberada das células enterocromafins (ECL), gastrina, liberada das células G e acetilcolina (ACh), liberada dos neurônios pós-ganglionares entéricos. A principal substância inibidora da secreção de HCl é a somatostatina, liberada das células D oxínticas e pilóricas (mecanismo parácrino) (YAO e FORTE, 2003).

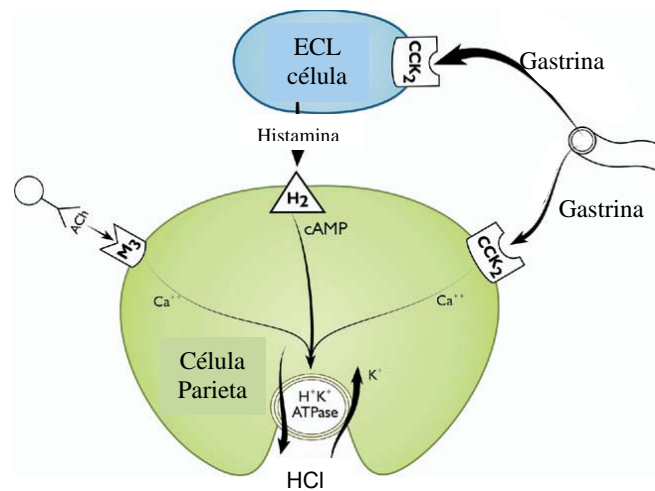


Figura 2. Esquema de secreção de HCl pela célula parietal (Adaptado de SCHUBERT e PEURA, 2008).

Estímulos originados no interior e fora do estômago convergem a neurônios gástricos eferentes, os quais constituem a regulação primária da secreção ácida. Os neurônios eferentes compreendem neurônios colinérgicos e 3 tipos de neurônios não colinérgicos, responsáveis pela liberação de GRP (peptídeo liberador de gastrina), VIP (peptídeo intestinal vasoativo) e PACAP (peptídeo ativador de adenilato-ciclase puitária). A figura 3 representa resumidamente a

relação existente entre todas essas vias na regulação da secreção ácida gástrica. Os neurônios podem regular a secreção ácida agindo diretamente nas células parietais bem como indiretamente, regulando a liberação de gastrina, histamina, somatostatina (SST) e ANP (peptídeo natriurético atrial). A liberação de ácido para a luz intestinal restabelece a secreção de SST no fundo e antro, via liberação de CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) de neurônios sensoriais (SCHUBERT e PEURA, 2008).

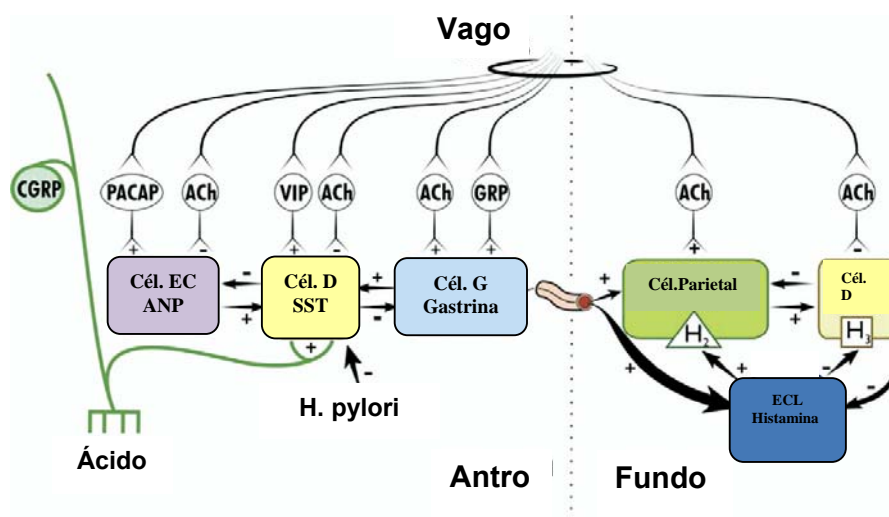


Figura 3. Regulação neural, parácrina e hormonal da secreção ácida gástrica (Adaptado de SCHUBERT e PEURA, 2008).

A fase anterior à ingestão do alimento é denominada de fase cefálica. Nesta fase, a secreção ácida gástrica é ativada por sinais sensoriais reconhecidos pelo cheiro, paladar, visão e pensamento nos alimentos. Todos esses sinais sensoriais ativam neurônios centrais que transmitem a informação para neurônios colinérgicos intramurais gástricos via nervo vago. Durante a ingestão do alimento, a secreção ácida máxima pode ser alcançada através da inibição da somatostatina, além da estimulação direta da secreção de ácido e gastrina (ativação de neurônios

colinérgicos) (SCHUBERT, 2005). Conforme o estômago vai sendo esvaziado, uma série de mecanismos parácrinos e neuronais vão sendo ativados para restaurar os níveis basais de HCl através da influência da somatostatina (SCHUBERT e PEURA, 2008).

A histamina é produzida no estômago pelas células enterocromafins (ECL) e estocada em vesículas secretoras, sendo liberada após alguns estímulos. A gastrina liga-se a receptores CCK2 das ECL promovendo um aumento de Ca^{2+} intracelular e liberação de histamina por exocitose (MÖSSNER e CACA, 2005). PACAP (peptídeo ativador da adenilato ciclase ptuitária) está presente nos neurônios da mucosa gástrica e liga-se ao receptor PAC1 nas células ECL. A gastrina e PACAP estimulam a transcrição e atividade da enzima histidina descarboxilase, que promove a descarboxilação da L- histidina originando a histamina. A histamina liberada estimula as células parietais diretamente pela ligação em receptores H2. Estes receptores são acoplados a proteína G, e quando ativados, estimulam a adenilato ciclase com geração de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc). A histamina também estimula a secreção ácida indiretamente através da sua ligação a receptores H3, acoplados nas células D produtoras de somatostatina. Quando ativados, esses receptores inibem a secreção de somatostatina (KAZUMORI et al, 2004). Enquanto gastrina, PACAP, VIP, grelina e fator de crescimento-alfa ($TGF-\alpha$) estimulam a secreção de histamina; a somatostatina, CGRP, prostaglandinas, peptídeo YY (PYY) e galanina inibem a secreção. A acetilcolina (ACh) não tem qualquer efeito direto sobre esta secreção histaminérgica (SCHUBERT e PEURA, 2008).

A gastrina é o principal estimulante da secreção ácida durante ingestão de alimento. É produzida pelas células G no

antro gástrico e, em menor quantidade na região proximal do intestino delgado, cólon e pâncreas. Gastrina e colecistocinina (CCK) possuem uma seqüência de pentapeptídeos idêntica na porção carboxil-terminal (-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂) (SCHUBERT, 2005). Duas principais classes de receptores CCK foram caracterizadas: CCK1(ouCCK-A), específicos para colecistocinina e CCK2 (anteriormente CCKB) que reconhecem tanto CCK como gastrina, esta com grande afinidade. Os receptores CCK2 foram identificados nas células parietais e ECL, no entanto parece que a principal via pela qual a gastrina estimula a secreção ácida é através da ativação dessas últimas células (ECL) com a liberação de histamina. Ach, GRP, secretina, agonistas β_2/ β_3 adrenérgicos, cálcio, estimulam a secreção de gastrina, enquanto que somatostatina, galanina e adenosina inibem a secreção. Além disso, pelo menos 2 vias mediadas pela liberação de somatostatina, exercem “feedback” negativo na regulação da secreção de gastrina. A primeira é ativada pela acidez luminal e, em ratos envolve os neurônios sensoriais CGRP que estimulam somatostatina, inibindo a secreção de gastrina. Inversamente, quando o pH sobe (baixa acidez intragástrica), por exemplo, por medicamentos anti-secretórios como os inibidores de bomba de prótons (IPP) ou por atrofia gástrica, a secreção de somatostatina é inibida, e os pacientes podem desenvolver hipergastrinemia. O segundo mecanismo de “feedback” negativo envolve a via parácrina, segundo a qual, a gastrina estimula a somatostatina e então atenua a sua própria secreção (SCHUBERT e PEURA, 2008).

Os receptores para acetilcolina (Ach) nas células parietais são do tipo muscarínicos M3, acoplados a proteína G que induzem a ativação de fosfolipase C com geração de inositol trifosfato (IP₃) e liberação de cálcio intracelular. ACh também estimula a secreção ácida de maneira indireta, através da ativação de

receptores M2 e M4 nas células D, levando a inibição da secreção de somatostatina (MÖSSNER e CACA, 2005).

A secreção da célula parietal é aumentada pela ativação intracelular de AMPc e da via dependente de Ca^{2+} , que ativa proteínas quinases, levando a fusão e ativação da bomba de prótons H^+K^+ ATPase. Esta enzima consiste de duas subunidades. A subunidade α realiza as funções catalíticas e de transporte da enzima. A subunidade β é extremamente glicosilada e protege a enzima da degradação e é necessária para o deslocamento da enzima entre o plasma e a membrana. Quando não estimulada, a atividade da H^+K^+ ATPase é mantida predominantemente dentro de túbulo-vesículas citoplasmáticas. Sob estimulação, estas vesículas se fundem com a membrana plasmática apical, resultando em extensiva secreção. Ao cessar a secreção, H^+K^+ ATPase é recolhida da membrana apical, e restabelecida no seu compartimento túbulo-vesicular (YAO e FORTE, 2003; SCHUBERT e PEURA, 2008). A secreção de prótons ocorre nas células parietais pela mudança de íons de hidrogênio H^+ por íons de K^+ através da enzima H^+K^+ ATPase. Este mecanismo ocorre juntamente com extrusão de Cl^- via canais de cloreto e potássio na membrana apical. Esses canais já estão sendo alvos de novas drogas anti-secretoras (SCHUBERT e PEURA, 2008).

A somatostatina é o principal fator inibitório da secreção ácida. É sintetizada a partir de uma molécula precursora composta por 92 aminoácidos. No estômago, pâncreas e neurônios entéricos é encontrada predominantemente a somatostatina-14, enquanto que no intestino delgado encontra-se a somatostatina-28. No estômago as células produtoras de somatostatina estão intimamente ligadas às células alvo para somatostatina, como as células parietais, ECL e células G, seja por via direta ou indiretamente pela circulação. Um aumento da acidez no lúmen

ativa a liberação de somatostatina no antro e fundo do estômago para que esta exerça um efeito inibitório sobre a secreção. ANP, CCK, secretina, adrenomedulina, amilina, leptina, estimulam somatostatina, inibindo assim a secreção ácida (SCHUBERT e PEURA, 2008).

O muco é produzido pelas células das glândulas gástricas e células epiteliais. É armazenado em grânulos no citoplasma apical dessas células e liberado por exocitose. O muco é constituído de 95% de água e 5% de glicoproteínas, denominadas de mucina. Os carboidratos compõem 80% do peso das mucinas, que constituem de quatro monômeros similares, ligados por pontes de dissulfeto. A polimerização destas unidades de mucina forma um gel viscoso que adere à superfície do estômago. No entanto, este gel é sujeito à proteólise pelas pepsinas, que clivam as ligações próximas aos centros dos tetrâmeros. Esse processo libera fragmentos que não formam géis e, desta forma, dissolve a camada mucosa protetora. A manutenção da camada de mucina protetora demanda síntese de novas mucinas tetraméricas para substituir aquelas mucinas que são clivadas pelas pepsinas (BERNE et al, 2004). A camada de muco funciona como uma barreira física protetora entre o epitélio e o lúmen contra agentes nocivos, enzimas, microorganismos e pepsina presente no lúmen. Além disso, mantém o gradiente de pH próximo a neutralidade, impedindo danos a mucosa gástrica. O muco é secretado em todo o trato gastrointestinal desde o estômago até o cólon é estimulado por hormônios gastrointestinais, incluindo gastrina e secretina, bem como prostaglandina PGE2 e agentes colinérgicos. Substâncias ulcerogênicas como aspirina e sais biliares causam a dissipação do muco, levando à injúria gástrica (LAINE et al, 2008).

O bicarbonato é uma secreção estável de bicarbonato junto com a camada de gel aderente cria um gradiente de pH (perto da neutralidade na superfície das células epiteliais), que promovem a primeira linha de defesa da mucosa do estômago e duodeno contra o ácido secretado no lúmen. O bicarbonato secretado pelas células epiteliais é retido pelo muco viscoso originando um revestimento pegajoso, viscoso e alcalino. Quando o alimento é ingerido, as taxas de secreção tanto de muco quanto de bicarbonato aumentam. A taxa máxima de secreção de bicarbonato é de aproximadamente 10% da taxa máxima de secreção de HCl (BERNE et al, 2004; LAINE et al, 2008). As células parietais quando liberam íon H^+ , simultaneamente transportam o íon bicarbonato pela membrana basolateral através da troca de Cl^-/HCO_3^- , que resulta numa maior disponibilidade de bicarbonato. Além disso, para cada íon de H^+ secretado pela célula parietal, uma molécula de CO_2 é convertida em bicarbonato, provocando o que se conhece como maré alcalina após a secreção de ácido gástrico (DONG e KAUNITZ, 2006). A secreção de bicarbonato é intensificada pela acetilcolina liberada dos terminais nervosos próximos às células superficiais epiteliais (BERNE et al, 2004; LAINE et al, 2008).

1.1.2 Mecanismos de agressão e proteção da mucosa gástrica

O trato gastrointestinal é freqüentemente exposto a estímulos nocivos que podem causar lesões. Estes estímulos podem ser endógenos como a produção fisiológica do suco gástrico, principalmente HCl e pepsinogênio, ou exógenos como o uso de antiinflamatórios não esteroidais (AINES), consumo de álcool, fumo, alimentos em várias temperaturas, infecções por *Helicobacter pylori* entre outros. Em contrapartida a estes estímulos nocivos, a mucosa gastrointestinal apresenta fatores de proteção (DONG e KAUNITZ, 2006). Os principais componentes da

proteção pré-epitelial são o muco e o bicarbonato. Além dessa proteção existe a proteção epitelial caracterizada pelas células epiteliais gástricas que possuem propriedades intrínsecas de proteção tanto por sua disposição anatômica quanto por sua constituição bioquímica. As junções fechadas e outras barreiras intercelulares controlam a passagem de agentes lesivos do lúmen para a mucosa gástrica, para espaços intersticiais e submucosos. Agentes que conseguem atravessar essas junções ainda são restritos pela membrana celular das células gástricas, que são compostas por elevada concentração de fosfolipídios, impedindo a difusão de moléculas hidrofílicas, como o íon H^+ . Quando as barreiras gástricas são destruídas e ocorre morte celular, as células necróticas podem ser repostas pela migração de células epiteliais sobreviventes nas bordas da lesão ou pela divisão de células da porção glandular que migram até o lúmen e diferenciam-se em células epiteliais superficiais (LAINE et al, 2008).

Entre outros fatores de proteção da mucosa, incluem-se os fatores de proteção subepitelial como a microcirculação e produção de prostaglandinas. O fluxo sanguíneo protege a mucosa por assegurar a chegada de uma quantidade ótima de oxigênio, nutrientes, bicarbonato, além de remover substâncias tóxicas (WALLACE, 2001). As células endoteliais dos microvasos geram potentes vasodilatadores como o óxido nítrico (NO) e prostaciclina (PGI_2), os quais protegem a mucosa gástrica contra fatores agressores e se opõem a ação danosa de vários agentes vasoconstritores como os leucotrienos C_4 , tromboxano A_2 e endotelina. PGI_2 e NO mantêm a viabilidade endotelial e previnem a aderência de plaquetas e leucócitos nas células endoteliais de microvasos, prevenindo assim o comprometimento da microcirculação (WALLACE, 2001; LAINE, et al, 2008).

A contínua geração das prostaglandinas PGE_2 e PGI_2 é crucial para a manutenção da integridade da mucosa e proteção contra agentes ulcerogênicos e necrosantes. Quase todos os mecanismos de defesa são estimulados e/ou facilitados pelas prostaglandinas. Elas inibem a secreção ácida, estimulam a secreção de muco, bicarbonato e fosfolípidos, aumentam o fluxo sanguíneo, aceleram a restituição epitelial e cicatrização da mucosa. Prostaglandinas também inibem a ativação de mastócitos, leucócitos e aderência plaquetária no endotélio vascular. A maioria das ações protetoras das PG na mucosa gástrica é mediada principalmente por receptores do tipo EP_1 , EP_3 e EP_4 (LAINE et al, 2008). Hatazawa (2007) descreve a importância da PGE_2 na promoção do processo cicatricial de úlceras crônicas gástricas via receptores EP_4 .

Geralmente, os estímulos lesivos sobre a mucosa responsáveis pela formação de úlceras pépticas, são acompanhados por danos microvasculares locais, com conseqüente isquemia, diminuição da distribuição de nutrientes, formação de radicais livres e necrose tecidual (TARNAWSHI, 2005).

Radicais livres (RL) incluindo espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) revelam dois mecanismos diferentes e complementares dependendo da quantidade liberada e da situação nas qual cada célula se encontra, ou seja, RLs podem exercer funções fisiológicas em condições normais, mas podem ser nocivos em uma variedade de condições patológicas (HALLIWELL, 1999). Os radicais livres são produzidos constantemente durante alguns processos, como na cadeia transportadora de elétrons (na fosforilação mitocondrial), durante o metabolismo de xenobióticos e durante a resposta inflamatória. O trato gastrointestinal tem a capacidade de produzir grandes quantidades de ERO pelas enzimas oxidases da mucosa como a xantina oxidase, mieloperoxidase (MPO) e

NADPH oxidase, encontrada em leucócitos residentes (macrófagos, neutrófilos e eosinófilos) da lâmina própria (DONG e KAUNITZ, 2006).

As ERO, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil ($\cdot OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são moléculas altamente reativas que interagem indiscriminadamente com macromoléculas essenciais, como o DNA, proteínas e lipídeos. As ERO tem um papel importante na patogênese de lesões agudas na mucosa gástrica (PERY et al, 1986; COCHRAN et al, 1982; PIHAN et al, 1987; DEL SOLDATO et al, 1985) ou no retardo da cicatrização de úlceras gástricas crônicas (SHII et al, 1992).

Assim, para se defender contra ataques de radicais livres, as células desenvolveram diferentes sistemas antioxidantes para manter a homeostase celular (CNUBBEN et al, 2001).

Sistema antioxidante: as enzimas que promovem a primeira linha de defesa contra o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) incluem a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (BAYIR, 2005). A segunda linha de defesa antioxidante é realizada por alguns compostos de moléculas químicas pequenas, incluindo vitaminas, flavonóides e carotenóides da dieta, ácido úrico e a glutathione (GSH) (CNUBBEN et al. 2001).

√ **Superóxido Dismutase (SOD):** em condições de estresse oxidativo, a superóxido dismutase (SOD) atua como um sistema de defesa intracelular que degrada o ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (CHANDE e BUDINGER, 2007; YASUI e BABA, 2006).

√ **Catalase (CAT):** a catalase é uma enzima que metaboliza o H_2O_2 (formado na reação com SOD) em água e oxigênio de maneira extremamente rápida (SIRAKI et al, 2002).

√ **Glutathione peroxidase (GPx):** A segunda via do metabolismo do H_2O_2 depende da ativação da GPx e da cooperação da glutathione redutase (GR). A redução do H_2O_2 em água pela GPx é acompanhada da conversão de glutathione da forma reduzida (GSH) para a forma oxidada (GSSG) (KWIECIEN, et al, 2002).

√ **Glutathione S-transferase (GST):** GST é uma super família de isoenzimas que catalisam a conjugação de compostos eletrofílicos a GSH, produzindo compostos menos reativos. A GST participa da defesa contra o estresse oxidativo devido a capacidade desta enzima em detoxificar compostos endógenos que causam danos (CNUBBEN et al, 2001).

√ **Glutathione (GSH):** O GSH é um tripeptídeo com potente atividade antioxidante e propriedade de cofator enzimático, importantes para regulação da atividade celular. Sob condições de estresse oxidativo, as espécies reativas de oxigênio são reduzidas por GSH com concomitante formação do dissulfeto oxidado, a GSSG (ou glutathione oxidada). Apesar de sua relativamente resistência a oxidação espontânea, GSH reage rapidamente e de forma não enzimática com o radical hidroxila, com N_2O_3 (trióxido de nitrogênio) e peroxinitrito ($ONOO^-$). Para manter o equilíbrio redox celular, o GSSG é exportado das células por proteínas de transporte dependentes de ATP (adenosina trifosfato), implicando que condições severas de estresses diminuem níveis celulares de GSH. Esta depleção de GSH está relacionada com a patofisiologia de muitas doenças, sugerindo um importante papel do GSH na manutenção da integridade dos sistemas fisiológicos (CNUBBEN et al, 2001).

Resposta inflamatória aguda: quando os níveis superficiais da defesa da mucosa falham ou são inundados por uma lesão luminal, o próximo nível de defesa é a

resposta inflamatória aguda (WALLACE, 2001). A resposta fisiológica observada no processo inflamatório está relacionada com a liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios, como aminas biogênicas (histamina e serotonina), cininas (bradicinina), prostanóides (prostaglandinas), citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6), fator de ativação plaquetária (PAF) e substância P (KIM et al, 2007; O'SHEA e MURRAY, 2008).

O dano tecidual resulta na liberação de mediadores químicos e ativação de eventos celulares. As células fagocíticas conduzidas pelos neutrófilos e monócitos circulantes são atraídas para o sítio inflamatório por moléculas quimiotáticas específicas chamadas de quimiocinas, responsáveis por expressar moléculas denominadas selectinas nas células endoteliais e promover a interação leucócito-endotélio. Subseqüente, citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6) liberadas nos locais próximos ao sítio inflamatório agem nos neutrófilos e aumentam a expressão de moléculas integrinas mobilizando os neutrófilos na superfície do endotélio vascular. A maioria dessas integrinas se liga em moléculas de adesão (CAMs) na superfície das células endoteliais. Outra citocina importante é a proteína quimiotática de monócitos (MCP), responsável pelo recrutamento de monócitos para o sítio inflamatório. Além das citocinas e quimiocinas, outra classe de mediadores exerce papel na regulação da cascata inflamatória. Os metabólitos do ácido araquidônico possuem potente atividade pró-inflamatória. A inflamação induz a expressão de cicloxigenase 2 (COX2) nas células inflamatórias, convertendo o ácido araquidônico em prostaglandinas, substâncias responsáveis pelas mudanças na permeabilidade vascular e vasodilatação. Similar propriedade é atribuída aos leucotrienos gerados pela ação da enzima 5-lipoxigenase (5-LPO) sobre o ácido araquidônico. O leucotrieno B4 (LTB4) induz a migração e adesão de

polimorfonucleares no endotélio vascular pelo aumento de integrinas na parede do endotélio vascular (JANEWAY et al, 2001; NATHAN 2002; LAWRENCE et al, 2002). Os monócitos, ao penetrarem no tecido, se diferenciam em macrófagos e junto com os neutrófilos liberam uma variedade de mediadores responsáveis pelo recrutamento de outras células inflamatórias como fibroblastos e mastócitos, promovendo assim propagação da resposta inflamatória (WALLACE, 2001).

Os leucócitos polimorfonucleares (PLM), principalmente os neutrófilos, são as primeiras células a serem recrutadas e a ativação de receptores acoplados a proteína G causa um aumento de cálcio citosólico que age como segundo mensageiro e induz uma série de eventos, resultando na ativação da resposta celular dos PLM. Essa resposta inclui a liberação de enzimas proteolíticas como leucócitos elastase ou catepsina G, além de espécies reativas de oxigênio, geradas predominantemente pela NADPH oxidase. (POECKEL et al, 2008). Nos neutrófilos ativados, a enzima MPO também resulta na formação de potente oxidante como o ácido hipocloroso (HOCl) a partir do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na presença de íons cloreto (Cl^-) (NAITO e YOSHIKAWA, 2002).

Quando ocorre um desequilíbrio entre o sistema antioxidante e a produção de RL, estes podem promover a destruição da membrana celular via peroxidação lipídica. As membranas celulares constituídas de fosfolipídios (ricos em ácidos graxos poliinsaturados) são constantemente atacadas por espécies reativas de oxigênio, produzindo radicais de ácidos graxos e hidroperóxidos lipídicos (NIKI e KOMURO, 1988; NIKI et al, 1993). Em consequência desse ataque (peroxidação lipídica) ocorre o desequilíbrio das funções celulares, incluindo transporte de moléculas, manutenção do gradiente iônico e metabólico e mecanismos de transdução de sinal entre outros (FARINATI et al, 1996; EVERETT et al, 2001)

1.2 Úlcera Péptica

Úlcera é uma lesão profunda da mucosa, onde tanto os componentes do tecido epitelial e conectivo, incluindo miofibroblastos subepiteliais, células do músculo liso, vasos e nervos podem estar destruídos (MILANI E CALABRO, 2001). Tanto as úlceras gástricas como as duodenais são referidas como úlceras pépticas. Em geral, as úlceras ocorrem mais comumente no duodeno (5X), onde 90% estão localizadas a 3 cm da junção do piloro com a mucosa duodenal. No estômago as úlceras se localizam mais comumente no antro (60%) e na junção do antro com o corpo na pequena curvatura (25%). A úlcera péptica é um dos distúrbios mais comuns que afetam o sistema gastrointestinal. A incidência de úlcera péptica durante a vida é superior a 10%, com um pico que ocorre entre 65 e 74 anos e é ligeiramente maior nos homens do que em mulheres (1,3:1,0). Apesar de ocorrer em qualquer idade, a úlcera duodenal ocorre com mais frequência na faixa de 30-55 anos, enquanto que a úlcera gástrica na faixa de 50-70 anos (OFMAM, 2000).

A fisiopatologia das úlceras pépticas é considerada um processo multifatorial. Atribuída ao desequilíbrio entre fatores agressivos (como o ácido clorídrico, a pepsina, infecção por *Helicobacter pylori* além de anti-inflamatórios não esteroidais, fumo e álcool) e defesas locais da mucosa (secreção de bicarbonato, muco, prostaglandinas, fluxo sanguíneo, óxido nítrico). Embora o tratamento seja frequentemente conduzido para a redução dos fatores agressivos, pode também ser dirigido para o fortalecimento das defesas da mucosa do estômago e duodeno (VENKATARANGANNA et al 1998; JAIN et al 2006). A úlcera péptica é considerada doença crônica, e a recorrência anual é esperada na maioria dos casos (BRUNTON et al, 2006).

Histologicamente uma úlcera péptica consiste de duas estruturas maiores: a margem da úlcera formada pela mucosa adjacente não necrosada – componente epitelial, e o tecido de granulação na base da úlcera – componente de tecido conectivo. Este último consiste de fibroblastos, macrófagos e células endoteliais formando microvasos (COTRAN et al, 1999; TARNAWSKI, 2000). O tecido de granulação se desenvolve na base da úlcera dentro de 48–72 h depois da ulceração (TARNAWSKI, 2000). Por tanto a cicatrização requer angiogênese no tecido de granulação na base da úlcera, junto com proliferação das células epiteliais na margem da úlcera e conseqüente restabelecimento da arquitetura glandular (Figura 4). A proliferação epitelial e endotelial é largamente conduzida pelos fatores de crescimento. No caso da angiogênese, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) aparece entre os mais importantes. VEGF é liberado pelas próprias células endoteliais e pelas plaquetas (WALLACE, 2005).

A cicatrização das úlceras é acompanhada pelo aumento do fluxo sanguíneo na área ulcerada e níveis plasmáticos de gastrina e citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β . Ao longo da cicatrização esses níveis decaem. A hipergastrinemia observada no período inicial da cicatrização pode ser atribuída à extraordinária supressão ácida gástrica e expressão de fatores de crescimento como EGF (fator de crescimento epidermal), TGF- α (fator de crescimento alfa) os quais controlam a proliferação celular e são bem conhecidos por exibirem atividade antissecretora (BRZOZOWSKI, 2003).



Figura 4. Representação esquemática da úlcera gástrica e seus dois maiores componentes envolvidos na cicatrização: a margem da úlcera (re-epitelização) e o tecido de granulação (angiogênese e reconstrução glandular) (Adaptado de ANDRZEJ e TARNAWSKI 2005).

Por mais de um século, as úlceras pépticas eram controladas cirurgicamente, com altas taxas de morbidade e mortalidade. O tratamento farmacológico resumia-se em neutralizar a acidez gástrica estomacal com a utilização de antiácidos, como bicarbonato de sódio (NaH_2CO_3), carbonato de cálcio (CaCO_3), hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) e hidróxido de magnésio ($\text{Mg}(\text{OH})_2$) ou associações. Porém, por alterar o pH gástrico e urinário, os antiácidos tem a capacidade de interagir com uma variedade de fármacos através de interações farmacocinéticas de dissolução e absorção, biodisponibilidade e eliminação renal. Alguns podem também quelar outras drogas presentes no trato gastrointestinal, formando complexos insolúveis que passam pelo TGI sem serem absorvidos. Além disso, os efeitos associados aos anti-ácidos são constipação ou diarreia, dependendo do paciente, sendo utilizados hoje em dia principalmente para o alívio rápido sintomático (YUAN et al, 2006; BRUNTON et al, 2006).

Antagonistas muscarínicos como a pirenzepina inibem a secreção ácida bem como a motilidade gástrica, mas o uso clínico destas drogas diminuiu por causa da disponibilidade de medicamentos anti-secretores mais eficazes. O desenvolvimento das drogas ao longo dos anos indica a mudança gradual no foco de tratamento, o qual surgiu com o descobrimento de antagonistas H_2 como Cimetidina (em 1976) e Ranitidina (1982) até o aparecimento dos inibidores da bomba de prótons em 1988 com o Omeprazol, seguido por Lansoprazol, Rabeprazol e Esomeprazol em 2001 (JAIN et al 2007).

Estes inibidores de bomba são pró-fármacos, necessitando ativação em ambiente ácido. Entram na célula parietal a partir do sangue e, devido a sua fraca natureza básica, acumulam-se em canalículos secretores ácidos da célula parietal, onde são ativados por um processo catalisado por prótons que resulta na formação de uma sulfenamida tiofílica ou ácido sulfênico. Esta forma ativada reage por meio de ligação covalente com o grupo sulfidril de cisteínas do domínio extracelular da H^+/K^+ -ATPase, resultando em uma inativação irreversível da bomba. A secreção do ácido só se reinicia após a inserção de novas moléculas de bomba na membrana luminal (YUAN et al, 2006; BRUNTON et al, 2006).

Hoje, quase duas décadas após a introdução do primeiro IBPs, os inibidores considerados irreversíveis começam a apresentar alguns inconvenientes, tornando-se então uma linha de estudo de grande interesse. A supressão ácida extrema, mesmo que em doses recomendadas às vezes pode conduzir a uma acloridia (ausência de ácido clorídrico) podendo desencadear infecções entéricas como a febre tifóide, cólera e disenteria (JAIN et al, 2007). Muitos estudos relatam os efeitos nocivos dos inibidores de prótons associados à infecção por *H.pylori*, os quais podem agravar o quadro de gastrite, podendo levar à sérias complicações.

Trabalhos de Stolte e colaboradores (1998); Meining et al (1998); Uemura et al (2002) e Suzuki et al (2002) relatam que pacientes *H. pylori* positivo em tratamento tanto com Omeprazol, Lansoprazol ou Ranitidina apresentam mudanças no padrão da gastrite, com conseqüente ativação de neutrófilos (através do aumento de MPO) no corpo gástrico. Outro estudo recente confirma que a supressão ácida extrema causada pela drogas antissecretoras induz interações leucocitárias no endotélio via liberação de gastrina. Esse hormônio é um estimulante da secreção ácida gástrica e é considerado um agente pró-inflamatório, contribuindo “in vivo” para a inflamação causada pelo *H.pylori* (ALVAREZ et al, 2006 e 2007).

Em virtude desses inúmeros inconvenientes apresentados pelos tratamentos antiulcerosos, que tem sido contínua e importante a investigação de novas drogas para o tratamento de doenças ácido-pépticas.

1.3 *Salvia officinalis* L.

Salvia officinalis L., conhecida popularmente como sálvia, salva, chá da Grécia, chá-da-França, sabiá, sal-das boticas, salva-comum, salva-das-boticas, salva-de remédio, salva-dos jardins, salva-ordinária, sálvia-comum, erva sagrada. As folhas de *Salvia officinalis* são amplamente empregadas como condimento na culinária de vários países desde os tempos medievais, sendo também cultivada no Hemisfério Norte como planta ornamental. Seu nome deriva do latim “salvere”, que significa saudável. Foi introduzida na América do norte no século XVII (ALONSO, 2004; LORENZI e MATOS, 2002).

√ Aspectos botânicos

A *Salvia officinalis* (Figura 5) é um subarbusto perene, fortemente aromática, pertencente à família das Lamiaceas. Ereta ou decumbente, ramificada na base formando aspecto de moita. Caracteriza-se por apresentar uma altura entre 30 e 70 cm; raiz fusiforme e fibrosa, talo ereto lenhoso e quadrangular na base com numerosas ramificações. Folhas opostas, inteiras, glandulares ou rugosas, finamente denteadas de 3 a 6 cm de comprimento (Figura 5), as inferiores pecioladas e as superiores sésseis, embranquecidas na parte de trás e verdes na frente, recobertas por uma penugem. As flores, pouco freqüente em nossas condições, são azul-violáceas, agrupadas em espigas terminais em número de 7 a 10, com intenso aroma e abundante néctar. As características das flores variam conforme a variedade da sálvia. O fruto é tetraquênio (LORENZI, 2002; ALONSO, 2004).

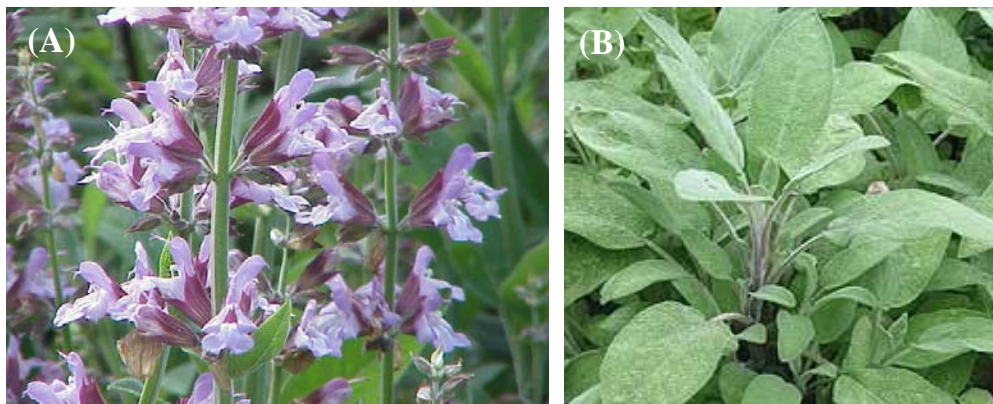


Figura 5. Flores (A) e folhas (B) de *Salvia officinalis* L.

Fonte: www.bbc.co.uk

√ **Constituintes químicos**

O gênero *Salvia* é rico em polifenóis, sendo 160 já identificados. Dentre os polifenóis encontram-se os ácidos fenólicos (como ácido caféico e seus metabólitos), além de flavonóides (antocianinas e proantocianidinas) (YINRONG e YEAP 2001). Constituintes diterpênicos como o diterpeno o-difenólico ácido carnósico (AC) e seu produto de oxidação carnosol (CS) (Figura 6) são os maiores constituintes de extratos provenientes das plantas *Rosmarinus officinalis* (Rosmarino, Alecrim) e *Salvia officinalis*. Folhas secas de Rosmarino e Sálvia contêm aproximadamente 0.2–1% de AC and de CS. Em extratos comerciais AC e CS são extremamente enriquecidos (na Rosemarino, por exemplo, foi determinado 10.3% de AC e 4.4% CS). Baseado na elevada ocorrência destes compostos nestas plantas, o desenvolvimentos de medicamentos naturais contendo estes diterpenos para o tratamento de doenças inflamatórias parece bem atrativo (POECKEL et al, 2008).

Através de uma extração aquosa a frio, de partes aéreas de *S. officinalis* foi possível isolar um complexo polissacarídeo composto de galactose (17.9%), 3-O-metil-galactose (3.0%), glicose (15.5%), manose (8.3%), arabinose (30.4%), xilose (7.6%), fucose (2.6%), ramnose (6.7%), e ácidos urônicos (8.0%) (CAPEK e HRIBALOV, 2004).

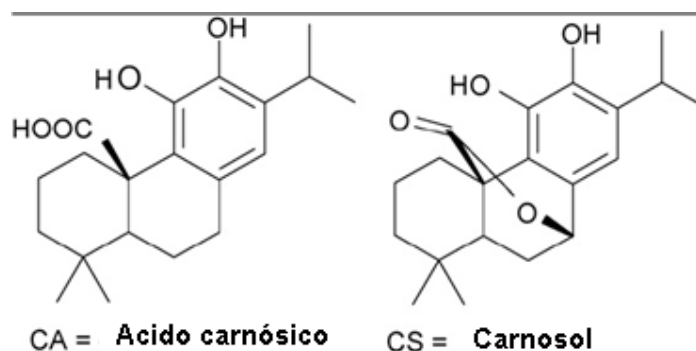


Figura 6. Estrutura química do ácido carnósico (CA) e carnosol (CS), encontrados na *Salvia officinalis*.

√ **Atividades biológicas**

Inúmeros são os trabalhos que relatam o potencial antioxidante do gênero *Salvia* (CUVELIER et al, 1994 e 1996; YINRONG LU, et al, 2001; MILIAUSKAS, 2004; BEKTAS TEPE, 2007). As propriedades antioxidantes estão relacionadas com os maiores constituintes químicos da *Salvia* como ácido carnósico (AC) e seu produto de oxidação carnosol (CS). Além de propriedade antioxidantes estes compostos também apresentam propriedades antiinflamatórias, antiproliferativas e neuroprotetoras (POECKEL et al, 2008).

Bektas Tepe, 2007, mostrou que o ácido rosmarínico encontrado em grande quantidade no extrato metanólico de *Salvia verbenaca*, é o principal responsável pela potente atividade antioxidante, avaliada em ensaios *in vitro* de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Em 2007, BOZIN e colaboradores avaliaram a capacidade antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial de *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis*. Ambas apresentaram importante atividade sobre cepas bacterianas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *S. enteritidis* e *Shigella sonnei*. A atividade antioxidante foi avaliada através de ensaio de DPPH e peroxidação lipídica (LPO).

Os óleos investigados apresentaram redução na formação do radical DPPH (IC50= 3,82 µg/mL para o óleo rosmarínico e 1,78 µg/mL para salvia). O óleo rosmarínico em especial, apresentou forte inibição nos níveis de LPO.

Ação imunomoduladora também já foi identificada em complexos polissacarídeos extraídos da *S. officinalis*. O estudo revelou a capacidade deste polissacarídeo em induzir a proliferação de timócitos em ratos (CAPEK e HRIBALOV, 2004).

A atividade antiinflamatória da *Salvia officinalis* é relatada em inúmeros trabalhos. RAU e colaboradores (2006) demonstraram que PPAR γ (receptor de proliferação de peroxissomo) é um alvo seletivo tanto para o ácido carnósico como carnosol. A ativação de PPAR γ em longo prazo causa alterações na expressão de genes inflamatórios. Em Poeckel et al (2008) foi demonstrado a habilidade do ácido carnósico e carnosol de agirem diretamente em agentes pró-inflamatórios, inibindo células polimorfonucleares (PLM), formação de leucotrienos e geração de espécies reativas de oxigênio.

Pouco são os estudos sobre os efeitos biológicos da *Salvia officinalis* no trato gastrointestinal. Os trabalhos existentes relatam atividade da infusão e óleo essencial de *S. officinalis* sobre fígado (LIMA, 2004 e 2005; AMIN E HAMZA, 2005). Em 2005 Maryam e colaboradores demonstraram o efeito hipoglicemiante do extrato metanólico de folhas de *S. officinalis* em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina.

Estudo com alguns diterpenos isolados promoveram gastroproteção em úlceras induzidas por etanol/HCl em camundongos. Citotoxicidade em células epiteliais humanas gástricas foi identificada em alguns destes compostos (SEPULVEDA et al, 2005). Em 2003, Rodriguez e colaboradores demonstraram o

potencial cicatrizante do ácido oleanólico em ratos com úlceras induzidas por ácido acético. Em 2007, Mayer e colaboradores demonstraram que atividade gastroprotetora do extrato da *Salvia officinalis* é decorrente da inibição da atividade da H⁺, K⁺-ATPase.

OBJETIVOS

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo consistiu em verificar o potencial cicatrizante do extrato bruto hidroalcoólico de *Salvia officinalis* em úlceras já estabelecidas através do modelo do ácido acético e possíveis mecanismo envolvidos.

2.1 Objetivos específicos:

- Avaliar o curso temporal do processo de cicatrização da úlcera gástrica induzida por ácido acético durante um período de 13 dias;
- Avaliar macroscopicamente e microscopicamente os efeitos do extrato de *Salvia officinalis* na cicatrização de lesões induzidas com ácido acético em ratos no período estabelecido;
- Avaliar o efeito do extrato de *Salvia officinalis* no processo inflamatório por meio de um método indireto que quantifica a migração de neutrófilos e macrófagos para o tecido (determinação da atividade enzimática da Mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglucosaminidase (NAG) respectivamente);
- Avaliar o efeito do extrato de *Salvia officinalis* na infiltração de leucócitos através do modelo “air-pouch” induzido pela carragenina;
- Avaliar o efeito do extrato de *Salvia officinalis* na produção intracelular de radicais livres;
- Avaliar o efeito do extrato de *Salvia officinalis* nos níveis de peroxidação lipídica da mucosa gástrica;
- Avaliar o efeito do extrato de *Salvia officinalis* na quantificação de grupos sulfidrílicos não protéicos (GSH-glutationa);

- Avaliar o efeito do extrato de *Salvia officinalis* na atividade de enzimas antioxidantes (catalase-CAT, superóxido dismutase-SOD e glutathione S-transferase-GST).

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Botânico

As folhas de *Salvia officinalis* foram fornecidas pela Chamel Indústria e Comércio de Produtos Naturais Ltda, PR-Brasil. O extrato foi preparado pelo Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti, do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Um exemplar da planta foi depositado no Herbário da Universidade Federal do Paraná sob o número 1156a.

3.2 Animais

Foram utilizados ratos (*Ratus norvegicus*, variedade Wistar) adultos, fêmeas, com peso variando entre 150 a 300 g fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal do Paraná mantidos sob condições controladas de temperatura e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas), com acesso livre à água e ração.

Os protocolos experimentais que utilizaram animais estão de acordo com as normas internacionais e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPR, com o número de protocolo 318.

3.3 Métodos fitoquímicos

√ Obtenção do extrato bruto hidroalcoólico da Sálvia (EHS)

O extrato de *Salvia officinalis* (EHS) foi obtido a partir de uma quantidade de 2 kg de folhas secas e moídas, utilizando o método de percolação (2 vezes à temperatura ambiente). Etanol 85% foi utilizado como solvente e foram obtidos 10 litros de percolado, o qual foi concentrado em rotaevaporador na temperatura de 45 °C rendendo 154,8 g (7,74%) de um extrato seco hidroalcoólico amarelo escuro.

√ **Obtenção das soluções do extrato para sua utilização nos ensaios**

O extrato foi diluído em água destilada para doses de 0,003; 0,03; 0,3 e 3 mg/Kg.

3.4 Métodos Farmacológicos *in vivo*

3.4.1 Lesões gástricas induzidas por ácido acético

As lesões gástricas induzidas por ácido acético seguem a metodologia originalmente proposta por Okabe et al (1971), com leves modificações (WALLACE et al, 2007).

As ratas (grupos de 8 animais) foram submetidas a jejum sólido por 18 hs anterior à indução. Os animais anestesiados com xilazina e cetamina (7,5 mg/Kg e 60 mg/Kg, via i.p) foram submetidos à cirurgia para a indução das úlceras. A parede abdominal foi aberta e o estômago exposto. A figura 8 ilustra a metodologia, na qual, um cilindro de vidro de 6 mm de diâmetro foi aplicado sobre a serosa do estômago. Dentro do cilindro foi injetado 500 µl de ácido acético 80%. Após 1 minuto o ácido foi aspirado e salina foi injetada dentro do cilindro. Após a salina ser aspirada secou-se a região com o auxílio de um cotonete e o cilindro foi retirado da superfície do estômago para que a parede abdominal fosse suturada.

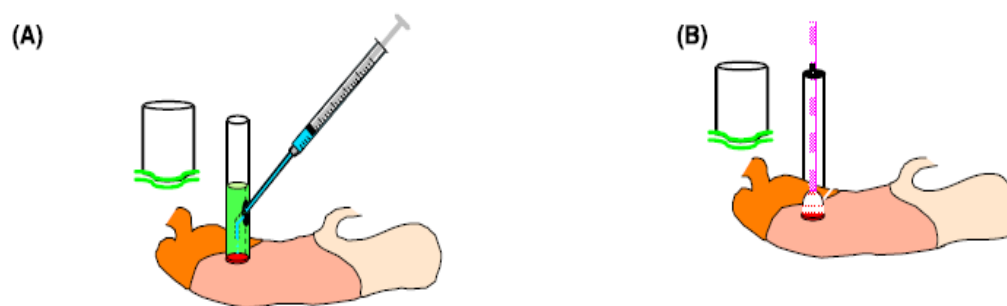


Figura 7. Metodologia de indução de úlcera por ácido acético. (A) aplicação de 500 μL de ácido acético 80% no interior de um cilindro, (B) retirada do excesso de ácido com o auxílio de um cotonete (Adaptado de KONTUREK et al, 2008).

Após a recuperação da anestesia, os animais retornaram ao biotério e permaneceram sob regime de restrição alimentar com consumo livre de água até o dia seguinte. A partir daí, seguiu-se uma dieta alimentar (ração duas vezes ao dia por uma hora) durante todo o período do tratamento que consistiu na administração por gavagem de veículo (água - 0,5 mL/200g), omeprazol (40 mg/kg) e as diferentes doses do extrato.

O tratamento, iniciado no segundo dia após a cirurgia, foi administrado trinta minutos após o consumo da ração e teve duração de sete dias (2x ao dia). Ao final do tratamento, os animais foram mortos, o estômago removido e esticado para posterior inspeção da mucosa e determinação da cicatrização.

A avaliação das lesões gástricas induzidas por ácido acético foi realizada por meio de uma régua graduada (mm).

3.5 Métodos Bioquímicos *in vitro*

Concentração de proteína nas amostras

A concentração de proteína foi determinada em placa de 96 poços através do método “BCA™ protein assay kit” (PIERCE, Rockford, IL), utilizando albumina bovina como padrão e realizado segundo as instruções fornecidas pelo fabricante.

Preparação do tecido ulcerado para os ensaios bioquímicos

Depois das análises macroscópicas, foram determinadas as atividades enzimáticas de MPO NAG, SOD e CAT, além das quantidades de GSH e radicais livres na mucosa gástrica. Para isto, as amostras (porção ulcerada, incluindo base e margem da úlcera) foram utilizadas para o preparo de homogenato. As úlceras foram pesadas (~200 mg) e homogeneizadas em 0,6 mL de tampão fosfato 200 mM pH 6,5. Este homogenato foi utilizado imediatamente para o ensaio de GSH.

Para as análises de SOD, CAT, GST, MPO e NAG o homogenato foi centrifugado por 20 minutos a 9000 x g utilizando uma ultracentrífuga. O pellet contendo 95% do total da atividade de MPO do tecido foi utilizado para o ensaio de MPO e o sobrenadante para as outras enzimas.

Para a determinação dos níveis de radicais livres e peroxidação lipídica, as amostras foram homogeneizadas em tampão TRIS-EDTA e metanol P. A respectivamente.

3.5.1 Determinação da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO)

Estômagos previamente submetidos ao ácido acético foram utilizados para verificar o efeito protetor do EHS na mucosa, através da participação da enzima mieloperoxidase (MPO), método de Bradley et al (1982) modificado por De Young et al (1989). MPO é uma enzima encontrada primariamente nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos (PMN) e comumente usada como um marcador do conteúdo tecidual de PMN que migram para o local do estímulo inflamatório. O homogenato produzido com a parte ulcerada adicionado de tampão fosfato de potássio (200 mM) pH 6,5 foi centrifugado a 9000 x g durante 20 min. O pellet obtido foi ressuscitado com 1 mL de tampão fosfato de potássio 80 mM na presença de 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). Após a homogeneização as amostras são centrifugadas a 11000 x g por 20 min a 4 °C. Em placas de 96 poços foram adicionados em triplicata 30 µL do sobrenadante, acrescido de 220 µL de uma solução contendo: 100 µL de tampão fosfato de potássio 80 mM, 85 µL de tampão fosfato de potássio 22 mM e 15 µL de H₂O₂ 0,017%. A reação foi iniciada com a adição de 20 µL de tetrametilbenzidina. HCl (TMB) e amostra foi incubada por três minutos a 37 °C. A reação foi interrompida com 30 µL de acetato de sódio e a atividade enzimática foi determinada em espectrofotômetro a 620 nm.

Para verificar se o extrato possui ação diretamente sobre a atividade da enzima, quando os leucócitos já migraram para o local do estímulo inflamatório, decidiu-se realizar outro experimento, no qual o extrato foi incubado diretamente com a amostra tecidual, após esta ser adicionada à placa.

3.5.2 Determinação *in vitro* da atividade enzimática de mieloperoxidase (MPO)

As amostras foram separadas em dois grupos: grupo não lesado (sem úlcera) e grupo lesado e foram preparadas conforme o protocolo descrito anteriormente. O grupo lesado representa amostras de úlceras obtidas dos animais controle sem tratamento prévio e, portanto com grande quantidade de PMN e conseqüentemente elevados níveis de MPO. Para realização do teste foi utilizada placa de 96 poços, onde foram adicionadas 30 μL /poço de cada amostra, e em seguida foi acrescentado o extrato (EHS) nas seguintes concentrações (0,3; 1,0; 10 e 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em cada grupo de amostra. Após a adição do extrato, fez-se pausa para incubação de 15 min em temperatura ambiente e procedeu-se a metodologia conforme o protocolo anterior, com a adição de peróxido de hidrogênio e TMB. A atividade enzimática foi determinada em espectrofotômetro a 620 nm.

3.5.3 Determinação da atividade enzimática da N-acetilglucosaminidase (NAG)

A atividade de NAG é baseada na hidrólise do p-nitrofenil-N-acetil- β -D glucosamina (substrato) pela N-acetil- β -D-glucosaminidase liberando p-nitrofenol (Bailey,1988).

Amostras contendo 25 μL (sobrenadante resultante do processo de centrifugação descrito anteriormente) foram incubadas com 100 μL de tampão citrato (50 mM, pH 4,5) na presença do substrato (2,24 mM). As placas foram incubadas por um período de 60 min a 37° C e a reação foi interrompida com tampão glicina (200 mM, pH 10,4) e mensurada em espectrofotômetro a 405 nm. Os resultados foram expressos como unidade de densidade óptica (D.O)/mg de proteína.

3.5.4 Determinação in vivo da migração leucocitária: modelo “air pouch”

Este modelo consiste da formação de uma cavidade artificial no dorso dos animais a partir da injeção subcutânea de ar estéril.

Neste estudo seguiu-se o procedimento descrito por Ribeiro e colaboradores (1991). Inicialmente, injetou-se 20 ml de ar estéril no dorso de animais sedados com éter. O dia da injeção foi considerado como o primeiro dia e a partir daí até o quarto dia foram administrados 10 mL de ar dentro da bolha para manter a cavidade. O experimento foi realizado então, no quinto dia após a primeira injeção de ar. Os ratos foram divididos em cinco grupos: o primeiro grupo recebeu somente 1 mL de salina estéril dentro da bolha e foi denominado de grupo normal, os outros grupos foram pré-tratados oralmente com água destilada (0,1 mL/100 g de peso) - grupo controle; 84 mg/Kg de extrato de *Salvia officinalis* (EHS) e 40 mg/Kg de Omeprazol. O quinto grupo recebeu 5,0 mg/kg de dexametasona através de administração intraperitoneal. A dose do EHS foi escolhida de acordo com a ED₅₀ (dose 50% efetiva) determinada previamente (MAYER et al, 2009) em ensaios de atividade aguda de gastroproteção.

Duas horas após os pré-tratamentos com água, EHS e omeprazol e uma hora depois da administração da dexametasona, os grupos 2, 3, 4 e 5 receberam subcutaneamente (dentro da bolha de ar) 1 mL de carragenina 0,5% dissolvida em tampão fosfato-salina (PBS) pH 5,4.

A segunda dose dos tratamentos foi repetida seis horas após o primeiro tratamento. Vinte e quatro horas depois da injeção da carragenina, os ratos foram anestesiados com éter e 5 mL de uma solução contendo 10 mL de PBS, 1mL de albumina 3% e 0,2 mL de heparina (500 U/mL) foram injetados dentro da bolha que foi então cuidadosamente aberta com uma pequena incisão e o exudato foi

coletado. Para a contagem global das células empregou-se uma diluição de 1:20 dos conteúdos das bolhas de ar em solução de Turk (ácido acético 2%), e a quantificação foi feita em câmara de Neubauer com auxílio de um microscópio ótico comum (aumento de 100 vezes).

Para a contagem diferencial, parte dos lavados das bolhas foi centrifugada e o sedimento diluído em 300 µL de albumina 3%. Alíquotas de 100 µL foram utilizadas para a confecção dos esfregaços que foram corados pelo método de May-Grünwad-Giensa. A contagem celular diferencial (polimorfonucleares e monócitos) foi realizada em microscópio ótico comum (aumento de 400 vezes), contando-se 100 células por lâmina.

3.5.5 Determinação intracelular de radicais livres (RL)

A determinação de radicais livres foi realizada de acordo com Keston e Brandt (1965), Driver et al (2000) e Song et al (2008).

O ensaio consiste na oxidação de DCFH - 2',7'-diclorfluoresceína- (depois da hidrólise da forma diacetato) à fluoresceína por espécies reativas de nitrogênio e/ou espécies reativas de oxigênio, onde a fluorescência gerada pode ser medida (TSUCHIYA et al, 1994). As úlceras foram pesadas (~100 mg) e homogeneizadas em 2 mL de tampão TRIS-EDTA (1mM - 5mM) pH 8,5. O homogenato (500 µL) foi incubado com 25 µL de DCFH-DA (2',7'-diclorfluoresceína-diacetato) (1 mM) por 40 min ao abrigo da luz. Depois da incubação, a fluorescência gerada foi mensurada em espectrofluorímetro usando uma cubeta de quartzo.

Todas as medidas foram feitas utilizando comprimento de onda para excitação: 488 nm e emissão: 520 nm.

3.5.6 Determinação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH)

A taxa de peroxidação lipídica foi mensurada pelo método FOX2, aperfeiçoada do método descrito por JIANG et al, 1991. Este método quantifica a formação de LOOH durante a peroxidação lipídica. O método é baseado na oxidação do íon ferroso em íon férrico pelos LOOH sob condições ácidas. Íons férricos formam um complexo com o xilenol laranja, que é um indicador desses íons, gerando um complexo azul púrpura em uma absorvância máxima de 550-600 nm (SÖDERGREN et al, 1998).

O reagente de FOX2 foi preparado pela dissolução de xilenol laranja (1 mM), H₂SO₄ (25 mM), FeSO₄. NH₄ (250 mM) e BHT (4 mM) em metanol 90%. O tecido lesado (~0,2 g) foi homogeneizado em metanol P.A (1:4) e centrifugado por 20 min a 9000 g (4 °C). O sobrenadante foi colocado em triplicata (60 µL) em placas de 96 poços, na qual foram adicionados 240 µL do reagente de FOX2. As placas foram incubadas por 30 min a temperatura ambiente e lidas em espectrofotômetro a 560 nm. A concentração de LOOH foi obtida com base em 1 mg de proteína de amostra.

3.5.7 Quantificação de grupos sulfidrílicos não protéicos – glutatona reduzida (GSH)

Estômagos previamente submetidos ao ácido acético foram utilizados para verificar o efeito do extrato bruto da *S. officinalis* sobre os grupamentos sulfidrílicos não protéicos na mucosa gástrica.

Os níveis de GSH na mucosa gástrica foram determinados através do método de Sedlak e Lindsay (1968). A parte ulcerada da mucosa gástrica foi pesada e diluída em tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 6,5), no qual foi

preparado um homogenato. Em 50 μL deste homogenato foi adicionado 40 μL de ácido tricloroacético (ATC) 12%, agitados por dez minutos e centrifugados por 15 min a 3000 rpm. Alíquotas de 10 μL do sobrenadante foram adicionadas a 290 μL de tampão TRIS 0,4 M (pH 8,9) e depositadas em placa de ELISA. A reação foi iniciada com a adição de 5 μL de DTNB (5,5'-ditiobis 2-ácido nitrobenzóico) 0,01 M, 5 min antes da leitura espectrofotométrica (415 nm). Os procedimentos foram realizados a 4 °C e os valores individuais interpolados numa curva padrão de GSH e expressos em μg GSH/g tecido.

3.5.8 Determinação da atividade enzimática da Glutathione S-Transferase (GST)

Estômagos previamente submetidos ao ácido acético foram utilizados para verificar a participação da enzima GST na proteção da mucosa pelo extrato da Sálvia.

O método para a determinação da atividade da GST presente na mucosa gástrica foi realizado com base no método de Habig et al (1974). A atividade específica da GST é determinada pela conjugação do dicloro-nitro-benzeno (CDNB) com a glutathione reduzida (GSH), formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento de absorbância. Assim, em microplacas de 96 poços, 100 μL da amostra (sobrenadante proveniente da centrifugação a 9000 x g) foram adicionados a 200 μL de solução-reação contendo 3 mM de CDNB (diluído em etanol PA) e 3 mM de GSH (diluída em tampão fosfato). A atividade da GST foi quantificada em intervalos de 10 s durante 1 min, em espectrofotômetro a 340 nm e expressa em $\mu\text{moles/mg/min}$.

3.5.9 Determinação da atividade enzimática da Superóxido dismutase (SOD)

O método para determinação da atividade da enzima SOD foi realizado com base no método de Marklund e Marklund (1974) e baseia-se na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação do pirogallol. As reações foram realizadas em tampão Tris HCl 200 mM com 2mM de EDTA em pH 8,5 e temperatura ambiente.

Em um tubo foram adicionados Tampão Tris - EDTA e 20 µl de amostra. Após agitação em vortex, foram adicionados 25 µL de pirogallol (1 mM) e a solução foi incubada por 20 minutos. Para interromper a reação, 12,5 µL de HCl (1N) foram adicionados. Os tubos foram centrifugados por 4 min a 14000 rpm e 300 µL do sobrenadante pipetados em microplaca para leitura em espectrofotômetro a 205 nm.

Os resultados foram comparados com o controle (Tampão Tris-EDTA com pirogallol sem incubação + média sem amostra e sem incubação), sendo este valor igual a 100%. A quantidade de proteína que inibe a reação em 50% (IC₅₀) equivale a 1 unidade (U) de SOD. Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína.

3.5.10 Determinação da atividade enzimática da catalase (CAT)

Estômagos previamente submetidos ao ácido acético foram utilizados para verificar o efeito do EHS na participação da catalase (CAT) durante o processo de proteção da mucosa.

A determinação da atividade da CAT presente na mucosa gástrica foi realizada com base no método de Aebi (1984). A mucosa gástrica foi homogeneizada em tampão fosfato pH 6,5. Em uma cubeta de quartzo contendo 990 µL de uma solução reação a 20 mM (Tampão Tris/ EDTA 5 mM, pH 8,0 +

peróxido de hidrogênio 30% + água miliQ) foram adicionados 10 µL da amostra diluída. Foram realizadas 2 réplicas de cada amostra. A absorbância foi medida em comprimento de onda a 240 nm.

3.6 Análise histológica

Para avaliação histológica, as lesões gástricas foram fixadas em solução ALFAC (85% de álcool 80%, 10% de formol e 5% de ácido acético glacial). As amostras foram desidratadas em álcool e xilol, emblocadas em parafina, seccionadas em cortes de 5 µm e coradas com hematoxilina e eosina (RECIO et al., 2000). As amostras foram observadas com o auxílio de uma lupa em aumento de 16 vezes.

3.7 Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média de 8 animais por grupo. As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. $P < 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação temporal da cicatrização das úlceras gástricas induzidas por ácido acético

A figura 8 demonstra os resultados da avaliação temporal das úlceras gástricas (mm^2) a partir do segundo dia após a indução por ácido acético 80%. A área da úlcera mostrou-se significativamente elevada no quarto dia: 55,71% maior que a área da úlcera no segundo dia. Nos dias cinco, seis e nove após a indução observou-se um aumento de 63,10%, 64,80% e 62,63% nas áreas das úlceras quando comparadas ao segundo dia. O tamanho das úlceras foi declinando com o tempo a partir do nono dia após a indução. No décimo primeiro dia a área da úlcera reduziu 47% em relação ao nono dia e no décimo terceiro a úlcera apresentou-se bem cicatrizada com uma área menor do que aquela observada no segundo dia.

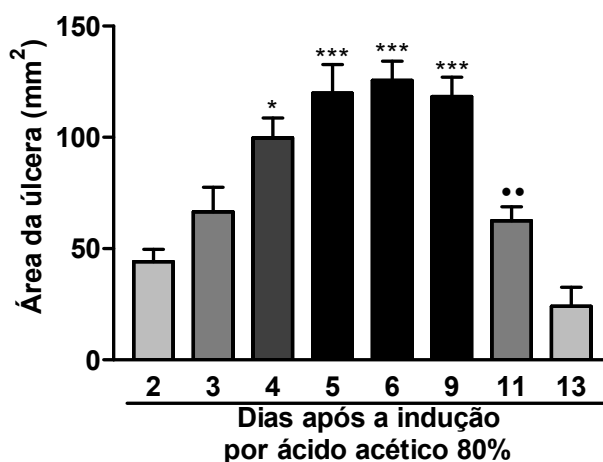


Figura 8. Avaliação da úlcera gástrica (mm^2) por 13 dias depois da indução por ácido acético 80%. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias ($n=8$) e representam a área das lesões. A diferença entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA) seguida do Teste de Bonferroni onde $*P < 0,05$ e $***P < 0,001$ quando comparados ao 2º dia e $**P < 0,01$ quando comparado ao 9º dia.

As fotos (Figura 9) abaixo mostram o desenvolvimento e a cicatrização espontânea das úlceras crônicas a partir do primeiro dia após a aplicação do ácido acético.

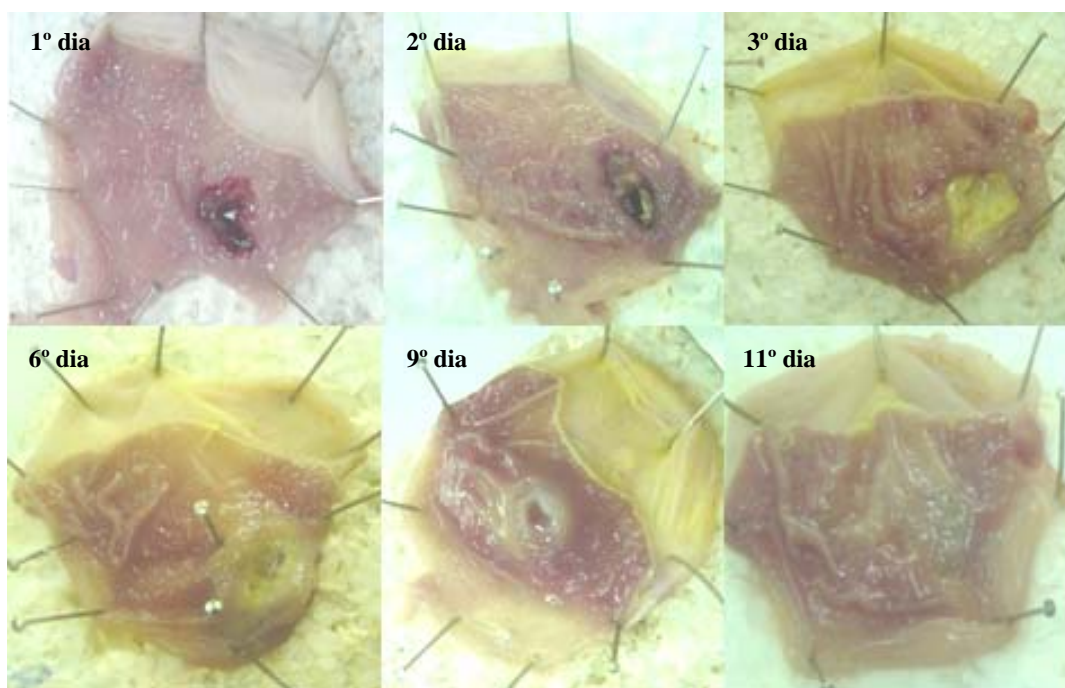


Figura 9. Fotos representativas do desenvolvimento e cicatrização espontânea das úlceras a partir do primeiro dia após indução com ácido acético 80% até o décimo primeiro dia.

4.2 Efeito do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* em úlceras gástricas induzidas por ácido acético

A administração oral do extrato nas doses de 0,003, 0,03, 0,3 e 3 mg/kg, duas vezes ao dia, do segundo ao oitavo dia após indução por ácido acético 80%, promoveu uma cicatrização em 18,4%, 30,0%, 49,0% e 65,0% respectivamente quando comparado ao grupo controle, onde a média da área da lesão foi de $118,3 \pm 8,8 \text{ mm}^2$ (Figura 10). Omeprazol (Omeprazol) na dose de 40 mg/kg foi utilizado como controle positivo. A administração oral do omeprazol, sob o mesmo regime de

tratamento anterior, promoveu como era esperado, uma cicatrização da úlcera em 55,5%.

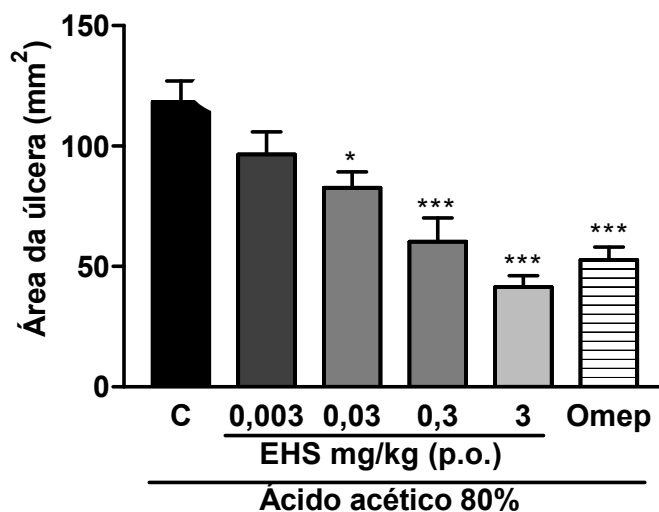


Figura 10. Efeitos do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* - EHS (0,003; 0,03; 0,3 e 3 mg/kg), do Omeprazol (Omep: 40 mg/kg) e da água (C: 0,1 ml/100g) após sete dias de tratamento via oral em ratos fêmeas submetidos à lesões gástricas por ácido acético 80%. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias (n=8) e representam a área das lesões. A diferença entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA) seguida do Teste de Bonferroni. * Diferente do grupo controle para $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

A avaliação histológica também confirmou a presença de uma profunda lesão na mucosa gástrica de animais controles, similar aquelas comumente observadas em úlceras crônicas (Figura 11). Após nove dias de lesão, os ratos tratados com EHS e omeprazol apresentaram lesões parcialmente cicatrizadas, com regeneração da mucosa na base da úlcera e a margem recoberta por tecido epitelial. Os ratos tratados somente com água apresentaram profundas lesões e ausência de cicatrização (Figura 11).

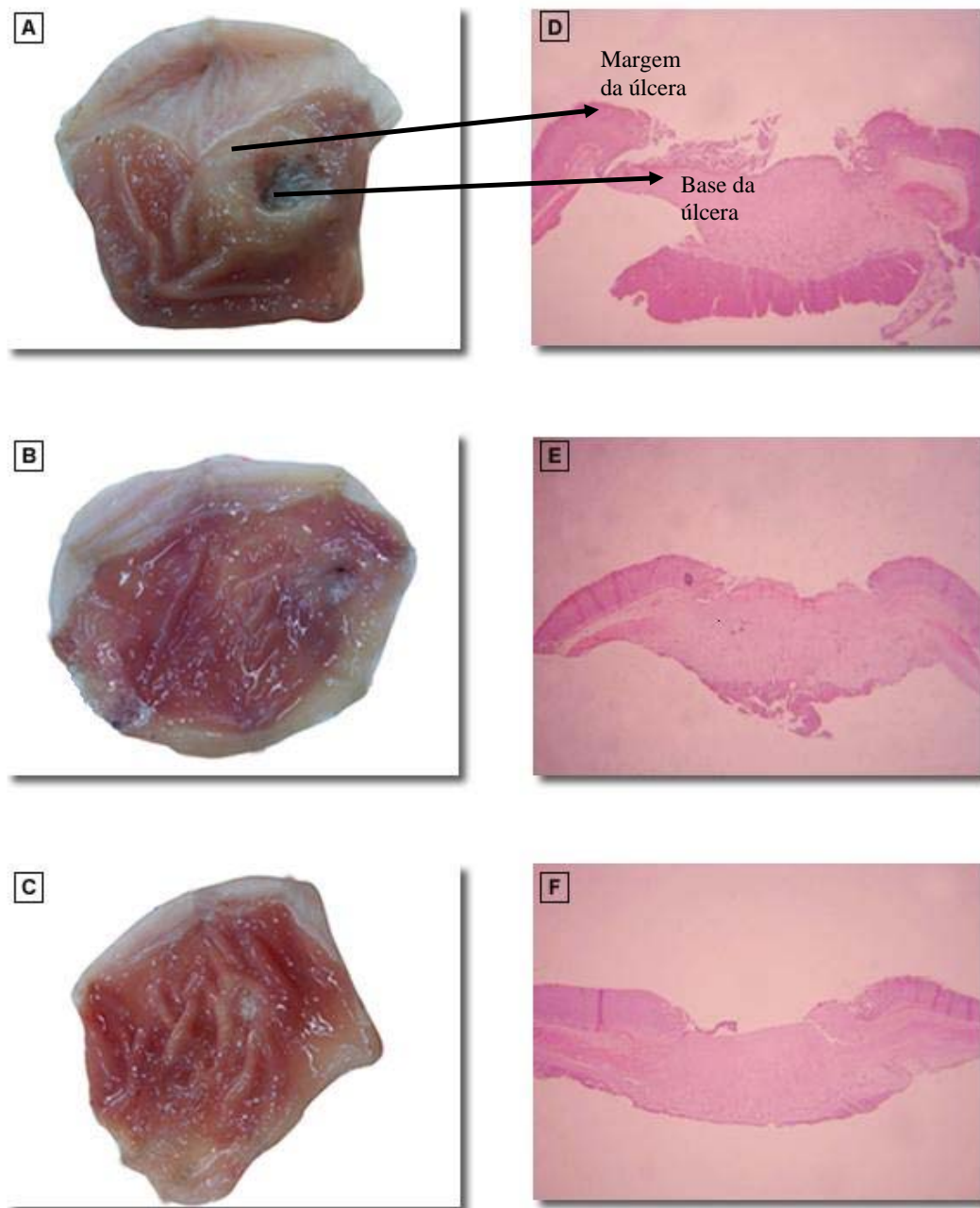


Figura 11. Fotos representativas das avaliações macroscópica e microscópica das lesões gástricas induzidas por ácido acético 80%. Omeprazol (40 mg/kg), extrato de *Salvia officinalis* - EHS (3,0 mg/Kg) ou água (0,1 mL/100g) foram administrados oralmente duas vezes ao dia durante sete dias, a partir do segundo dia de aplicação do ácido. (A, D) ratos

controle tratados com água; (B, E) ratos tratados com EHS e (C, F) ratos tratados com omeprazol.

4.3 Efeito do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* sobre a atividade enzimática da Mieloperoxidase (MPO) em úlceras gástricas induzidas por ácido acético

A figura 12 representa a atividade da mieloperoxidase (MPO) na mucosa gástrica de grupos não lesados, grupo controle e grupo tratado com o extrato. No nono dia após a indução das lesões, a atividade da MPO no grupo controle apresentou-se significativamente elevada em 68,71% quando comparada com os níveis basais do grupo normal (N). O tratamento com o extrato de *Salvia officinalis* na dose de 3 mg/kg foi capaz de restabelecer completamente os níveis basais da atividade da MPO após a indução de úlceras gástricas com ácido acético 80%.

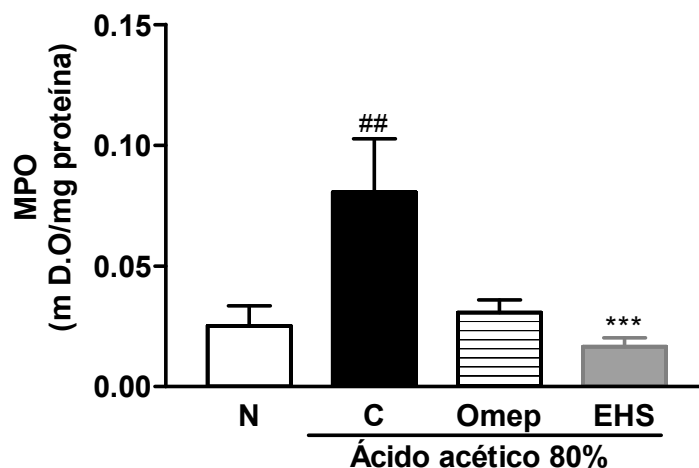


Figura 12. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* - EHS (3 mg/kg, vo), do Omeprazol (Omep: 40 mg/kg, vo) e da água (C: 0,1 mL/100g, v.o) sobre a atividade da MPO em ratos fêmeas após a indução de lesões gástricas por ácido acético 80%. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias (n=8). A diferença entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) seguida do Bonferroni. ## $P < 0,01$ quando comparado ao grupo normal (N) e *** $P < 0,001$ quando comparado ao grupo controle (C).

4.4 Efeito da incubação *in vitro*, do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* sobre a atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) em úlceras gástricas induzidas por ácido acético

Os resultados abaixo indicam ligeira diminuição na atividade enzimática da MPO quando o tecido ulcerado e não tratado foi incubado com o EHS. O grupo controle na ausência do extrato apresentou um aumento de 92% na atividade da MPO ao ser comparado com os níveis basais da enzima do grupo normal (N). A incubação do extrato nas concentrações de 1; 10 e 30 $\mu\text{g/ml}$ reduziu a atividade da MPO em 13%, 19,5% e 23,2% respectivamente.

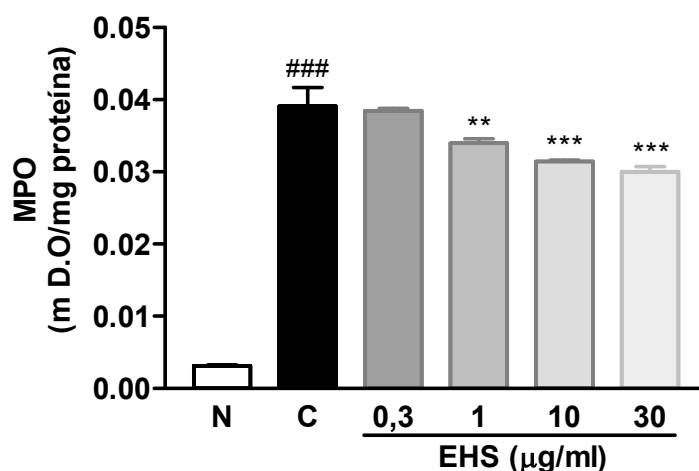


Figura 13. Efeito da incubação do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* - EHS, sobre a atividade da enzima MPO em úlceras gástricas após a indução por ácido acético. C: grupo controle (sem incubação), EHS: 0,3; 1; 10 e 30 $\mu\text{g/ml}$ e N: grupo normal. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (n=8). A diferença entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) seguida do Bonferroni. ### $P < 0,001$ quando comparado ao grupo normal (N), ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ quando comparado ao grupo controle (C).

4.5 Efeito do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* sobre a atividade enzimática da N-acetilglucosaminidase (NAG) em úlceras gástricas induzidas por ácido acético

Os níveis de atividade da NAG apresentados pelo grupo controle no nono dia após a indução da úlcera aumentaram 18,38% em comparação aos níveis normais (N). O tratamento das úlceras com omeprazol e EHS (3 mg/kg) foi capaz de reverter esse aumento para níveis normais.

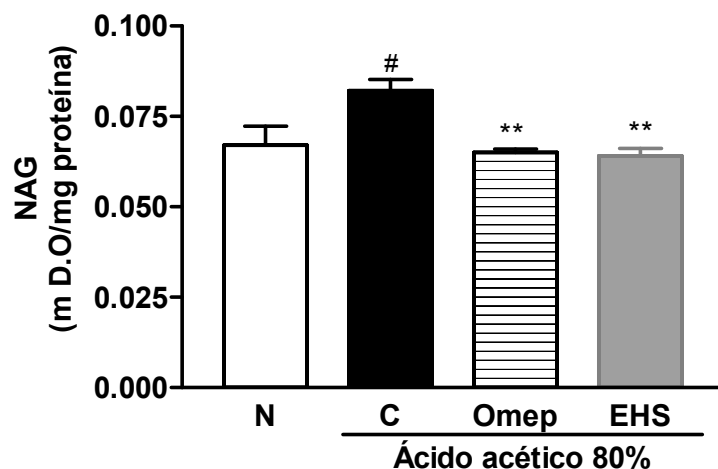


Figura 14. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* - EHS (3 mg/kg, vo), do Omeprazol (Omep: 40 mg/kg- vo) e da água (C: 0,1 mL/100g, v.o) sobre a atividade da NAG em ratos fêmeas após a indução de lesões gástricas por ácido acético 80%. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias (n=8). A diferença entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) seguida do Bonferroni. # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo normal (N) e ** $P < 0,01$ quando comparado ao grupo controle (C).

4.6 Efeito do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* sobre a migração leucocitária no modelo de bolha de ar (*air pouch*)

Como ilustrado na Tabela 1, o número de células por bolha de ar nos ratos normais pré-tratados apenas com água foi somente de $0,19 \pm 0,03 \times 10^6$ células/ml, enquanto o grupo controle carragenina apresentou $16,6 \pm 1,6 \times 10^6$ células/ml, um aumento de 98,8%. O tratamento com o Omeprazol, EHS e Dexametasona reduziu em 69,8%; 71,6% e 95,1% respectivamente o número de leucócitos/bolha recrutados. Esta redução foi representada principalmente pelo influxo de células polimorfonucleares. O pré-tratamento com EHS (84 mg/kg) inibiu significativamente o extravasamento de neutrófilos em 78,1% enquanto o tratamento com Omeprazol e Dexametasona reduziu 66,3% e 97,4% respectivamente, comparado ao grupo controle carragenina. Além disso, o número de monócitos dentro da bolha de ar também foi reduzido pelos mesmos tratamentos em 56,5 %, 52,1% e 89,1% respectivamente em comparação ao grupo controle.

Tabela 1. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* (EHS-84 mg/kg – v.o.), Omeprazol (Omep: 40 mg/kg – v.o.) e Dexametasona (Dexa: 5 mg/Kg – i.p.) na migração de leucócitos no modelo de bolha de ar (“air pouch”) induzida por carragenina

Grupo	Leucócitos totais ($\times 10^6$ céls/ml)	Neutrófilos ($\times 10^6$ céls/ml)	Monócitos ($\times 10^6$ céls/ml)
Normal	$0,19 \pm 0,03$	$0,02 \pm 0,002$	$0,16 \pm 0,03$
Controle	$16,6 \pm 1,6$ ###	$11,9 \pm 1,4$ ###	$4,6 \pm 0,6$ ###
Omep	$5,0 \pm 1,2$ ***	$4,0 \pm 0,4$ ***	$2,2 \pm 0,4$ *
EHS	$4,7 \pm 0,8$ ***	$2,6 \pm 0,5$ ***	$2,0 \pm 0,5$ *
Dexa	$0,8 \pm 0,2$ ***	$0,3 \pm 0,1$ ***	$0,5 \pm 0,1$ ***

Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias (n=8). A diferença entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) seguida do Bonferroni. ### $P < 0.001$ quando comparado ao grupo normal, * $P < 0.05$ e *** $P < 0.001$ quando comparado ao grupo controle (carragenina).

4.7 Efeito do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* sobre a quantidade intracelular de radicais livres (RL) em úlceras gástricas induzidas por ácido acético

Como pode ser observado na figura 15, nove dias após a indução da úlcera, o grupo não tratado (grupo controle) apresentou um aumento de 60% na fluorescência (U), indicando um aumento na produção de radicais livres em relação aos níveis basais do grupo não lesado (N). O grupo tratado com EHS (3 mg/kg) foi capaz de reverter totalmente o aumento de RL provocados pelo ácido acético.

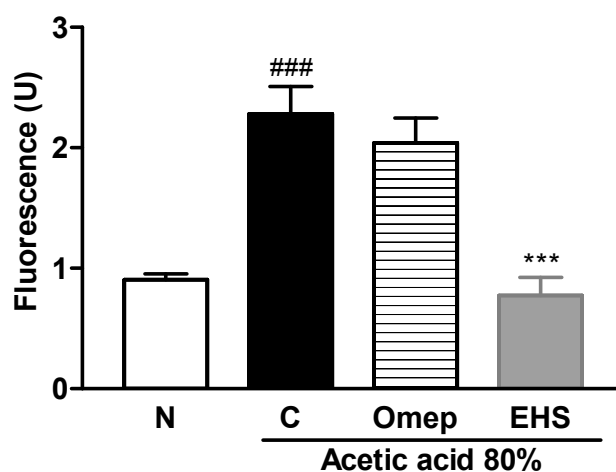


Figura 15. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* - EHS (3 mg/kg, v.o.), do Omeprazol (Omep: 40 mg/kg- v.o.) e da água (C: 0,1 ml/100g, v.o.) sobre a determinação intracelular de radicais livres em ratos fêmeas após a indução de lesões gástricas por ácido acético 80%. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias (n=8). A diferença entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) seguida do Bonferroni. ### $P < 0,001$ quando comparado ao grupo normal (N) e *** $P < 0,001$ quando comparado ao grupo controle (C).

4.8 Efeito do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* sobre os níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em úlceras gástricas induzidas por ácido acético

Os resultados apresentados na Figura 16 mostram o aumento dos níveis de LOOH em 87% no grupo controle quando comparado ao grupo normal. O pré-tratamento dos animais com EHS (3 mg/kg) reduziu em 38% os níveis de LOOH enquanto a administração de omeprazol (40 mg/kg) não alterou esses níveis.

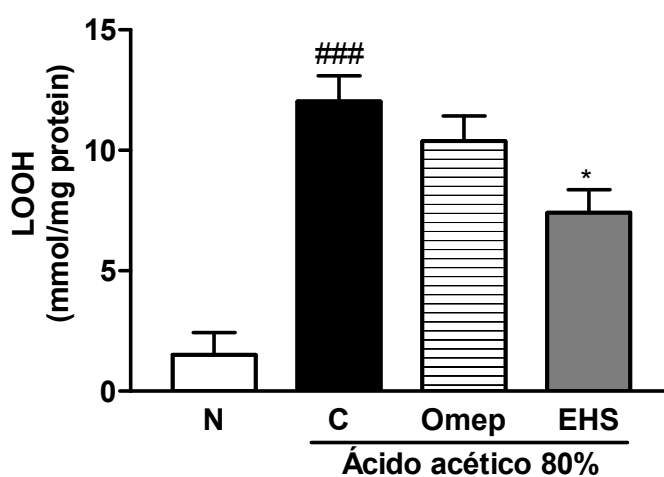


Figura 16. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* - EHS (3 mg/kg, v.o.), do Omeprazol (Omep: 40 mg/kg- v.o.) e da água (C: 0,1 ml/100g, v.o.) sobre os níveis de LOOH em ratos fêmeas após a indução de lesões gástricas por ácido acético 80%. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias (n=8). A diferença entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) seguida do Bonferroni. ### $P < 0,001$ quando comparado ao grupo normal (N) e * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (C).

4.9 Efeito do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* sobre as enzimas antioxidantes (GST, SOD, CAT) e níveis de glutathiona reduzida (GSH) e em úlceras gástricas induzidas por ácido acético

Os níveis de GSH e enzimas antioxidantes na mucosa gástrica dos grupos experimentais estão representados na Tabela 2.

No presente estudo, a aplicação de ácido acético 80% reduziu os níveis de GSH em 95,2% e aumentou a atividade da CAT em 48,7% em comparação aos níveis basais do grupo normal. Quando o extrato (EHS) foi administrado na dose de 3 mg/kg, ele foi capaz de prevenir parcialmente a redução dos níveis de GSH, no entanto, não foi capaz de prevenir o aumento da atividade da CAT. Um aumento das atividades da SOD (44,5%) e GST (54,8%) foi observado no grupo controle quando comparado ao grupo normal, enquanto que o tratamento com Omeprazol inibiu em 32,8% apenas a atividade da SOD. A administração de EHS foi capaz de restabelecer os níveis normais de atividade da SOD e GST.

Tabela 2: Efeito do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* (EHS: 3 mg/kg) e Omeprazol (Omep: 40 mg/kg) na atividade de enzimas antioxidante e níveis de GSH em úlceras gástricas induzidas por ácido acético

Grupos	SOD (U/mg proteína)	CAT (μ mol/min/ mg proteína)	GST (nmol/mg/ proteína/min)	GSH (μ g/g tecido)
Normal	7,1 \pm 0,4	197,8 \pm 24,3	300,4 \pm 27,9	337,9 \pm 18,7
Controle	12,8 \pm 0,5 ^{###}	385,7 \pm 39,4 [#]	665,9 \pm 131,2 [#]	16,1 \pm 4,1 ^{###}
Omep	8,6 \pm 0,3 ^{***}	228,0 \pm 25,9 [*]	375,1 \pm 56,2	280,0 \pm 19,3 ^{**}
EHS	6,7 \pm 0,7 ^{***}	290,0 \pm 43,9	308,4 \pm 41,7 [*]	154,1 \pm 47,2 [*]

Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias (n=8). A diferença entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA) seguida do Bonferroni. [#] P <0,05 e ^{###} P <0,001 quando comparado ao grupo normal, ^{*} P <0,05 e ^{***} P <0,001 quando comparado ao grupo controle.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Algumas espécies de *Salvia* têm sido largamente cultivadas para uso na medicina popular e na culinária. No Brasil a espécie de *Salvia officinalis* é comumente usada para desordens do trato gastrointestinal, para dispepsia, problemas de fígado, diabetes, constipação, bem como, para infecções de pele, boca, gengiva entre outros (LORENZI, 2002). Estudos prévios do nosso grupo mostraram que esta espécie possui atividade gastroprotetora em úlceras gástricas induzidas por etanol, principalmente devido a sua ação seqüestradora de radicais livres, bem como pela sua capacidade de inibição da bomba H^+,K^+ -ATPase (MAYER et al, 2009).

Neste trabalho nós avaliamos o potencial cicatrizante do extrato hidroalcoólico de *S. officinalis* (EHS) em úlceras gástricas induzidas por ácido acético 80% em ratos fêmeas.

O primeiro modelo de úlcera crônica relatado na literatura consistia na injeção de 0,02 mL de ácido acético 20% com uma seringa, na subserosa da porção glandular anterior do estômago. Devido algumas desvantagens como a grande aderência em outros órgãos, fígado, por exemplo, e dificuldade no manuseio da técnica, que outros modelos foram sendo padronizados ao longo dos anos. O modelo proposto por Okabe et al, 1971, consistia na aplicação de ácido acético 100% (0,2 mL) na superfície da serosa por 30 a 60 segundos, com o auxílio de um cilindro. Essa metodologia se caracterizava por ser de fácil aplicação, determinando assim mais claramente o local da úlcera. A primeira etapa deste estudo foi então constituída da adaptação desta técnica para as condições existentes em nosso laboratório.

Para avaliar o início da formação da úlcera e a sua cicatrização espontânea, a partir do dia seguinte à cirurgia grupos de 4 animais foram eutanasiados todos os dias até o 13º dia. De acordo com os resultados apresentados observou-se um aumento significativo da área da lesão a partir do 4º após indução por ácido acético. No 11º dia a úlcera já estava bem cicatrizada, por isso decidimos conduzir o tratamento crônico (7 dias) com o extrato de Sálvia a partir do segundo dia após a indução da lesão.

A administração oral do extrato hidroalcoólico de *S. officinalis* (EHS) na dose de 3 mg/kg duas vezes ao dia, durante sete dias acelerou a cicatrização da úlcera crônica em 65,0%, enquanto a administração de Omeprazol promoveu uma cicatrização em 55,5%. Foi demonstrado que o EHS possui atividade inibidora da bomba H^+,K^+ -ATPase, assim como o Omeprazol, contribuindo para a diminuição de um dos principais fatores agressores da mucosa: o HCl (MAYER et al, 2009) Portanto, é possível que o tratamento com EHS tenha reduzido a área da úlcera por apresentar essa importante atividade. No entanto inúmeros outros fatores incluindo aumento de mecanismos de proteção da mucosa podem estar envolvidos.

Microscopicamente foi possível observar a lesão na mucosa gástrica caracterizada pelas duas estruturas principais da úlcera crônica: margem da úlcera e base da úlcera. Os animais controle apresentaram uma profunda lesão enquanto os animais tratados com Omeprazol e EHS apresentaram redução dessa lesão caracterizada por um aumento do componente epitelial na margem da úlcera.

O único modelo de úlcera gástrica que permite avaliar o processo de cicatrização é o modelo apresentado neste trabalho, em que a lesão é induzida por ácido acético, introduzido pela primeira vez por Takagi et al, 1969.

As lesões gástricas provocadas por ácido acético são induzidas por alteração de vários fatores incluindo fatores de crescimento, aderência de muco, microcirculação, óxido nítrico, citocinas além da produção de prostaglandinas derivadas da enzima ciclooxigenase-2 (KOBAYASHI et al 2001; SHAHIN et al 2001). Portanto, a cura da úlcera é um processo complexo que envolve a migração e proliferação de células epiteliais e inflamatórias, envolve a síntese e degradação de moléculas da matriz extracelular e componentes de tecido conectivo, além da síntese de fatores de crescimento e citocinas que, juntos fazem da cicatrização um processo bem orquestrado (TARNASWSKI et al, 1995).

Sabe-se que a fase inicial da úlcera gástrica é caracterizada por necrose tecidual e liberação de leucotrienos B, os quais atraem macrófagos e leucócitos polimorfonucleares que liberam citocinas pró-inflamatórias como $TNF\alpha$, $IL-1\alpha$, e $IL-1\beta$. Essas citocinas são responsáveis pela ativação de fibroblastos locais e células endoteliais e epiteliais (ANDRZEJ e TARNAWSKI, 2005). A cicatrização termina quando o tecido de granulação se forma acima da depressão ulcerosa (HALTER et al, 1995).

A inflamação na mucosa gástrica é um fator crucial para a recorrência da úlcera péptica (KAZUSHI et al, 2005). Portanto, para analisar o processo inflamatório que ocorre durante o processo de cicatrização da úlcera gástrica, decidimos avaliar a infiltração de neutrófilos e macrófagos nos estômagos através da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglucosaminidase (NAG) respectivamente.

A atividade da mieloperoxidase (MPO) é um marcador indireto da resposta inflamatória em uma variedade de modelos experimentais (BRADLEY et al, 1982) e serve para avaliar a função normal dos neutrófilos quando estes são estimulados.

A MPO é uma enzima cuja função é promover a formação de espécies reativas de oxigênio auxiliando na destruição de agentes patogênicos. (ARNHOLD, 2003). O aumento da atividade da MPO observado no grupo controle devido ao ácido acético indica uma considerável quantidade de neutrófilos ativos sugerindo a presença de uma resposta inflamatória no tecido ulcerado (MATSUI, et al, 2001). O grupo de animais tratado com o extrato na dose de 3,0 mg/Kg, apresentou significativa redução na atividade da MPO, a qual pode ser resultante da atenuação do processo inflamatório na mucosa.

O protocolo utilizado para a medida da MPO avalia a presença de enzima ativa no tecido, desta forma, um tratamento que apresente diminuição deste parâmetro pode ter agido de duas formas: através da inibição dos neutrófilos para o sítio inflamatório, ou por impedir a atividade desta enzima, seja por uma ação direta ou por meio de uma inibição de seu substrato, o peróxido de hidrogênio. Em decorrência disso, optou-se por analisar o efeito “in vitro” da incubação do EHS sobre a atividade da MPO, utilizando-se apenas o grupo controle de animais lesados com ácido acético que não receberam tratamento com EHS.

Nossos resultados mostraram uma pequena redução na atividade da MPO quando o tecido ulcerado (não tratado) foi incubado com EHS nas concentrações de 1, 10 e 30 µg/mL, sugerindo alguma ação do extrato sobre a enzima. Como o extrato de *Salvia officinalis* apresenta uma atividade sequestradora de radicais livres (MAYER et al, 2009) é possível que ocorra seqüestro de H₂O₂, substrato essencial para a atividade da MPO. No entanto esse efeito do EHS sobre a enzima é muito pequeno comparado a enorme redução da atividade da MPO observada no ensaio “in vivo”, o que nos indica a possibilidade de alguma ação do extrato sobre a infiltração de neutrófilos.

N-acetilglucosaminidase (NAG) é uma enzima lisossômica produzida por monócitos ativados (macrófagos) e é utilizada como um indicador de infiltração dessas células em sítios inflamatórios (ARNHOLD, 2003; BRADLEY et al, 1982). Nossos dados mostraram aumento da atividade da NAG no grupo controle, indicando infiltração de macrófagos no tecido. A redução de NAG no grupo tratado com EHS, além da diminuição da MPO sugere redução da infiltração de macrófagos e neutrófilos respectivamente, indicando melhora no processo inflamatório das úlceras gástricas.

Para complementar a investigação do EHS sobre o processo inflamatório na cicatrização da úlcera gástrica optou-se por utilizar o modelo de bolha de ar (“air-pouch”), modelo que tem sido extensivamente utilizado pra induzir inflamação subaguda e avaliar os efeitos de drogas experimentais na formação do processo inflamatório e infiltração leucocitária (SALVEMINI et al, 1995). No presente estudo, a administração de EHS reduziu a infiltração de neutrófilos e monócitos no modelo induzido por carragenina.

A carragenina, um polissacarídeo sulfatado de origem vegetal, isolado da alga *Chondrus crispus* é amplamente utilizado como agente edematogênico (EMIM, 1996). Na fase inicial observa-se liberação de mediadores como histamina, serotonina, bradicinina; a segunda fase é mantida pela liberação de prostaglandinas, fator de agregação plaquetária (PAF), substância P, proteases, citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-8) e lisossomos do tecido inflamado (ORHAN et al, 2007). Portanto, compostos capazes de inibirem o processo inflamatório desencadeado pela carragenina, podem estar interferindo com qualquer um dos elementos que compõe este tipo de resposta.

Os resultados apresentados no modelo de bolha de ar mostraram aumento significativo da infiltração de leucócitos no grupo controle que não recebeu tratamento em comparação ao grupo normal. O controle positivo utilizado para este modelo foi a Dexametasona, um antiinflamatório da classe dos glicorticóides que possui efeitos antiinflamatórios e imunossupressores. O mecanismo de ação destes fármacos depende da interação com receptores intracelulares (complexos esteróides) que resulta na indução da síntese de proteínas, como a lipocortina-1. Os glicocorticóides também promovem a inibição de fatores de transcrição como NF- κ B (fator nuclear kappa B), resultando na supressão da transcrição de genes da COX-2 e de interleucinas (TAMAOKI et al, 2008). Os potentes efeitos da Dexametasona foram observados no presente estudo através da redução significativa da infiltração tanto de neutrófilos quanto monócitos no tecido ulcerado no modelo de bolha de ar induzido por carragenina. Animais tratados com Omeprazol também apresentaram redução na infiltração leucocitária. Nossos resultados corroboram com dados da literatura que demonstram propriedade antiinflamatória do Omeprazol. Yoshida e colaboradores (2000) mostraram que após a incubação de neutrófilos humanos e células endoteliais com inibidores de bomba de prótons IBP (lanzoprazol e omeprazol) ou drogas anti-secretoras (famotidina e ranitidina), apenas os IBP foram capazes de atenuar a aderência de neutrófilos nas células endoteliais via inibição da expressão de moléculas de adesão (CD11b e CD18 nos neutrófilos e ICAM-1 e VCAM-1 nas células endoteliais). Handa et al (2006) apontam para redução da atividade de NF κ B em células endoteliais vasculares e modulação da concentração de cálcio nos polimorfonucleares (PMN) como mecanismos para a ação antiinflamatória dos IBP. Em nosso trabalho os animais tratados com EHS apresentaram redução da

infiltração leucocitária representada especialmente pela diminuição da infiltração de neutrófilos. Redução na infiltração de monócitos também foi observada no grupo tratado com o extrato.

Coletivamente com os resultados da determinação de MPO e NAG, parece que o extrato de *Salvia officinalis* apresenta expressiva ação antiinflamatória, talvez por alterar a ação de fatores endógenos (VAJJA et al, 2004) envolvidos na migração de neutrófilos e monócitos para o sitio inflamatório.

A atividade antiinflamatória da *Salvia officinalis* parece estar relacionada com os seus dois maiores constituintes: o ácido carnósico e carnosol. Poeckel e colaboradores (2008) demonstraram a habilidade destes compostos agirem diretamente em agentes pró-inflamatórios, inibindo células polimorfonucleares (PLM), formação de leucotrienos e geração de espécies reativas de oxigênio. A supressão destes PLM está correlacionada com a mobilização de Ca^{+2} intracelular e inibição da enzima lipoxigenase (5-LPO) responsável pela formação dos leucotrienos especialmente em células inflamatórias como leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e mastócitos (WERZ, 2007 e RADMARK et al, 2007).

Outra possibilidade para explicar a ação antiinflamatória pode ser determinada pela capacidade destes mesmos compostos ativarem receptores PPAR γ , propriedade esta relatada em Rau et al (2006). A ativação de PPAR γ pelo seu agonista seletivo – Pioglitazona demonstrou potente ação gastroprotetora e cicatrizante de úlceras gástricas em animais. O envolvimento de prostaglandinas endógenas e óxido nítrico, expressão e liberação atenuadas de citocinas próinflamatórias como TNF- α e IL-1 além do aumento da angiogênese na margem

da úlcera foram determinantes para os efeitos gastroprotetores e cicatrizantes (BRZOZOWSKI et al, 2005).

Durante a infiltração de neutrófilos para o sítio inflamatório, além da mieloperoxidase outras substâncias são liberadas para o espaço extracelular, como radicais livres e proteínas citotóxicas (SULLIVAN et al, 2000; REITER et al, 2000). O peróxido de hidrogênio é considerado o primeiro produto responsável pela citotoxicidade dos neutrófilos, evidente quando a enzima é liberada fora do vacúolo lisossômico (DYKE e SERHAN, 2003; PACHER et al., 2007). Esta citotoxicidade é proveniente da produção de poderosas cloroaminas oxidantes. Somado ao seu ataque oxidativo direto, os radicais de oxigênio também podem modular várias atividades celulares, importantes mediadores na seqüência de eventos que leva à lesão tecidual (DYKE e SERHAN, 2003).

Desde a década de noventa que inúmeros trabalhos sugerem a contribuição de espécies reativas de oxigênio (EROS) no processo ulcerogênico em diversos modelos experimentais (TAKEUCHI et al, 1991; SMITH et al, 1992; YOSHIKAWA et al, 1990). Motilva et al (1996) e Hamaishi et al (2006) relatam o importante papel de EROS gerados por neutrófilos ativados nas lesões da mucosa gástrica induzidas pelo ácido acético, contribuindo para o atraso na cicatrização.

Os neutrófilos constituem uma das maiores fontes endógenas de radicais livres durante o processo inflamatório em humanos (SATOH et al, 1991; DIXON, 1994) ou animais (WATANABE et al, 1997; TAKAHASHI et al, 1998). Nestas células a ativação de sistemas enzimáticos como NAPH oxidase, óxido nítrico sintase e mieloperoxidase geram espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, precursores da produção de hipoclorito e peroxinitrito, com efeitos oxidativos e citolíticos na mucosa gástrica (DEKIGAI et al, 1995; YOSHIKAWA e NAITO, 2000).

Por isso, a redução do processo inflamatório aliado a diminuição de neutrófilos ativados no sítio inflamatório sugere um decréscimo na produção de RL liberados por estas células. Portanto, a próxima etapa do estudo foi avaliar *in vivo* a produção de RL na mucosa gástrica dos grupos experimentais após a indução da úlcera gástrica pelo ácido acético 80%.

A produção intracelular de radicais livres pelas células pode ser investigado usando 2',7'-diclorfluoresceína-diacetato (DCFH-DA), um componente já bem estabelecido para detectar e quantificar espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (O_2^- , H_2O_2), das quais a fluorescência pode ser mensurada (CATHCART et al, 1983; TSUCHIYA et al, 1994). Nossos resultados mostraram um aumento de 60% na geração de fluorescência no grupo controle, indicando considerável quantidade de espécies reativas nesse grupo induzidas pelo ácido acético. No entanto, animais tratados com *S. officinalis* apresentaram significativa redução desses radicais. Acredita-se que essa importante redução seja em decorrência da inibição do processo inflamatório, representado pela diminuição da infiltração de neutrófilos observado no ensaio do "air pouch". Além disso, pode-se sugerir a capacidade seqüestradora de radicais livres pelo EHS, já que estudos prévios do nosso grupo mostraram *in vitro* essa atividade pelo extrato de *S. officinalis* (MAYER et al, 2009).

Radicais livres como o radical hidroxil (OH^-) ou ânion superóxido (O_2^-) e espécies consideradas não-radicais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são produzidos por NADPH oxireductase em neutrófilos ativados e geram constantemente estresse oxidativo e peroxidação lipídica com conseqüente dano aos tecidos (ZIMMERMAN et al., 1997; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1998).

O processo oxidativo pode ser caracterizado, entre outros fatores, pela peroxidação lipídica da membrana das células do tecido lesado. O estresse

oxidativo pode ser descrito como resultado de um desequilíbrio dos mecanismos de defesa do organismo (moléculas antioxidantes), em relação ao número de substâncias oxidantes produzidas pelo agente indutor da lesão ou ainda por alterações bioquímicas do próprio organismo (LIH-BRODY et al, 1996). A taxa de peroxidação lipídica neste trabalho foi mensurada pelo método FOX2, aperfeiçoada do método descrito por JIANG et al (1991). Este método quantifica a formação de hidroperóxidos durante a peroxidação lipídica.

No presente estudo um aumento de hidroperóxidos lipídicos foi observado no grupo controle, enquanto os ratos tratados com o extrato de *Salvia officinalis* apresentaram redução da peroxidação lipídica, resultando na melhora do dano na mucosa gástrica. Nossos dados sugerem que redução na peroxidação lipídica nos animais tratados está diretamente relacionada com a diminuição de RL gerados na mucosa. Estes resultados corroboram com dados da literatura que também apontam para esta relação (SAIRAM et al, 2002; KAZUSHI et al, 2005; GONZÁLEZ-SEGOVIA et al, 2008).

É bem estabelecido que as células de mamíferos possuem mecanismos de defesa antioxidantes elaborados, a fim de neutralizar os efeitos deletérios desses RL (MANOHARAN et al, 2005). O estresse oxidativo pode ser impedido por defesas antioxidantes enzimáticas e químicas.

Glutationa reduzida (GSH) é encontrada em altas concentrações na mucosa gástrica de ratos e humanos (BODY et al, 1979) e é considerada uma molécula muito importante para a manutenção da integridade da mucosa, onde a sua depleção induz ulcerações que podem ser visualizadas macroscopicamente na mucosa (HOPPENKAMPS et al, 1984). Sob condições de estresse oxidativo, as espécies reativas de oxigênio são reduzidas por GSH com concomitante formação

do dissulfito oxidado: a GSSG (ou glutathiona oxidada) (CNUBBEN et al, 2001). Os resultados aqui apresentados mostraram uma diminuição nos níveis de GSH depois da administração de ácido acético. O tratamento com EHS 3 mg/Kg e omeprazol (40 mg/kg) preveniu a redução nos níveis de GSH provocados pela administração do ácido acético. As enzimas antioxidantes incluindo superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona S-transferase (GST) possuem um papel importante na patogênese das lesões por ácido acético (REPETTO AND LLESUY, 2003). Altas concentrações de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) ativam a SOD, a qual catalisa a dismutação do radical em um composto menos nocivo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é inativado pela sua degradação em água pela CAT ou GPx (KWIECIEŃ et al. 2004). A aplicação do ácido acético promoveu um aumento na atividade da SOD, sugerindo altas concentrações de ânion superóxido no tecido ulcerado. A atividade da enzima GST também se apresentou elevada no grupo controle. GST atua nas reações de conjugação juntamente com GSH. Quando ligada no estado ativo, permite o GSH de formar ligações tio-éter com o agente oxidante em seu sítio eletrofílico, resultando em um composto menos reativo quimicamente (SCHULTZ et al, 1997). A elevada atividade da glutathiona-S-transferase (GST) no grupo lesado com ácido acético confirma com os baixos níveis de GSH encontrados neste mesmo grupo. O tratamento com EHS foi capaz de reverter o aumento de SOD e GST para os níveis basais, semelhantes aos níveis apresentados pelos animais não lesados com ácido acético. Esses dados sugerem baixos níveis de radicais livres na mucosa gástrica de animais tratados com EHS, não havendo assim, a necessidade de ativar enzimas antioxidantes

A atividade da CAT aumentada nos animais lesados com ácido acético também sugere elevados níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formados pela SOD. Acredita-se que mesmo apresentando níveis elevados da catalase, esta não foi capaz de neutralizar o H_2O_2 , que ao ser acumulado foi capaz de gerar peroxidação lipídica e conseqüente dano na mucosa. Por outro lado os níveis da CAT não apresentaram uma redução significativa nos animais tratados com EHS, quando comparados com o grupo controle.

Os resultados das enzimas antioxidantes apresentados nos animais tratados com *S. officinalis* parecem mais uma vez indicar uma redução de radicais livres, seja por uma inibição do processo inflamatório como pela atividade antioxidante da própria planta.

A atividade antioxidante de *S. officinalis* tem sido descrita em vários trabalhos (CUVELIER et al, 1994 e 1996; YINRONG LU, et al, 2001; MILIAUSKAS, 2004 and BEKTAS TEPE, 2008). É bem estabelecido que a propriedade antioxidante apresentada por diversas plantas está diretamente relacionada com as atividades gastroprotetora (KAHRAMAN et al, 2003) e citoprotetoras (MAHAKUNAKORN et al, 2003). A literatura reporta que flavonóides podem ser os principais componentes responsáveis pela atividade antiúlcera de certas plantas (HAVSTEEN, 2002). Não somente os flavonóides, mas também outras substâncias fenólicas são conhecidas por sua atividade antioxidante (REPETTO e LLESUY, 2003). *Salvia officinalis* é rica em polifenóis, 160 já identificados e alguns deles são únicos do gênero. Um dos maiores componentes desta espécie é um difenol do tipo diterpeno, o ácido carnósico (CA) e seu produto de oxidação, o carnosol (CS) (BENTAYEB et al, 2007; NINOMIYA et al, 2004). Estes componentes são

conhecidos por suas propriedades antioxidantes e antiinflamatórias (CHAN et al, 1995; PENG et al, 2007).

Coletivamente, os resultados até aqui apresentados nos levam a sugerir que propriedades antiinflamatória e antioxidante apresentadas pela *Salvia officinalis* podem levar ao processo de cicatrização das úlceras gástricas induzidas pelo ácido acético.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- ✓ Finalmente, podemos concluir que o extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* (EHS) possui potente capacidade de cicatrização das úlceras gástricas induzidas por ácido acético 80%, observada macroscopicamente e microscopicamente.
- ✓ De acordo com os resultados obtidos, o tratamento com o extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* (EHS) apresentou redução de infiltração de neutrófilos e monócitos e conseqüente redução das enzimas Mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglucosaminidase (NAG) no tecido ulcerado indicando inibição do processo inflamatório.
- ✓ O tratamento com EHS promoveu redução de radicais livres capazes de lesar o tecido através da peroxidação lipídica, a qual também foi inibida pela administração do extrato.
- ✓ Os níveis das enzimas antioxidantes superóxido dimutase (SOD) e glutathiona-S-transferase (GST) foram preservados durante o tratamento com EHS.

Uma possível ação antiinflamatória do extrato hidroalcoólico de *S. officinalis* (EHS) parece contribuir para a cicatrização da úlcera gástrica, para tanto, experimentos adicionais devem ser realizados para esclarecer melhor o mecanismo de ação envolvido no processo cicatrizante da úlcera gástrica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.** v. 105, p.121-6, 1984.

ALONSO, J. **Tratado de Fítofarmacos y Nutracéuticos.** Rosário, Argentina: Corpus Libros, 2004.

ALVAREZ, A.; IBIZA, M.S.; HERNANDEZ, C.; ALVAREZ-BARRIENTOS, A.; ESPLUGUES, J.V.; CALATAYUDE, S. Gastrin induces leukocyte-endothelial cell interactions *in vivo* and contributes to the inflammation caused by *Helicobacter pylori*. **The FASEB Journal.** v.20, p.1742-1752, 2006.

ALVAREZ, A.; IBIZA, S.; ANDRADE, M.M.; BLAS-GARCÍA, ANA.; CALATAYUD, S. Gastric antisecretory drugs induce leukocyte-endothelial cell interactions through gastrin release and activation of cck-2 receptors. **JPET**, v.10, n.1124, p.1-32, 2007.

AMIN, A.; HAMZA, A.A. Hepatoprotective effects of Hibiscus, Rosmarinus and Salvia on azathioprine-induced toxicity in rats. **Life Sciences.** v.77, p.266–278, 2005.

ANDRZEJ, S.; TARNAWSKI, M.D. Cellular and Molecular Mechanisms of Gastrointestinal Ulcer Healing. **Digestive Diseases and Sciences**, v.50, Supp. 1, pp. S24–S33, 2005.

ARNHOLD, J. Free radicals – Friends or foes? Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**, v. 69 (1), p. 4-9, 2003.

BAYIR, H. Reactive oxygen species **Crit Care Med.** v.33, n.12, p. 498-501, 2005.

BAILEY. P.J. Sponge implants as models. **Methodology in immunology.** v. 162. p.327-334. 1988.

BENTAYEB K, RUBIO C, BATLLE R, NERIN C. Direct determination of carnosic acid in a new active packaging based on natural extract of rosemary. **Anal Bioanal Chem.** v. 389, p.1989–96, 2007

BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M. STANTON, B.A. **Fisiologia: 5ª Edição** Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

BEKTAS TEPE. Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *Salvia staminea* (Montbret & Aucher ex Benth) and *Salvia verbenaca* (L.) from Turkey. **Bioresource Technology.** v.99, p.1584–1588, 2008.

BODY, S.C.; SASAME, H.A.; BODY, M.R. High concentrations of glutathione in glandular stomach: possible implications for carcinogenesis, **Science**, v. 205, p.1010–1012, 1979.

BOZIN, B.; MIMICA-DUKIC, N.; SAMOJLIK, I.; JOVIN, E. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils. **J. Agric. Food Chem.** 2007

BRADLEY. P.P.. PRIEBAT. D.A.. CHRISTENSEN. R.D.. ROTHSTEIN. G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal Investigative of Dermatology.** v. 78. p. 206-209. 1982.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.** 11ª Edição. United States of America: Mc Graw-Hill Companies, Inc., 2006.

BRZOZOWSKI, T. Experimental production of peptic ulcer, gastric damage and cancer models and their use in pathophysiological studies and pharmacological

treatment - Polish achievements. **Journal of physiology and pharmacology**. v.54. p. 99-126, 2003.

BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P.C.; PAJDO, R.; KWIECIE, S. N.; KONTUREK,S.; TARGOSZ, A.; BURNAT, G.; CIESZKOWSKI, J.; PAWLIK, W.W.; HAHN, E.G. Agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-): a new compound with potent gastroprotective and ulcer healing properties . **Inflammopharmacology**, v.13, n.1-3, pp. 317-330 (14) 2005.

CAPEK, P.; HRIBALOV, V. Water-soluble polysaccharides from *Salvia officinalis* L. possessing immunomodulatory activit. **Phytochemistry**. v.65, p. 1983–1992, 2004.

CATHCART, R.; SCHWIERS, E.; AMES, B.N. Detection of picomole levels of hydrogenperoxide using a fluorescent dichlorofl uorescein assay. **Anal Biochem**, v. 134, p.111-116, 1983.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**. v.21, n.1, p. 99-105,1998.

CHAN, M.M.; HO, C.T.; HUANG, H.I. Effects of three dietary phytochemicals from tea, rosemary and turmeric on inflammation-induced nitrite production. **Cancer Lett**; v.96, p.23–9, 1995.

CHANDE, N.S. L; BUDINGER, G.R.S. Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation. **Free Radical Biology & Medicine**, v.42 pg. 165–174, 2007

CNUBBEN, N.H.P.; RIETJENS, I.M.C.M.; WORTELBOER, H.; ZANDEN, J.; BLADEREN, P.J. The interplay of glutathione-released process in antioxidant defense. **Enviromental Toxicology an Pharmacology**, v.10, p.141-152, 2001.

COCHRAN, R.A.; STEFANKO, J.; MOORE, C.; SAIK, R. Cytotoxic-free radicals in stress ulcerations. **Surg. Forum**, v. 28, p.159–161,1982.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Gastric ulceration. *In* Robbins **Pathologic Basis of Disease**. 5th Edition. RS Cotran, V Kumar, SL Robbins (eds). Philadelphia, Saunders, pp 298–299, 773– 777,1999

CUVELIER, M.-E., BERSET, C., RICHARD, H. Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, pg.665 - 669, 1994.

CUVELIER, M.E. et al. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts sage and rosemary. **Journal of the American Oil Chemists' Society** v. 13, p.645-652, 1996

DEKIGAI H., MURAKAMI M, KITA T. Mechanism of *Helicobacter pylori*-associated gastric mucosal injury. **Dig Dis Sci**. v.40, p.1332, 1995

DEL SOLDATO, P.; FOSCHI, D.; BEBONI, G.; SCARPIGNATO, C.; Oxygen free radicals interact with indomethacin to cause gastrointestinal injury. **Agents Actions**, v. 17, p. 484–488, 1985.

DE YOUNG, L.M.; KHEIFETS, J.B.; BALLARON, S.J.; YOUNG, J.M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents Actions**, v. 26, p.335–34, 1989.

DONG, M.H.; KAUNITZ, J.D. Gastroduodenal mucosal defense. **Current Opinion in Gastroenterology**. v.22, n. 6, p. 599 – 606, 2006

DIXON, M.F. Pathophysiology of *Helicobacter pylori* infection. **Scand J Gastroenterol**, v. 201, p.7–10, 1994

DRIVER, A.; PRASADA, R.S.; KODAVANTI, W.R. M. Age-related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 22, p. 175–181, 2000.

DYKE, T. E. V.; SERHAN, C. N. Resolution of Inflammation: A New Paradigm for the Pathogenesis of Periodontal Diseases. **Journal of Dental Research**, v. 82(2), p. 82 – 90, 2003.

EMIM, J.A.S. Atividades farmacológicas de um inibidor seletivo da calicreína tecidual em processos nociceptivos e antiinflamatórios de camundongos. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Paulo, 1996.

EVERETT, S. M.; SINGH, R.; LEURATTI, C.; WHITE, K. L.; NEVILLE, P.; GREENWOOD, D.; MARNETT, L. J.; SCHORAH, C. J.; FORMAN, D.; SHUKER, D.; AXON, A. T. Levels of malondialdehyde-deoxyguanosine in the gastric mucosa: relationship with lipid peroxidation, ascorbic acid, and *Helicobacter pylori*. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.** v.10, p.369–376; 2001

FARINATI, F.; DELLA LIBERA, G.; CARDIN, R.; MOLARI, A.; PLEBANI, M.; RUGGE, M.; DI MARIO, F.; NACCARATO, R. Gastric antioxidant, nitrites, and mucosal lipoperoxidation in chronic gastritis and *Helicobacter pylori* infection. **J. Clin. Gastroenterol.** v.22, p. 275–281; 1996.

HABIG WH; PABST MJ; JAKOBY WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J Biol Chem.** v.249(22), p.7130-9, 1974.

HALTER, F.; SCHMASSMANN, A.; TARNAWSKI, A. Review article: healing of experimental gastric ulcers. Interference by gastric acid. **Dig. Dis. Sci.**, v. 40, n. 11, p.2481-2486, 1995.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed. New York: Oxford University Press, 1999

HAMAISHI, K.; KOJIMA, R.; ITO, M. Anti-ulcer effect of tea catechin in rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 2206-2213, 2006.

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

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

HOPPENKAMPS, R.; THIES, E.; YOUNES, M.; SIEGERS, C.P. Glutathione and GSH dependant enzymes in the human gastric mucosa. **Klin Wochenschr.** v.62, p.183–186, 1984.

JAIN, K.S.; SHAH, A.K.; BARIWAL, J.; SHELKE, S.M.; KALE, A.P.; JAGTAP, J.R.; BHOSALE, A.V. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.15, p. 1181-1205, 2007.

JANEWAY, C. A., TRAVERS, P., WALPORT, M., & SHLOMCHIK, M. Immunobiology: The immune system in health and disease. London: Taylor & Francis, 2001.

JIANG Y, WOOLLARD ACS, WOLFF SP. Lipid Hydroperoxide Measurement by Oxidation of Fe+2 in the Presence of Xilenol Orange. Comparison with the TBA Assay and an Iodometric Method. **Lipids**, v. 26, p. 853-856, 1991.

KAHRAMAN, A.; ERKASAP, N.; KOKEN, T.; SERTESER, M.; AKTEPE, F.; ERKASAP, S. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. **Toxicology**, v. 183, p.133–142, 2003.

KAZUMORI, H.; ISHIHARA, S.; RUMI, M.A.K. Transforming growth factor- α augments histidine decarboxylase and vesicular monoamine transporter 2 production in rat enterochromaffin-like cells. **Am. J. Gastrointest. Liver Physiol.** v.286, p. G508-G514, 2004.

KAZUSHI, S.; TOSHIHIRO, O.; KATSUYA, Y. Rebamipide Reduces Recurrence of Experimental Gastric Ulcers: Role of Free Radicals and Neutrophils. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, Supplement 1, p. S90–S96, 2005.

KESTON, A.S.; BRANDT, R. The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. **Anal Biochem.** v.11, p.1-5. 1965.

KOBAYASHI, T.; OHTA, Y.; YOSHINO, J.; NAKAZAWA, S. Teprenone promotes the healing of acetic acid-induced chronic gastric ulcers in rats by inhibiting neutrophil infiltration and lipid peroxidation in ulcerated gastric tissues. **Pharmacology Research**, v.43, p.23–30, 2001.

KONTUREK, P.C.; KONTUREK, S. J.; BURNAT, G. BRZOZOWSKI, T.; BRZOZOWSKA, I.; REITER, R.J. Dynamic physiological and molecular changes in gastric ulcer healing achieved by melatonin and its precursor L-tryptophan in rats. **Journal of Pineal Research.** v. 45, p.180 –190, 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.

KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S. J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. **Journal of Physiology and Pharmacology**. v.53, p.39-50, 2002 a.

LAWRENCE, T., WILLOUGHBY, D. A., & GILROY, D. W. (Antiinflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature Reviews. Immunology*, v. 2, p. 787–795, 2002.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. **Gastroenterology**, v.135, p.41–60, 2008.

LIMA, H. C.F.; CARVALHO, F.; FERNANDES, E.; BASTOS, M.L.; SANTOS-GOMES, P.C.; FERREIRA, M.F.; WILSON, C.P. Evaluation of toxic/protective effects of the essential oil of *Salvia officinalis* on freshly isolated rat hepatocytes. **Toxicology in Vitro**. v.18, p. 457–465, 2004.

LIMA, H. C.F.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.M.; FERREIRA, M.F.; WILSON, C.P. The drinking of a *Salvia officinalis* infusion improves liver antioxidant status in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 97, p.383–389, 2005

LIH-BRODY L.; POWELL, S.R.; COLLIER, K.P. REDDY, G.M. CERCHIA, R.; KAHN, E.; MULLIN, G.E . Increase of oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowell disease. **Dig. Dis. Sci**, v.41, p.2078-2086, 1996.

LORENZI, H.; MATTOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MAHAKUNAKORN, P.; TOHDA, M.; MURAKAMI, Y.; MATSUMOTO, K.; WATANABE, H.; VAJARAGUPTA, O. Cytoprotective and cytotoxic effects of curcumin: dual action on H₂O₂-induced oxidative cell damage in NG108-15 cells. **Biol. Pharm. Bull.** v.26, p. 725– 728, 2003.

MARYAM, E.; AKRAM, E.; HAMIDREZA, Z. Effect of *Salvia officinalis* L. leaves on serum glucose and insulin in healthy and streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v.100, p.310–313, 2005.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. **Eur. J. Biochem**. v. 47, p. 469-474, 1974.

MAYER, B.; BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; DOS SANTOS, A.C.; TWARDOWSCHY, A.; HORST, H.; PIZZOLATTI, M.G.; MICKE, G.A.; HELLER, M.; SANTOS, E.P.; MARQUES, M. C. A.; OTUKI, M. F. Gastroprotective constituents of *Salvia officinalis* L.. **Fitoterapia**, 2009.

MATSUI, H.; MURATA, Y.; KOBAYASHI, F.; SHIBA, R.; MOMO, K.; KONDO, Y.; NAKAHARA, A.; MUTO, H. Diclofenac-induced gastric mucosal fluorescence in rats, **Dig. Dis. Sci.** v. 46, p.338–344, 2001.

MATU, N. E.; VAN STADEN, J. Antibacterial and anti-inflammatory activities of some plants used for medicinal purposes in Kenya. **Journal of Ethnopharmacology**, v.87, p. 35–41, 2003

MILANI, S.; CALABRÒ, A. Role of growth factors and their receptors in gastric healing. **Microscopy Research and Techniqye**. v.53, p.3060-371, 2001.

MEINING, A.; KIEL, G.; STOLTE, M. **Aliment Pharmacol Ther.** v.12, p.735-740, 1998.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONISA, P.R.; VAN BEEKB, T.A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**. v.85, p. 231–237, 2004.

MÖSSNER J.; CACA, K. Developments in the inhibition of gastric acid secretion. **Eur J Clin Invest.** v.35, n.8, p.469-75, 2005.

NAITO, Y.; TOSHIKAZU, Y. Molecular and cellular mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation and Oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 3, p. 323–336, 2002

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, p.846–852, 2002.

NIKI, E.; KOMURO, E. Inhibition of peroxidation of membranes. **Basic Life Sci.** v. 49, p.561–566; 1988.

NIKI, E.; NOGUCHI, N.; GOTOH, N. Dynamics of lipid peroxidation and its inhibition by antioxidants. **Biochem. Soc. Trans.** v. 21, p.313– 317; 1993.

NINOMIYA, K.; MATSUDA, H.; SHIMODA, H.; NISHIDA, N.; KASAJIMA, N.; YOSHINO, T. Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage. **Bioorg Med Chem Lett** 14:1943–6.2004.

OFMAN, J.J.; ETCHASON, J.; ALEXANDER, W.; STEVENS, B.R.; HERRIN, J.; CANGIALOSE, C.; BALLARD, D.J.; BRATZLER, D.; ELWARD, K.S.; FITZGERALD, D.; CULPEPPER-MORGAN, J.; MARSHALL, B. The Quality of Care for Medicare Patients With Peptic Ulcer Disease. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 95, n. 1, 2000

OKABE, S.; ROTH, L.A.; PFEIER, J. A method of experimental penetrating gastric and duodenal; ulcers in rats. **Am J Dig Dis.** v.16, p. 277–280, 1971.

ORHAN, D. D.; HARTEVIOGLU, A.; KUPELI, E.; YESILADA, E. in vivo antiinflammatory and antinociceptive activity of crude extract and fractions from *Rosa canina* L. Fruits. **Journal Ethnopharmacology**, v.111, p.394-400, 2007.

O'SHEA, J.J.; MURRAY, P.J. Cytokine Signaling Modules in Inflammatory Responses. **Immunity Review**, v.28, p. 477-487, 2008.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. **Physiology Reviews**, v. 87, p. 315 – 424, 2007.

PERY, M.A.; WADHWA, S.; PARKS, D.A.; PICKARD, W.; GRANGER, D.N. Role of oxygen radicals in ischemia-induced lesions in the cat stomach. *Gastroenterology*, v. 90, p.362–367, 1986.

PENG, C.H.; SU, J.D.; CHYAU, C.C.; SUNG, T.Y.; HO, S.S.; PENG, C.C. Supercritical fluid extracts of rosemary leaves exhibit potent anti-inflammation and anti-tumor effects. **Biosci Biotechnol Biochem**. v.71, p.2223–32, 2007

PIHAN, G.; REGILLO, C.; SZABO, S.; Free radicals and lipid peroxidation in ethanol- or aspirin-induced gastric injury. **Dig. Dis. Sci**. v.32, p.1395–1401, 1987.

POECKEL, D.; GREINER, C.; VERHOFF, M.; RAU, O.; TAUSCH, L.; HO"RNIG, C.; STEINHILBER D.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; WERZ, O. Carnosic acid and carnosol potently inhibit human 5-lipoxygenase and suppress pro-inflammatory responses of stimulated human polymorphonuclear leukocytes. **Biochemical pharmacology**. v.76, p. 91–97, 2008.

RADMARK, O.; WERZ, O.; STEINHILBER, D.; SAMUELSSON, B. 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. **Trends Biochem Sci**. v.32, p. 332–41, 2007.

RAU O, WURGLICS M, PAULKE A, ZITZKOWSKI J, MEINDL N, BOCK A, et al. Carnosic acid and carnosol, phenolic diterpene compounds of the labiate herbs

rosemary and sage, are activators of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **Planta Méd.** v.72, p.881–7, 2006

RECIO, M. C.; GINET, R. M.; URIBUN, L.; MÁÑEZ, S.; CERDÁ, M.; DE LA FUENTE, J. R.; RÍOS, J. L. In vivo activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. **Life Sciences**, v. 66 (26), p. 2509 – 2518, 2000.

REPPETO, M.G.; LLESUY, S.F. Antioxidant proprieties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 35, p. 523-534, 2003

RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. IL-8 causes in vivo neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. **Immunol.** v.74, p. 472-477, 1991.

REITER, R.J.; TAN, D.X.; OSUNA, C.; GITTO, E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: a review. **J. Biomed. Sci.** v.7, p.444–458, 2000.

RODRÍGUEZ, J.L.;ASTUDILLO, L.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Oleanolic acid promotes healing of acetic acid-induced chronic gastric lesions in rats. **Pharmacological Research**. v.48, p.291–294, 2003.

SAIRAM, k.; RAO, CH.V.; DORA BABU, M.; VIJAY KUMAR K., AGRAWAL, V.K.; GOEL R. K. Antiulcerogenic effect of methanolic extract of *Embllica officinalis*: an experimental study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, p. 1-9, 2002.

SALVEMINI, D.; MANNING, P.J.; ZWEIFEL, B.S.; SEIBERT, K.; CONNER, J.; CARRIE, M.G.; NEEDLEMAN, Evaluation of antiinflammatory activity of methanol

extract of *Phyllanthus amarus* in experimental animal models. **J. Clin. Invest.**, v.96, p.301, 1995.

SATOH, K.; KIMURA, K.; YOSHIDA, Y.; KASANO, T.; KIHIRA, K.; TANIGUCHI, Y. A topographical relationship between *Helicobacter pylori* and gastritis: quantitative assessment of *Helicobacter pylori* in the gastric mucosa. **Am J Gastroenterol** v. 86, p.285–291, 1991

SCHULTZ, M.; DUTTA, S.; TEW K. D. Inhibitors of glutathione S-transferase as therapeutic agents. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 26, pg. 91-104, 1997.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**. v.25, p.192-205, 1988.

SHAHIN, M.; KONTUREK, P.W.; POHLE, T.; SCHUPPAN, D.; HERBST, H.; DOMSCHKE, W. Remodeling of extracellular matrix in gastric ulceration. **Microscopy Research and Technique**. v.15 (53), p. 396–408, 2001.

SIRAKI, A.G.; POURAHMAD, J.; CHAN, T.S.; KHAN, S.; O'BRIEN, P.J. Endogenous and endobiotic induced reactive oxygen species formation by isolated hepatocytes. **Free Radical Biol. Med.**, v. 32, pg. 2–10, 2002.

SCHUBERT, M.L. Gastric secretion. *Current Opinion in Gastroenterology*, v.21, p.636-643, 2005.

SCHUBERT, M.; PEURA, D.A. **Control of Gastric Acid Secretion in Health and Disease**. *Gastroenterology*, v. 134, p.1842–1860, 2008.

SEPULVEDA, B.; ASTUDILLO, L.; RODRÍGUEZ, J.; YANEZ, T.; THEODULOZ, C.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Gastroprotective and cytotoxic effect of

dehydroabietic acid derivatives. **Pharmacological Research**. v.52, p.429–437, 2005.

SHII, D.; INAGUMA, K.; ITO, M.; SUZUKI, Y. Role of oxygen radicals in healing process of acetic acid-induced ulcers in rats with limited food-intake-time and effects of oxygen radical scavengers on the healing. **Exp. Ulcer**, v. 19, p. 105-109, 1992.

SÖDERGREN, E. et. al. Re-evaluation of the ferrous oxidation in xylenol orange assay for the measurement of plasma lipid hydroperoxides **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.37, n. 3, p.137-146, Nov 1998.

STOLTE, M.; MEINING, A.; SCHMITZ, J.M.; ALEXANDRIDIS, T.; SEIFERT, E. **Aliment Pharmacol Ther**.v.12, p.247-253, 1998.

SULLIVAN, G.W.; SAREMBOCK, I.J.; LINDEN J. The role of inflammation in vascular diseases, **J. Leukoc. Biol**. v.67, p.591–602, 2000.

SUZUKI, M.; SUZUKI, H.; KITAHORA, T.; MIYAZAWA, M.; NAGAHASHI, S.; SUZUKI, K.; ISHII, H. Treatment with a proton pump inhibitor promotes corpus gastritis in patients with *Helicobacter pylori*-infected antrum-predominant gastritis. **Aliment Pharmacol Ther**. v.16, p 159-165, 2002

TAKAGI, E.; OKABE, S.; SAZIKI, R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and effect of several drugs on healing. **Japanese Journal of Pharmacology**. v. 19, p.416-426, 1969.

TAKAHASHI, S.; KETO, Y.; FUJITA, H.; MURAMATSU, H.; NISHINO, T.; OKABE, S. Pathological changes in the formation of *Helicobacter pylori* induced gastric lesions in Mongolian gerbils. **Dig Dis Sci**. v.43, n.4, p.754– 765, 1998

TAMAOKI, J.; ISONO, K.; TAIRA, M.; TAGAYA, E.; NAKATA, J.; KAWATANI, K.; NAGAI, A.. Role of regular treatment with inhaled corticosteroid or leukotriene receptor antagonist in mild intermittent asthma. **Allergy and Asthma Proceedings**. v. 29, n. 2, p. 189-196. 2008.

TARNAWSKI, A.; TANQUE, K.; SANTOS, M. A.; SARFEH, I. J. Cellular and molecular mechanisms of gastric ulcer healing. Is the quality of mucosal scar affected by treatment? **Scand J Gastroenterol**, v.30, p.9-14, 1995.

TARNAWSKI, A. Molecular mechanism of ulcer healing. **Drug News Perspect**, v. 13, p.158–168, 2000

TARNAWSKI, A. Cellular and molecular mechanism of gastrointestinal ulcer healing. **Dis. Sci.**, v.50, s.1, p.24-33, 2005.

TSUCHIYA, M.; SUEMATSU, M.; SUZUKI, H. In vivo visualization of oxygen radical-dependent photoemission. **Methods Enzymol**. v.233, p.128– 140, 1994.

UEMURA, N.; OKAMOTO, S.; YAMAMOTO, S.; MATSUMURA, N.; YAMAGUCHI, A.; MASHIBA, H.; SASAKI, N.; TANIYAMA, K. **Aliment Pharmacol Ther**. v.14, p 1345-1352, 2002.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.M.A. Medicinal Plants: safe cure? **Revista Química Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

VENKATARANGANNA, M.V.; GOPUMADHAVAN, S.; SUNDARAM, S.K.; MITRA. Evaluation of possible mechanism of anti-ulcerogenic activity of UL 409, a herbal preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.63, p. 187-192, 1998.

WALLACE, J. Mechanisms of Protection and Healing: Current Knowledge and Future Research. **Am J Med**, v.110, pg. 19S–23S, 2001.

WALLACE, J. Recent advances in gastric ulcer therapeutics. **Current Opinion in Pharmacology**. v.5, p.573–577, 2005.

WALLACE, J.; DICAY, M.; MCKNIGHT, W.; MARTIN, G.R. Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats. **FASEB J**. v. 21, p. 4070–4076, 2007.

WERZ, O. Inhibition of 5-lipoxygenase product synthesis by natural compounds of plant origin. **Planta Med**. v.73, p.1331–57, 2007.

WITTLE, B.J.R. Mechanisms underlying intestinal injury induced by antiinflammatory COX inhibitors. **Eur. J. Pharmacol.**, v.500, p.427-439, 2004.

YAO, X.; FORTE, J.G. Cell biology of acid secretion by the parietal cell. **Annu. Rev. Physiol**. v. 65, p.103–31, 2003.

YASUI, K.; BABA, A. Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation. **Inflamm. res.**, v.55, pg. 359–363, 2006.

YOSHIDA, N.; YOSHIKAWA, T.; TANAKA, Y.; FUJITA, N.; KASSAI, K.; NAITO, Y.; KONDO, M. A new mechanism for anti-inflammatory actions of proton pump inhibitors – inhibitory effects on neutrophil-endothelial cell interactions. **Aliment. Pharmacol Ther**. v14, suppl 11, p. 74-81, 2000.

YOSHIKAWA T, NAITO Y. The role of neutrophils and inflammation in gastric mucosal injury. **Free Radic Res**. v.33, p.785–94. 2000.

YINRONG, LU.; YEAP FOO L. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). **Food Chemistry**. v. 75, p. 97–202, 2001.

YUAN, Y.; PADOL, I.T.; HUNT, R.H. Peptic ulcer disease today. **Nature Clin Pract Gastroent & Hepat**. v. 3(2), 2006

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas Mediciniais**: sob a ótica da Química Medicinal Moderna: Chapecó: Argos, 2001.

ZIMMERMAN, B.J.; GRISHAM, M.B.; GRANGER, D.N. Mechanisms of oxidant-mediated microvascular injury following reperfusion of the ischemic intestine. **Basic Life Sci**; v. 49, p. 881-886, 1988.