



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ- REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

GABRIELLA PACHECO

**ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO VANILÓIDE 4
(TRPV4) NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL, EM CAMUNDONGOS.**

PARNAÍBA

2019

GABRIELLA PACHECO

**ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO VANILÓIDE 4
(TRPV4) NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL, EM CAMUNDONGOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Farmacologia Molecular aplicada à Biotecnologia

Orientador: Jand Venes Rolim Medeiros

PARNAÍBA

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Divisão de Processos Técnicos

P116p Pacheco, Gabriella

Papel do receptor de potencial transitório vanilóide 4 (TRPV4) na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos. / Gabriella Pacheco.

83 f

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Saúde, Mestrado em Biotecnologia, Parnaíba, 2019.

Orientação: Prof. Jand Venes Rolim Medeiros "

.

1. Farmacologia Molecular. 2. Biotecnologia. I. Título

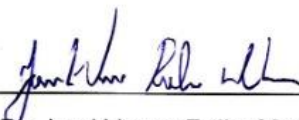
CDD 615.1

PAPEL DO RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO VANILÓIDE 4 (TRPV4)
NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL, EM CAMUNDONGOS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia..

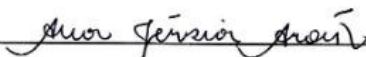
Aprovada em: 13/12/2019

BANCA EXAMINADORA



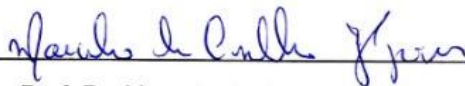
Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros

Universidade Federal do Piauí (Orientador)



Prof. Dr. Ana Jérsia Araújo

Universidade Federal do Piauí



Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Filgueiras

Universidade Federal do Piauí

Ao meu pai, meu anjo da guarda, minha estrela mais brilhante, meu protetor e inspirador. A minha mãe, razão dos meus esforços e meu porto seguro. A minha tia Valeria, minha maior incentivadora.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus**, por todas as oportunidades, por me dá forças todas as vezes que desacreditei que seria possível chegar até aqui.

Ao meu pai, Valmir Pacheco, que mesmo que não esteja vivo fisicamente vive dentro de mim, e sei que me apoiou, me aconselhou, me guiou e me deu forças nessa trajetória. A sua memória é minha maior inspiração.

A minha amada mãe, que abriu e abre mão de tanto por mim, que acredita nas minhas vitórias mais do eu mesma. Que me “abraçou” por telefone todas as vezes que chorei e tive medo. Que se manteve perto mesmo estando tão longe. Obrigada por me fazer sua prioridade, por tornar possível todas as oportunidades, sempre dando um jeito de resolver todas as dificuldades e por nunca me deixar desistir.

A minha tia de coração Valeria, uma das pessoas que mais me incentivou, que sempre fez o não virar sim, que é exemplo de força e caráter e é sempre a primeira pessoa a dizer sim pros meus sonhos, custe o que custar. Obrigada por sempre acreditar em mim e me incentivar a alcançar tudo que almejo.

Ao meu orientador Jand Venes, que sempre se manteve sábio em meio a tantas dificuldades, que faz o impossível para que todos os alunos alcancem o objetivo esperado. Obrigada por me aceitar como orientanda, por acreditar em mim, por tornar esse projeto possível, por todas as orientações e por ser uma inspiração de pesquisador.

Ao meu namorado João Ricardo, por ter tornado tudo tão mais fácil. Por ter me ensinado a ser uma pessoa mais calma. Obrigada pela paciência de ouvir meus problemas e pela sabedoria de sempre conseguir me tornar mais resiliente. Gratidão por ter sido um respiradouro, meu ponto de paz. Tudo se tornou mais leve com você ao meu lado.

Ao meu grupo de pesquisa LAFIDG, pelo apoio de todos desde o preparo para os experimentos, até a escrita e correção desse trabalho. Gratidão a todos os alunos de iniciação científica, Matheus, Gaby Gabrielle, Samara, Antônio, Darlan, Sandiely, Jelson e Bruna, por sempre estarem de prontidão para ajudar no que fosse preciso. Aos mestrandos e doutorandos Nayara, Luan, Kerolayne, Priscila e Bruno, por ajudarem nos experimentos e nas dúvidas referentes à execução do trabalho. A Ana Patrícia, que esteve ao meu lado em quase todos os experimentos, me auxiliando desde as administrações até a escrita da qualificação. Sempre disposta a ler e reler minha discussão, opinar sobre as imagens e por ter sido uma ótima companhia todos os dias no laboratório. Ao André, o IC prodígio, que com sua inteligência sempre esteve ao meu lado resolvendo qualquer dificuldade. A Andreza, que será eternamente minha IC e que se tornou uma grande amiga, com quem dividi todos os meus problemas pessoais e referentes ao desenvolvimento da pesquisa, obrigada por sempre estar ao meu lado. A Letícia, com que convivo a bastante tempo, mas que de uns tempos pra cá se tornou alguém próximo, que sempre esteve ao meu lado disposta a me apoiar. Ao Thiago, que mesmo agora mais

distante fisicamente continua sendo uma inspiração de profissional, um amigo excepcional e que também sempre esteve disposto a me apoiar. A Bia, que sempre me abraçou, me norteou, me ajudou e tentou solucionar junto comigo os problemas que foram aparecendo no percurso. Obrigada por ser a amiga que você é. A Isabela, por ter ido muito além de uma colega de laboratório, por ter me escutado todas as vezes que fiquei triste e por ter sempre me aconselhado e me ajudado.

Aos meu amigos, Julia, Humberto, Igor, Felipe, Ryan, Bruna e Joaquim, com quem compartilhei tantos momentos, e que sempre estavam do meu lado para conversar, sair e me divertir. Gratidão por serem amigos tão presentes.

A Higinalice, Jéssica e Carol, que também são meus pontos de apoio, que são o local pra onde eu corro quando as coisas não estão bem. Obrigada por serem amigas, conselheiras e irmãs pra mim.

A todos os meus professores, da graduação e da pós graduação, que me ensinaram tanto, que me incentivaram a chegar até aqui.

Aos Parceiros Marcin, Even, Prof. Daniel e Alyne por possibilitarem a realização de algumas análises.

A Universidade Federal do Piauí, CNPQ, FAPEPI e Programa de Pós graduação em biotecnologia que tornaram a realizam desse trabalho possível.

*“Não há acaso, sina, destino, que possa
limitar, impedir ou controlar a firme resolução
de uma alma determinada”*

-Ella Wheller Wilcox

RESUMO

Os receptores de potencial transitório (TRP) formam uma superfamília implicada em uma variedade de funções celulares. Dentre eles, podemos destacar os receptores de potencial transitório vanilóide (TRPV), que são associados ao desenvolvimento de inúmeras patologias, entre eles distúrbios gástricos, como úlceras ocasionadas pelo uso de indometacina, ácido acético e etanol. O receptor de potencial transitório vanilóide 4 (TRPV4) faz parte da família de receptores TRPV, é morfológicamente e funcionalmente expresso no epitélio gástrico e também é associado a distúrbios do trato gastrointestinal. No entanto, existem poucos estudos que demonstrem a associação do TRPV4 com o desenvolvimento de úlceras gástricas. Levando isso em consideração, o nosso estudo teve como objetivo avaliar a possível participação desse receptor no desenvolvimento desses tipos de úlceras. Para isso, utilizou-se de modelos animais de indução de lesão gástrica por etanol a partir da utilização de camundongos swiss pesando entre 25 e 30g, em grupos de aproximadamente 5 animais. O grupo controle negativo recebeu apenas a administração de solução salina (0,9%) e o controle positivo a administração de etanol a 50% ou 30%. Em dois grupos experimentais foram administrados antagonistas do TRPV4 associados ao etanol a 50% (0,5ml/25g, v.o), onde um grupo recebeu Vermelho de rutênio (doses: 0,03, 0,1 ou 0,3 mg/kg, *i.p*), um antagonista inespecífico, e o outro grupo GSK2193874 (doses: 0,1, 0,3 e 0,9 mg/kg, *i.p*), um antagonista específico. Além disso, um grupo de animais recebeu a administração de GSK1016790A (0,9 mg/kg, *i.p*), agonista do TRPV4, e logo após etanol a 30% (0,5ml/25g). Uma hora após as administrações os animais foram eutanasiados, realizou-se uma laparotomia para retirada do estômago, que foi aberto ao redor da curvatura maior, estirado e fotografado para análise macroscópica da mucosa gástrica, que foi realizada pelo programa Image J. Após essa análise a melhor dose dos antagonistas de TRPV4 foram selecionadas para os demais testes. Amostras de estômago foram retiradas para a realização da avaliação histopatológica, microscopia de força atômica, dosagens de malondialdeído (MDA), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona reduzida (GSH). Realizou-se também o experimento de muco gástrico, imunohistoquímica e análise da expressão de mRNA de TRPV4. Como resultado, evidenciamos que o bloqueio de TRPV4 promoveu a gastroproteção a nível macro e microscópico no modelo de lesão induzida pelo etanol, levando a diminuição dos parâmetros hemorragia, perda de células, edema, e aumento da integridade gástrica em relação ao grupo etanol. Os dados demonstraram também um aumento significativo ($p < 0,05$) das concentrações de SOD e GSH e redução das concentrações de MDA ($p < 0,05$) na mucosa gástrica, demonstrando uma diminuição do estresse oxidativo causado pelo álcool. O experimento de muco evidenciou uma maior quantidade de muco gástrico nos animais pré tratados com os antagonistas de TRPV4. Por outro lado, a utilização do agonista de TRPV4 demonstrou, por meio das análises macroscópicas uma exacerbação da área de lesão ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo que recebeu etanol a 30%. Com isso podemos concluir que a ativação de TRPV4 está envolvida no processo de lesão gástrica induzida por etanol, e que a utilização de bloqueadores de TRPV4 pode ser futuramente uma alternativa terapêutica para o tratamento de úlceras gástricas.

Palavras chaves: TRPV4; vermelho de rutênio; GSK2193874; GSK1016790A; dano gástrico.

ABSTRACT

Transient potential receptors (TRP) form a superfamily implicated in a variety of cellular functions. Among them, we can highlight the transient vanilloid potential receptors (TRPV), which are associated with the development of numerous pathologies, including gastric disorders, such as ulcers caused by the use of indomethacin, acetic acid and ethanol. Vanilloid transient potential receptor 4 (TRPV4) is part of the TRPV receptor family, is morphologically and functionally expressed in the gastric epithelium and is also associated with disorders of the gastrointestinal tract. However, there are few studies demonstrating the association of TRPV4 with the development of gastric ulcers. Taking this into consideration, our study aimed to evaluate the possible participation of this receptor in the development of these types of ulcers. For this, we used animal models of gastric lesion induction by ethanol from the use of swiss mice weighing between 25 and 30g, in groups of approximately 5 animals. The negative control group received only saline administration (0.9%) and the positive control received 50% or 30% ethanol administration. In the two experimental groups were administered 50% ethanol-associated TRPV4 antagonists (0.5ml / 25g, vo), where one group received ruthenium red (doses: 0.03, 0.1 or 0.3 mg / kg, ip), a nonspecific antagonist, and the other group GSK2193874 (doses: 0.1, 0.3 and 0.9 mg / kg, ip), a specific antagonist. In addition, one group of animals received administration of GSK1016790A (0.9 mg / kg, i.p), TRPV4 agonist, and soon after 30% ethanol (0.5ml / 25g). One hour after the administration the animals were euthanized, a laparotomy was performed to remove the stomach, which was opened around the greater curvature, stretched and photographed for macroscopic analysis of the gastric mucosa, which was performed by the Image J program. The best dose of TRPV4 antagonists were selected for the other tests. Stomach samples were taken for histopathological evaluation, atomic force microscopy, malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and reduced glutathione (GSH) dosages. Gastric mucus experiment, immunohistochemistry and analysis of TRPV4 mRNA expression were also performed. As a result, we found that TRPV4 blockade promoted macro and microscopic gastroprotection in the ethanol-induced injury model, leading to decreased bleeding parameters, cell loss, edema, and increased gastric integrity relative to the ethanol group. The data also showed a significant increase ($p < 0.05$) in SOD and GSH concentrations and a reduction in MDA concentrations ($p < 0.05$) in the gastric mucosa, demonstrating a decrease in oxidative stress caused by alcohol. The mucus experiment showed a higher amount of gastric mucus in animals pretreated with TRPV4 antagonists. On the other hand, the use of TRPV4 agonist demonstrated, through macroscopic analyzes, an exacerbation of the lesion area ($p < 0.05$) when compared to the group that received 30% ethanol. With this we can conclude that the activation of TRPV4 is involved in the process of gastric injury induced by ethanol, and that the use of TRPV4 blockers may in future be a therapeutic alternative for the treatment of gastric ulcers

Keywords: TRPV4; ruthenium red; GSK2193874; GSK1016790A; gastric damage.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AINE	Antinflamatórios não esteroidais
ANOVA	Análise de variância
CAT	Catalase
CCK ₂	Receptores específicos do tipo colecistoquinina 2
CEEA	Comitê de ética em experimentação animal
COBEA	Colégio brasileiro de experimentação animal
COX	Cicloxigenases
DMSO	Ácido dimetilsulfóxido
DTNB	Ácido ditionitrobenzoico
E.P.M	Erro padrão da média
ECF	Células enterocromafins
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
EET	Ácidos epoxieicosatrienoicos
ELISA	Ensaio de imunoabsorbância ligado a enzima
Enos	Óxido nítrico sintase endotelial
ERNS	Espécies reativas de nitrogênio
EROS	Espécies reativas de oxigênio
GLP-2	Peptídeo 2 semelhante a glucagon
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
GTP	Guanosina trifosfato
i.p	intraperitoneal
Inos	Óxido nítrico sintase induzida
MDA	Malondialdeído
MUC 2	Mucina 2
NADPH	Nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato
NO	Óxido nítrico

NOS	Óxido nítrico sintase
NOS	Oxidase
PGE ₂	Prostaglandina E2
PGI ₂	Prostaciclina
PKA	Proteína quinase A
SOD	Superóxido dismutase
TCA	Ácido tricloroacético
TRP	Receptor de potencial transitório
TRPV1	Receptor de potencial transitório vanilóide 1
TRPV4	Receptor de potencial transitório vanilóide 4
v.o	Via oral
VR	Vermelho de rutênio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Árvore filogenética de canais TRP humanos.....	17
Figura 2- Receptor de potencial transitório vanilóide 4 (TRPV4)	18
Figura 3- Mecanismo antioxidante	27
Figura 4- Fisiopatologia da úlcera gástrica.....	28
Figura 5- Efeitos macroscópicos e microscópicos do etanol na mucosa gástrica.....	29
Figura 6- Representação esquemática do delineamento experimental	33
Figura 7- Passo a passo da metodologia da lesão gástrica induzida por etanol	35
Figura 8- Demonstração do cálculo da lesão por meio de planimetria utilizando o programa Image J.....	36
Figura 9- Análise macroscópica do envolvimento do TRPV4 na lesão gástrica induzida por etanol e curva dose resposta.....	42
Figura 10- Análise macroscópica da ativação do TRPV4 na lesão induzida por etanol.....	42
Figura 11- Análise histopatológica do efeito do GSK2193874 e vermelho de rutênio na lesão gástrica induzida por etanol	45
Figura 12- Análise histológica da mucosa gástrica por Microscopia de Força atômica.	46
Figura 13- Expressão gênica e imunohistoquímica de TRPV4 após lesão gástrica induzida por etanol.....	48
Figura 14- Avaliação do efeito da inativação de TRPV4 sobre os níveis de GSH e SOD na mucosa gástrica lesionada por etanol.	49
Figura 15- Determinação dos níveis de MDA na mucosa gástrica após bloqueio de TRPV4 e lesão gástrica	50
Figura 16 - Efeito da utilização dos antagonistas de TRPV4 sobre a quantidade de muco, após lesão gástrica induzida por etanol	51
Figura 17 - Conclusão gráfica	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 RECEPTOR DE POTÊNCIAL TRANSITÓRIO (TRP)	16
2.2.1 Receptor de Potência Transitória Vanilóide 4 (TRPV4)	18
2.2.1.1 O TRPV4 e o trato gastrointestinal	20
2.2.1.1.1 Associações entre o TRPV4 e distúrbios gástricos	20
2.3 MECANISMOS DE PROTEÇÃO DA MUCOSA GÁSTRICA E A ÚLCERA GÁSTRICA	21
2.3.1 Mecanismos de proteção da mucosa gástrica	21
2.3.1.1 Muco e bicarbonato	21
2.3.1.2 Microcirculação	22
2.3.1.3 Prostaglandinas	23
2.3.1.4 Óxido nítrico	23
2.3.1.5 Defesas antioxidantes	25
2.3.2 Úlcera péptica	27
3 OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GERAL	31
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4 METODOLOGIA	32
4.1 ANIMAIS	32
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	32
4.3 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR TRPV4 NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL	34
4.3.1 Lesão gástrica induzida por etanol e análise macroscópica	34
4.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	36
4.5 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MUCOSA GÁSTRICA APÓS A UTILIZAÇÃO DE ANTAGONISTAS DE TRPV4 E LESÃO INDUZIDA POR ETANOL	36
4.6 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DE TRPV4 NA MUCOSA GÁSTRICA	37
4.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE TRPV4 POR MEIO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	38

4.8 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS PRÉ TRATADOS COM VERMELHO DE RUTÊNIO E GSK2193874 NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL A 50%	38
4.9 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS PRÉ-TRATADOS COM VERMELHO DE RUTÊNIO E GSK2193874 NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL A 50%	39
4.10 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MALONDIALDEÍDO (MDA) NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS PRÉ-TRATADOS COM VERMELHO DE RUTÊNIO E GSK2193874 NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL A 50%.	39
4.11 DETERMINAÇÃO DO MUCO GÁSTRICO.....	40
4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	40
5 RESULTADOS	41
5.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA DO EFEITO DA UTILIZAÇÃO DOS ANTAGONISTAS DE TRPV4 NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL	41
5.2 ANÁLISE MACROSCÓPICA DO EFEITO DA UTILIZAÇÃO DO AGONISTA DE TRPV4, GSK1016790A, NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL	43
5.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO EFEITO DO VERMELHO DE RUTÊNIO E GSK2193874, ANTAGONISTAS DO TRPV4, NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL EM CAMUNDONGOS.....	44
5.4 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MUCOSA GÁSTRICA APÓS A UTILIZAÇÃO DE ANTAGONISTAS DE TRPV4 E LESÃO INDUZIDA POR ETANOL	46
5.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TRPV4 NA MUCOSA GÁSTRICA APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE ETANOL.....	47
5.6 EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE DOIS ANTAGONISTAS DE TRPV4 NA REDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL.....	49
5.7 MUCO GÁSTRICO.....	51
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXOS	83
ANEXO A-Carta de aprovação comitê de ética.....	83

1 INTRODUÇÃO

A família de canais catiônicos de receptores de potencial transitório (TRP) é uma superfamília, com aproximadamente 33 membros, implicada em uma variedade de funções celulares, como funções sensoriais, homeostáticas e de mobilidade (FETTIPLACE; KIM, 2014; KOIZUMI et al., 2018; MORGAN et al., 2018a; LI et al., 2019a; HE et al., 2019a). Incluída na superfamília TRP temos a subfamília de receptores de potencial transitório vanilóide (TRPV), composta por seis membros, divididos em altamente seletivos e relativamente não seletivos a Ca^{2+} .

Dentre eles, temos o receptor de potencial transitório vanilóide 4 (TRPV4), um canal que faz parte da superfamília de receptores TRP e da subfamília TRPV e que foi descoberto recentemente, há aproximadamente 15 anos. Trata-se de um canal de íons ativados por diferentes estímulos, como prótons, calor e compostos químicos e que possui ampla distribuição nos tecidos e um grande número de funções fisiológicas como a regulação da contração, respiração, circulação sanguínea (MORGAN et al., 2018a; AN et al., 2018; JONES et al., 2019; MATSUMOTO et al., 2019).

No entanto, além das funções já descobertas, pode-se destacar também a sua importante participação nos processos de dor e inflamação no trato gastrointestinal (BRIERLEY et al., 2008; HOLZER et al., 2011; FICHA et al., 2012; ZHANG et al., 2015b). Ademais, sabe-se que o TRPV4 é morfológicamente e funcionalmente expresso no epitélio gástrico (MIHARA, et al., 2016). Porém, ainda existem poucos estudos sobre a sua ação neste epitélio. Até o presente momento, evidenciou-se apenas que esse receptor contribui para o esvaziamento gástrico (MIHARA, et al., 2018), bem como para o influxo de ATP (MIHARA, et al., 2017) e que está associado a progressão do câncer gástrico (XIE et al., 2017). Ainda assim, são necessários mais estudos a fim de verificar mais profundamente o seu envolvimento com funções e distúrbios gástricos.

Estudos demonstram que outros receptores, membros da superfamília de canais TRP estão associados ao desenvolvimento de distúrbios gástricos, entre eles o receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1), que é correlacionado com o desenvolvimento de lesões gástricas induzidas por etanol (MEDEIROS et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2019), ácido acético (MAGIEROWSKA et al., 2018) e indometacina (YARUSHKINA, et al., 2018). O TRPV4 apresenta inúmeras similaridades com o

TRPV1, pois compartilham de 40% das suas sequências de aminoácidos, são considerados receptores não seletivos, e estão juntamente associados a regulação de algumas funções biológicas e ao desenvolvimento de algumas patologias (NILIUS et al., 2007; GOUTSOU et al., 2019; GORBUNOV et al., 2019; HUANG et al., 2019).

Levando em consideração os fatos apresentados, como a similaridade com o TRPV1, a expressão de TRPV4 na mucosa gástrica, e o seu envolvimento com processos inflamatórios e hemorrágicos no trato gastrointestinal, bem como o número reduzido de estudos com esse receptor a nível gástrico, objetivou-se nesse trabalho intensificar os estudos sobre o TRPV4 e investigar a sua possível participação nos processos de lesão gástrica, mais especificamente na lesão induzida por etanol, e dessa forma contribuir para o desenvolvimento de uma nova abordagem terapêutica no tratamento das desordens gástricas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO (TRP)

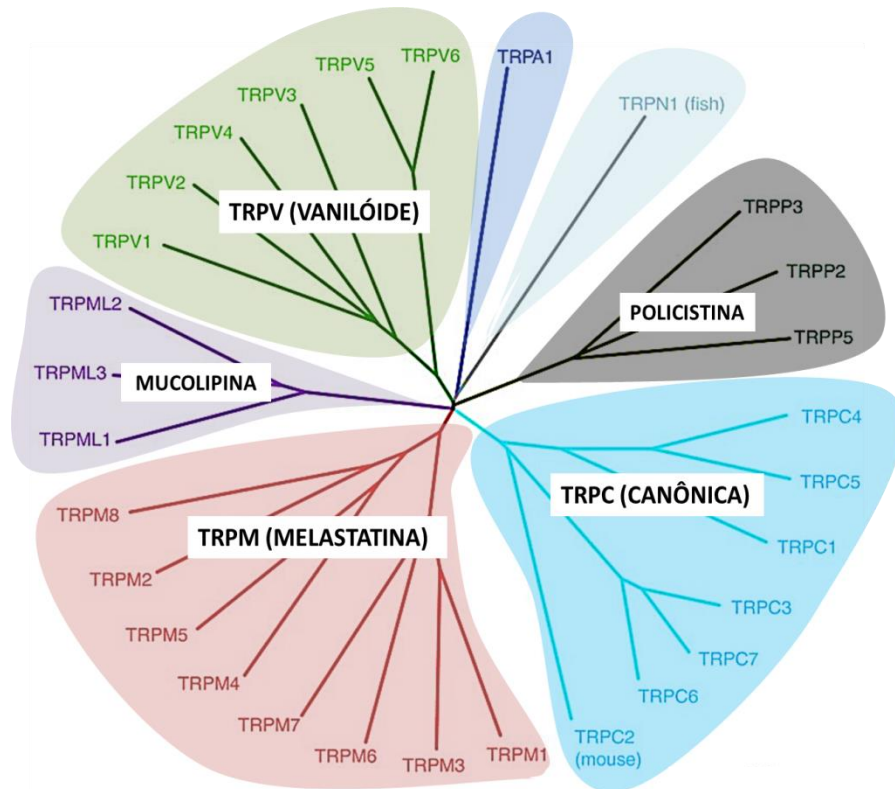
A identificação dos canais TRP em mamíferos ocorreu pela primeira vez em 1969, a partir de estudos com *Drosophilas* mutantes. Observou-se, a partir de um eletroretinograma, que as moscas mutantes apresentavam respostas transitórias a estimulação luminosa, diferentemente das moscas normais (COSENS; MANNING, 1969). Por sua vez, o gene TRP só foi isolado e identificado em 1985 por Montell e Rubin, que após clonagem e sequenciamento descreveram a proteína relacionada ao gene TRP com 1275 aminoácidos e seis segmentos transmembrana (MONTELL; RUBIN, 1989). A partir da observação da semelhança estrutural com outros canais de cátions e análise de permeação da corrente induzida pela luz em *Drosophilas* mutantes, foi proposto que a proteína produto do gene TRP funciona como um canal de cátions permeável a cálcio (MONTELL; RUBIN, 1989; VANGEEL; VOETS, 2019).

Sabe-se que os TRPs têm uma arquitetura molecular semelhante à de canais dependente de voltagem, com cada subunidade contendo seis domínios transmembrana e subunidades dispostas para formar um canal tetramérico (MONTELL; 2005; NILIUS et al., 2007). Hoje já se sabe que os TRPs são ativados por diferentes mecanismos e apresentam variabilidade na seletividade de cátions, podendo ser seletivos para Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} (QIAO et al., 2019; LI et al., 2019b).

A sua ativação pode ocorrer por estímulos sensoriais, químicos, mecânicos (GONZÁLEZ et al., 2018; HAFNER-BRATKOVIČ; PELEGRIN, 2018; STARTEK et al., 2019) e ligantes intra e extracelulares (GONZÁLEZ et al., 2018; REGGIO; MULLER; MORALES, 2018), podendo ser ativados por exemplo em caso de dor (MOORE et al., 2018b), mudança de temperatura (VANDEWAUW et al., 2018) e percepção da luz (DELGADO et al., 2019).

Nos mamíferos, a superfamília TRP compreende sete subfamílias conhecidas como canais iônicos TRPC (canônica), TRPV (vaniloide), TRPM (melastatina), TRPML (mucolipina), TRPP (policistina), TRPA (ANKTM1) e TRPN (NompA), como apresentado na **figura 1**, que se diferenciam de outros canais pela seletividade de íons, modos de ativação e função fisiológica (MONTELL, 2005; PENG; SHI; KADOWAKI, 2019).

Figura 1- Árvore filogenética de canais TRP humanos.



Legenda: Adaptado e modificado de Clapham, 2003 e Nilius; Owsianik, 2011.

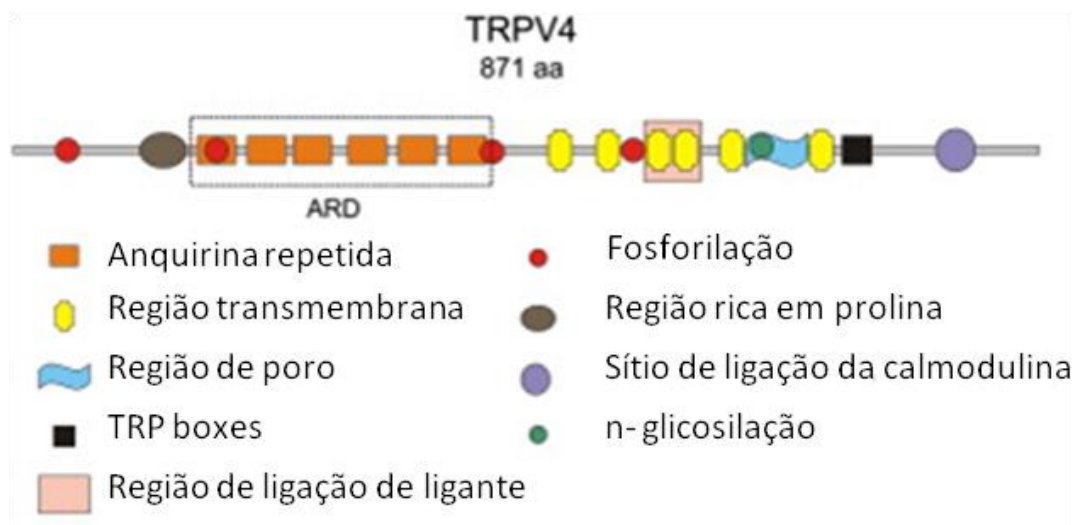
Por se tratar de canais ativados por diferentes estímulos e responsáveis pela regulação de numerosas funções biológicas, os TRP's estão implicados no desenvolvimento de inúmeras patologias. Dentre as famílias englobadas dentro da superfamília de canais TRP, os canais da família TRPV se destacam em relação à associação dessa família de canais com o aparecimento e progressão de doenças (RIZOPOULOS; PAPADAKI-PETROU; ASSIMAKOPOULOU, 2018; ZHANG et al., 2018; SILVA et al., 2018).

A subfamília TRPV compreende seis membros, considerados receptores polimodais, que podem ser ativados por diversas mudanças no microambiente celular e agentes endógenos e exógenos. Já foram implicados na regulação da temperatura, nocicepção e sensibilidade osmótica (MAJHI et al., 2018; GOUTSOU et al., 2019; REPPETTI et al., 2019; FLORENTINO et al., 2019). Alguns dos canais TRPV, como o TRPV5 e TRPV6 são altamente seletivos para Ca^{2+} em relação a outros cátions (PENG et al., 2018; HUGHES et al., 2018), enquanto os canais TRPV1 e TRPV4 são considerados relativamente não seletivos (REPPETTI et al., 2019; HDUD et al., 2019).

2.2.1 Receptor de potencial transitório vanilóide 4 (TRPV4)

O receptor de potencial transitório vanilóide 4, também conhecido como TRPV4, OTRPC4, VRL-2, VR-OAC e TRP12, é um membro da família de canais TRPV (**Figura 2**). (LIEDTKE et al., 2000; STROTMANN et al., 2000; NILIUS et al., 2001).

Figura 2- Receptor de potencial transitório vanilóide 4 (TRPV4)



Legenda. Adaptado de Nilius, Vennekens e Ewsianik, 2008.

Este receptor foi identificado pela primeira vez como um canal ativado pelo inchaço celular induzido por hipotonicidade (LIEDTKE et al., 2000; STROTMANN et al., 2000; NILIUS et al., 2001). Hoje já se sabe que o TRPV4 pode ser ativado por estímulos mecânicos (SCHERAGA et al., 2016), inchaço, osmolaridade, variações de temperatura, compostos químicos, ácido araquidônico lipídico, metabólitos de ácido epoxieicosatrienoico (EET) (WATANABE et al., 2003; VRIENS et al., 2004) e ésteres de forbol (WATANABE et al., 2002). É considerado um canal catiônico, não seletivo e sua ativação induz o influxo de Ca^{2+} para aumentar a concentração de Ca^{2+} livre intracelular. Por sua vez, as altas concentrações de Ca^{2+} podem levar a inativação do receptor, por um processo de feedback negativo ainda desconhecido (WATANABE et al., 2003).

É amplamente expresso nos mais diferentes tipos de tecido, sendo encontrado em abundância no sistema nervoso central (SHI et al., 2013), trato gastrointestinal (língua, esôfago, estômago, íleo e cólon) (MATSUMOTO et al., 2018;

MATSUMOTO et al., 2019), trato respiratório (UEDA et al., 2015), ossos (MOORE et al., 2018), endotélio vascular (ZHANG et al., 2018a; SURESH et al., 2018), células epiteliais e queratinócitos da pele (OHSAKI; TANUMA; TSUKIMOTO, 2018; LEE et al., 2018b), bexiga (DONG et al., 2018; IHARA et al., 2018), rim (MAMENKO et al., 2011; BERROUT et al., 2012), pulmão (MORGAN et al., 2018b; AN et al., 2018) e coração (JONES et al., 2019).

Por mais que seu papel na regulação de situações fisiológicas seja considerado de extrema importância, a sua ativação já foi correlacionada ao desenvolvimento de inúmeras patologias como tosse, doença pulmonar obstrutiva crônica (BAXTER et al., 2014), asma (JIA et al., 2004; MCALEXANDER et al., 2014), fibrose pulmonar idiopática (RAHAMAN et al., 2014), osteogênese imperfeita (MOORE et al., 2018), edema (REITER et al., 2006; ALVAREZ et al., 2008, WILLETTE et al., 2008), sepse (DALSGAARD et al., 2016), hiperalgesia (SIPE et al., 2008), alodinia (DIAS et al., 2019), coceira (AKIYAMA et al., 2016), inflamação (WANG et al., 2019), insuficiência renal (SONI et al., 2019) e doenças intestinais (D'ALDEBERT et al., 2011). Estudos recentes relataram o envolvimento do receptor TRPV4 na resposta inflamatória, onde a ativação do TRPV4 foi relacionada a um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, como à liberação de IL-1 β , IL-6 e IL-8 (PAIRET et al., 2018). Além disso, já foi demonstrado também que a inativação de TRPV4 pode prevenir a resposta neutrofílica a estímulos inflamatórios (YIN et al., 2016).

Levando em consideração a associação entre a ativação desse receptor e o desenvolvimento de diversas doenças, a utilização de antagonistas do TRPV4 vem sendo estudado como uma possível alternativa para o tratamento de diversas patologias. Dentre os antagonistas usualmente utilizados podemos citar o GSK2193874, HC-067047 e vermelho de rutênio.

O primeiro poderoso antagonista de canal iônico descoberto foi o vermelho de rutênio, um corante a base de metal, conhecido como capaz de bloquear os canais TRPV1 e TRPV4. A sua seletividade é considerada um problema, uma vez que é conhecido por interagir com uma série de outras proteínas incluindo outros canais iônicos como TRPV2, TRPV3, TRPV5, TRPV6, TRPA1. Mesmo que não seletivo, a utilização do vermelho de rutênio é uma importante ferramenta farmacológica na descoberta de novas funções biológicas dos canais TRPV4 e pode ser utilizado também juntamente com antagonistas seletivos para comparação de resultados,

podendo sugerir o envolvimento de mais de um canal nos mecanismos estudados (VINCENT; DUCTON, 2011; PAIRET et al., 2018; IHARA et al., 2018).

O GSK2193874 (3- (1,4'-bipiperidin-1'-ilmetil) -7-bromo- N- (1-fenilciclopropil) -2- [3- (trifluorometil) fenil] -4-quinolinacarboxamida) é um bloqueador seletivo de TRPV4, potente e ativo por via oral (v.o). Esse antagonista foi utilizado em diversos estudos que buscaram a relação entre TRPV4 e o desenvolvimento de doenças, sendo considerada uma ferramenta seletiva para elucidar a biologia do TRPV4 tanto *in vitro* quanto *in vivo* (CHEUNG et al., 2017). O seu uso também foi empregado para verificar o papel do TRPV4 na insuficiência cardíaca, edema e lesão pulmonar (THORNELOE et al., 2012; YIN et al., 2016), inflamação (PAIRET et al., 2018) e insolação (ZHU; PEI, 2018).

2.2.1.1 O TRPV4 e o trato gastrointestinal

Como já mencionado o TRPV4 é amplamente expresso no trato gastrointestinal. Assim como em outros órgãos, no TGI também apresenta funções fisiológicas e é correlacionado com desenvolvimento de doenças. Esse receptor está associado à liberação de líquido por meio da glândula exócrina (DEROUICHE et al., 2018), produção de bile (LI et al., 2019), está presente e contribui para o funcionamento das glândulas salivares (HOSOI, 2016), para a hipersensibilidade visceral (CENAC et al., 2019) e nocicepção colônica (MUELLER-TRIBBENSEE ET AL., 2015). Diversos autores vêm demonstrando a sua associação com o desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais (VERGNOLLE, 2014; MATSUMOTO; KATO, 2018; MIHARA et al., 2019), como a progressão da fibrose hepática (ECHTERMEYER et al., 2019; ZHAN; LI, 2018), pancreatite (ZHANG et al., 2015) e úlceras intestinais (YAMAWAKI et al., 2014).

2.2.1.1.1 Associações entre o TRPV4 e distúrbios gástricos

Mesmo que já tenha sido comprovada a sua expressão no epitélio gástrico, poucos são os estudos que abordam a função e papel desse receptor na fisiologia gástrica e distúrbios gástricos. Até o presente momento, sabe-se apenas que o TRPV4 contribui para o esvaziamento gástrico (MIHARA, et al., 2018), é morfológica e funcionalmente expresso nesse epitélio, sendo capaz de

contribuir para o influxo de ATP (MIHARA, et al., 2017) e que está associado a progressão do câncer gástrico (XIE et al., 2017). Ainda assim, são necessários mais estudos a fim de verificar mais profundamente o seu envolvimento com funções e distúrbios nesse órgão, principalmente com o surgimento de úlceras gástricas, uma vez que esse receptor já foi associado ao aparecimento de ulcerações em outros órgãos do trato gastrointestinal (YAMAWAKI et al., 2014) e por apresentar similaridades com outros receptores envolvidos nesses tipos de úlceras (OLIVEIRA et al., 2019; HUANG et al., 2019).

2.3 MECANISMOS DE PROTEÇÃO DA MUCOSA GÁSTRICA E A ÚLCERA GÁSTRICA

As úlceras gástricas ocorrem devido a um desequilíbrio entre os fatores agressores e protetores da mucosa gástrica. Sendo assim, para entender a sua fisiopatologia é necessário conhecer e compreender quais são os mecanismos de proteção que atuam na mucosa gástrica.

2.3.1 Mecanismos de proteção da mucosa gástrica

2.3.1.1 Muco e bicarbonato

O muco intestinal é produzido por células epiteliais de superfície (células caliciformes) e forma uma rede de glicoproteínas altamente organizada, consistindo principalmente de mucina 2 (MUC2) (RODRÍGUEZ-PIÑEIRO, 2013; KENNETH et al., 2013; NAMULEMA et al., 2018; SCHROEDER et al., 2019). No estômago é composto por duas camadas, adesivas e viscosas, com qualidades lubrificantes (ATUMA et al., 2001; TYTGAT, 2011). A sua liberação é regulada por meio da estimulação de hormônios gastrointestinais, como a gastrina e secretina, prostaglandinas E_2 (PGE_2), neurotransmissores, óxido nítrico, agentes colinérgicos, autácóides e também pode ser regulada pelos níveis intracelulares de Ca^{+2} (SPECIAN; NEUTRA, 1980; AIHARA, et al., 2007; WALLACE, 2008; TYTGAT, 2011).

O muco protege as células epiteliais subjacentes dos danos mecânicos causados pela passagem de alimentos, fezes e forças vigorosas dos processos digestivos. Além disso, juntamente com o bicarbonato e fosfolipídios surfactantes formam uma barreira protetora contra o ácido e a pepsina, sendo importantes também para a manutenção do pH gástrico (ALLEN; FLEMSTROM, 2005; PHILLIPSON et al., 2002; GARCIA; YANG, QUINTON, 2009; GUSTAFSSON et al., 2012). Além da proteção citada, a camada de muco e bicarbonato possui propriedades antioxidantes, reduzindo os danos que seriam causados por radicais livres e em casos de estresse, como a formação de úlceras, a produção de muco aderente é aumentada pelas células caliciformes, promovendo a cicatrização de feridas (CHAUDHURY et al., 1980; REPETTO; LLESUY, 2002; AMANG et al., 2017).

2.3.1.2 Microcirculação

A regulação da saída do ácido, produção de muco e secreção de bicarbonato conta com a participação da microcirculação. Diante disso, o fluxo sanguíneo desempenha um papel importante na proteção da mucosa gástrica normal e na proteção e cura da mucosa lesada (STARLINGER; SCHIESSEL, 1988; SORBYE; SVANES, 1994; ROCHA et al., 2019; MAGIEROWSKI et al., 2017).

Diversos autores vêm demonstrando que diferentes moléculas e compostos, que possuem propriedades gastroprotetoras e curativas, possuem em seu mecanismo de ação a regulação/ alteração do fluxo sanguíneo. Como o Araloside A, um constituinte antiúlcera da casca da raiz de *Aralia elata*, que demonstrou sua ação protetiva por meio da regulação do fluxo sanguíneo em úlceras ocasionadas pela utilização de etanol e anti-inflamatório (HE et al., 2019b), o nitrato inorgânico na proteção gástrica contra antibióticos (ROCHA et al., 2019), o naproxeno modificado doador de sulfeto de hidrogênio na lesão induzida por estresse (MAGIEROWSKI et al., 2017), bem como o peptídeo-2 (GLP-2), semelhante ao glucagon, na lesão induzida por etanol (ISBIL-BUYUKCOKSUN et al., 2018).

Para que isto ocorra, o fluxo sanguíneo supre a mucosa com oxigênio e HCO_3^- , e remove H^+ e agentes tóxicos que se difundem do lúmen para a mucosa. O controle do fluxo sanguíneo se dá por meio de mediadores secretados pelos nervos sensoriais aferentes, presentes na mucosa e submucosa gástrica e por fatores

lesivos, como ácido e toxinas. O baixo fluxo sanguíneo na mucosa predispõe a lesão, enquanto o alto fluxo sanguíneo protege contra agentes lesivos (SORBYE; SVANES, 1994; GUTTU et al., 1994; WALLACE, GRANGER, 1996; MIMAKI et al., 2002).

2.3.1.3 Prostaglandinas

Além dos agentes protetores já citados, as prostaglandinas também são importantes fatores protetores da mucosa gástrica. Estão presentes em diversos tecidos humanos, são derivadas do ácido araquidônico (AA) e quimicamente fazem parte do grupo de eicosanoides. A síntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico ocorre por meio da ação das Cicloxigenases (COX). No estômago existem duas isoformas de cicloxigenases, a COX-1 e a COX-2, sendo a primeira expressa constitutivamente, e a segunda que por não ser expressa constitutivamente recebe a denominação de indutível, pois é indutora da síntese de prostaglandinas em casos de processos inflamatórios (FENG et al., 1993; KARGMAN et al., 1996; WALLACE; GRANGER, 1996; SMITH, et al., 1996; YOO et al., 2018; TAKEUCHI; AMAGASE, 2018).

As prostaglandinas, principalmente as denominadas PGs da série-2, incluindo a PGE₂ e as prostaciclinas (PGI₂) protegem a mucosa gástrica através da ativação dos seus receptores EP, aumentando assim, a secreção de muco e bicarbonato, o fluxo sanguíneo e levando a uma diminuição da secreção ácida. Dessa forma, estes compostos protegem a mucosa contra agentes necrosantes como álcool, HCl, NaOH, NaCl hipertônico e lesão térmica (ROBERT et al., 1979; CHAUDHURY et al., 1980; MILLER, 1983; SÁNCHEZ-MENDOZA et al., 2019; GÓMEZ et al., 2019).

2.3.1.4 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um mediador gasoso, produzido fisiologicamente pela conversão de L- arginina, por meio da ação das enzimas óxido nítrico sintase (NOS) (MONCADE; HIGGS, 1993; KITAY et al., 2017; AMADOR-MARTÍNEZ et al., 2019). No estômago existem dois tipos de NOS, a endotelial (eNOS), expressa constitutivamente e a induzida (iNOS), expressa em caso de injúrias e processos inflamatórios (BERG et al., 2004; ARAB; HASSANPOUR; BOZORGI, 2008;

ANGRISANO et al. 2012; KITAY et al., 2017; ZOLOTAREV et al., 2017). Depois da oxidação de L-arginina em óxido nítrico, esse mediador se liga a guanilato ciclase, por meio do grupamento heme, e catalisa a conversão de guanosina trifosfato (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), aumentando os níveis intracelulares desse componente. Além disso, o óxido nítrico também pode atuar de um modo independente de GMPc (ABDEL et al., 2007; HONG et al., 2009; GHORBANZADEH et al., 2018).

A diminuição do conteúdo de NO leva a múltiplas consequências e está envolvida na patogênese de muitas doenças, como o desenvolvimento de úlceras gástricas (KONTUREK et al., 1993; DJAKOVIC et al., 2016; HEGAB; ABD-ELLATIF; SADEK, 2018; BECEJAC et al., 2018; FU et al., 2018). Diante disso, o NO é considerado um dos principais fatores envolvidos na manutenção da integridade da mucosa gástrica devido à sua capacidade de regular o fluxo sanguíneo e a secreção ácida gástrica (WHITTLE et al., 1990; KONTUREK et al., 1993; RAIMURA et al., 2013; LUCETTI et al., 2017).

Já foi demonstrado que a administração de doadores do óxido nítrico é capaz de acelerar o processo de cicatrização de úlceras gástricas causadas pelo uso de anti-inflamatórios não esteroides (AINES), indometacina, estresse, HCL e álcool. Entre os doadores de NO podemos citar o nitroprussiato de sódio, nitroglicerina e L-arginina (TAKEUCHI et al., 1993; LUCETTI et al., 2017; CZEKAJ et al., 2018; DRMIC et al., 2017). Estudos já evidenciaram, por exemplo, que a utilização de nitroglicerina e L-arginina é capaz de levar a redução de úlceras causadas pelo etanol (MACNAUGHTON; CIRINO; WALLACE, 1989), a L-arginina também foi associada a uma eficiente proteção gástrica em lesões ocasionadas por antiinflamatórios (DRMIC et al., 2019), enquanto o nitroprussiato de sódio foi efetivo na diminuição de úlceras gástricas induzida por ácido acético, levando a uma redução da área de úlcera, dos níveis de peroxidação lipídica, infiltração de células inflamatórias e aumento os níveis de SOD (HAN et al., 2017).

Diante do exposto, destaca-se que o óxido nítrico endógeno ou liberado por doadores, protege a mucosa gástrica contra as lesões ocasionadas por múltiplos fatores, reduzindo a peroxidação lipídica, reestabelecendo o equilíbrio antioxidante, diminuindo os parâmetros inflamatórios e regulando a secreção do ácido gástrico.

2.3.1.5 Defesas antioxidantes

O organismo possui um complexo sistema de proteção antioxidante como mecanismo de defesa contra os radicais livres. Um radical livre é definido como qualquer espécie química que contém um ou mais elétrons desemparelhados, sendo consideradas espécies reativas, uma vez que a concentração elevada desses radicais pode levar a um quadro de estresse oxidativo e dano celular. Os radicais livres são divididos em dois grupos principais: espécies reativas de oxigênio (EROS) e espécies reativas de nitrogênio (ERNS) (SUN et al., 2018; GUZMÁN-GÓMEZ et al., 2019).

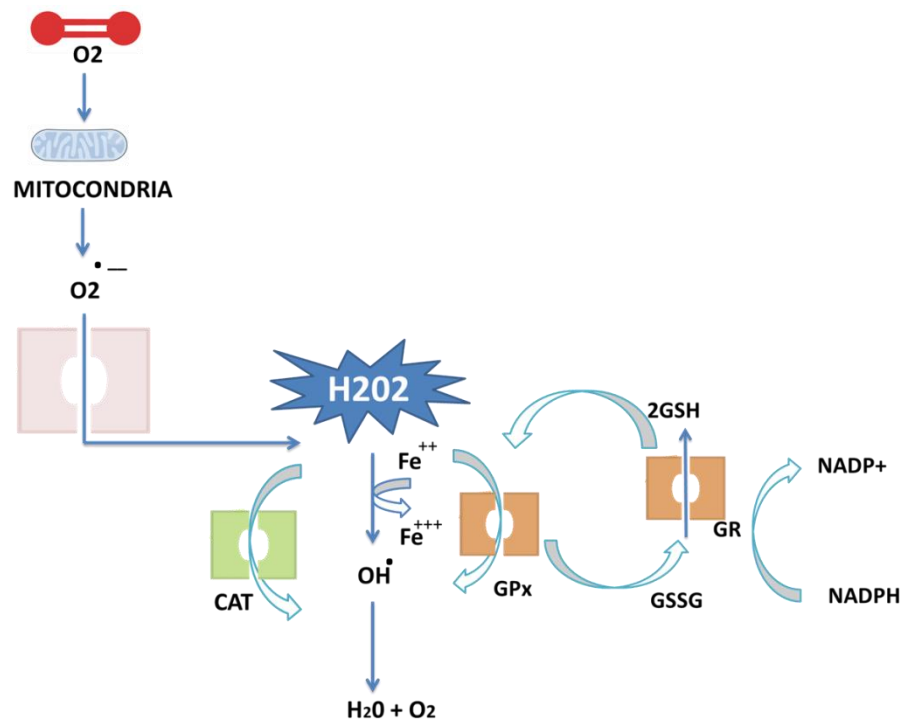
Os principais tipos prejudiciais de EROS incluem o ânion superóxido (O_2^-), radicais hidroxila ($OH^\cdot$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HALLIWEL, 2012; SMAGA et al., 2015; BALMUS et al., 2016). A via respiratória mitocondrial e a enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (Nox) são os dois principais produtores de EROS endógenos. Estressores também podem induzir as células a produzir EROS por meio de microssomas, peroxissomas e ativação ou dano da via do metabolismo energético mitocondrial (HU et al., 2019; VENDROV et al., 2019; LIANG et al., 2019; SCOTT et al., 2019). A elevação anormal das espécies reativas de oxigênio leva a um quadro de estresse oxidativo, marcado por depleção do sistema de defesa antioxidante (enzimático e não enzimático), favorecendo danos às estruturas celulares, como carboidratos, ácidos nucleicos, proteínas e lipídios, promovendo a peroxidação lipídica (OLIVEIRA et al., 2019; IBRAHIM et al., 2019).

As enzimas superóxido dismutase (SOD) são metaloenzimas presentes em células aeróbicas, e representam a primeira linha de defesa contra espécies reativas, sendo considerada uma das mais importantes enzimas antioxidantes (MCCCORD; FRIDOVICH, 1969; GUZMÁN-GÓMEZ et al., 2019). Essa enzima captura radicais superóxido gerados como subproduto do metabolismo aeróbico, catalisando a conversão de radicais O_2^- em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este último é gerado como resultado da atividade da SOD é decomposto pela proteína ubíqua catalase (CAT) e glutational peroxidase (GPx) em água e oxigênio molecular (IGHODARO; AKINLOYE, 2018; CARNEVALE et al., 2018; SHEKHAR; JAIN; PRIYA, 2019; KHAN et al., 2019).

A catalase é uma enzima chave no metabolismo do H_2O_2 e espécies reativas de nitrogênio. Os mecanismos moleculares que regulam a expressão da catalase, a mais antiga enzima antioxidante conhecida e descoberta, não são completamente elucidados. Está localizada principalmente nos peroxissomos, sendo expressa em todos os órgãos. Os níveis mais altos de atividade são medidos no fígado, nos rins e nos glóbulos vermelhos. Além de sua atividade catalítica dominante (decomposição de H_2O_2), a catalase também pode atuar na decomposição de pequenos substratos como metanol e no caso do etanol, também é capaz de oxidá-lo em acetaldeído, contribuindo para o seu metabolismo hepático (WINTERNIT; MELOY, 1908; KEILIN; HARTREE, 1945; THURMAN; LEY; SCHOLZ, 1972; CHANCE; OSHINO, 1973; GLORIEUX; CALDERON, 2017).

A glutathione possui um papel fundamental na defesa celular contra o estresse oxidativo. Sua ação protetora é demonstrada em vários órgãos como no fígado (CARVALHO et al., 2019), sistema nervoso (ESMAEILZADEH et al., 2019), pulmão (IBRAHIM et al., 2019) e estômago (OLIVEIRA et al., 2019). Trata-se de um tripeptídeo (g-L-glutamil-L-cisteinil-glicina) presente no organismo na forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) que atua em diversos processos biológicos como síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular. Em situações de estresse, como na lesão gástrica, as espécies reativas de oxigênio são reduzidas pela GSH com a formação de oxigênio e água. Ao realizar essa redução a GSH é oxidada, sendo convertida em GSSG. Por outro lado, em situações fisiológicas ocorre a regeneração de GSH, a partir de GSSG, na presença de NADPH (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido), formando um ciclo, como disposto na **figura 3** (MEISTER, ANDERSON, 1983; BALLATORI; DUTCZAK, 1994; WEI et al., 2017; OLMOS et al., 2017; DALMIZRAK et al., 2019).

Além disso, em casos de estresse oxidativo severo o GSSG pode ser exportado das células levando a uma depleção dos níveis de GSH (LEIER, et al., 1996, CNUBBEN, 2001). Já foi evidenciado o papel da glutathione na proteção gástrica em lesões induzidas por etanol (ROBERT; MENARY, 1984; SOUZA, 2016; OLIVEIRA et al., 2019), antiinflamatórios não esteróides (TURKYILMAZ et al., 2019) e alendronato (CARVALHO et al., 2015), onde observa-se um decréscimo da glutathione em caso de estresse, demonstrando a importância do estudo dessa enzima nos modelos de lesão gástrica.

Figura 3- Mecanismo antioxidante

Legenda: Autoria própria, 2019. Abreviaturas: CAT: catalase; GPx: glutathione peroxidase; GSSG: glutathione oxidada; GR: glutathione reductase; GSH: glutathione reduzida; $NADP^+$: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

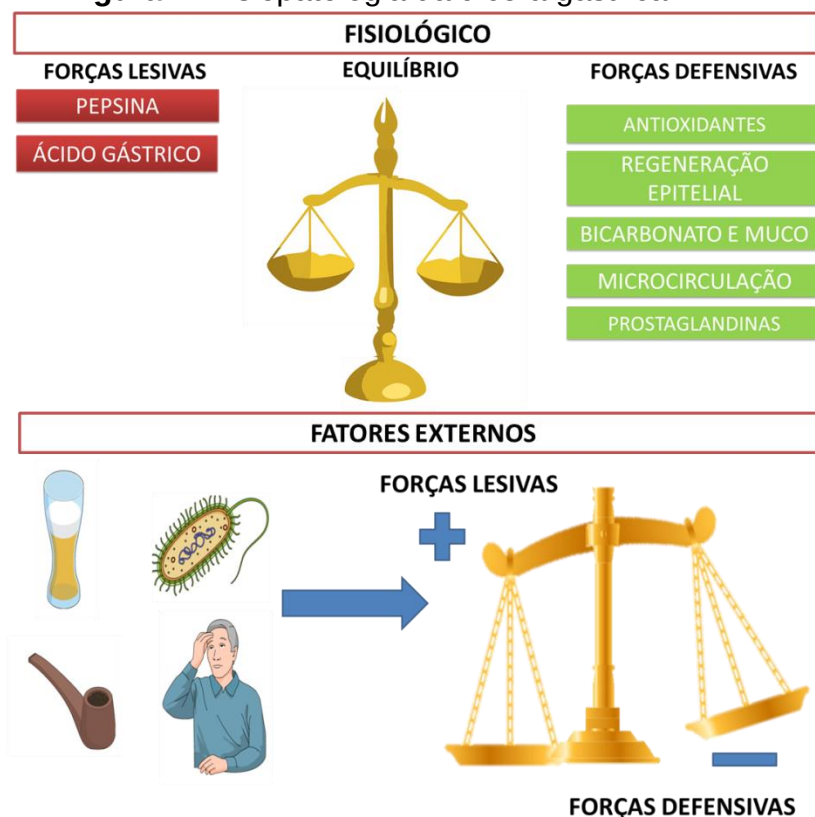
2.3.2 Úlcera péptica

As úlceras pépticas embora possam ocorrer em qualquer lugar do trato digestório são mais frequentes no estômago e duodeno. Essas lesões variam em profundidade, podendo ocorrer como um mero desprendimento do epitélio até lesões mais profundas, chegando até ulcerações (MILANI; CALABRÓ, 2001; BARKUN; LEONTIADIS, 2010; HUNT et al., 2015; FANG et al., 2019).

As úlceras pépticas quando ocorrem no estômago são nomeadas de úlceras gástricas e são consideradas como um grave problema de saúde pública. Esses tipos de úlceras se desenvolvem devido à ação prejudicial do ácido e da pepsina. Em condições fisiológicas, a exposição a esses agentes agressores é contrabalanceada pelos fatores protetores da mucosa gástrica como o muco, bicarbonato (OLIVEIRA et al., 2019), prostaglandinas (FANG et al., 2019), óxido nítrico (MAGIEROWSKI et al., 2018), fluxo sanguíneo (TARNAWSKI; AHLUWALIA; JONES, 2014), regeneração da mucosa (MATSUOKA et al., 2005) e agentes antioxidantes (PINTO et al., 2019).

No entanto, infecções por *H. pylori* (BORGES et al., 2019), bem como o uso exacerbado de AINES (FANG et al., 2019) e de álcool (OLIVEIRA et al., 2019), tabagismo e idade avançada (TABIRI; AKANBONG; ABUBAKARI, 2016) podem levar a um desequilíbrio entre os fatores protetores da mucosa e as ações prejudiciais do ácido e da pepsina sobre a mucosa gástrica, levando ao aparecimento das lesões ulcerativas, como disposto na **figura 4** (SILVA et al., 2019, LEE et al., 2019a).

Figura 4- Fisiopatologia da úlcera gástrica



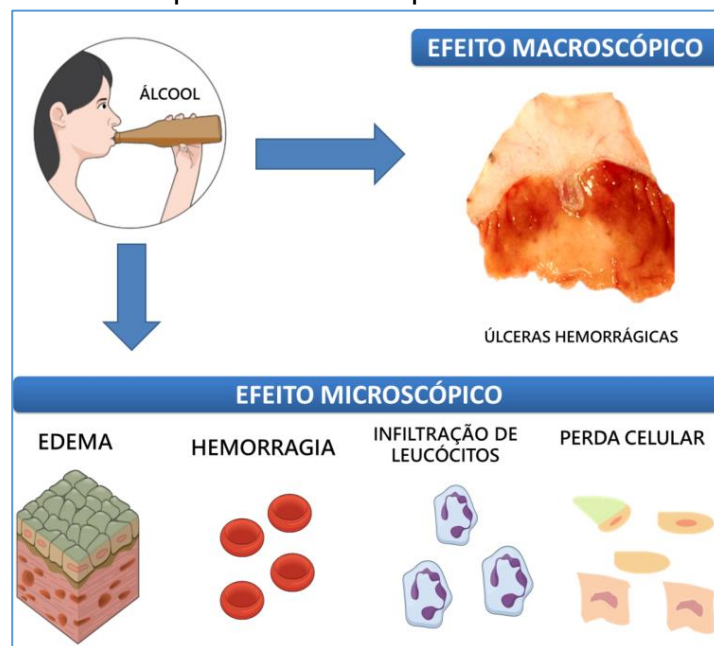
Legenda: Autoria própria, 2019.

As úlceras gástricas desenvolvidas devido ao uso indiscriminado de álcool são consideradas como a causa mais comum de ulceração gástrica em homens (JAHOVIC, et al., 2007; MATSUHASHI, et al., 2007; SARDA; GARD, 2018; YEGEN, 2018; AL-MARSOUMI; JABOO et al., 2018). O etanol afeta a integridade da mucosa gástrica, aumentando a permeabilidade da mucosa e, em certos casos, causando sangramento, levando a lesões hemorrágicas de coloração avermelhada. Além disso, o uso de etanol eleva as concentrações de espécies reativas de oxigênio e, portanto, o estresse oxidativo é considerado um fator com papel crítico no dano a

mucosa gástrica (PAN et al., 2008; GUZMÁN-GÓMEZ et al., 2018; FAHMI et al., 2019).

Estudos demonstraram que a utilização de doses elevadas ou repetidas de etanol leva a uma diminuição das enzimas antioxidantes SOD, GSH e catalase, além da diminuição dos níveis de PGE_2 e óxido nítrico, fatores protetores da mucosa gástrica (SALAMA et al, 2016; LIM et al., 2018; FAHMI et al., 2019; OLIVEIRA., 2019; GÓMEZ et al., 2019). A lesão gástrica induzida por etanol também é capaz de levar a uma diminuição do fluxo sanguíneo (OHYA; GUTH, 1988), alteração da permeabilidade vascular e resposta inflamatória grave, com o aumento de citocinas pró-inflamatórias ($\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-1 β), da infiltração neutrofílica e diminuição de citocinas anti-inflamatórias (IL-10) (SALAMA et al, 2016; FAHMI et al., 2019).

Figura 5- Efeitos macroscópicos e microscópicos do etanol na mucosa gástrica



Legenda: Autoria própria, 2019.

O uso desse agente agressor leva a lesões macroscópicas hiperêmicas e edema da mucosa acompanhado de necrose por hemorragia linear e por pontos. Além disso, o seu uso pode levar ao aparecimento de lesões microscópicas, marcadas por hemorragia extensa, edema, necrose e infiltração de leucócitos, como disposto na **figura 5** (WANG et al., 2015; CZEKAJ et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2019). Diante dessa problemática vários estudos estão buscando novos mecanismos envolvidos no processo de lesão gástrica, a fim do desenvolvimento de

novos medicamentos, entre eles, podemos citar os estudos com receptores TRP (MEDEIROS et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2019).

Levando em consideração a descoberta recente de TRPV4, os inúmeros estudos demonstrando a sua relação com o desenvolvimento de doenças e a ausência de estudos que correlacionem o TRPV4 com o desenvolvimento de úlceras gástricas, esse estudo tem como objetivo avaliar o possível envolvimento desse receptor com as lesões gástricas induzidas por etanol.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o possível envolvimento do TRPV4 no desenvolvimento de lesões gástrica induzidas por etanol em camundongos swiss.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar os efeitos macroscópicos da ativação e bloqueio do receptor TRPV4 na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos;
- ✓ Estudar as alterações histopatológicas, como perda de células, hemorragia, infiltração de células inflamatórias e edema na mucosa gástrica após a lesão promovida pelo etanol e as possíveis alterações no envolvimento do TRPV4;
- ✓ Avaliar a integridade da mucosa gástrica, por meio da Microscopia de força atômica (MFA), após a utilização do GSK2193874, antagonista de TRPV4, e lesão induzida por;
- ✓ Analisar a expressão de TRPV4 na mucosa gástrica após a administração do etanol, por meio da técnica de PCR e imunohistoquímica
- ✓ Avaliar a participação do TRPV4 no estresse oxidativo, no modelo de lesão gástrica induzida por etanol, a partir na análise de malondialdeído (MDA), um marcador de peroxidação lipídica;
- ✓ Avaliar o envolvimento do TRPV4 na alteração da concentração das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutathione reduzida (GSH) no dano gástrico induzido por etanol.
- ✓ Verificar a participação do TRPV4 na produção de muco gástrico após lesão induzida por etanol.

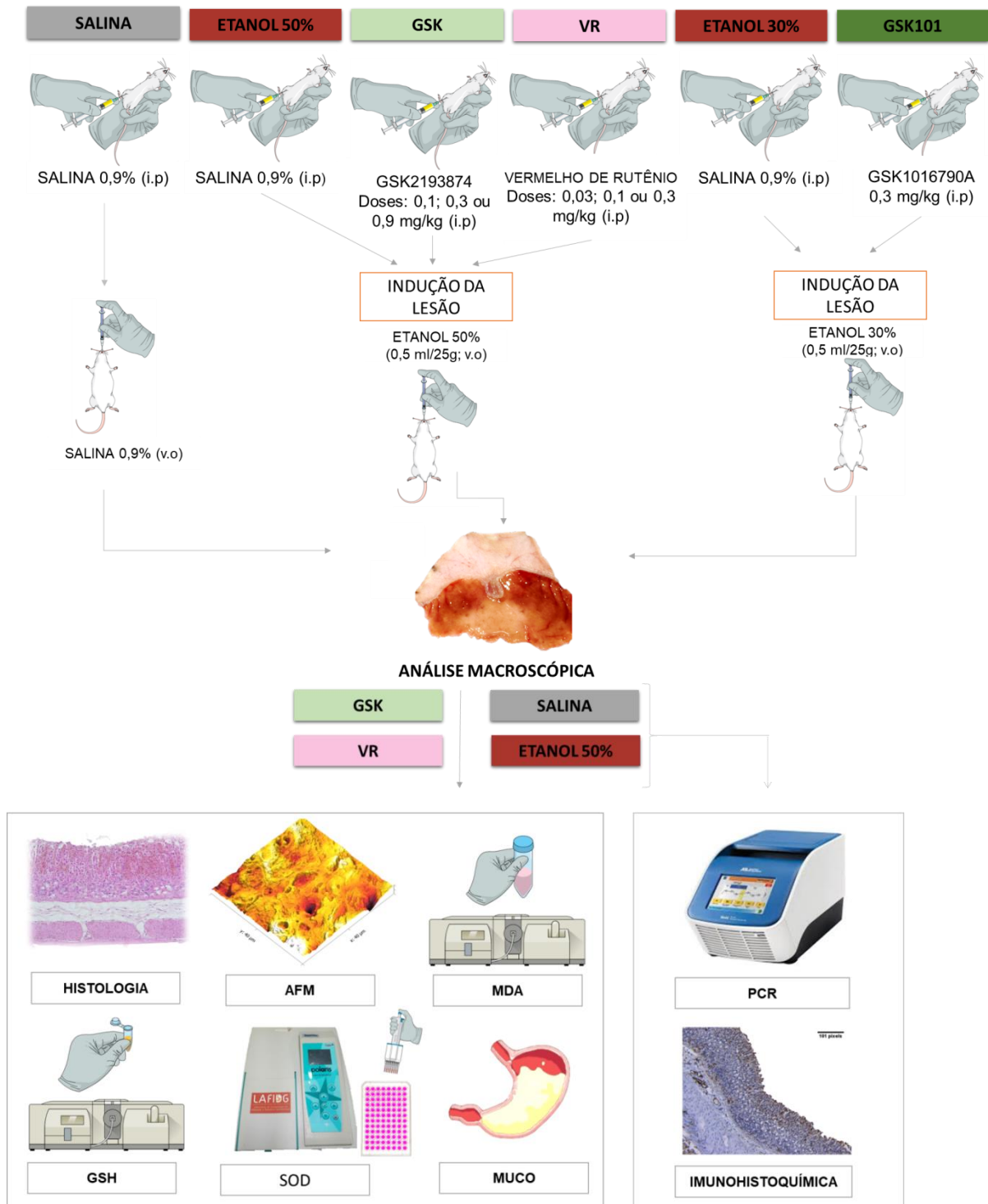
4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss, machos e fêmeas, pesando entre 25-30g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Os animais foram acondicionados em caixas com xilana, em ambiente com temperatura média de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e luminosidade controlada em ciclos de claro/escuro de 12 horas, com acesso a água e ração padrão *ad libitum*. Os grupos experimentais apresentaram um número entre 5 e 8 animais. Todos os princípios e normas internacionalmente aceitas para a utilização de animais em projetos de pesquisa e também as normas do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) foram seguidas. Todos os procedimentos cirúrgicos estiveram de acordo com a Lei Federal 11.794 de outubro de 2008, ditada pela Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório. Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal (CEEA) da Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Reis Velloso, número de protocolo CEEA nº 003/19.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Figura 6- Representação esquemática do delineamento experimental



Legenda: Autoria própria, 2019. Abreviaturas: GSK: GSK2193874; VR: vermelho de rutênio; GSK101: GSK1016790A; MDA: malondialdeído; GSH: glutatona reduzida; SOD: superóxido dismutase; AFM: Microscopia de força atômica; PCR: Reação em cadeia da polimerase

A imagem acima (**Figura 6**) apresenta de forma esquemática o delineamento experimental utilizado para a realização do presente trabalho.

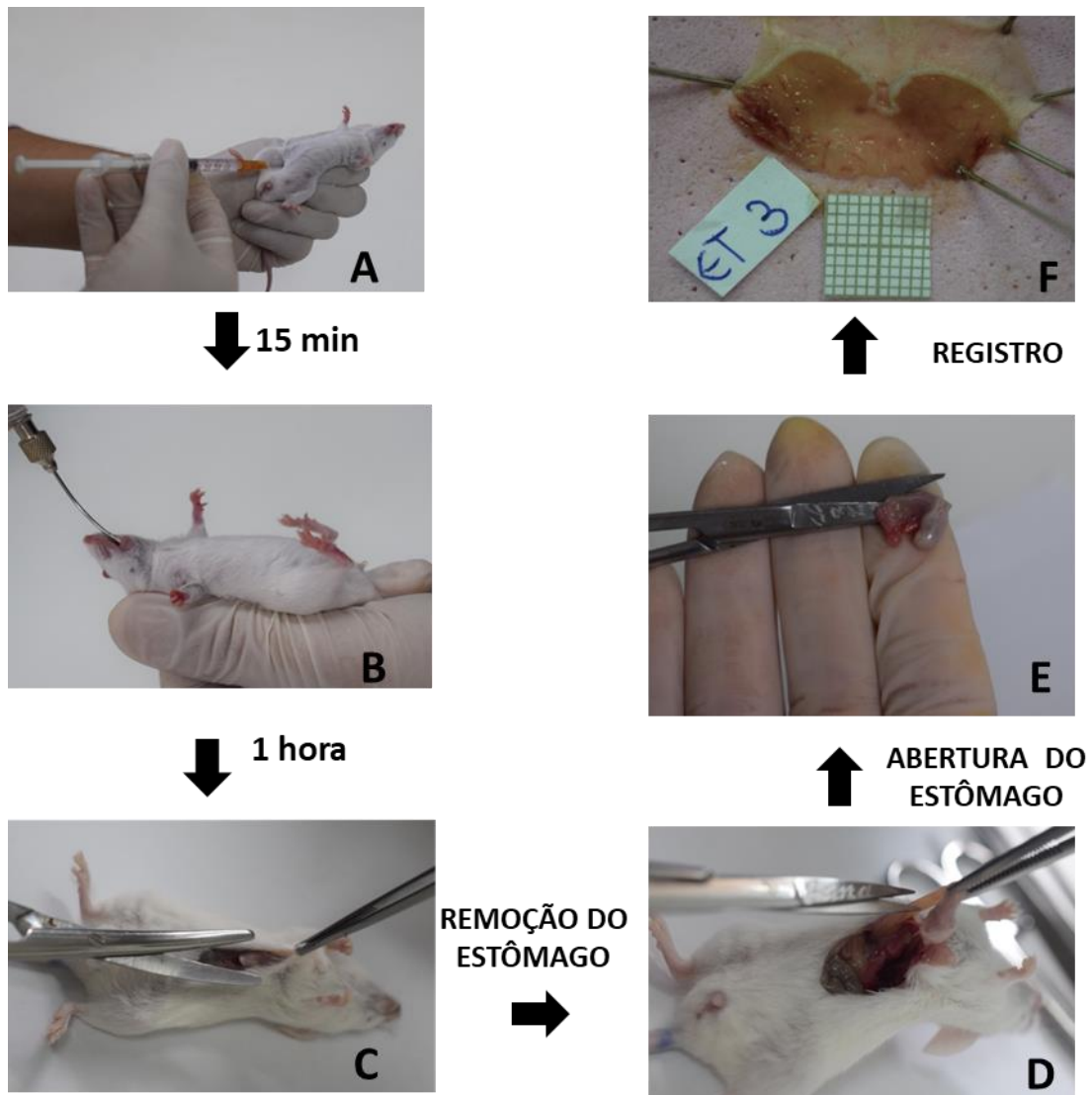
4.3 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR TRPV4 NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL

Para avaliar o envolvimento do receptor TRPV4 na lesão gástrica induzida por etanol a 50%, foram utilizados os antagonistas GSK2193874 (GSK; Sigma-Aldrich/ St. Louis, MO, EUA) nas doses 0,1, 0,3 e 0,9 mg/kg e Vermelho de rutênio (VR; Sigma-Aldrich/ St. Louis, MO, EUA) nas doses 0,03, 0,1 ou 0,3 mg/kg, em grupos separados. Além disso, para uma melhor avaliação foi utilizado GSK1016790A (GSK101; Sigma-Aldrich/ St. Louis, MO, EUA), agonista de TRPV4, na dose de 0,3 mg/kg na lesão gástrica induzida por etanol a 30%. As doses foram escolhidas de acordo com os trabalhos prévios de Thorneloe e colaboradores (2008) e Buday e colaboradores (2017).

4.3.1 Lesão gástrica induzida por etanol e análise macroscópica

Os animais foram previamente divididos nos grupos: Salina; Etanol 50%, GSK2193874, Vermelho de rutênio, Etanol a 30% e GSK1016790A. Os animais do grupo Salina, Etanol a 50% e Etanol a 30% receberam por via intraperitoneal (i.p) salina, enquanto os demais animais GSK2193874 nas doses de 0,1, 0,3 e 0,9 mg/kg (i.p) ou Vermelho de rutênio nas doses de 0,03, 0,1 ou 0,3 mg/kg (i.p) ou GSK1016790A na dose de 0,3mg/kg (i.p) (**Figura 7A**). Após 15 minutos, realizou-se a indução da lesão gástrica por meio da administração, por gavagem, de etanol 50% (Sigma-Aldrich/ St. Louis, MO, EUA), em um volume de 0,5mL/25g, v.o, nos animais dos grupos Etanol 50%, GSK2193874 e Vermelho de rutênio e a administração de etanol 30% (em um volume de 0,5mL/25g, v.o), nos animais do grupo Etanol a 30% e GSK1016790A. Os animais do grupo Salina receberam apenas salina, na proporção de 0,5ml/25g (v.o) (**Figura 7B**). Uma hora após a indução da lesão os animais foram eutanasiados. Realizou-se uma laparotomia (**Figura 7C**) a fim de remover o estômago do animal (**Figura 7D**), em seguida o estômago foi aberto ao longo da curvatura maior (**Figura 7E**), o conteúdo gástrico foi removido e o estômago lavado delicadamente com salina. Os estômagos foram estirados a fim de expor a lesão e fotografados (**Figura 7F**).

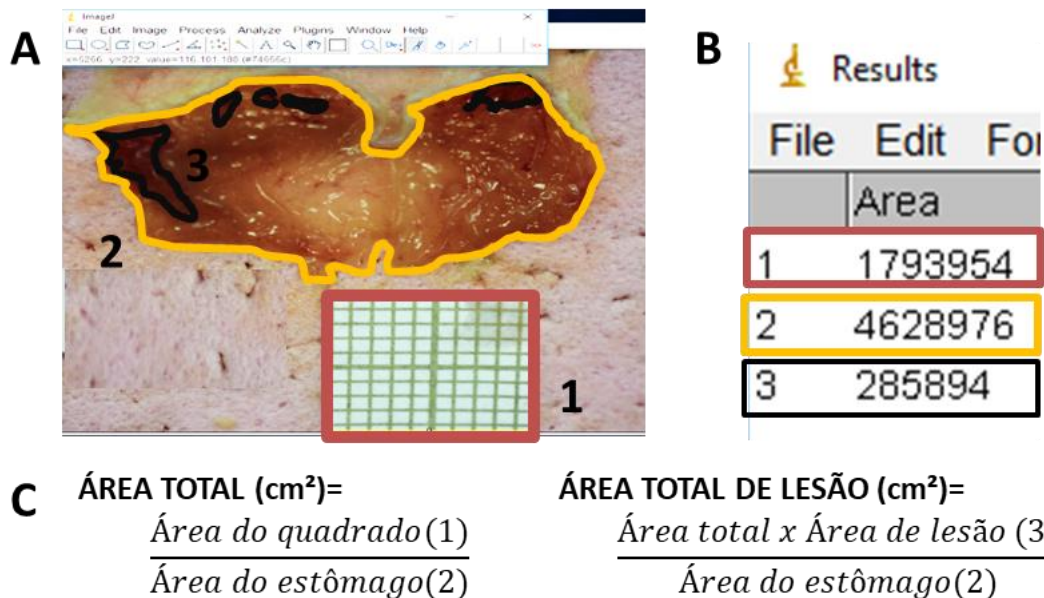
Figura 7- Passo a passo da metodologia da lesão gástrica induzida por etanol



Legenda: Passo a passo da metodologia de lesão gástrica induzida por etanol, demonstrando o (A) pré-tratamento por via intraperitoneal (administração de salina, GSK2193874, GSK1016790A ou vermelho de rutênio); (B) indução da lesão, por meio da administração de etanol a 50% ou 30% por gavagem; (C) laparotomia; (D) remoção do estômago; (E) abertura do estômago por meio da curvatura maior e (F) estiramento do estômago para análise macroscópica.

As imagens foram utilizadas para calcular a área de lesão a partir da planimetria, por meio da utilização do programa ImageJ, de acordo com as fórmulas presentes na **figura 8**. Além disso, pequenas amostras de tecido do corpo do estômago foram retiradas e fixadas em formol a 10% por 24 horas, e após esse tempo foram transferidas para etanol a 70%. O restante de tecido oriundo do corpo do estômago foi congelado a -80°C e utilizado para posteriores análises. Após análise a melhor dose de GSK2193874 e Vermelho de rutênio foram selecionadas para a realização das demais metodologias utilizadas no trabalho.

Figura 8- Demonstração do cálculo da lesão por meio de planimetria utilizando o programa Image J.



Legenda: (A) Imagem da planimetria realizada no programa Image J demarcando a área do quadrado (1), a área total do estômago (2) e as áreas de lesão (3). (B) Valores das áreas demarcadas e (C) fórmulas utilizadas para calcular a área total da lesão. Autoria própria, 2019.

4.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Para avaliação histopatológica, amostras de estômago foram fixadas em solução de formalina a 10% (v/v), onde permaneceram por 18 horas, quando foram transferidas para uma solução de álcool a 70%. Em seguida, o material foi embebido em parafina. Com a utilização de um micrótomo, as amostras foram cortadas em secções de 4mm de espessura, desparafinizadas e posteriormente coradas com hematoxilina-eosina para estudo ao microscópio óptico de forma cega. A severidade da lesão gástrica foi classificada usando os seguintes critérios descritos por Laine e Weinsten (1988): perda de células epiteliais (0 a 3), edema na superfície de mucosa (0 a 4), danos hemorrágicos (0 a 4) e infiltração de células inflamatórias (0 a 3), resultando em um score máximo de 14.

4.5 AVALIAÇÃO DA MUCOSA GÁSTRICA POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA)

A análise por MFA da mucosa gástrica de camundongos foi realizada a partir de secções de 5 µm de tecido gástrico fixadas em parafina. Em seguida as amostras foram desparafinizadas com xilol e álcool etílico em concentrações decrescentes e fixadas nas lâminas sem passar pelo processo de coloração. Em seguida, as amostras foram analisadas em equipamento TT-AFM (AFM, Workshop, EUA no modo de contato intermitente (vibrating) com sonda (cantilever) de silício (TEDPELLA) e frequência de ressonância de aproximadamente 237 kHz. Imagens de 40 × 40 µm e resolução de 512 × 512 pixels foram obtidas e processadas com auxílio do Software Gwyddion 2.4 (ABDON et al., 2014; NOLETO et al., 2019).

4.6 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DE TRPV4 NA MUCOSA GÁSTRICA

Amostras do tecido gástrico foram retiradas e fixadas em formol a 10%, e realizados os procedimentos para processamento e cortes histológicos descritos anteriormente. Os cortes foram desparafinizados, reidratados e submetidos a recuperação antigênica, e colocados solução de bloqueios de ligação inespecíficos (leite desnatado a 1% em PBS; e solução de bloqueio de peroxidase endógena: H₂O₂ 3% diluída em metanol). As amostras foram então lavadas em PBS e incubadas com anticorpos anti-TRPV4 (Abcam) diluídos a 1: 500 durante a noite a 2-8 ° C. As lâminas de tecido foram lavadas, e foi realizada a incubação com anticorpo secundário anti-coelho biotinilado (1: 250) (Sigma-Aldrich) por 1 h em temperatura ambiente, seguida de exposição à solução complexa estreptavidina-biotina-peroxidase (Vector laboratories, EUA) por 1 h em temperatura ambiente e substrato de peroxidase para análise com o cromógeno 3,3' Diaminobenzidina tetrahydrocloreto (DAB), que forneceu à lâmina a cor marrom típica da reação. As lâminas foram contrastadas com a hematoxilina de Harris. As seções de controle negativo foram processadas ao mesmo tempo como descrito, mas sem anticorpo TRPV4 (SONG et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2019).

4.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE TRPV4 POR MEIO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

O RNA total foi extraído de 50 mg de tecido gástrico com o reagente TRIzol® (Invitrogen, EUA), seguindo as instruções do fabricante e o cDNA sintetizado a partir de 100 ng de RNA total usando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems, EUA), seguindo as instruções do fabricante, e armazenado a -30 °C até o uso. A expressão dos genes alvo foi investigada por PCR quantitativo em tempo real (Applied Biosystems, EUA), usando alíquotas de cDNA nas quais o TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, EUA), primer e mix de sondas de TRPV4 (Mm00499025_m1) ou GAPDH (Rn01775763_g1), bem como o ensaio de expressão do gene Taqman (Applied Biosystems, EUA), foram utilizados como indicado pelo fabricante. Todas as amostras foram processadas em triplicata, e a expressão relativa de mRNA determinada após normalizar todos os valores aos de GAPDH. Os resultados foram analisados usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ com GAPDH como gene de manutenção e o controle não tratado como calibrador (grupo SAL) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4.8 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS PRÉ TRATADOS COM VERMELHO DE RUTÊNIO E GSK2193874 NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL A 50%

A concentração de GSH em amostras de tecidos do estômago foi analisada de acordo com o método descrito por Sedlak e Lindsay (1968). Para determinação dos níveis de grupos sulfidrílicos não-protéicos, amostras da mucosa gástrica dos animais foram homogeneizadas na concentração de 1ml de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,02M para cada 100mg de tecido. Alíquotas de 400µL do homogenato foram misturadas em 320µL de água destilada e 80µL de ácido tricloroacético (TCA) 50% para que ocorresse a precipitação de proteínas. Os tubos com o material foram centrifugados por 15 minutos a 3.000 rpm/4°C. Em seguida, 400µL do sobrenadante foi adicionado a 800µL de tampão Tris 0,4M (pH 8.9) e 20µL de ácido ditio-nitrobenzoico DTNB (reagente de Ellman) 0,01M. Agitou-se a mistura por 3 minutos e a absorbância foi lida a 412nm em espectrofotômetro (Modelo

UV1000A/ INSTRUTHERM). Os resultados foram expressos em μg de GSH/ g de tecido

4.9 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS PRÉ-TRATADOS COM VERMELHO DE RUTÊNIO E GSK2193874 NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL A 50%

A atividade de SOD foi medida de acordo com o proposto por Sun, Oberley e Li (1988). Utilizando-se de amostras do tecido do estômago foi preparado um homogenato a 10%, que posteriormente foi centrifugado a 3000 rpm, por um período de 15 minutos a uma temperatura de 4°C. Em seguida, 100 μL do sobrenadante foi retirado e transferido para um outro tubo, e adicionado 1110 μL de tampão fosfato, descontando o que já foi adicionado desse tampão no homogenato, 75 μL de L-metionina (20mM), 40 μL de Triton X-100 (1% v/v), 75 μL de cloreto de hidroxilamina (10 mM) e 100 μL de EDTA (50 μM). Após a adição de todos os reagentes, os tubos foram colocados em banho-maria a 37°C por cinco minutos. Após o tempo necessário, sob pouca luz, foi adicionado 80 μL de riboflavina (50 μM) e todos os tubos colocados em uma caixa apropriada com luz branca, sendo expostos a luz por um tempo de 10 minutos. Em seguida, ainda sob pouca luz, 100 μL da solução preparada foi adicionada a poços da placa para Ensaio de imunoabsorbância ligado a enzima (ELISA), seguido da adição de 100 μL de reagente de Griess. Após 10 minutos, em temperatura ambiente, realizou-se a leitura em leitor de Elisa a 550nm. Para a dosagem de proteínas totais foi utilizado um kit fornecido pela empresa LABTEST. A partir do valor da dosagem de proteínas totais calculou-se o valor de Unidade de SOD (ug) / ug de proteínas totais.

4.10 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MALONDIALDEÍDO (MDA) NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS PRÉ-TRATADOS COM VERMELHO DE RUTÊNIO E GSK2193874 NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL A 50%.

Para dosagem de malondialdeído, utilizou-se a metodologia proposta por Myhara e Uchyama (1978). Utilizando-se de pequenos fragmentos da mucosa gástrica, preparou-se um homogenato a 10% (100mg de tecido por mL de tampão) a partir da utilização de uma solução tampão de KCL gelado 1,15%. Foi adicionado 1,5 mL de H_3PO_4 a 1% em um tubo de ensaio, 250 μL do homogenato e por último

500 µL de solução de ácido Tiobarbitúrico 0,6%. Todos os tubos foram agitados e em seguida aquecidos em banho-maria a 100°C por 45 minutos. Após o tempo necessário realizou-se um choque térmico com a utilização de água gelada e cubos de gelo. Após o resfriamento dos tubos, adicionou-se 2mL de n-butanol e todos os tubos foram tampados. Os conteúdos foram misturados por 1 minuto a partir da utilização de um vortex. Em seguida, realizou-se a centrifugação do material por 15 minutos a 4000 rpm. A fase butanólica foi retirada e utilizada para mensuração da absorbância a 520 e 530 nm. Os resultados obtidos foram expressos em nmol por grama de tecido, a partir da utilização de uma curva padrão.

4.11 DETERMINAÇÃO DO MUCO GÁSTRICO

Os camundongos foram previamente divididos nos grupos: Salina; Etanol 50%, GSK (0,9mg/kg), e VR (0,3mg/kg), o pré-tratamento seguiu os experimentos anteriores. Após uma hora da administração do etanol os animais foram eutanasiados e amostras de tecido gástrico coletadas e transferidas para solução de alcian blue 1% (0,16 M de sacarose em 0,05 M acetato de sódio, pH 5,8). O excesso do corante no tecido foi removido com lavagem em uma solução de 0,25 M de sacarose. O complexo muco - corante foi extraído colocando o tecido em 0,5 M de $MgCl_2$ durante 2 horas. O extrato do corante foi misturado com éter dietílico, centrifugado a 1.400g durante 10 min e a absorbância medida a 598 nm. A quantidade de alcian blue extraída (µg/g de tecido) foi calculada utilizando uma curva padrão (CORNE et al., 1974).

4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a realização das análises estatísticas foram utilizados o teste de análise e variância (ANOVA), seguido do teste de Student-Newman-Keuls, em caso de diferença estatística entre os grupos. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M), sendo as diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$. Para a avaliação histológica, foram utilizados testes não paramétricos Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn, diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas a partir do programa GraphPad Prism, software versão 7.

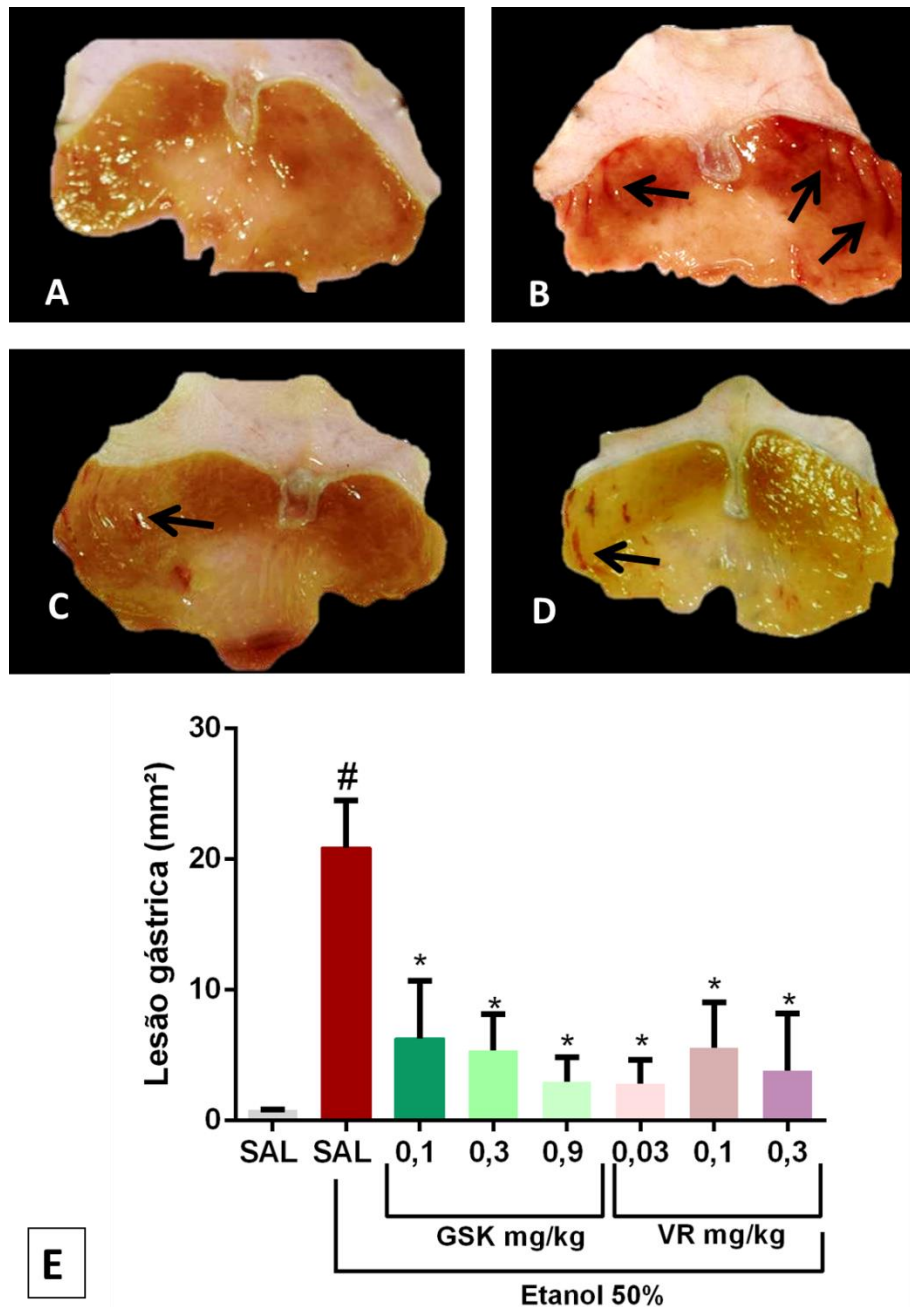
5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA DO EFEITO DA UTILIZAÇÃO DOS ANTAGONISTAS DE TRPV4 NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL

Na **figura 9**, podemos observar os efeitos macroscópicos da utilização de antagonistas do TRPV4 na lesão gástrica induzida por etanol. Nas **figuras 9 (B, C e D)** é possível observar que o etanol levou a lesões hemorrágicas ($20,99 \pm 3,28 \text{ mm}^2$), de cor avermelhada que não estavam presentes no grupo salina (**Figura 9A**). No entanto, a mucosa dos animais tratados com GSK2193874 (**Figura 9C**) e Vermelho de rutênio (**Figura 9D**), antagonistas do TRPV4, apresentaram uma área de lesão significativamente inferior ao grupo sem tratamento que teve apenas a lesão induzida etanol (**Figura 9B**), sugerindo o possível envolvimento da ativação desse receptor nesse modelo de lesão.

Na **figura 9 (E)** é possível identificar que a utilização de GSK2193874, nas doses 0,1, 0,3 e 0,9 mg/kg, foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0.05$) as lesões macroscópicas causadas pelo etanol em 47,4%, 74,05% e 89,65%, respectivamente. Da mesma forma, o vermelho de rutênio, nas doses de 0,03, 0,1 e 0,3 mg/kg, também foi capaz de reduzir as lesões macroscópicas causadas pelo etanol 50% em 90,09%, 72,73% e 64,99%, respectivamente. De acordo com os dados apresentados, concluiu-se que as melhores doses para GSK e RR foram as de 0,9mg/kg ($2,97 \pm 1,7 \text{ mm}^2$) e 0,03mg/kg ($2,83 \pm 1,62 \text{ mm}^2$) respectivamente, sendo essas as doses utilizadas para as demais análises.

Figura 9- Análise macroscópica do envolvimento do TRPV4 na lesão gástrica induzida por etanol e curva dose resposta.

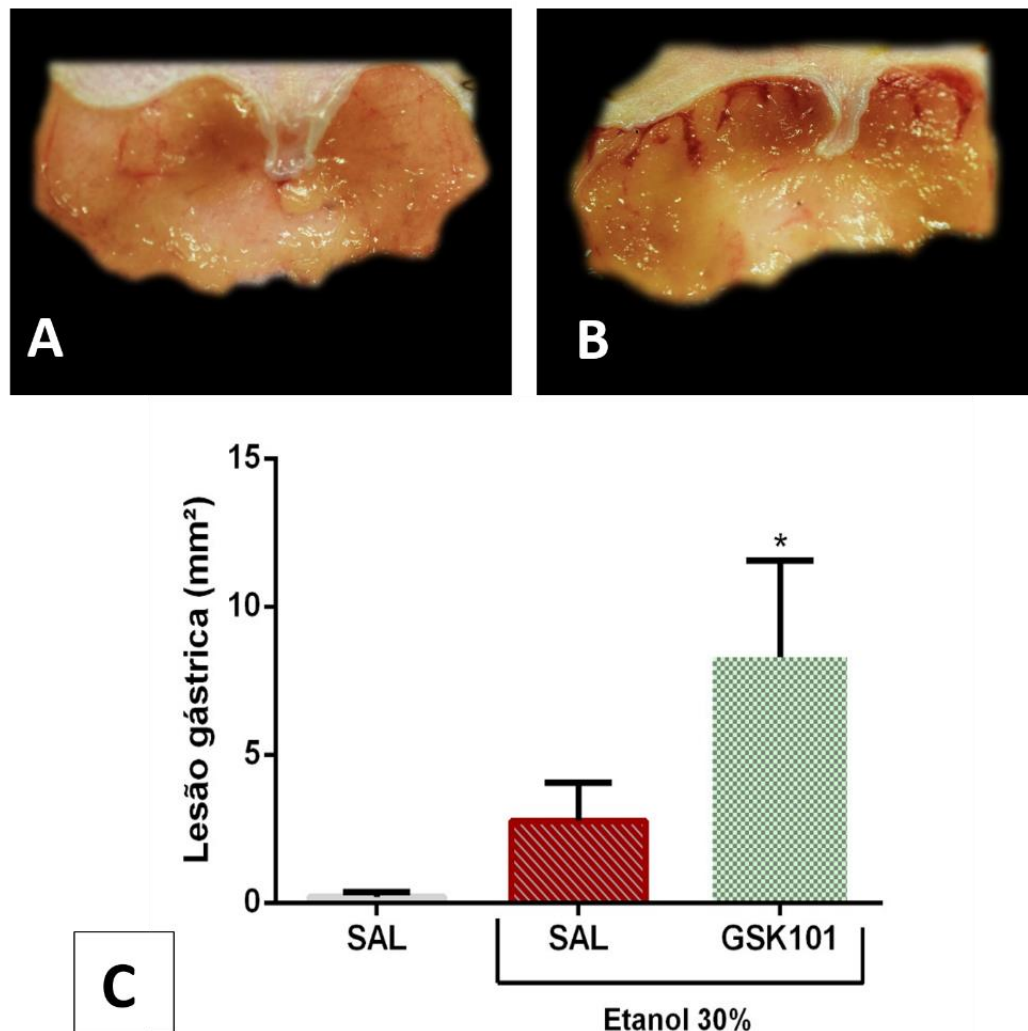


Legenda. (A) Grupo salina, controle negativo. (B) Grupo lesionado (etanol a 50%) (C) Grupo pré tratado com GSK2193874 na dose de 0,9mg/kg seguido de etanol a 50% (D) Grupo teste pré tratado com vermelho de rutênio 0,03mg/kg e etanol a 50%. (E) Curva dose resposta da utilização do pré tratamento com GSK2193874 nas doses de 0,1, 0,3 e 0,9 mg/kg e Vermelho de rutênio nas doses de 0,03, 0,1 e 0,3 mg/kg, seguidos de etanol a 50%. Os resultados estão expressos pela média $\pm$ erro padrão da média de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $P < 0.05$ quando comparado ao grupo tratado com etanol; (#) $P < 0.05$ quando comparado ao grupo tratado com salina, o resultados foram analisados por one-way ANOVA seguido por Newman-Keuls. Abreviaturas: SAL: salina; GSK: GSK2193874; VR: Vermelho de rutênio,

5.2 ANÁLISE MACROSCÓPICA DO EFEITO DA UTILIZAÇÃO DO AGONISTA DE TRPV4, GSK1016790A, NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL

Também foi realizada a análise macroscópica da utilização de GSK1016790A na lesão gástrica induzida por etanol. A partir disso, observamos que a utilização desse agonista do TRPV4 levou a uma exacerbação significativa ($p < 0,05$) da área de lesão ($8.29 \pm 2.83 \text{ mm}^2$) (**Figura 10B e C**) quando comparado ao grupo etanol a 30% ($2.77 \pm 1.12 \text{ mm}^2$) (**Figura 10A e C**).

Figura 10- Análise macroscópica da ativação do TRPV4 na lesão induzida por etanol

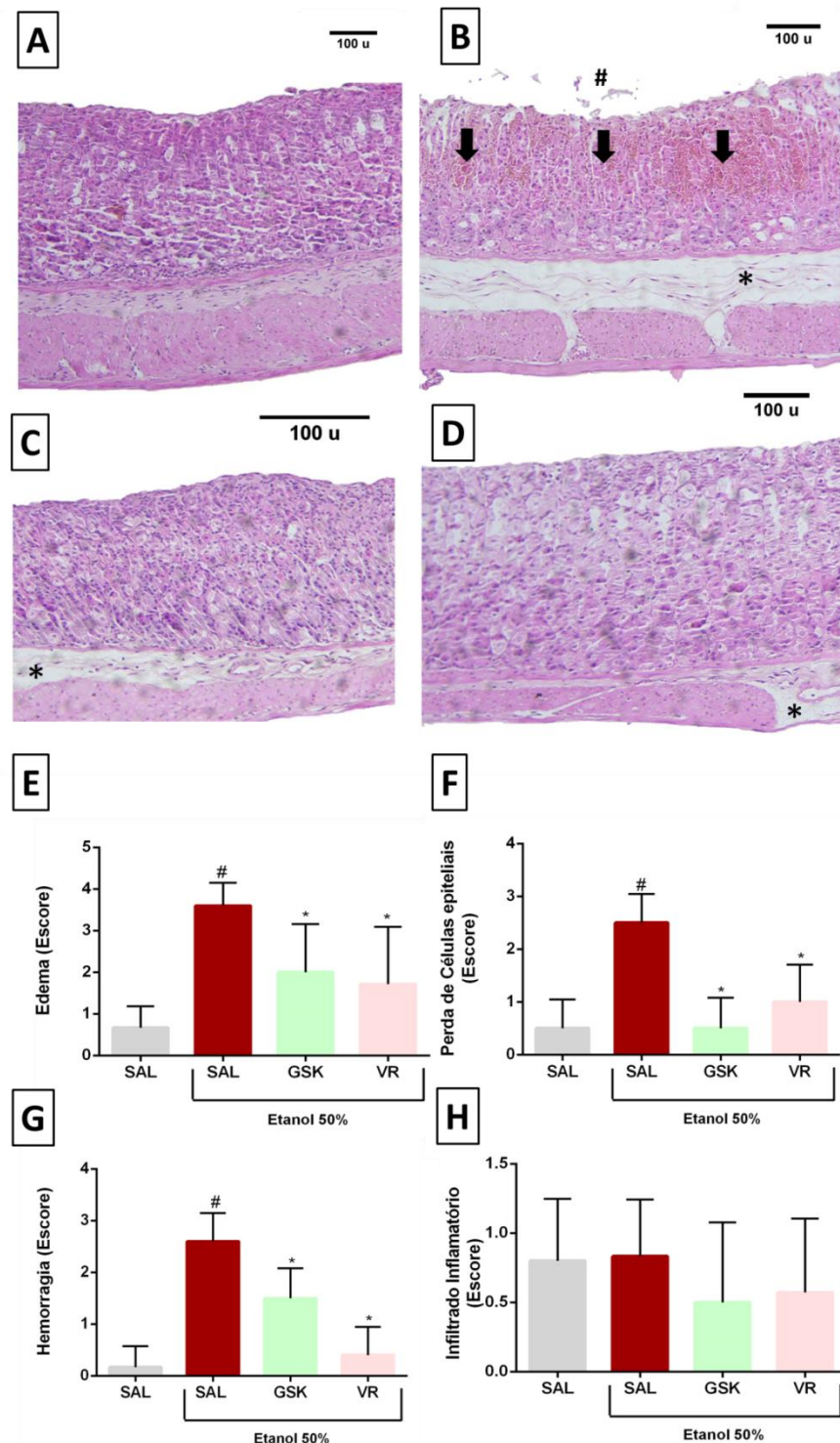


Legenda. (A) Grupo lesionado a partir da utilização de etanol a 30%. (B) Grupo pré tratado com GSK1016790A (0,9 mg/kg) e posteriormente com etanol a 30%. Os resultados estão expressos pela média $\pm$ erro padrão da média de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $P < 0.05$ quando comparado ao grupo tratado com etanol, os resultados foram analisados por one-way ANOVA seguido por Newman-Keuls. Abreviaturas: SAL: salina; GSK101: GSK1016790A.

5.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLOGICA DO EFEITO DO VERMELHO DE RUTÊNIO E GSK2193874, ANTAGONISTAS DO TRPV4, NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL EM CAMUNDONGOS

Para análise microscópica os parâmetros hemorragia, perda de células epiteliais, edema e infiltrado de células inflamatórias foram analisados e estão dispostos na **figura 11**, marcados respectivamente pelos símbolos: seta, cerquilha e asterisco. Na **figura 11(B)** observa-se que a administração do etanol 50% (0,5ml/25g) provocou graves lesões microscópicas. Sendo constatados, perda de células epiteliais, danos hemorrágicos e edema. Além disso, observou-se que o grupo pré-tratado com GSK 0,9 mg/kg (**Figura 11C**) e VR 0,03 mg/kg (**Figura 11D**) apresentaram reduções significativas ($p < 0,05$) nas lesões microscópicas causadas pelo etanol, em relação aos parâmetros: edema (**Figura 11E**), danos hemorrágicos (**Figura 11G**) e perda de células epiteliais (**Figura 11F**). No entanto, não foram encontradas diferenças significativas em relação ao parâmetro infiltrado inflamatório quando comparado o grupo etanol com o grupo salina e demais grupos (**Figura 11H**).

Figura 11- Análise histopatológica do efeito do GSK2193874 e vermelho de rutênio na lesão gástrica induzida por etanol

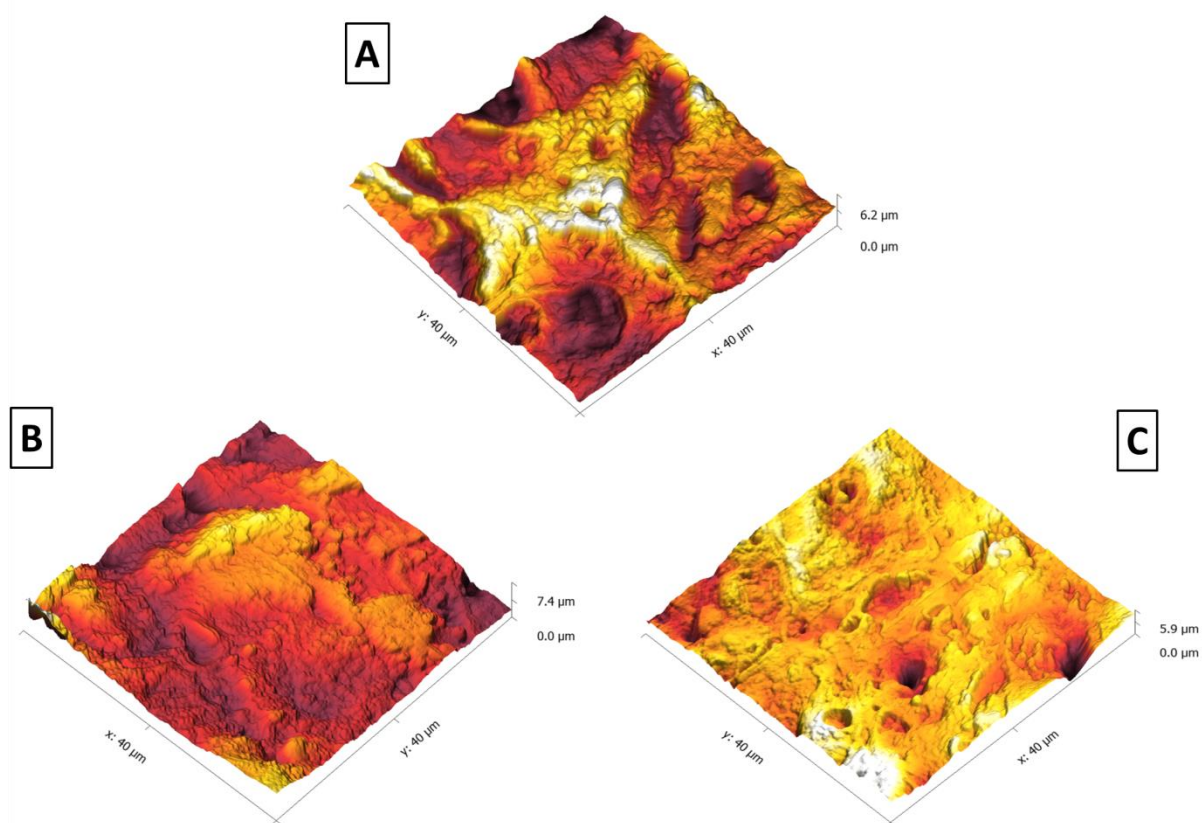


Legenda: (A-D) Fotomicrografia da mucosa gástrica de camundongos (40x), (A) Grupo salina. (B) Grupo etanol 50% (0,5 ml/25g), perda de células epiteliais (#), hemorragia (seta) e edema (*). (C-D) Grupo GSK2193874 0,9 mg/kg e Vermelho de rutênio 0,03 mg/kg, respectivamente. Os painéis E, F, G e H demonstram os escores referentes aos parâmetros: edema, perda de células epiteliais, dano hemorrágico e infiltrado inflamatório, respectivamente. (*) $P < 0.05$ quando comparado ao grupo tratado com etanol; (#) $P < 0.05$ quando comparado ao grupo tratado com salina, foram utilizados testes não paramétricos Kruskal- Wallis, seguido do teste de Dunn.

5.5 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MUCOSA GÁSTRICA APÓS A UTILIZAÇÃO DE ANTAGONISTAS DE TRPV4 E LESÃO INDUZIDA POR ETANOL

A análise por MFA demonstrou que o grupo controle salina apresentou a mucosa gástrica íntegra e com menor profundidade nas depressões ($6,2\text{ }\mu\text{m}$) comparado ao grupo etanol a 50%. No grupo etanol evidenciou-se o desaparecimento das estruturas típicas do tecido e perda da integridade da mucosa, com ruptura das camadas submucosas e fibras de colágeno, bem como o aumento da profundidade das depressões ($7,4\text{ }\mu\text{m}$) presentes no tecido. A utilização do GSK diminuiu a ação do etanol sobre a mucosa, uma vez que as amostras desse grupo apresentaram depressões com menor profundidade ($5,9\text{ }\mu\text{m}$) e integridade do epitélio.

Figura 12- Análise histológica da mucosa gástrica por Microscopia de Força atômica



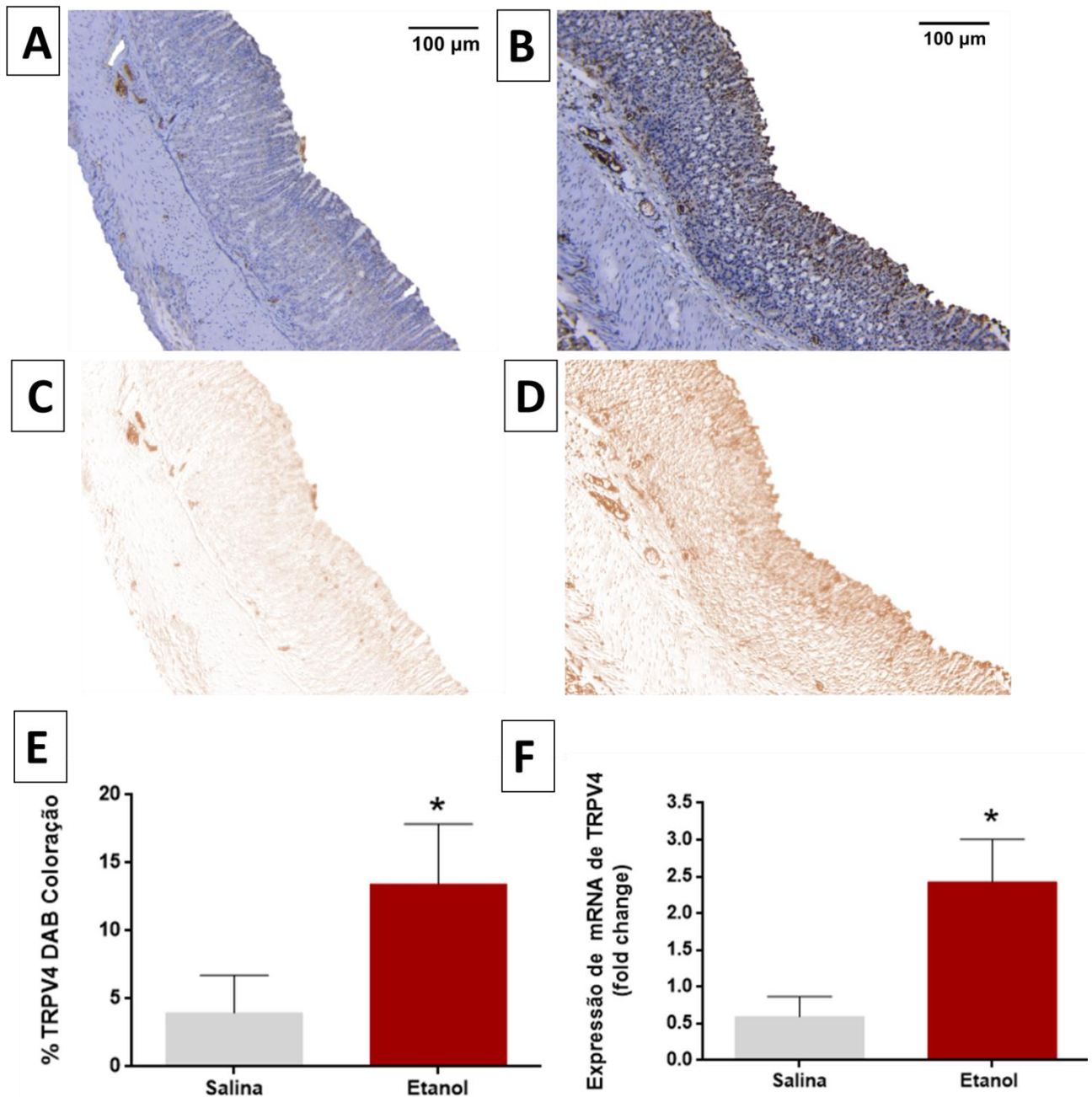
Legenda: (A) Grupo salina; (B) Grupo etanol; (C) GSK2193874

5.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TRPV4 NA MUCOSA GÁSTRICA APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE ETANOL

A análise imunohistoquímica de TRPV4 no tecido gástrico demonstrou uma maior marcação de TRPV4 no tecido lesionado pelo etanol (**Figura 13B**), com intensa coloração com DAB, principalmente na superfície do epitélio, em comparação com o grupo salina (**Figura 13A**). Esses resultados foram confirmados pela análise da deconvolução das cores, onde a utilização de etanol levou um aumento da intensidade de DAB ($13,45 \pm 3,95$ DABwt; **Figura 13D**) quando comparado ao grupo salina ($3,95 \pm 2,48$ DABwt) (**Figura 13C**).

A análise de PCR demonstrou que a expressão de mRNA de TRPV4 no grupo etanol ($2,45 \pm 0,52$ mRNA expressão) foi 75,57% maior do que no grupo salina ($0,5925 \pm 0,24$ mRNA expressão) (**Figura 13E**).

Figura 13- Expressão gênica e imunohistoquímica de TRPV4 após lesão gástrica induzida por etanol



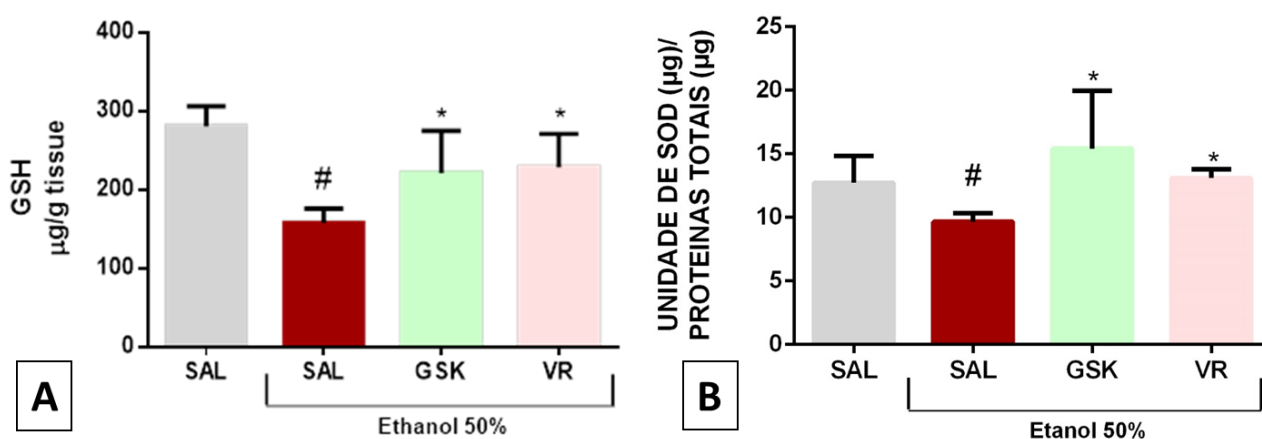
Legenda: (A-D) Análise imunohistoquímica do receptor TRPV4 na mucosa gástrica após lesão induzida por etanol a 50%. (A) Grupo controle salina. (B) Grupo lesionado após indução com etanol a 50%. (C; D) Análise de deconvolução colorida da coloração DAB para TRPV4 no grupo (C) solução salina e (D) grupo etanol, na mucosa gástrica. Os resultados foram analisados por ANOVA unidirecional seguida por Newman - Keuls. (E) Análise da alteração da expressão do mRNA de TRPV4 após lesão induzida por etanol a 50%. Os resultados são expressos como alteração na dobra do mRNA de TRPV4 normalizado para GAPDH. Os resultados são média $\pm$ SEM de pelo menos 5 animais por cada grupo experimental. (*) P < 0,05

5.7 EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE DOIS ANTAGONISTAS DE TRPV4 NA REDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL

A análise de marcadores de estresse oxidativo demonstrou que a utilização de etanol a 50% levou a diminuição significativa ($p < 0,05$) dos níveis de glutathiona reduzida ($158.24 \pm 16.10 \mu\text{g GSH} / \text{g tecido}$) na mucosa gástrica quando comparado ao grupo salina ($280.78 \pm 23.08 \mu\text{g GSH} / \text{g tecido}$). Por outro lado, a utilização dos antagonistas de TRPV4 ($p < 0,05$), GSK ($221.58 \pm 47.85 \mu\text{g GSH} / \text{g tecido}$) e VR ($228.98 \pm 39.74 \mu\text{g GSH} / \text{g tecido}$) reverteram esse efeito significativamente, reestabelecendo os níveis de GSH para valores próximos ao do grupo salina, como disposto na **figura 14(A)**.

Da mesma forma, a utilização de GSK2193874 ($15.40 \pm 3.94 \mu\text{SOD} / \text{mg de proteína}$) e VR ($13.09 \pm 0.64 \mu\text{SOD} / \text{mg de proteína}$) levaram a um aumento significativo ($p < 0,05$) dos níveis de superóxido dismutase na mucosa gástrica se comparado com o grupo etanol ($9.65 \pm 0.59 \mu\text{SOD} / \text{mg de proteína}$), enquanto a utilização de etanol a 50% levou a uma diminuição significativa desses níveis se comparado ao grupo salina ($12.72 \pm 1.83 \mu\text{SOD} / \text{mg de proteína}$) (**Figura 14B**).

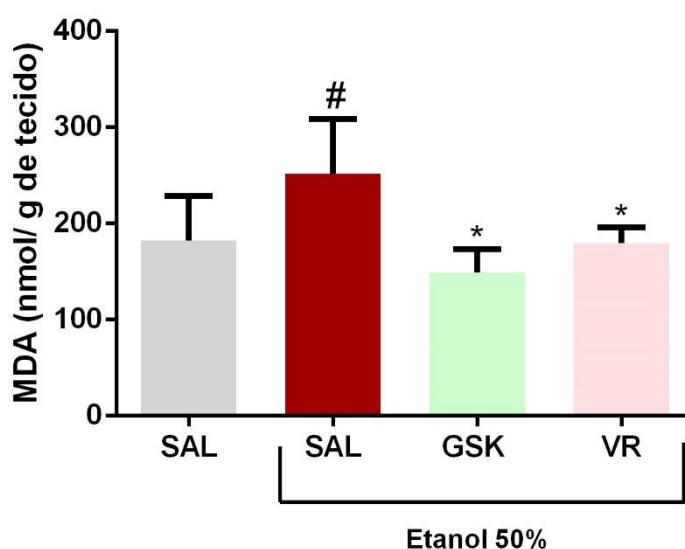
Figura 14- Avaliação do efeito da inativação de TRPV4 sobre os níveis de GSH e SOD na mucosa gástrica lesionada por etanol.



Legenda: (A) Concentração de glutathiona reduzida (GSH), (B) Atividade da superóxido dismutase (SOD), na mucosa gástrica após pré tratamento com GSK2193874 (0,9mg/kg) ou Vermelho de rutênio (0,03mg/kg) com posterior indução da lesão a partir da administração de etanol a 50%. Os resultados estão expressos pela média $\pm$ erro padrão da média de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $P < 0.05$ quando comparado ao grupo tratado com etanol; (#) $P < 0.05$ quando comparado ao grupo tratado com salina, os resultados foram analisados por one-way ANOVA seguido por Newman-Keuls. Abreviaturas: SAL: salina; GSK: GSK2193874; VR: Vermelho de rutênio.

As dosagens de malondialdeído na mucosa gástrica demonstraram que o etanol (251.68 ± 50.68 nmol / g) levou a um aumento significativo ($p < 0,05$) dos níveis desse marcador, demonstrando uma intensa peroxidação lipídica se comparado ao grupo controle negativo (salina) (182.15 ± 40.48 nmol / g). Entretanto, quando realizada a administração de GSK ($0,9$ mg/kg) (148.72 ± 22.11 nmol / g) e VR (183.04 ± 14.83 nmol / g) observou-se uma redução significativa dos níveis gástricos de MDA, quando comparado ao grupo que recebeu apenas etanol (**Figura 15**).

Figura 15- Determinação dos níveis de MDA na mucosa gástrica após bloqueio de TRPV4 e lesão gástrica

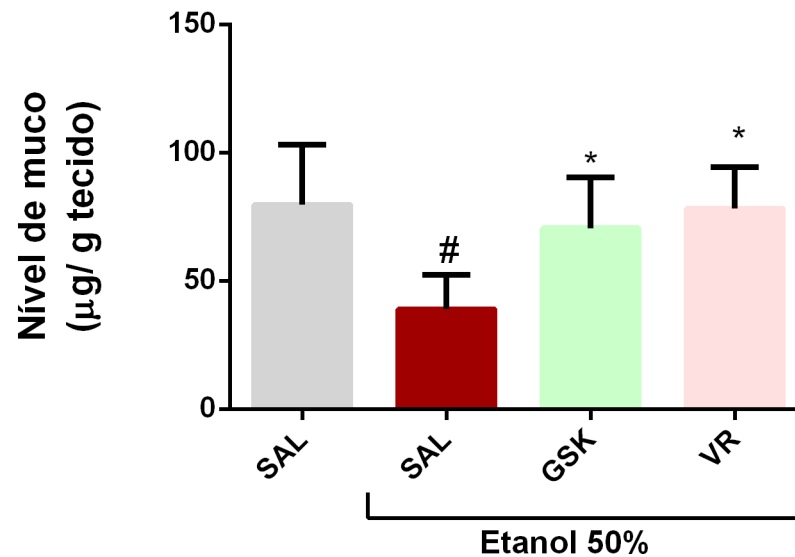


Legenda: Os resultados estão expressos pela média $\pm$ erro padrão da média de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $P < 0.05$ quando comparado ao grupo tratado com etanol; (#) $P < 0.05$ quando comparado ao grupo tratado com salina, os resultados foram analisados por one-way ANOVA seguido por Newman-Keuls. Abreviaturas: SAL: salina; GSK: GSK2193874; VR: Vermelho de rutênio.

5.8 MUCO GÁSTRICO

A utilização de etanol a 50% diminuiu a adesão ($0,015 \pm 0,005$) do Alcian Blue ao muco da parede gástrica em comparação com o grupo salina ($0,031 \pm 0,008$). Por outro lado a utilização dos antagonistas de TRPV4, GSK2193874 ($0,028 \pm 0,007$) e Vermelho de rutênio ($0,031 \pm 0,006$), reestabeleceram a adesão do Alcian Blue ao muco em comparação com o grupo etanol, mesmo após a indução da lesão (**Figura 16**).

Figura 16 - Efeito da utilização dos antagonistas de TRPV4 sobre a quantidade de muco, após lesão gástrica induzida por etanol.



Legenda: Os resultados estão expressos pela média $\pm$ erro padrão da média de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $P < 0.05$ quando comparado ao grupo tratado com etanol; (#) $P < 0.05$ quando comparado ao grupo tratado com salina, os resultados foram analisados por one-way ANOVA seguido por Newman-Keuls. Abreviaturas: SAL: salina; GSK: GSK2193874; VR: Vermelho de rutênio.

6 DISCUSSÃO

Levando em consideração os inúmeros distúrbios causados pela ativação de TRPV4, principalmente distúrbios gastrointestinais, e o número reduzido desses estudos a nível gástrico (ABBAS et al., 2019; FAHMI et al., 2019; YAO et al., 2019; GOUTSOU et al., 2019; SONI et al., 2019; HINES et al., 2019; CHAN; NELSON; CIPOLLA, 2019; NABISSI et al., 2018), visamos com esse trabalho investigar a associação entre a ativação desse receptor e o desenvolvimento de lesões gástricas induzidas pelo etanol. Para isso, realizamos a indução da lesão por meio da utilização de etanol a 50% e a fim de verificar a participação do receptor, utilizamos o GSK2193874, antagonista seletivo, e o vermelho de rutênio, antagonista não seletivo, do TRPV4. Além disso, também realizamos a indução da lesão com etanol a 30% juntamente com a utilização de um agonista do TRPV4, o GSK1016790A.

Nossos dados macroscópicos demonstraram uma exacerbada área de lesão nos grupos que não receberam nenhum tipo de pré-tratamento com os antagonistas de TRPV4 e no grupo que recebeu pré tratamento com o agonista de TRPV4 e passaram pelo processo de indução da lesão, em relação ao grupo controle salina. Esse processo já está bem estabelecido na literatura, uma vez que o alto consumo de etanol está associado ao afinamento da mucosa gástrica, necrose, por meio de sua ação tóxica direta, e esfoliação das células epiteliais (SU et al., 2017; LIU et al., 2019). Isto ocorre porque o etanol tem a capacidade de solubilizar o muco protetor, expondo o epitélio a pepsina e ácido clorídrico, além de levar a uma diminuição da secreção de bicarbonato e desregulação da produção de muco gástrico (GLAVIN et al., 1992; BRZOZOWSKI et al., 1998; ZATORSKI et al., 2019).

No entanto, quando utilizados antagonistas do TRPV4, a mucosa gástrica dos camundongos apresentou uma significativa diminuição na área de lesão quando comparado ao grupo etanol, e quando utilizado o agonista juntamente com etanol a 30% os animais apresentaram uma exacerbação da lesão. Esses dados evidenciam a participação do TRPV4 na lesão gástrica induzida por etanol, uma vez que o bloqueio e a ativação do receptor levaram a uma diminuição e exacerbação da área de lesão, respectivamente. Afim de confirmar o envolvimento desse receptor nesse processo de lesão, realizou-se os testes de imunohistoquímica e PCR, onde foi confirmado que o TRPV4 está mais expresso no epitélio gástrico lesado. Isto estaria de acordo com alguns trabalhos que demonstram o envolvimento entre a ativação

desse receptor e o desenvolvimento de desordens gastrointestinais, como o aumento de efeitos pró inflamatórios no trato gastrointestinal (TGI), e a alta expressão de mRNA de TRPV4 em pacientes e animais com doenças inflamatórias intestinais (BRIERLEY et al., 2008; HOLZER et al., 2011; FICHA et al., 2012; ZHANG et al., 2015b).

Mesmo que frequentemente citado, ainda não há muitos estudos na literatura que demonstrem a associação desse receptor com o desenvolvimento de doenças causadas pelo consumo de álcool e de distúrbios gástricos. Porém, em um estudo sobre pancreatite crônica, hipotetizou-se que os canais TRPV4 seriam ativados em um ambiente rico em álcool, o que está de acordo com os nossos resultados (ZHANG et al., 2015a). Além disso, a ativação de TRPV4 também já foi associada ao desenvolvimento de lesões ulcerosas no intestino causadas pela utilização aguda de anti-inflamatórios não esteroidais (YAMAWAKI et al., 2014). Se levarmos em consideração que os AINES também são uma grande causa do desenvolvimento de úlceras gástricas (KIM et al., 2019; PINEDA-PEÑA et al., 2019), e que a sua utilização pode culminar com a ativação de TRPV4 e desenvolvimento de lesões ulcerosas (YAMAWAKI et al., 2014), essa seria mais uma evidência que demonstra a importância do aprofundamento dos estudos sobre o papel da ativação de TRPV4 no desenvolvimento de úlceras gástricas.

Para um maior aprofundamento dos estudos, foram realizadas análises microscópicas aonde foi possível observar que a utilização dos antagonistas do receptor levou a uma diminuição dos parâmetros edema, hemorragia e perda de células epiteliais que se encontravam aumentados no grupo etanol. Sabe-se que um dos motivos para o desenvolvimento das lesões hemorrágicas/hiperêmicas, desenvolvidas pelo uso exacerbado de etanol, ocorrem devido a um distúrbio na circulação gástrica (OATES; HAKKINEN, 1988). Já foi demonstrado que a ativação de TRPV4 está intimamente associada a uma alteração hemodinâmica, podendo levar a hemorragias em órgãos como pulmão, rim e intestino grosso (WILLETE et al., 2008). Além disso, o mesmo estudo demonstrou que a ativação desse receptor também está associada a edema pulmonar e queda da pressão arterial, no entanto o mecanismo de ação não foi desvendado, o autor apenas sugeriu que isso ocorreu devido à intensa alteração hemodinâmica. Levando em consideração os resultados aqui apresentados e os encontrados por Willete e colaboradores (2008) sugere-se que as alterações do fluxo sanguíneo ocasionadas pela ativação de TRPV4 podem

ter associação com as lesões hemorrágicas advindas dessa ativação. No entanto, para fins de confirmação seria interessante o aprofundamento dos estudos sobre as alterações do fluxo sanguíneo gástrico, na lesão induzida por etanol e seu possível envolvimento com a ativação de TRPV4.

A fim de confirmar e complementar as análises microscópicas, realizou-se a microscopia por força atômica, onde foi evidenciado que o etanol levou a destruição da camada submucosa e ao aumento das depressões presentes do tecido, da mesma forma que ocorreu nos estudos de Noletto e colaboradores (2019), onde realizou-se a indução da lesão gástrica por alendronato e Abdon e colaboradores (2014), na lesão por etanol. Como resultado, observou-se que a utilização de GSK impediu que o etanol levasse a uma diminuição da integridade da mucosa, confirmando o envolvimento de TRPV4 nesse processo de lesão.

Sabe-se também que outro fator causador das lesões macro e microscópicas na mucosa gástrica, após a utilização de etanol, é o aumento da concentração de ácido clorídrico (MATSUHASHI, et al., 2007; KIM et al., 2019; LONG et al., 2019). Estudos já demonstraram que o TRPV4 quando ativado leva a um influxo de cálcio que ativa a bomba H⁺K⁺/ATPase culminando com a secreção de ácido gástrico (NILIUS et al., 2004; SHIKANO et al., 2011; D'ALDEBERT et al., 2011). Dessa forma, a ativação de TRPV4 com a utilização do etanol, pode ser um fator desencadeador para o aumento da secreção de ácido clorídrico e intensificação da lesão na mucosa gástrica. Todavia, mais estudos devem ser realizados para desvendar esse possível mecanismo, como por exemplo a partir dos experimentos para avaliação da secreção ácida gástrica juntamente com a utilização de agonistas e antagonistas de TRPV4.

Além dos prejuízos acima citados o consumo de etanol é capaz de levar a um estresse oxidativo na mucosa gástrica, por meio da geração espécies reativas de oxigênio que estão envolvidas diretamente com o dano das membranas celulares (ZAMORA et al., 2007; YEO et al., 2018; BANG et al., 2019). Estudos anteriores também já demonstraram que a ativação de TRPV4 leva a um aumento da sobrecarga de liberação de Ca⁺² e geração de espécies reativas de oxigênio, e que por sua vez isso está associado à geração de dano celular (BULBOZ et al., 2012; HONG et al., 2016; SURESH et al., 2018).

Tendo em vista que a utilização do álcool está relacionado a geração de espécies reativas de oxigênio, e que a ativação de TRPV4 também já foi associada

ao aumento de EROS em outras situações de estresse buscou-se observar se o estresse oxidativo presente na mucosa gástrica após a lesão induzida por etanol poderia ter alguma associação com a ativação desse receptor. Para isso foram avaliadas as dosagens de glutathiona reduzida, malondialdeído e superóxido dismutase. Enquanto a SOD e GSH são consideradas protetoras da mucosa gástrica, por serem enzimas antioxidantes envolvidas na redução de radicais livres (MICHIELS et al., 1994; SALIM; MCCORD, 1975; GURUNATHAN et al., 2019; ZHANG et al., 2019b; OLIVEIRA et al., 2019), o MDA é um produto final do processo de peroxidação lipídica (UCHIYAMA; MIHARA, 1978; LI et al., 2016; WU et al., 2019). Esses parâmetros podem ser utilizados para avaliar indiretamente o estresse oxidativo e os níveis de radicais livres no tecido, já que em tecidos lesados, como na lesão gástrica induzida por etanol, ocorre uma redução dos níveis das enzimas antioxidante citadas e aumento dos níveis de malondialdeído (LIU et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2019; BANG et al., 2019).

Os presentes resultados evidenciaram que a utilização dos dois antagonistas de TRPV4 levaram a uma diminuição da peroxidação lipídica quando comparado ao grupo etanol bem como ao aumento dos níveis de GSH e de SOD. Um estudo realizado anteriormente por Hong e colaboradores (2016), também relatou a relação entre TRPV4 e esses marcadores de estresse oxidativo demonstrando que a utilização do agonista GSK1016790A levou a um aumento de MDA e diminuição de GSH, e que o TRPV4 está envolvido no processo de neurotoxicidade.

Embora alguns estudos que demonstrem a associação entre TRPV4 e estresse oxidativo nas doenças do trato gastrointestinal ainda sejam escassos, diversos autores demonstram essa associação no desenvolvimento de outras patologias (AKIYAMA et al., 2016; DALSGAARD et al., 2016; MOORE et al., 2018; SONI et al., 2019). Diante disso, os resultados apresentados corroboram com outros estudos que relatam, por exemplo, que a ativação de TRPV4 no hipocampo pode levar a danos neurais e astrocíticos e que isso está intimamente relacionado à liberação de Ca^{2+} e estresse oxidativo, e que a utilização de bloqueadores de TRPV4 pode levar a redução desses dados neurais (BAI; LIPSKI, 2010; BAI; LIPSKI, 2014). Outro estudo demonstrou que a entrada de Ca^{2+} mediada pela ativação de TRPV4 pode ser um importante evento de sinalização que leva à liberação induzida de EROS mitocondriais e o aumento da produção de H_2O_2 em células hipocâmpais (BULBOZ et al., 2012).

Da mesma forma, o estudo realizado por Suresh e colaboradores (2018) demonstrou que o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e o influxo de Ca^{2+} via TRPV4 estão diretamente associados a disfunção do endotélio microvascular, podendo contribuir para o desenvolvimento de hipertensão arterial pulmonar. A ativação de TRPV4 e consequentemente o influxo de cálcio também já foram associados a geração de espécies oxidativas em cardiomiócitos (WU et al., 2017). Além desses, o estudo de Li e colaboradores (2019) evidenciou que a ativação de TRPV4 está presente na lesão pulmonar induzida por lipopolissacarídeo (LPS) e que a utilização de macrófagos *Knockdown* para TRPV4 leva a uma diminuição da geração de EROS no modelo de lesão, quando comparado a animais normais.

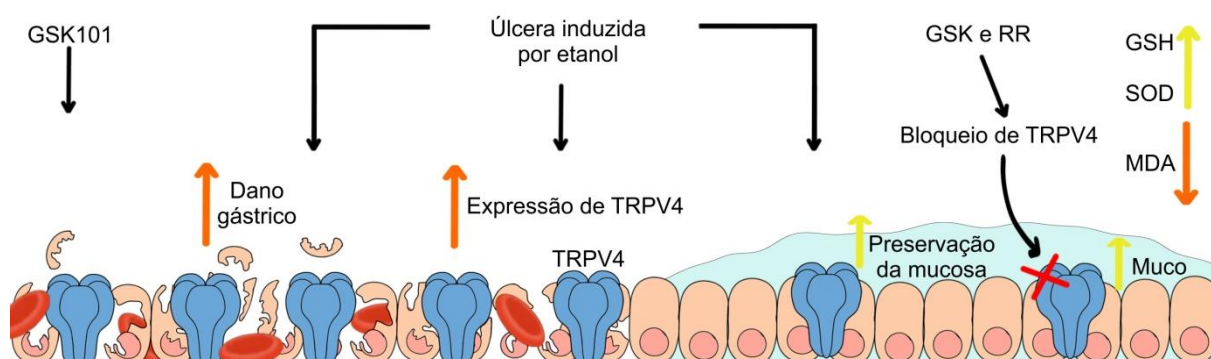
Diante disso, pode-se observar que há um bom número de estudos que associam o estresse oxidativo com a ativação de TRPV4, porém é necessário mais análises que demonstrem como isso ocorre na mucosa gástrica. Um estudo que investigou a utilização da carbenoxona na disfunção miccional, acabou por demonstrar que possivelmente esse fármaco possa atuar por meio da inibição dos canais de TRPV4, uma vez que a utilização de carbenoxona levou a diminuição do estresse oxidativo e lesão celular em células uroteliais mediados pela ativação do TRPV4 (ENDONG et al., 2011; OKINAMI et al., 2014; ZHANG et al., 2017). Levando em consideração que esse fármaco é utilizado para o tratamento de úlceras gástricas, essa poderia ser mais uma hipótese que demonstra a associação do TRPV4 no desenvolvimento de úlceras gástricas, de forma que a carbenoxona além de atuar por outros mecanismos também possa estar bloqueando os canais TRPV4 na mucosa gástrica, reduzindo o estresse oxidativo e levando a uma diminuição das úlceras pépticas. Considerando os resultados aqui apresentado bem como os encontrados pelos demais autores citados, observamos que os estudos sobre TRPV4 e estresse oxidativo são promissores e podem abrir portas para o desenvolvimento de novos tratamentos para distúrbios gástricos.

Outro fator abordado foi à produção de muco ligado à parede gástrica. Sabe-se que a camada muco protetora é essencial para a proteção da mucosa contra agentes lesivos e que ela se encontra diminuída nos casos de dano gástrico induzido pelo consumo de etanol (AMANG et al., 2017; SILVA et al., 2019). Constatou-se que o bloqueio de TRPV4 levou a um aumento da quantidade de muco ligado a parede do estômago, mais uma evidência de que o bloqueio desse receptor

está associado a uma diminuição da injúria gástrica. Esta é a primeira evidência encontrada sobre a possível relação entre o bloqueio do receptor TRPV4 e o aumento da quantidade de muco gástrico. No entanto, diversos estudos demonstram que a ativação de receptores da superfamília TRP está associada à liberação de muco, uma vez que a ativação desses canais está relacionada ao influxo de Ca^{2+} , que por sua vez tem um papel fisiológico na produção de muco e bicarbonato (AIHARA;MONTROSE, 2014; KIM., 2018; HARFORD et al., 2019). Levando isso em consideração, pode-se sugerir que esse aumento da quantidade de muco gástrico possa não ser devido à ação direta do bloqueio do receptor, mas sim devido à diminuição da lesão por outros mecanismos. Contudo, um estudo realizado com um probiótico, o *L. reuteri*, inibidor de TRPV1, outro membro da família de canais TRPV, também demonstrou um aumento da quantidade de muco aderido à parede, o que corrobora com os resultados aqui apresentados. Existem na literatura diversos trabalhos que demonstram o envolvimento de TRPV1 lesão gástrica, incluindo na induzida por etanol (GAZZIERI et al., 2007; DRMIC et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2019). No entanto, este estudo é considerado inovador, uma vez que não há na literatura outros trabalhos que demonstrem o envolvimento do TRPV4 nesse modelo de lesão.

Diante do exposto, o presente trabalho demonstra que a inativação de TRPV4 pode levar a uma diminuição dos danos da mucosa gástrica causados pela etanol, além de levar a uma diminuição dos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo (**Figura 17**). Além disso, levando em consideração as similaridades entre os receptores da família TRPV, podemos considerar de extrema importância estudos que demonstrem o envolvimento desses receptores com distúrbios gástricos.

Figura 17- Conclusão gráfica



Legenda: Autoria própria, 2019. Abreviaturas: GSK1016790A; GSK: GSK2193874; VR: Vermelho de rutênio; GSH: Glutathione reduzida; SOD: Superóxido dismutase; MDA: Malondialdeído.

7 CONCLUSÕES

Os dados evidenciam o envolvimento do TRPV4 na lesão gástrica induzida por etanol, uma vez que a ativação e bloqueio desse receptor levaram respectivamente a uma exacerbação e diminuição da lesão induzida por etanol, onde a utilização de GSK2193874 e Vermelho de rutênio levaram a redução da hemorragia, perda de células e edema na mucosa. Além disso, por meio do PCR e imunohistoquímica confirmou-se que o TRPV4 está mais expresso na mucosa gástrica lesionada pelo etanol.

Em adição, a utilização de antagonistas de TRPV4 levou a uma diminuição do estresse oxidativo, aumento do muco gástrico e da integridade da mucosa gástrica. Dessa forma, nosso estudo evidencia que o TRPV4 está envolvido no mecanismo de lesão gástrica induzida por etanol.

REFERÊNCIAS

ABBAS, M.A. *et al.* Gastroprotective activity of *Loranthus acaciae* flower extract in a rodent model of ethanol-induced ulcer. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, 2019. [http:// doi: 10.1139/apnm-2019-0166](http://doi:10.1139/apnm-2019-0166). [in press].

ABDEL, A.M.T. *et al.* Heme oxygenase vs. nitric oxide synthase in signaling mediating sildenafil citrate action. **The Journal of Sexual Medicine**, v.4, p. 1098-1107, 2007.

ABDON, A.P.V. *et al.* Ethanol-induced gastric injury: microscopic analysis of the protective effect of frutalin. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 20, n. 3, p. 325-332, 2014.

AIHARA, E. *et al.* Involvement of prostaglandin E receptor EP3 subtype in duodenal bicarbonate secretion in rats. **Life sciences**, v. 80, n. 26, p. 2446-2453, 2007.

AIHARA, E.; MONTROSE, M.H. Importance of Ca²⁺ in gastric epithelial restitution—new views revealed by real-time in vivo measurements. **Current opinion in pharmacology**, v. 19, p. 76-83, 2014.

AKIYAMA, T. *et al.* Involvement of TRPV4 in serotonin-evoked scratching. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 136, n. 1, p. 154-160, 2016.

ALLEN, A.; FLEMSTROM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 288, n. 1, p. C1-C19, 2005.

AL-MARSOUMI, A. M.; JABBO, N. S. Risk factors in perforated peptic ulcer disease: Incidence and relation to morbidity and mortality. **Mustansiriya Medical Journal**, v. 12, n. 1, p. 10-10, 2018

ALVAREZ, D.F. *et al.* Transient receptor potential vanilloid 4—mediated disruption of the alveolar septal barrier: a novel mechanism of acute lung injury. **Circulation research**, v. 99, n. 9, p. 988-995, 2006.

ALY, A.; SHULKES, A.; BALDWIN, G.S. Gastrins, cholecystokinins and gastrointestinal cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1704, n. 1, p. 1-10, 2004.

AMADOR-MARTÍNEZ, I. *et al.* Reduced endothelial nitric oxide synthase activation contributes to cardiovascular injury during chronic kidney disease progression. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**. 2019. <http://doi:10.1152/ajprenal.00020.2019>. [In press]

AMANG, C. *et al.* Healing and antisecretory effects of aqueous extract of *Eremomastax speciosa* (Acanthaceae) on unhealed gastric ulcers. **BioMed research international**, v. 2017, 2017.

AN, J.Y. *et al.* Inhibition of mucin secretion via glucocorticoid-induced regulation of calcium-related proteins in mouse lung. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 314, n. 6, p. L956-L966, 2018.

ANGRISANO, T. *et al.* *Helicobacter pylori* regulates iNOS promoter by histone modifications in human gastric epithelial cells. **Medical microbiology and immunology**, v. 201, n. 3, p. 249-257, 2012.

ARAB, H. A.; HASSANPOUR, H.; BOZORGI, A. Role of nitric oxide produced by constitutive and inducible nitric oxide synthases in the mouse gastric fundus. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 35, n. 9, p. 1038-1042, 2008.

ARIN, R.M. *et al.* Adenosine: direct and indirect actions on gastric acid secretion. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 737, 2017.

ATUMA, C. *et al.* The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 280, n. 5, p. G922-G929, 2001.

BAI, J.Z; LIPSKI, J. Differential expression of TRPM2 and TRPV4 channels and their potential role in oxidative stress-induced cell death in organotypic hippocampal culture. **Neurotoxicology**, v.21, n.2, p.204-214, 2010.

BAI, J.Z; LIPSKI, J. Involvement of TRPV4 channels in A β (40)-induced hippocampal cell death and astrocytic Ca(2+) signalling. **Neurotoxicology**, v.41, p.64-72, 2014

BALLATORI, N.; DUTCZAK, W.J. Identification and characterization of high and low affinity transport systems for reduced glutathione in liver cell canalicular membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.31, p. 19731-19737, 1994.

BALMUS, I. *et al.* Oxidative stress implications in the affective disorders: main biomarkers, animal models relevance, genetic perspectives, and antioxidant Approaches. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v.2016, p.1-25, 2016.

BANG, B.W. *et al.* BST-104, a water extract of *Lonicera japonica*, has a gastroprotective effect via antioxidant and anti-inflammatory activities. **Journal of Medicinal Food**, v.22, p.140-151, 2019.

BARKUN, A.; LEONTIADIS, G. Systematic review of the symptom burden, quality of life impairment and costs associated with peptic ulcer disease. **The American Journal of Medicine**, v. 123, p. 358-366, 2010.

BAXTER, M. *et al.* Role of transient receptor potential and pannexin channels in cigarette smoke-triggered ATP release in the lung. **Thorax**, v. 69, n. 12, p. 1080-1089, 2014.

BECEJAC, T. *et al.* An endogenous defensive concept, renewed cytoprotection/adaptive cytoprotection: intra(per)-oral/intraastric strong alcohol in rat. Involvement of pentadecapeptide BPC 157 and nitric oxide system. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.69, n.3, p. 429-440, 2018.

BELLMANN, S. *et al.* Development of an advanced in vitro model of the stomach and its evaluation versus human gastric physiology. **Food Research International**, v.8, p.191-198, 2016.

BERG, A. *et al.* Nitric oxide-an endogenous inhibitor of gastric acid secretion in isolated human gastric glands. **BMC gastroenterology**, v. 4, n. 1, p. 16, 2004.

BERROUT, J. *et al.* Function of transient receptor potential cation channel subfamily V member 4 (TRPV4) as a mechanical transducer in flow-sensitive segments of renal collecting duct system. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 12, p. 8782-8791, 2012.

BOMBECK, C. T.; DILLARD, D. H.; NYHUS, L. M. Muscular anatomy of the gastroesophageal junction and role of phrenoesophageal ligament; autopsy study of sphincter mechanism. **Annals of Surgery**, v.164, n.4, p.643–654,1996.

BORGES, S.S. *et al.* Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients and its association with clinical risk factors for developing gastric adenocarcinoma. **Archives of Gastroenterology**, v.56, n.1, p.66-70, 2019.

BRIERLEY, S.M. *et al.* Selective role for TRPV4 ion channels in visceral sensory pathways. **Gastroenterology**, v. 134, n. 7, p. 2059-2069, 2008.

BRZOZOWSKI, T. *et al.* Involvement of endogenous cholecystokinin and somatostatin in gastroprotection induced by intraduodenal fat. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 27, p. S125-S137, 1998.

BUBOLZ, A.H. *et al.* Activation of endothelial TRPV4 channels mediates flow-induced dilation in human coronary arterioles: role of Ca²⁺ entry and mitochondrial ROS signaling. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 302, n. 3, p. H634-H642, 2011.

BUDAY, T. *et al.* TRPV4 antagonist GSK2193874 does not modulate cough response to osmotic stimuli. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 236, p. 1-4, 2017.

BULBOZ, A.H. Activation of endothelial TRPV4 channels mediates flow-induced dilation in human coronary arterioles: role of Ca²⁺ entry and mitochondrial ROS signaling. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v.302, n.3, p.H634-642.

BURDAN, F. *et al.* Anatomical classification of the shape and topography of the stomach. **Surgical and Radiologic Anatomy**, v. 34, n.2, p.171–178, 2012.

CARNEVALE, R. *et al.* Blood hydrogen peroxide break-down activity in healthy subjects and in patients at risk of cardiovascular events. **Atherosclerosis**, v. 274, p. 29-34, 2018.

CARVALHO, M.M.F. *et al.* Effects of Açai on oxidative stress, ER stress, and inflammation-related parameters in mice with high fat diet-fed induced NAFLD. **Scientific Reports**, v.9, n.1, p. 8107, 2019.

CENAC, N. *et al.* Potentiation of TRPV4 signalling by histamine and serotonin: an important mechanism for visceral hypersensitivity. **Gut**, v. 59, n. 4, p. 481-488, 2010.

CHAN, S.L; NELSON, M.T.; CIPOLLA, M.J. Transient receptor potential vanilloid-4 channels are involved in diminished myogenic tone in brain parenchymal arterioles in response to chronic hypoperfusion in mice. **Acta Physiologica**, v. 225, n. 2, p. e13181, 2019.

CHANCE, B.; OSHINO, N. Analysis of the catalase--hydrogen peroxide intermediate in coupled oxidations. **Biochemical Journal**, v.131, n.3, p.564-567, 1973.

CHAUDHURY, T.K. *et al.* Prevention by mild irritants of gastric necrosis produced in rats by sodium taurocholate. **Digestive diseases and sciences**, v. 25, n. 11, p. 830-836, 1980.

CHEUNG, L. Y.; DELCORE, R. Stomach In. Townsend CM, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL; Sabiston Textbook of Surgery. **Philadelphia: WB Saunders**, v. 8, p. 37-860, 2001.

CHEUNG, M. *et al.* Discovery of GSK2193874: an orally active, potent, and selective blocker of transient receptor potential vanilloid 4. **ACS medicinal chemistry letters**, v. 8, n. 5, p. 549-554, 2017.

CHOI, E. *et al.* Cell lineage distribution atlas of the human stomach reveals heterogeneous gland populations in the gastric antrum. **Gut**, v.63, n.11, p.1711–1720, 2014.

CHUANG, C.N. *et al.* Gastrin-Histamine interactions: direct and paracrine elements. **Scandinavian journal of gastroenterology. Supplement**, v.26, p.95-103, 1991.

CLAPHAM, D. E. TRP channels as cellular sensors. **Nature**, v.426, n.6966, p.517–524, 2003.

CNUBBEN, N.H. *et al.* The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.10, n.4, p.141-152, 2001.

CORNE, S. J. A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. **J. Physiol.(London)**, v. 242, p. 116-117, 1974.

COSENS, D. J.; MANNING, Aubrey. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. **Nature**, v. 224, n. 5216, p. 285, 1969.

CZEKAJ, R. *et al.* Mechanisms of curcumin-induced gastroprotection against ethanol-induced gastric mucosal lesions. **Journal of Gastroenterology**, v.53, n.5, p. 618-630, 2018.

D'ALDEBERT, E. *et al.* Transient receptor potential vanilloid 4 activated inflammatory signals by intestinal epithelial cells and colitis in mice. **Gastroenterology**, v. 140, n. 1, p. 275-285, 2011.

DALMIZRAK, O. *et al.* The relevance of glutathione reductase inhibition by fluoxetine to human health and disease: insights derived from a combined kinetic and docking study. **The protein journal**, p. 1-10, 2019.

DALSGAARD, T. *et al.* Pharmacological inhibitors of TRPV4 channels reduce cytokine production, restore endothelial function and increase survival in septic mice. **Scientific reports**, v. 6, p. 33841, 2016.

DANGELO, J.G; FATTINI, C.A. **Anatomia humana sistêmica e segmentar**. São Paulo: Editora Atheneu, 2007.

DELGADO, R. *et al.* Light-induced opening of the trp channel in isolated membrane patches excised from photosensitive microvilli from *Drosophila* photoreceptors. **Neuroscience**, v. 396, p. 66-72, 2019.

DEROUICHE, S. *et al.* TRPV4 heats up ANO1-dependent exocrine gland fluid secretion. **The FASEB Journal**, v. 32, n. 4, p. 1841-1854, 2018

DIAS, F.C. *et al.* The selective TRPV4 channel antagonist HC-067047 attenuates mechanical allodynia in diabetic mice. **European journal of pharmacology**, v.856, p. 172408, 2019.

DJAKOVIC, Z. *et al.* Esophagogastric anastomosis in rats: Improved healing by BPC 157 and L-arginine, aggravated by L-NAME. **World journal of gastroenterology**, v. 22, n. 41, p. 9127, 2016.

DONG, X. *et al.* Tadalafil attenuates hypotonicity-induced Ca²⁺ influx via TRPV2 and TRPV4 in primary rat bladder urothelial cell cultures. **Neurourology and urodynamics**, v. 37, n. 5, p. 1541-1548, 2018.

DRMIC, D. *et al.* Celecoxib-induced gastrointestinal, liver and brain lesions in rats, counteraction by BPC 157 or L-arginine, aggravation by L-NAME. **World Journal of Gastroenterology**, v.23, n.29, p. 5304-5312, 2017.

ECHTERMEYER, F. *et al.* Acetaminophen-induced liver injury is mediated by the ion channel TRPV4. **The FASEB Journal**, p. fj. 201802233R, 2019

ENDONG, L. *et al.* The gap-junction inhibitor carbenoxolone suppresses the differentiation of Th17 cells through inhibition of IL-23 expression in antigen presenting cells. **Journal of neuroimmunology**, v. 240, p. 58-64, 2011.

ESMAEILZADEH, E. *et al.* Curcumin ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in a C57BL/6 mouse model. **Drug Development Research**, 2019.

FAHMI, A.A. *et al.* Chemical composition and protective role of *Pulicaria undulata* (L.) C.A. Mey. subsp. *Undulata* against gastric ulcer induced by ethanol in rats. **Heliyon**, v.5, n.3, p. e01359, 2019.

FANG, Y.F. *et al.* Effect of Hydrotalcite on Indometacin-Induced Gastric Injury in Rats. **BioMed Research International**, v.2019, 2019.

FERRUA, M.; SINGH, P. Modeling the fluid dynamics in a human stomach to gain insight of food digestion. **Journal of Food Science**, v.75, n. 7, 2010, p. R151 - R162.

FETTIPLACE, R.; KIM, K.X. The physiology of mechanoelectrical transduction channels in hearing. **Physiological reviews**, v. 94, n. 3, p. 951-986, 2014.

FICHA, J. *et al.* Transient receptor potential vanilloid 4 blockade protects against experimental colitis in mice: a new strategy for inflammatory bowel diseases treatment? **Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v.24, p.e557–e560, 2012

FLORENTINO, I.F. *et al.* Antinociceptive effects of new pyrazoles compounds mediated by the ASIC-1 α channel, TRPV-1 and μ MOR receptors. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 115, p. 108915, 2019.

FU, Y. *et al.* Gastroprotective and anti-ulcer effects of oxymatrine against several gastric ulcer models in rats: Possible roles of antioxidant, antiinflammatory, and prosurvival mechanisms. **Phytotherapy Research**, v.32, n.10, p. 2047-2058, 2018.

GARCIA, M.A; YANG, N., QUINTON, P.M. Normal mouse intestinal mucus release requires cystic fibrosis transmembrane regulator–dependent bicarbonate secretion. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 9, p. 2613-22, 2009.

GAZZIERI, D. *et al.* Substance P released by TRPV1-expressing neurons produces reactive oxygen species that mediate ethanol-induced gastric injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 12, p. 1670, 2007.

GHORBANZADEH, B. *et al.* Local antinociceptive action of fluoxetine in the rat formalin assay: role of l-arginine/nitric oxide/cGMP/KATP channel pathway. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 96, n. 2, p. 165-172, 2017.

GLAVIN, G.B.; SZABO, S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. **The FASEB journal**, v. 6, n. 3, p. 825-831, 1992.

GLORIEUX, C.; CALDERON, P.B. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. **Biological Chemistry**, v.398, v.10, p. 1095-1108, 2017.

GÓMEZ, J. *et al.* Antioxidant, Gastroprotective, Cytotoxic Activities and UHPLC PDA-Q Orbitrap Mass Spectrometry Identification of Metabolites in *Baccharis grisebachii* Decoction. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v.24, n.6, p.1085, 2019.

GONZÁLEZ, A. *et al.* Copper-induced activation of TRP channels promotes extracellular calcium entry and activation of CaMK, PKA, PKC, PKG and CBLPK leading to increased expression of antioxidant enzymes in *Ectocarpus siliculosus*. **Plant physiology and biochemistry**, v. 126, p. 106-116, 2018.

GORBUNOV, A. S. *et al.* Physiological and Pathological Role of TRPV1, TRPV2 and TRPV4 Channels in Heart. **Current cardiology reviews**, 2019. <http://10.2174/1573403X15666190307112326>. [in press].

GOUTSOU, S. *et al.* Transient receptor potential vanilloid (TRPV) channel expression in meningiomas: prognostic and predictive significance. **Virchows Archiv**, p. 1-10, 2019.<http://doi:10.1007/s00428-019-02584-y>. [in press].

GURUNATHAN, S. *et al.* The effects of apigenin-biosynthesized ultra-small platinum nanoparticles on the human monocytic THP-1 cell line. **Cell**, v.8, n.5, E444, 2019.

GUSTAFSSON, J.K. *et al.* Bicarbonate and functional CFTR channel are required for proper mucin secretion and link cystic fibrosis with its mucus phenotype. **Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 7, p. 1263-1272, 2012.

GUTTU, K. *et al.* Gastric mucosal repair and release of HCO₃-after damage by 2 M NaCl in cat: role of systemic acid base status. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 267, n. 4, p. G536-G545, 1994.

GUZMÁN-GÓMEZ, O. *et al.* Amelioration of ethanol- induced gastric ulcers in rats pretreated with phycobili proteins of *Arthrospira* (Spirulina) Maxima. **Nutrients**, v.10, n.6, p.763, 2018.

HARFORD, T. J. *et al.* Modulation of TRPV1 in Bronchial Epithelium of Children by PI3 Kinase. In: **B33. ASTHMA: MECHANISMS OF DISEASE II**. American Thoracic Society, 2019. p. A2954-A2954.

HAFNER-BRATKOVIČ, I.; PELEGRIN, P.. Ion homeostasis and ion channels in NLRP3 inflammasome activation and regulation. **Current opinion in immunology**, v. 52, p. 8-17, 2018

HALLIWELL, B. *et al.* Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v.70, n.5, p. 257–265, 2012.

HAN, T. *et al.* O Nitric oxide donor protects against acetic acid-induced gastric ulcer in rats via S-nitrosylation of TRPV1 on vagus nerve. **Scientific Reports**, v.7, n.1, p.2063, 2017.

HDUD, I.M. *et al.* Expression of transient receptor potential vanilloid (TRPV) channels in different passages of articular chondrocytes. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, n.4, p. 4433–4445, 2019.

HE, H. *et al.* Gastroprotective effect of Araloside A on ethanol-and aspirin-induced gastric ulcer in mice: involvement of H⁺/K⁺-ATPase and mitochondrial-mediated signaling pathway. *Journal of natural medicines*, v. 73, n. 2, p. 339-352, 2019b.

HE, J. *et al.* Remodeling of substance p sensory nerves and transient receptor potential melastin 8 (TRPM8) cold receptors after corneal experimental surgery. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 60, n. 7, p. 2449-2460, 2019a.

HEGAB, I.I; ABD-ELLATIF, R;N; SADEK, M.T. The gastroprotective effect of N-acetylcysteine and genistein in indomethacin-induced gastric injury in rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.96, n.11,p.1161-1170, 2018.

HILL, S.J. *et al.* International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. **Pharmacological reviews**, v. 49, n. 3, p. 253-278, 1997.

HINES, S.L. *et al.* Protein informatics combined with multiple data sources enriches the clinical characterization of novel TRPV 4 variant causing an intermediate skeletal dysplasia. **Molecular genetics & genomic medicine**, v. 7, n. 3, p. e566, 2019.

HOGBEN, C.A.M. *et al.* Quantitative histology of gastric mucosa: Man, dog, cat, guinea pig, and frog. **Gastroenterology**, v. 67, p.1143-1154, 1974.

HOLZER, P. *et al.* TRP channels in the digestive system. **Current pharmaceutical biotechnology**, v.12, p.24–34, 2011.

HONG, E. *et al.* Early diabetes in WKY and SHR produces decrease of the responses to angiotensin II and 5-HT and changes in the NO-GMPc pathway. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 31, n. 5, p. 462-470, 2009.

HONG, Z. *et al.* Enhanced oxidative stress is responsible for TRPV4-induced neurotoxicity. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 10, p. 232, 2016.

HOSOI, K. Physiological role of aquaporin 5 in salivary glands. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 468, n. 4, p. 519-539, 2016.

HU, M. *et al.* Hyperandrogenism and insulin resistance induce gravid uterine defects in association with mitochondrial dysfunction and aberrant ROS production. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v.316, n.5, p.E794-E809, 2019.

HUANG, R. *et al.* Recurrent activations of transient receptor potential vanilloid-1 and vanilloid-4 promote cellular proliferation and migration in esophageal squamous cell carcinoma cells. **FEBS open bio**, v. 9, n. 2, p. 206-225, 2019

HUGHES, T.E. *et al.* Structural basis of TRPV5 channel inhibition by econazole revealed by cryo-EM. **Nature structural & molecular biology**, v. 25, n. 1, p. 53, 2018.

HUNT, R. H. *et al.* The stomach in health and disease. **Gut**, v. 64, n. 10, p. 1650-1668, 2015.

IBRAHIM, M.A.A. *et al.* Role of scutellarin in ameliorating lung injury in a rat model of bilateral hind limb ischemia-reperfusion. **The Anatomical Record**, 2019.
<http://doi:10.1002/ar.24175>. [in press].

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287-293, 2018

IHARA, T. *et al.* The oscillation of intracellular Ca²⁺ influx associated with the circadian expression of Piezo1 and TRPV4 in the bladder urothelium. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 5699, 2018.

ISBIL-BUYUKCOSKUN, N. *et al.* Effects of intracerebroventricularly injected glucagon-like peptide-2 on ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. **Endocrine research**, v. 43, n. 4, p. 220-227, 2018.

JAHOVIC, N. *et al.* Gastric protection by α -melanocyte-stimulating hormone against ethanol in rats: Involvement of somatostatina. **Life Sciences**, v. 80, n. 11, p. 1040 - 1045, 2007.

JAIN, K.S. *et al.* Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. **Bioorganic e medicinal chemistry**, v.15, p. 1181-1205, 2007.

JIA, Y. *et al.* Functional TRPV4 channels are expressed in human airway smooth muscle cells. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 287, n. 2, p. L272-L278, 2004.

JONES, J.L. *et al.* TRPV4 increases cardiomyocyte calcium cycling and contractility yet contributes to damage in the aged heart following hypoosmotic stress. **Cardiovascular research**, v. 115, n. 1, p. 46-56, 2018.

KAJIMURA, M.; REUBEN, M.A; SACHS, G. The muscarinic receptor gene expressed in rabbit parietal cells is the m3 subtype. **Gastroenterology**, v. 103, n. 3, p. 870-875, 1992.

KARGMAN, S. *et al.* Characterization of Prostaglandin G/H Synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. **Gastroenterology**, v.111, n.2, p.445- 54, 1996.

KEILIN, D.; HARTREE, E.F. Properties of catalysis of coupled oxidation of alcohols. **Biochemical Journal**, v.39, n.4, p. 293-301, 1945.

KENNETH, B.A. *et al.* Regulated mucin secretion from airway epithelial cells. **Frontiers in endocrinology**, v. 4, p. 129, 2013.

KHAN, M.A. *et al.* In vivo, extract from *Withania somnifera* root ameliorates arthritis via regulation of key immune mediators of inflammation in experimental model of arthritis. **Anti-inflammatory & anti-allergy agents in medicinal chemistry**, v.18, n.1, p.55-70, 2019.

KIM, J.H. The Emerging Role of TRPV1 in Airway Inflammation. **Allergy, asthma & immunology research**, v. 10, n. 3, p. 187-188, 2018.

KIM, Y.S. *et al.* Gastroprotective Effects of *Paeonia* Extract mixture HT074 against experimental gastric ulcers in rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, p. 3546258, 2019.

KITAY, A.M. *et al.* Activation of secretagogue independent gastric acid secretion via endothelial nitric oxide synthase stimulation in rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 4, p. 1606-1615, 2017.

BERNE, R.M.; KOEPPEN, B.M.; LEVY, M.N. **Berne & Levy physiology**. Elsevier Brasil, 2008.

KOIZUMI, H. *et al.* Transient receptor potential channels TRPM4 and TRPC3 critically contribute to respiratory motor pattern formation but not rhythmicogenesis in rodent brainstem circuits. **Eneuro**, v. 5, n. 1, 2018.

KONTUREK, S.J. *et al.* Inhibition of nitric oxide synthase delays healing of chronic gastric ulcers. **European journal of pharmacology**, v. 239, n. 1-3, p. 215-217, 1993.

KULAKSIZ, H. *et al.* Expression and cell-specific localization of the cholecystokinin B/gastrin receptor in the human stomach. **Cell and tissue research**, v. 299, n. 2, p. 289-298, 2000.

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

LEE, J.K. *et al.* Alleviation of ascorbic acid-induced gastric high acidity by calcium ascorbate in vitro and in vivo. Alleviation of ascorbic acid-induced gastric high acidity by calcium ascorbate in vitro and in vivo. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v.22, n.1, p.35-42, 2018a.

LEE, Y. *et al.* *Aster glehni* extract containing caffeoylquinic compounds protects human keratinocytes through the TRPV4-PPAR δ -AMPK pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, 2018b.

LEIER, I. *et al.* ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump. **Biochemical Journal**, v. 314, p. 433 – 437, 1996.

LI, M. *et al.* Transient receptor potential vanilloid 4 is a critical mediator in LPS mediated inflammation by mediating calcineurin/NFATc3 signaling. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 513, n. 4, p. 1005-1012, 2019c.

LI, J. *et al.* The structure of TRPC ion channels. **Cell calcium**, 2019b. <http://doi:10.1016/j.ceca.2019.03.005>. [in press].

LI, N. *et al.* Role of TRPC1 channels in pressure-mediated activation of airway remodeling. **Respiratory research**, v. 20, n. 1, p. 91, 2019a

LI, Q. *et al.* The mechanosensor Transient Receptor Potential Vanilloid Member 4 (TRPV4) regulates mouse cholangiocyte secretion and bile formation. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, 2019c.

LI, W. *et al.* Cardamonin Alleviates Pressure Overload-induced Cardiac Remodeling and Dysfunction Through Inhibition of Oxidative Stress. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 68, n. 6, p. 441-451, 2016.

LIANG, X. *et al.* Cyclic stretch induced oxidative stress by mitochondrial and NADPH oxidase in retinal pigment epithelial cells. **BMC ophthalmology**, v.19,n.1,p.79, 2019.

LIEDTKE, Y. *et al.* Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. **Cell**, v.103, n.2000, p.525-535, 2000.

LIM, J.M. *et al.* Protective effects of a triple-fermented barley extract (FBe) against HCl/EtOH-induced gastric mucosa damage in mice. **Food Science e Nutrition**,v.6, n.8, p. 2036-2046, 2018.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LIU, J. *et al.* Short chain fatty acid acetate protects against ethanol-induced acute gastric mucosal lesion in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, n. 9, p. 1439-1446, 2017.

LONG, X. *et al.* Protective effect of silkworm pupa oil on hydrochloric acid/ethanol-induced gastric ulcers. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 6, p. 2974-2986, 2019.

LUCETTI, L.T. *et al.* Nitric Oxide and Hydrogen Sulfide Interact When Modulating Gastric Physiological Functions in Rodents. **Digestive Diseases and Sciences**, v.62, n.1, p.93-104, 2016.

LUCEY, M.R.; YAMADA, T. Biochemistry and physiology of gastrointestinal somatostatin. **Digestive Diseases and Sciences**, v.34, p.5-13, 1989.

MACNAUGHTON, W.K; CIRINO, G.; WALLACE, J.L. Endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) has protective actions in the stomach. **Life Sciences**, v.45, n.20, p. 1869-1876, 1989.

MAGIEROWSKA, K. *et al.* Alterations in gastric mucosal expression of calcitonin gene-related peptides, vanilloid receptors, and heme oxygenase-1 mediate gastroprotective action of carbon monoxide against ethanol-induced gastric mucosal lesions. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 10, p. 2960, 2018.

MAGIEROWSKI, M. *et al.* Nitric oxide, afferent sensory nerves, and antioxidative enzymes in the mechanism of protection mediated by tricarbonyldichlororuthenium(II) dimer and sodium hydrosulfide against aspirin-induced gastric damage. **Journal of Gastroenterology**, v.53, n.1, p.52-63, 2018.

MAGIEROWSKI, M. *et al.* The effect of hydrogen sulfide-releasing naproxen (ATB-346) versus naproxen on formation of stress-induced gastric lesions, the regulation of systemic inflammation, hypoxia and alterations in gastric microcirculation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 68, p. 749-756, 2017.

MAJHI, R.K. *et al.* Endogenous expression of thermo-sensitive ion channels TRPV1 and TRPV4 in immune tissues of avian species (duck, *Anas platyrhynchos*). **Peer J Preprints**, 2018.

MALINOWSKA, D.H. *et al.* Cloning, functional expression, and characterization of a PKA-activated gastric Cl⁻ channel. **American Journal of Physiology**, v.268, n.1, p.C191–C200, 1995.

MALINOWSKA, D.H. *et al.* Gastric parietal cell secretory membrane contains PKA- and acid-activated Kir2.1 K⁺ channels. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v.286, p.C495–C506, 2004.

MAMENKO, M. *et al.* Purinergic activation of Ca²⁺-permeable TRPV4 channels is essential for mechano-sensitivity in the aldosterone-sensitive distal nephron. **PloS one**, v. 6, n. 8, p. e22824, 2011.

MATSUHASHI, T. *et al.* Protective effect of a novel rice extract against ethanol-induced gastric mucosal injury in rat. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 52, n.2, p. 434 – 441, 2007.

MATSUKURA, N.; ASANO, G. Anatomy, histology, ultrastructure, stomach, rat. **Digestive System**, v.1985, p.281–288, 1985.

MATSUMOTO, K. *et al.* Transient receptor potential vanilloid 4 channel regulates vascular endothelial permeability during colonic inflammation in dextran sulphate sodium-induced murine colitis. **British journal of pharmacology**, v. 175, n. 1, p. 84-99, 2018.

MATSUMOTO, K.; KATO, S. TRPV4 regulates vascular endothelial permeability during colonic inflammation in dextran sulphate sodium-induced murine colitis. **Nihon**

yakurigaku zasshi. **Folia pharmacologica Japonica**, v. 152, n. 4, p. 170-174, 2018.

MATSUMOTO, K. *et al.* Transient receptor potential vanilloid 4 mediates sour taste sensing via type III taste cell differentiation. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 6686, 2019.

MATSUOKA, T. *et al.* An immunocytochemical study of regeneration of gastric epithelia in rat experimental ulcers. **Medical molecular morphology**, v. 38, n. 4, p. 233-242, 2005.

MCALEXANDER, M. A. *et al.* Transient receptor potential vanilloid 4 activation constricts the human bronchus via the release of cysteinyl leukotrienes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 349, n. 1, p. 118-125, 2014.

MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v.244, n.22, p.6049-6055, 1969.

MEDEIROS, J. V. R. *et al.* Hydrogen sulfide prevents ethanol-induced gastric damage in mice: role of ATP-sensitive potassium channels and capsaicin-sensitive primary afferent neurons. **J Pharmacol Exper Therap**, v. 330, n. 3, p. 764-770, 2009.

MEISTER, A.; ANDERSON, E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v.52, p. 711-760, 1983.

MERCER, D.W.; ROBINSON, E.K. Stomach. **Sabiston Textbook of Surgery. 18th ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier**, 2008.

MICHIELS, C. *et al.* Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free radical Biology and medicine**, v. 17, n. 3, p. 235-248, 1994.

MIHARA, H. *et al.* Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Regulation of Adenosine Triphosphate Release by the Adenosine Triphosphate Transporter Vesicular Nucleotide Transporter, a Novel Therapeutic Target for Gastrointestinal Baroreception and Chronic Inflammation. **Digestion**, v. 101, n. 1, p. 1-6, 2020.

MILANI, D.; CALABRÒ, A. Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing. **Microscopy Research and Technique**, v.53, n.5, p.360-371, 2001.

MILLER, T.A. Protective effects of prostaglandins against gastric mucosal damage: current knowledge and proposed mechanisms. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 245, n. 5, p. G601-G623, 1983.

MIMAKI, H. *et al.* Effect of lafutidine, a histamine H₂-receptor antagonist, on gastric mucosal blood flow and duodenal HCO₃⁻ secretion in rats: Relation to capsaicin-

sensitive afferent neurons. **Digestive diseases and sciences**, v. 47, n. 12, p. 2696-2703, 2002.

MONCADE, S; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **New England journal of medicine**, v. 329, n. 27, p. 2002-2012, 1993.

MONTELL, C. Drosophila TRP channels. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, v.451, n.1, p.19-28,2005

MONTELL, C.; RUBIN, G. M. Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. **Neuron**, v. 2, n. 4, p. 1313-1323, 1989

MOORE, E.R. *et al.* Adenylyl cyclases and TRPV4 mediate Ca²⁺/cAMP dynamics to enhance fluid flow-induced osteogenesis in osteocytes. **Journal of molecular biochemistry**, v. 7, p. 48-59, 2018a.

MOORE, C. *et al.* Regulation of pain and itch by TRP channels. **Neuroscience bulletin**, v. 34, n. 1, p. 120-142, 2018b

MORGAN, C.P. *et al.* TRPV6, TRPM6 and TRPM7 do not contribute to hair-cell mechanotransduction. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 12, p. 41, 2018a.

MORGAN, J.T. *et al.* The Mechanosensitive Ion Channel TRPV4 is a Regulator of Lung Development and Pulmonary Vasculature Stabilization. **Cellular and molecular bioengineering**, v. 11, n. 5, p. 309-320, 2018b.

MUELLER-TRIBBENSEE, S.M. *et al.* Differential contribution of TRPA1, TRPV4 and TRPM8 to colonic nociception in mice. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0128242, 2015.

NABISSI, M. *et al.* Thyme extract increases mucociliary-beating frequency in primary cell lines from chronic obstructive pulmonary disease patients. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 105, p. 1248-1253, 2018.

NAMULEMA, J. *et al.* Thyroid hormones increase stomach goblet cell numbers and mucin expression during indomethacin induced ulcer healing in Wistar rats. **Thyroid research**, v. 11, n. 1, p. 6, 2018.

NOLÊTO, I.R.S.G *et al.* Alendronate-induced gastric damage in normoglycemic and hyperglycemic rats is reversed by metformin. **European journal of pharmacology**, v. 856, p. 172410, 2019.

NILIUS, B. *et al.* TRPV4 calcium entry channel: a paradigm for gating diversity. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 286, n. 2, p. C195-C205, 2004.

NILIUS, J. *et al.* Differential activation of the volume-sensitive cation channel TRP12 (OTRPC4) and volume-regulated anion currents in HEK-293 cells. **Pflügers Archiv**, v. 443, n. 2, p. 227-233, 2001.

NILIUŠ, B.; *et al.* Transient receptor potential cation channels in disease. **Physiol Rev.**, v. 87, n.1, p.165-217, 2007.

NILIUŠ, B.; OWSIANIK, G. The transient receptor potential family of ion channels. **Genome biology**, v. 12, n. 3, p. 218, 2011.

NILIUŠ, B.; VENNEKENS, R; OWSIANIK, G. Vanilloid transient receptor potential cation channels: an overview. **Current pharmaceutical design**, v. 14, n. 1, p. 18-31, 2008.

OATES, P.J.; HAKKINEN, J.P. Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats. **Gastroenterology**, v.94, n.1, p.10-21,1988.

OHSAKI, A.; TANUMA, S.; TSUKIMOTO, M. TRPV4 channel-regulated ATP release contributes to γ -irradiation-induced production of IL-6 and IL-8 in epidermal keratinocytes. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 41, n. 10, p. 1620-1626, 2018.

OHYA, Y; GUTH, P.H. Ethanol-induced gastric mucosal blood flow and vascular permeability changes in the rat. **Digestive Diseases and Sciences**, v.33, n.7, p.883-888, 1988.

OKINAMI, T. *et al.* Altered detrusor gap junction communications induce storage symptoms in bladder inflammation: a mouse cyclophosphamide-induced model of cystitis. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e104216, 2014.

OLIVEIRA, A.P. *et al.* Lactobacillus reuteri DSM 17938 Protects against Gastric Damage Induced by Ethanol Administration in Mice: Role of TRPV1/Substance P Axis. **Nutrients**, v. 11, n. 1, p. 208, 2019.

OLMOS, M.P.M. *et al.* Simultaneous Electrochemical Speciation of Oxidized and Reduced Glutathione. Redox Profiling of Oxidative Stress in Biological Fluids with a Modified Carbon Electrode. **Analytical Chemistry**, v.89, n.20, p. 10726-10733, 2017.

PAIRET, N. *et al.* TRPV4 inhibition attenuates stretch-induced inflammatory cellular responses and lung barrier dysfunction during mechanical ventilation. **PloS one**, v. 13, n. 4, p. e0196055, 2018.

PAN, J.S. *et al.* Oxidative stress disturbs energy metabolism of mitochondria in ethanol- induced gastric mucosa injury. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n.38, p. 5857 - 5867, 2008.

PATEL, D.; VAEZI, M.F. Normal esophageal physiology and laryngopharyngeal reflux. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v.46, n.6, p. 1023-1041, 2013.

PATTON, K.T.; THIBODEAU, G.A. **Mosby's Handbook of Anatomy & Physiology-E-Book**. Elsevier Health Sciences, 2014.

PENG, G., SHI, X., KADOWAKI, T. Evolution of TRP channels inferred by their classification in diverse animal species. **Molecular phylogenetics and evolution**, v.84, p.145, 157, 2019

PENG, J.B. *et al.* TRPV5 and TRPV6 Calcium-Selective Channels. In: **Calcium Entry Channels in Non-Excitable Cells**. CRC Press/Taylor & Francis, 2018.

PHILLIPSON, M. *et al.* The importance of mucus layers and bicarbonate transport in preservation of gastric juxtamucosal pH. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 282, n. 2, p. G211-G219, 2002.

PINEDA-PENÑA, Elizabeth A. *et al.* Pharmacodynamic interaction of 3 α -hydroxymasticadienonic acid and diligustilide against indomethacin-induced gastric damage in rats. **Drug development research**, 2019. [http://doi: 10.1002/ddr.21535](http://doi:10.1002/ddr.21535). [in press].

PINTO, I.R. *et al.* Antiulcer and antioxidant activity of lectin from *Mucuna pruriens* seeds on ethanol-induced gastropathy: involvement of alpha-2 adrenoceptors and prostaglandin. **Current pharmaceutical design**, 2019. [http://doi: 10.2174/1381612825666190524081433](http://doi:10.2174/1381612825666190524081433). [in press].

PIQUERAS, L; TACHÉ, Y; MARTINEZ, V. Somatostatin receptor type 2 mediates bombesin-induced inhibition of gastric acid secretion in mice. **The Journal of physiology**, v. 549, n. 3, p. 889-901, 2003.

QIAO, W. *et al.* Effects of salivary Mg on head and neck carcinoma via TRPM7. **Journal of dental research**, v. 98, n. 3, p. 304-312, 2019

RAHAMAN, S.O. *et al.* TRPV4 mediates myofibroblast differentiation and pulmonary fibrosis in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 124, n. 12, p. 5225-5238, 2014.

RAIMURA, M. *et al.* Neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide is involved in gastric mucosal hyperemic response to capsaicin in rats. **Pharmacology**, v.92, n.1-2, p.60-70, 2013.

REGGIO, P.H.; MULLER, C.; MORALES, P.. Cannabinoid ligands targeting TRP channels. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 11, p. 487, 2018

REITER, B. *et al.* TRPV4-mediated regulation of epithelial permeability. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 11, p. 1802-1812, 2006.

REPPETTI, J. *et al.* Osmotic stress induces apoptosis in extravillous trophoblast cells. Role of TRPV-1. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 514, n. 1, p. 58-63, 2019.

REPETTO, MG; LLESUY, SF. Propriedades antioxidantes de compostos naturais utilizados na medicina popular para úlceras gástricas. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 5, p. 523-534, 2002.

RIZOPOULOS, T.; PAPADAKI-PETROU, H.; ASSIMAKOPOULOU, M. Expression profiling of the transient receptor potential vanilloid (TRPV) channels 1, 2, 3 and 4 in mucosal epithelium of human ulcerative colitis. **Cells**, v. 7, n. 6, p. 61, 2018.

ROBERT, A. *et al.* Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. **Gastroenterology**, v.77, p. 433–443, 1979.

ROBERTS, N. J.; MENARY, R. C. Effect of nitrogen on growth, flower yield, oil composition, and yield in *Boronia megastima* Nees. **Journal of Plant Nutrition**, v. 17, p.2035-2052, 1994.

ROCHA, B.S. *et al.* Inorganic nitrate prevents the loss of tight junction proteins and modulates inflammatory events induced by broad-spectrum antibiotics: A role for intestinal microbiota?. **Nitric Oxide**, v. 88, p. 27-34, 2019.

RODRÍGUEZ-PIÑEIRO, A.M. *et al.* Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. II. Gastrointestinal mucus proteome reveals Muc2 and Muc5ac accompanied by a set of core proteins. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 305, n. 5, p. G348-G356, 2013.

SAHOO, N. *et al.* Gastric acid secretion from parietal cells is mediated by a Ca²⁺ efflux channel in the tubulovesicle. **Developmental cell**, v. 41, n. 3, p. 262-273, 2017.

SALAMA, S.M. *et al.* A Zinc Morpholine Complex Prevents HCl/Ethanol-Induced Gastric Ulcers in a Rat Model. **Scientific reports**, v.6,p. 29646, 2016.

SALIN, M. L.; MCCORD, J. M. Free radicals and inflammation. Protection of phagocytosine leukocytes by superoxide dismutase. **The Journal of clinical investigation**, v. 56, n. 5, p. 1319-1323, 1975.

SÁNCHEZ-MENDOZA, M.E. *et al.* Gastroprotection of Calcitonin Receptor-Like Receptor 1 against Ethanol-Induced Gastric Lesions in Mice: Role of Prostaglandins, Nitric Oxide and Sulfhydryls. **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 622, 2019.

SARDA, D.K.; GARG, P.K. Study of Incidence of Peptic Ulcer Perforation in Young Adults: A Hospital Based Study. **Alcohol**, v. 33, p. 44, 2018.

SCHERAGA, R.G. *et al.* TRPV4 mechanosensitive ion channel regulates lipopolysaccharide-stimulated macrophage phagocytosis. **Journal of immunology**, v.196, n.1, p. 428–436, 2016.

SCHROEDER, B.O. *et al.* Fight them or feed them: how the intestinal mucus layer manages the gut microbiota. **Gastroenterology report**, v. 7, n. 1, p. 3-12, 2019.

SCHUBERT, M.L. Functional anatomy and physiology of gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 31, p. 479-485, 2015.

SCHUBERT, M.L. Gastric acid secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 32, n. 6, p. 452-460, 2016.

SCHUBERT, M.L. Gastric secretion. **Current opinion in gastroenterology**, v. 21, n. 6, p. 636-643, 2005.

SCHUBERT, M.L.; PEURA, D.A. Control of gastric acid secretion in health and disease. **Gastroenterology**, v. 134, p. 1842 – 1860, 2008.

SCOTT, D.A. *et al.* Expression of Nox4 NADPH Oxidase Splice Variants Generate Hydrogen Peroxide and Modify the Cell Cycle. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 1_supplement, p. 815.11-815.11, 2019.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical biochemistry**, v. 25, n.1, p.192-205, 1968.

SHEEN, E; TRIADAFILOPOULOS, G. Adverse effects of long-term proton pump inhibitor therapy. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 56, n. 4, p. 931-950, 2011.

SHEKHAR, S.; JAIN, S.; PRIYA, P. Assessment of Serum Antioxidant Enzymes Superoxide Dismutase (SOD) and Glutathione Peroxidase in Oral Submucous Fibrosis. **Journal of Advanced Medical and Dental Sciences Research**, v. 7, n. 1, p. 1-5, 2019.

SHI, M. *et al.* Glial cell-expressed mechanosensitive channel TRPV4 mediates infrasound-induced neuronal impairment. **Acta neuropathologica**, v. 126, n. 5, p. 725-739, 2013.

SHIKANO, M. *et al.* Acid inhibits TRPV4-mediated Ca²⁺ influx in mouse esophageal epithelial cells. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 23, n. 11, p. 1020-e497, 2011.

SILVA, L.M. *et al.* Hesperidin, a citrus flavanone glycoside, accelerates the gastric healing process of acetic acid-induced ulcer in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v.308, p.45-50, 2019.

SILVA, R. O. *et al.* Role of TRPV 1 receptor in inflammation and impairment of esophageal mucosal integrity in a murine model of nonerosive reflux disease. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 30, n. 8, p. e13340, 2018

SIPE, W.E.B. *et al.* Transient receptor potential vanilloid 4 mediates protease activated receptor 2-induced sensitization of colonic afferent nerves and visceral hyperalgesia. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 294, n. 5, p. G1288-G1298, 2008.

SMAGA, I. *et al.* Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 2. Depression, anxiety, schizophrenia and autism. **Pharmacological Reports**, v.67,n.3, p. 569–580, 2015.

SMITH, W.L.; GARAVITO, M.; DEWITT, D. Prostaglandin endoperoxide H sintase (ciclooxigenases) -1 e -2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 33157-33160, 1996.

SONG, Y. *et al.* TRPV4 channel inhibits TGF- β 1-induced proliferation of hepatic stellate cells. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e101179, 2014.

SONI, H. *et al.* Pharmacological inhibition of TRPV4 channels protects against ischemia–reperfusion-induced renal insufficiency in neonatal pigs. **Clinical Science**, v. 133, n. 9, p. CS20180815, 2019.

SORBYE, H.; SVANES, K. The role of blood flow in gastric mucosal defence, damage and healing. **Digestive Diseases**, v. 12, n. 5, p. 305-317, 1994.

SOUZA, L.K.M. *et al.* Diminazene aceturate, an angiotensin-converting enzyme II activator, prevents gastric mucosal damage in mice: role of the angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis. **Biochemical Pharmacology**, v. 112, p. 50-59, 2016.

SPECIAN, R.D.; NEUTRA, M.R. Mechanism of rapid mucus secretion in goblet cells stimulated by acetylcholine. **The Journal of cell biology**, v. 85, n. 3, p. 626-640, 1980.

STARLINGER, M.; SCHIESSEL, R. Bicarbonate (HCO₃) delivery to the gastroduodenal mucosa by the blood: its importance for mucosal integrity. **Gut**, v. 29, n. 5, p. 647, 1988.

STARTEK, J.B. *et al.* TRP Channels as Sensors of Chemically-Induced Changes in Cell Membrane Mechanical Properties. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 2, p. 371, 2019.

STEWART, J.M. Compounds and methods for the detection of TRPV-6 cancers and drug delivery. **U.S. Patent Application** n. 10/064,964, 4 set. 2018.

STROTMANN, C. *et al.* OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. **Nature Cell Biology**, p.2, n. 10, p.695, 2000.

SU, M. *et al.* Anti-ulcerogenic effect of KFP-H008 against ethanol-induced gastric ulcer via p38 MAPK/NF- κ B pathway. **RSC Advances**, v. 7, n. 78, p. 49423-49435, 2017.

SUN, M.S. *et al.* Free Radical damage in ischemia-reperfusion injury: an obstacle in acute ischemic stroke after revascularization therapy. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v.2018, p.1-17, 2018.

SUN, Y. I.; OBERLEY, L.W.; LI, Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. **Clinical chemistry**, v. 34, n. 3, p. 497-500, 1988.

SURESH, K. *et al.* Reactive oxygen species induced Ca²⁺ influx via TRPV4 and microvascular endothelial dysfunction in the SU5416/hypoxia model of pulmonary

arterial hypertension. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 314, n. 5, p. L893-L907, 2018.

TABIRI, S.; AKANBONG, P.; ABUBAKARI, B.B. Assessment of the environmental risk factors for a gastric ulcer in northern Ghana. **The Pan African medical jornal**, v.25, 2016.

TAKEUCHI, K. *et al.* Cytoprotective action of L-arginine against HCl-induced gastric injury in rats: involvement of nitric oxide?. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v.61, n.1, p.13-21, 1993.

TAKEUCHI, K; AMAGASE, K. Roles of cyclooxygenase, prostaglandin E2 and EP receptors in mucosal protection and ulcer healing in the gastrointestinal tract. **Current pharmaceutical design**, v. 24, n. 18, p. 2002-2011, 2018.

TARNAWSKI, A.S.; AHLUWALIA, A.; JONES, M.K. Angiogenesis in gastric mucosa: an important component of gastric erosion and ulcer healing and its impairment in aging. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 29, p. 112-123, 2014.

THORNELOE, K.S. *et al.* An orally active TRPV4 channel blocker prevents and resolves pulmonary edema induced by heart failure. **Science translational medicine**, v. 4, n. 159, p. 159ra148-159ra148, 2012.

THORNELOE, K.S. *et al.* N-((1S)-1-[[4-((2S)-2-[[[(2, 4-dichlorophenyl) sulfonyl] amino]-3-hydroxypropanoyl)-1-piperazinyl] carbonyl]-3-methylbutyl)-1-benzothiophene-2-carboxamide (GSK1016790A), a novel and potent transient receptor potential vanilloid 4 channel agonist induces urinary bladder contraction and hyperactivity: Part I. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 326, n. 2, p. 432-442, 2008.

THURMAN, R.G.; LEY, H.G; SCHOLZ, R. Hepatic microsomal ethanol oxidation. Hydrogen peroxide formation and the role of catalase. **European Journal of Biochemistry**, v.25, n.3, p..420-430, 1972.

TSUNODA, Y. *et al.* An inhibitor of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II, KN-62, inhibits cholinergic-stimulated parietal cell secretion. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 262, n. 1, p. G118-G122, 1992.

TURKYILMAZ, I.B. *et al.* The effects of antioxidant combination on indomethacin-induced gastric mucosal injury in rats. **Cellular And Molecular Biology (noisy-Le-Grand, France)**, v.65, n;3, p.76-83, 2019.

TYTGAT, G.N. Etiopathogenetic principles and peptic ulcer disease classification. **Digestive Diseases**, v. 29, n. 5, p. 454-458, 2011.

UCHIYAMA, M.; MIHARA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analytical biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 271-278, 1978.

UEDA, T. *et al.* Basal cells express functional TRPV4 channels in the mouse nasal epithelium. **Biochemistry and biophysics reports**, v. 4, p. 169-174, 2015.

VANDEWAUW, I. *et al.* A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing. **Nature**, v. 555, n. 7698, p. 662, 2018.

VANGEEL, L.; VOETS, T. Transient Receptor Potential Channels and Calcium Signaling. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v.11, n.6, p. a035048, 2019.

VDOVIÁKOVÁ, K. *et al.* Surgical Anatomy of the Gastrointestinal Tract and Its Vasculature in the Laboratory Rat. **Gastroenterology Research and practice**, v.2016, p.1-11, 2016.

VENDROV, A.E. *et al.* NOXA1-dependent NADPH oxidase regulates redox signaling and phenotype of vascular smooth muscle cell during atherogenesis. **Redox biology**, v. 21, p. 101063, 2019.

VERGNOLLE, Nathalie. TRPV4: new therapeutic target for inflammatory bowel diseases. **Biochemical pharmacology**, v. 89, n. 2, p. 157-161, 2014.

VINCENT, F.A.J; DUNCTON, M. TRPV4 agonists and antagonists. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 11, n. 17, p. 2216-2226, 2011.

VRIENS, J. *et al.* Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 1, p. 396-401, 2004.

XIE, R.*et al.* Calcium promotes human gastric cancer via a novel coupling of calcium-sensing receptor and TRPV4 channel. **Cancer research**, v. 77, n. 23, p. 6499-6512, 2017

WALLACE, J.L. Prostaglandins, NSAIDs, and Gastric Mucosal Protection: Why Doesn't the Stomach Digest Itself? **Physiological reviews**, v. 88, n. 4, p. 1547-1565, 2008.

WALLACE, J.L.; GRANGER, D. N. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. **The FASEB journal**, v. 10, n. 7, p. 731-740, 1996.

WANG, Q.S. *et al.* Protective effects of alginate-chitosan microspheres loaded with alkaloids from *Coptis chinensis* Franch. and *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. (Zuojin Pill) against ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. **Drug Design, Development and Therapy**, v.9, p. 6151-6165, 2015.

WANG, Z. *et al.* TRPV4-induced inflammatory response is involved in neuronal death in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. **Cell death & disease**, v. 10, n. 6, p. 386, 2019.

WATANABE, H. *et al.* Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. **Nature**, v. 424, n. 6947, p. 434, 2003.

WATANABE, H. *et al.* Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 16, p. 13569-13577, 2002.

WEI, Y. *et al.* Single-molecule transformation and analysis of glutathione oxidized and reduced in nanopore. **Talanta**, v. 167, p. 526-531, 2017.

WHITTLE, B.J. *et al.* Regulation of gastric mucosal integrity by endogenous nitric oxide: interaction with prostanoids and sensory neuropeptides in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v.99, p. 607-611, 1990.

WILLET, S.G.; MILLS, J. C. Stomach organ and cell lineage differentiation: from embryogenesis to adult homeostasis. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 2, n. 5, p. 546-559, 2016.

WILLETTE, R.N. *et al.* Systemic activation of the transient receptor potential vanilloid subtype 4 channel causes endothelial failure and circulatory collapse: Part 2. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 326, n. 2, p. 443-452, 2008.

WINTERNIT, M.C; MELOY, C.R. On the occurrence of catalase in human tissues and its variations in diseases. **Journal of Experimental Medicine**, v.10, n.6, p.759-781, 1908.

WU, Q.F. *et al.* Activation of transient receptor potential vanilloid 4 involves in hypoxia/reoxygenation injury in cardiomyocytes. **Cell death & disease**, v. 8, n. 5, p. e2828, 2017.

WU, Z. *et al.* Effect of puerarin on apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells under oxidative stress and its mechanisms. **Journal of BU ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology**, v. 24, n. 2, p. 628-633, 2019.

YAMAWAKI, H. *et al.* Role of transient receptor potential vanilloid 4 activation in indomethacin-induced intestinal damage. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 307, n. 1, p. G33-G40, 2014.

YAO, H. *et al.* Andrographolide attenuates imbalance of gastric vascular homeostasis induced by ethanol through glycolysis pathway. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 4968, 2019.

YARUSHKINA, N. I. *et al.* Vulnerability of gastric and small intestinal mucosa to ulcerogenic action of indomethacin in c57/BL6/J MlcE and Transient Receptor Potential Channel Vanilloid Type 1 knockout mice. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 69, n. 6, p. 951-961, 2018.

YEO, D. *et al.* The aqueous extract from *Artemisia capillaris* inhibits acute gastric mucosal injury by inhibition of ROS and NF- κ B. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, v. 99, p. 681-687, 2018.

YEGEN, B.C. Lifestyle and Peptic Ulcer Disease. **Current pharmaceutical design**, v. 24, n. 18, p. 2034-2040, 2018.

YIN, J. *et al.* Role of transient receptor potential vanilloid 4 in neutrophil activation and acute lung injury. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 54, n. 3, p. 370-383, 2016.

ZAMORA R. Z. B. *et al.* Antioxidant mechanism is involved in the gastroprotective effects of ozonized sunflower oil in ethanol-induced ulcers in rats. **Mediators of Inflammation**, v. 2007, 2007

ZATORSKI, H. *et al.* High activity of endogenous opioid system protects against gastric damage development in mouse models of gastric mucosal injury. **Pharmacological Reports**, v. 71, n. 2, p. 218-224, 2019.

ZHAN, L.; LI, J. The role of TRPV4 in fibrosis. **Gene**, v. 642, p. 1-8, 2018

ZHANG, L.P. *et al.* Alcohol and high fat induced chronic pancreatitis: TRPV4 antagonist reduces hypersensitivity. **Neuroscience**, v.311, p. 166-179, 2015a.

ZHAO, Z. *et al.* Effect and mechanism of evodiamine against ethanol-induced gastric ulcer in mice by suppressing Rho/NF- κ B pathway. **International immunopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 588-595, 2015b.

ZHANG, P. *et al.* TRPV4 (Transient receptor potential vanilloid 4) mediates endothelium-dependent contractions in the aortas of hypertensive mice. **Hypertension**, v. 71, n. 1, p. 134-142, 2018a.

ZHANG, Q. *et al.* Activation of transient receptor potential vanilloid 3 channel (TRPV 3) aggravated pathological cardiac hypertrophy via calcineurin/NFAT c3 pathway in rats. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 22, n. 12, p. 6055-6067, 2018b.

ZHANG, X. *et al.* Carbenoxolone inhibits TRPV 4 channel-initiated oxidative urothelial injury and ameliorates cyclophosphamide-induced bladder dysfunction. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 21, n. 9, p. 1791-1802, 2017.

ZHANG, H. *et al.* Comparison between laparoscopic and endoscopic resections for gastric submucosal tumors. **Saudi journal of gastroenterology: official journal of the Saudi Gastroenterology Association**, 2019a.

ZHANG, X. *et al.* Effects of *Panax notoginseng* saponins on liver graft rejection in rats and the mechanisms. **Journal of Southern Medical University**, v. 39, n. 4, p. 394-400, 2019b.

ZHU, Y; PEI, Z.M. GSK2193874 treatment at heatstroke onset reduced cell apoptosis in heatstroke mice. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. 64, n. 7, p. 36-42, 2018.

ZOLOTAREV, V.A. *et al.* Interaction of constitutive nitric oxide synthases with cyclooxygenases in regulation of bicarbonate secretion in the gastric mucosa. **Bulletin of experimental biology and medicine**, v. 163, n. 1, p. 6-9, 2017.

ANEXOS

ANEXO A- Carta de aprovação do comitê de ética



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
 Campus Ministro Reis Velloso, Av. São Sebastião, n. 2819, Parnaíba, Piauí, Brasil; CEP: 64204-035
 Telefone (86) 3323-5251 e-mail: ceuacmr@ufpi.edu.br



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **"Envolvimento do recptor de potencial transitório vanilóide 4 (TRPV4) na lesão gástrica induzida por etanol, em camundongos."**, registrada nº 003/19, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Campus Ministro Reis Velloso/UFPI** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **15/03/2019**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Junho/ 2019 à Maio/ 2021
Espécie/Linhagem/raça	Camundongos (<i>Mus musculus</i> / Swiss)
Nº de Animais	174
Peso/ Idade	20 – 25g
Sexo	Machos (87) e Fêmeas (87)
Origem	Biotério Central da Universidade Federal do Piauí

Parnaíba, 15 de Março de 2019.


 Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos
 (Coordenador da CEUA/CMRV-UFPI)