

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS

MARCELO RICARDO DUTRA CALDAS FILHO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DE *Maytenus*
distichophylla Mart. ex Reissek (CELASTRACEAE)

JOÃO PESSOA - PB
2013

MARCELO RICARDO DUTRA CALDAS FILHO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DE *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek (CELASTRACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de concentração: FARMACOLOGIA.

Orientadora: Profa. Dra. Leônia Maria Batista

João Pessoa - PB

2013

C145a Caldas Filho, Marcelo Ricardo Dutra.
Avaliação da atividade gastroprotetora de *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek (Celastraceae) / Marcelo Ricardo Dutra Caldas Filho.- João Pessoa, 2013.
127f. : il.
Orientadora: Leônia Maria Batista
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS
1. Produtos naturais. 2. *Maytenus distichophylla*. 3. Úlceras gástricas. 4. Gastroproteção. 5. Antissecrétoria.
6. Citoprotetora.

MARCELO RICARDO DUTRA CALDAS FILHO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DE *Maytenus*

***distichophylla* Mart. ex Reissek (CELASTRACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de concentração: FARMACOLOGIA.

Aprovada em: 26/02/2013.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Leônia Maria Batista
Orientadora - Universidade Federal da Paraíba

Profa. Dra. Cláudia Helena Pellizzon
Examinadora Externa - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Botucatu - SP

Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral
Examinadora Interna - Universidade Federal da Paraíba

À minha mãe, Luciene de Araújo Medeiros e aos meus
avós, Francisco Alexandre de Medeiros e Tereza Maria
de Araújo Medeiros, por todo o amor e dedicação que
sempre recebi e por terem contribuído em todas as
minhas conquistas de vida.

Agradecimentos

A Deus, por ter me concedido o dom da vida e me dado forças para que possa seguir conquistando meus sonhos.

À minha família, pelos inúmeros ensinamentos que contribuíram para formação do meu caráter, e pelo apoio nos momentos difíceis.

À Profa. Dra. Leônia Maria Batista, por ter confiado e me proporcionado essa conquista. E por todos os ensinamentos passados, desde a época da graduação.

Ao Prof. Dr. Josean Fechine Tavares, pela parceria no fornecimento das amostras vegetais.

Ao Dr. Marcelo Cavalcante Duarte e à MSc. Isis Fernandes Gomes pela colaboração na obtenção das amostras vegetais.

Às Profas. Dra. Cláudia Helena Pellizzon e Dra. Marianna Vieira Sobral, pela participação na banca examinadora.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Farmacologia do Trato Gastrintestinal, Igor Rafael Praxedes de Sales, Thaylan Martins de Sousa, Raphaela Francelino do Nascimento, Rodrigo de Oliveira Formiga, Heloína de Sousa Falcão, Camila de Albuquerque Montenegro, Neyres Zínia Taveira de Jesus, Gedson Rodrigues de Moraes Lima e Flávia Danniele Frota Machado, pela contribuição essencial na realização dos experimentos e também pelos momentos marcantes que passamos.

Aos ex-integrantes do grupo de pesquisa, Cynthia Layse Ferreira de Almeida, Cínthia Dias, Vitor Carvalho e Thiago Leite pela ajuda e amizade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pelos ensinamentos adquiridos durante as disciplinas, e pela contribuição na minha formação profissional.

A José Crispim Duarte, responsável pelo biotério, por todo auxílio técnico fornecido, apoio e momentos de descontração.

Aos funcionários do biotério, Luís Cordeiro e Adriano Silva.

Às secretárias, Tânia Maria Alves e Carolina Mangueira, pela solicitude de sempre.

À funcionária da empresa ALERTA, Mônica Rodrigues da Silva pelo apoio e pelas palavras de incentivo.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na pessoa da Profa. Dra. Maria de Fátima Agra, pela atenção e auxílio prestados durante o mestrado.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo aporte financeiro.

A cada um dos animais de laboratório que contribuíram com suas vidas para que este trabalho pudesse ser realizado.

MUITO OBRIGADO!

Marcelo Ricardo Dutra Caldas Filho

“O sábio nunca diz tudo o que pensa, mas pensa sempre tudo o que diz.”

(Aristóteles)

Avaliação da atividade gastroprotetora de *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek (Celastraceae). CALDAS FILHO, M. R. D. Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Dissertação de Mestrado, CCS/UFPB (2013).

RESUMO

Maytenus distichophylla Mart. ex Reissek, popularmente conhecida como “casca amarela” ou “pau-colher”, pertence a família Celastraceae. Esta espécie foi selecionada para este trabalho a partir de critérios quimiotaxonômicos, tendo em vista que já foi comprovada a atividade gastroprotetora em várias espécies deste gênero, a qual foi atribuída a metabólitos secundários tais como flavonoides, triterpenos, alcaloides e taninos. Com o objetivo de avaliar a toxicidade aguda, atividade gastroprotetora, bem como mecanismos relacionados a esta atividade, foram obtidos, a partir das folhas de *M. distichophylla*, o extrato metanólico bruto (EMeOH-*Md*) e a fase acetato de etila (FaAcOEt-*Md*). A administração única (v.o.) de 2000 mg/kg do EMeOH-*Md* em camundongos, não causou alterações comportamentais nos parâmetros avaliados (tais como hiperatividade, piloereção, analgesia, ambulação, dentre outros) e também não provocou variações no peso nem na estrutura macroscópica dos órgãos. No entanto, foi capaz de reduzir o consumo de água e ração nos animais machos. Não foi possível determinar a DL₅₀, visto que não houve mortes, ao final dos 14 dias de observação. Com relação à atividade gastroprotetora, EMeOH-*Md* e FaAcOEt-*Md* nas doses de 62,5, 125, 250 e 500 mg/kg (v.o.) foram testados frente a diferentes modelos de indução aguda de úlcera (etanol acidificado, etanol, estresse por imobilização e frio, anti-inflamatório não-esteroidal (AINE) e contensão do suco gástrico). No modelo de etanol acidificado, o EMeOH-*Md* reduziu o índice de lesão ulcerativo (ILU) em 68, 84, 81 e 80%, respectivamente. Frente as lesões por etanol, o EMeOH-*Md* e a FaAcOEt-*Md* nas mesmas doses protegeram a mucosa gástrica em 40, 56, 65, 86 e 12, 34, 46 e 71%, respectivamente. Quando se avaliou o modelo do estresse, EMeOH-*Md* e FaAcOEt-*Md* diminuíram o ILU em 58, 72, 79, 84 e 29, 38, 50 e 52%, respectivamente. Da mesma forma, no modelo de úlceras gástricas induzidas por AINE, houve inibição das lesões em 46, 65, 81 e 82% para o EMeOH-*Md* e 26, 40, 58 e 69% para a FaAcOEt-*Md*. Nas úlceras induzidas por contensão do suco gástrico (ligadura de piloro) o EMeOH-*Md* e a FaAcOEt-*Md* nas suas doses mais efetivas (500 mg/kg) promoveram proteção da mucosa gástrica quando administrados por via intraduodenal 75 e 77%, respectivamente, em comparação ao controle negativo. Também no modelo de ligadura (i.d.), EMeOH-*Md* e FaAcOEt-*Md* reduziram o volume do conteúdo gástrico. No intuito de investigar os mecanismos de ação relacionados a gastroproteção promovida pelo EMeOH-*Md* (500 mg/kg) e FaAcOEt-*Md* (500 mg/kg), foi avaliado o envolvimento dos grupamentos sulfidrílicos, óxido nítrico, muco e prostaglandinas. Dessa forma, foi verificado que o efeito gastroprotetor das amostras vegetais de *M. distichophylla* não envolve aumento do muco aderido à mucosa, nem a participação do óxido nítrico. No entanto, este efeito está relacionado à participação dos grupamentos sulfidrílicos e aumento dos níveis de prostaglandina. Logo, esses dados sugerem que *M. distichophylla* apresenta atividade gastroprotetora, possivelmente relacionada a mecanismos antissecrétórios e citoprotetores.

Palavras-chave: *Maytenus distichophylla*, úlceras gástricas, gastroproteção, antissecrética, citoprotetora.

Evaluation of the gastroprotective activity of *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek (Celastraceae). CALDAS FILHO, M. R. D. Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Master's thesis, CCS/UFPB (2013).

ABSTRACT

Maytenus distichophylla Mart. ex Reissek, popularly known as "casca amarela" or "pau-colher", belongs to the family Celastraceae. This species was selected for this work from chemotaxonomic criteria, with a view that has been proven to gastroprotective activity in several species of this genus, which was attributed to secondary metabolites such as flavonoids, terpenoids, alkaloids and tannins. Aiming to assess the acute toxicity, gastroprotective activity, as well as mechanisms related to this activity were obtained, from the leaves of *M. distichophylla*, crude methanolic extract (*Md-MeOHE*) and ethyl acetate phase (*Md-EtOAcP*). The single administration (p.o.) of 2000 mg/kg in mice *Md-MeOHE*, did not cause behavioral changes in the evaluated parameters (such as hyperactivity, piloerection, analgesia, ambulation, among others), also caused no changes in weight or the gross structure of organs. However, was able to reduce the consumption of water and feed in male animals. Unable to determine the LD₅₀, whereas no deaths at the end of 14 days of observation. Regarding the gastroprotective activity, *Md-MeOHE* and *Md-EtOAcP* at doses of 62.5, 125, 250 and 500 mg/kg (p.o.) were tested against different models of acute induction of ulcer (ethanol acidified, ethanol, stress immobilization and cold, nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) and containment of gastric juice). In the model of acidified ethanol, the *Md-MeOHE* reduced the ulcerative lesion index (ULI) for 68, 84, 81 and 80%, respectively. Front lesions by ethanol, *Md-MeOHE* and *Md-EtOAcP* in the same doses protected the gastric mucosa 40, 56, 65, 86, 12, 34, 46 and 71%, respectively. When assessing the model stress- *Md-MeOHE* and *Md-EtOAcP* decreased ULI at 58, 72, 79, 84, 29, 38, 50 and 52%, respectively. Likewise, in the model of NSAID-induced gastric ulcers, lesions was no inhibition at 46, 65, 81 and 82% for *Md-MeOHE* and 26, 40, 58 and 69% for *Md-EtOAcP*. In the ulcers induced by restraint of gastric juice (pylorus ligature) the *Md-MeOHE* and *Md-EtOAcP* in its most effective doses (500 mg/kg) caused gastric mucosa protection when administered intraduodenally 75 and 77%, respectively, compared to negative control. Also on ligation model (i.d.), *Md-MeOHE* and *Md-EtOAcP* reduced the volume of gastric contents. In order to investigate the mechanisms of action related to gastropoptection promoted by *Md-MeOHE* (500 mg/kg) and *Md-EtOAcP* (500 mg/kg), was evaluated the involvement of sulphydryl groups, nitric oxide, prostaglandins and mucus. Thus, it was verified that the gastroprotective effect of plant samples of *M. distichophylla* not involve increased mucus adhered to the mucosa or participation of nitric oxide. However, this effect is related to the participation of sulphydryl groups and increased levels of prostaglandin. Thus, these data suggest that *M. distichophylla* presents gastroprotective activity, possibly related to mechanisms antisecretory and cytoprotective.

Key Words: *Maytenus distichophylla*, gastric ulcers, gastropoptection, antisecretory, cytoprotective.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Representação esquemática da área de ocorrência das úlceras pépticas e camadas teciduais lesionadas 24
- Figura 2** Principais mediadores da secreção ácida gástrica 31
- Figura 3** Representação esquemática do sistema antioxidante enzimático e não enzimático 43
- Figura 4** Partes aéreas de *Maytenus distichophylla* 53
- Figura 5** Marcha fitoquímica para obtenção do EMeOH e FaAcOEt das folhas de *Maytenus distichophylla* 55
- Figura 6** Animais utilizados nos modelos experimentais: camundongo Swiss (*Mus musculus*) (A) e rato Wistar (*Rattus norvegicus*) (B)..... 56
- Figura 7** Fluxograma experimental 57
- Figura 8** Lupa OLYMPUS Optical TL3 - SZ40 (A) e estômago de rato ulcerado com etanol absoluto (B) para determinação do ILU 60
- Figura 9** Estômagos de ratos pré-tratados (v.o.) com solução salina 0,9% (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B), EMeOH-*Md* (62,5 mg/kg) (C), EMeOH-*Md* (125 mg/kg) (D), EMeOH-*Md* (250 mg/kg) (E) e EMeOH-*Md* (500 mg/kg) (F) em modelo de etanol 72
- Figura 10** Estômagos de ratos pré-tratados (v.o.) com solução salina 0,9% (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B), FaAcOEt-*Md* (62,5 mg/kg) (C), FaAcOEt-*Md* (125 mg/kg) (D), FaAcOEt-*Md* (250 mg/kg) (E) e FaAcOEt-*Md* (500 mg/kg) (F) em modelo de etanol 72

Figura 11 Estômagos de ratos pré-tratados com sol. salina 0,9% e tratados com sol. salina 0,9% (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B), EMeOH-*Md* (500 mg/kg) (C) e FaAcOEt-*Md* (500 mg/kg) (D) ou pré-tratados com NEM e tratados com sol. salina 0,9% (E), carbenoxolona 100 mg/kg (F), EMeOH-*Md* (500 mg/kg) (G) e FaAcOEt-*Md* (500 mg/kg) (H) em modelo de grupamentos sulfidrílicos 78

Figura 12 Estômagos de ratos pré-tratados com sol. salina 0,9% e tratados com sol. salina 0,9% (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B), EMeOH-*Md* (500 mg/kg) (C) e FaAcOEt-*Md* (500 mg/kg) (D) ou pré-tratados com L-NAME e tratados com sol. salina 0,9% (E), carbenoxolona 100 mg/kg (F), EMeOH-*Md* (500 mg/kg) (G) e FaAcOEt-*Md* (500 mg/kg) (H) em modelo de óxido nítrico 80

Figura 13 Estômagos de ratos pré-tratados com sol. salina 0,9% e tratados com sol. salina 0,9% (A), misoprostol 50 µg/kg (B), EMeOH-*Md* (500 mg/kg) (C) e FaAcOEt-*Md* (500 mg/kg) (D) ou pré-tratados com indometacina e tratados com sol. salina 0,9% (E), misoprostol 50 µg/kg (F), EMeOH-*Md* (500 mg/kg) (G) e FaAcOEt-*Md* (500 mg/kg) (H) em modelo de prostaglandina 82

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** Efeito da administração oral do EMeOH-*Md*, FaAcOEt-*Md* e carbenoxolona após pré-tratamento com NEM (i.p.), na úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos 78
- Gráfico 2** Efeito da administração oral do EMeOH-*Md*, FaAcOEt-*Md* e carbenoxolona após pré-tratamento com L-NAME (i.p.), na úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos 79
- Gráfico 3** Efeito da administração oral do EMeOH-*Md*, FaAcOEt-*Md* e carbenoxolona sobre o conteúdo de muco gástrico após ligadura do piloro em ratos 81
- Gráfico 4** Efeito da administração oral do EMeOH-*Md*, FaAcOEt-*Md* e misoprostol após pré-tratamento com indometacina (v.o.), na úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Efeito da administração oral do EMeOH- <i>Md</i> na evolução ponderal, índice dos órgãos, consumo de água e ração em camundongos fêmeas e machos, após 14 dias de observação	69
Tabela 2 Efeito da administração oral do EMeOH- <i>Md</i> e carbenoxolona em úlceras gástricas induzidas por etanol acidificado em camundongos	70
Tabela 3 Efeito da administração oral do EMeOH- <i>Md</i> , FaAcOEt- <i>Md</i> e carbenoxolona em úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos	71
Tabela 4 Efeito da administração oral do EMeOH- <i>Md</i> , FaAcOEt- <i>Md</i> e cimetidina em úlceras gástricas induzidas por estresse (imobilização e frio) em camundongos	73
Tabela 5 Efeito da administração oral do EMeOH- <i>Md</i> , FaAcOEt- <i>Md</i> e cimetidina em úlceras gástricas induzidas por AINE (piroxicam) em camundongos	74
Tabela 6 Efeito da administração intraduodenal do EMeOH- <i>Md</i> , FaAcOEt- <i>Md</i> e cimetidina em úlceras gástricas induzidas por contensão do suco gástrico por meio da ligadura do piloro em ratos	75
Tabela 7 Efeito da administração intraduodenal do EMeOH- <i>Md</i> , FaAcOEt- <i>Md</i> e cimetidina sobre os parâmetros bioquímicos do suco gástrico após a ligadura do piloro em ratos	76

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AC	ciclase de adenil
ACh	acetilcolina
AINE	anti-inflamatório não-esteroidal
ALU	área de lesão ulcerativa
AMP_c	3',5'- monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	análise de variância de uma via
CAT	catalase
CBiotec	centro de biotecnologia
CCK	colecistocinina
CCK-1	receptor de colecistocinina 1
CCK-2	receptor de colecistocinina 2
CCS	centro de ciências da saúde
CGRP	peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CO₂	dióxido de carbono
COX	ciclooxygenase
DAG	diacilglicerol
DL₅₀	dose Letal 50%
DNA	ácido desoxirribonucleico
d.p.	desvio padrão
ECL	células semelhantes às enterocromafins
EGF	fator de crescimento epidérmico
EMeOH-<i>Md</i>	extrato metanólico de <i>Maytenus distichophylla</i>
eNOS	sintase de óxido nítrico endotelial
EP	receptor de prostaglandina E
FaAcOEt-<i>Md</i>	fase acetato de etila de <i>Maytenus distichophylla</i>
FGF	fator de crescimento de fibroblastos
GCs	ciclase de guanilil solúvel
G_{q/11}	proteína G _q ou proteína 11
GMP_c	monofosfato cíclico de guanosina
GPx	glutationa peroxidase
GR	glutationa redutase

GSH	glutationa reduzida
GSSH	glutationa oxidada
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
HSP	proteína de choque térmico
IL-1β	interleucina 1 beta
IL-8	interleucina 8
IP₃	1,4,5-trifosfato de inositol
i.p.	intraperitoneal
ILU	índice de Lesão Ulcerativo
iNOS	sintase de óxido nítrico induzível
L-NAME	N-nitro-L-arginina metil éster
LT	leucotrieno
MDA	malondialdeído
MeOH	metanol
MPO	mieloperoxidase
NH₃	amônia
nNOS	sintase de óxido nítrico neuronal
NO	óxido nítrico
NOS	sintase de óxido nítrico
O₂	oxigênio molecular
O₂⁻	ânion superóxido
OH[.]	radical hidroxila
PACAP	peptídeo ativador da ciclase de adenilil pituitária
ONOO⁻	peroxinitrito
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PG	prostaglandina
PGE₂	prostaglandina da série E
PGI₂	prostaciclina
PK	proteína quinase
PKG	proteína quinase dependente de GMP _c
PLC	fosfolipase C
PNA	peptídeo natriurético atrial
PPgPNSB	programa de pós-graduação em produtos naturais e

	sintéticos bioativos
ROS	espécies reativas de oxigênio
RNS	espécies reativas de nitrogênio
s.c.	subcutânea
SH	sulfidrila
SNA	sistema nervoso autônomo
SNC	sistema nervoso central
SNE	sistema nervoso entérico
SOD	superóxido dismutase
SST₂	receptor de somatostatina 2
SUS	sistema único de saúde
TBARS	substância reativa ao ácido tiobarbitúrico
TFF	fator trefoil
TNFα	fator de necrose tumoral α
TRH	hormônio liberador de tireotrofina
TSH	hormônio estimulante da tireoide
UFPB	universidade federal da paraíba
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
v.o.	via oral

Obs: As abreviaturas, siglas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Considerações gerais	22
1.2 Úlcera péptica	23
1.2.1 Etiologia da úlcera péptica	23
1.2.2 Epidemiologia da úlcera péptica	27
1.3 Fisiologia gastrintestinal	29
1.3.1 Secreção ácida gástrica	29
1.3.2 Mecanismos de defesa da mucosa gástrica	34
1.3.2.1 Defesa pré-epitelial	34
1.3.2.2 Defesa epitelial	35
1.3.2.3 Defesa sub-epitelial	36
1.3.2.4 Inervação sensorial da mucosa gástrica	37
1.3.2.5 Reconstituição do epitélio gástrico	37
1.3.3 Fatores moduladores da barreira gástrica	38
1.3.3.1 Óxido nítrico (NO)	38
1.3.3.2 Prostaglandinas (PGs)	39
1.3.3.3 Grupamentos sulfidrílicos (SHs)	40
1.3.3.4 Sistema antioxidante	41
1.4 Terapêutica da úlcera péptica	44
1.5 Plantas como alternativa terapêutica	46
1.5.1 <i>Maytenus distichophylla</i> Mart. ex Reissek (Celastraceae)	48
1.5.2 Considerações sobre os triterpenos	49
2 OBJETIVOS	50
2.1 Objetivo geral	51
2.2 Específicos	51
3 MATERIAL E MÉTODOS	52
3.1 MATERIAL	53
3.1.1 Material botânico	53
3.1.2 Local da pesquisa	54
3.1.3 Procedimentos fitoquímicos: obtenção do extrato metanólico (EMeOH- <i>Md</i>) e fase acetato de etila (FaAcOEt- <i>Md</i>)	54
3.1.4 Animais	55

3.1.5 Drogas utilizadas	56
3.2 MÉTODOS	57
3.2.1 Ensaio toxicológico pré-clínico agudo de <i>Maytenus distichophylla</i> Mart. ex Reissek	58
3.2.2 Avaliação da atividade gastroprotetora de <i>Maytenus distichophylla</i> Mart. ex Reissek	58
3.2.2.1 Modelos de indução aguda de úlcera gástrica	60
3.2.2.1.1 Úlceras gástricas induzidas por etanol acidificado (triagem farmacológica)	60
3.2.2.1.2 Úlceras gástricas induzidas por etanol	61
3.2.2.1.3 Úlceras gástricas induzidas por estresse (imobilização e frio)	61
3.2.2.1.4 Úlceras gástricas induzidas por anti-inflamatório não-esteroidal (piroxicam)	61
3.2.2.1.5 Úlceras gástricas induzidas por contensão do suco gástrico	62
3.2.2.1.6 Avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico após ligadura do piloro (i.d.)	62
3.2.3 Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora de <i>Maytenus distichophylla</i>	63
3.2.3.1 Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrílicos (SHs) na gastroproteção	63
3.2.3.2 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) na gastroproteção	63
3.2.3.3 Determinação da concentração de muco aderido à parede gástrica	64
3.2.3.4 Avaliação da participação das prostaglandinas (PGs) na gastroproteção	65
3.3 Análise estatística	65
4 RESULTADOS	67
4.1 Ensaio toxicológico pré-clínico agudo de <i>Maytenus distichophylla</i> Mart. ex Reissek	68
4.2 Avaliação da atividade gastroprotetora de <i>Maytenus distichophylla</i> Mart. ex Reissek	69
4.2.1 Úlceras gástricas induzidas por etanol acidificado (triagem farmacológica)	69

4.2.2 Úlceras gástricas induzidas por etanol	70
4.2.3 Úlceras gástricas induzidas por estresse (imobilização e frio)	73
4.2.4 Úlceras gástricas induzidas por anti-inflamatório não-esteroidal (piroxicam)	74
4.2.5 Úlceras gástricas induzidas por contensão do suco gástrico	75
4.2.6 Avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico após ligadura do piloro (i.d.)	76
4.3 Avaliação de mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora de <i>Maytenus distichophylla</i>	77
4.3.1 Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrílicos (SHs) na gastroproteção	77
4.3.2 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) na gastroproteção	79
4.3.3 Determinação da concentração de muco aderido à parede gástrica	80
4.3.4 Avaliação da participação das prostaglandinas (PGs) na gastroproteção	81
5 DISCUSSÃO	83
6 CONCLUSÃO	99
7 PERSPECTIVAS	101
REFERÊNCIAS	104
ANEXOS	125

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

As plantas medicinais, durante muito tempo, foram largamente utilizadas para aliviar e tratar as diversas doenças humanas, mas, suas aplicações diminuíram devido à medicina moderna. Contudo, nos dias atuais seu uso vem sendo retomado em todo o mundo, e isso pode ser atribuído à facilidade de acesso ao uso, ao contexto cultural no qual as plantas encontram-se inseridas e aos inúmeros estudos de validação de espécies vegetais (CINDRIĆ et al., 2013).

Cerca de 80% da população dos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento continuam completamente dependentes da medicina caseira, utilizando vegetais para as necessidades primárias de saúde (BRAZ-FILHO, 2010). No Brasil, 20% da população respondem por 63% do consumo de medicamentos disponíveis; o restante encontra nos produtos naturais, especialmente nas plantas medicinais, a única fonte de recurso terapêutico (AGRA et al., 2007 apud RABELO et al., 2013).

A importância medicinal dos produtos naturais reside não só nos seus efeitos terapêuticos (MAHOMOODALLY et al., 2012), além disto, eles fornecem modelos para modificações estruturais e otimização das propriedades farmacológicas e bioquímicas, servindo inclusive, para a inspiração de químicos orgânicos, estimulando-os para enfrentar desafios na construção sintética de novas arquiteturas moleculares naturais (BRAZ-FILHO, 2010).

O estímulo à pesquisa, produção e comercialização de espécies vegetais brasileiras gera trabalho, renda, desenvolvimento e integração regional, enfim, possibilidades econômicas importantes ao crescimento do país, visando à sustentabilidade (BRASIL, 2010). Nesse contexto, os produtos naturais apresentam-se como uma fonte ainda pouco explorada, e que oferece maiores oportunidades para encontrar moléculas ativas que proporcionem a produção de novos fármacos úteis no tratamento de diversas afecções (SCHMITT et al., 2011).

Nosso país, com seu amplo patrimônio genético e diversidade cultural, tem a oportunidade de estabelecer um modelo diferenciado e excepcional no

Sistema Único de Saúde (SUS), com o uso sustentável de plantas medicinais (BRASIL, 2010), sobretudo a partir da publicação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (BRASIL, 2006a) e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006b).

As doenças do trato gastrintestinal (TGI), destacando-se a úlcera péptica e suas complicações são exemplos de agravos à saúde, as quais estão associadas à significativa morbidade e mortalidade, além de elevados custos decorrentes do tratamento de suas complicações (NIETO, 2012). As lesões ulcerativas constituem um problema de saúde mundial, com incidência e prevalência associadas a fatores pertinentes ao cotidiano dos indivíduos, como estresse, infecção bacteriana por *Helicobacter pylori* e uso prolongado de anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) (MEGALA; GEETHA, 2010).

Existe uma variedade de espécies vegetais que apresentam excelente potencial para tratar a úlcera péptica e outros distúrbios gastrintestinais, muitas delas, oriundas da medicina tradicional (BANSAL et al., 2009). No entanto, o uso popular de plantas medicinais não é suficiente para a validação etnofarmacológica (RABELO et al., 2013).

Diante deste cenário, o presente trabalho visa contribuir para a utilização medicinal das plantas de forma segura, colaborar com o avanço da pesquisa científica por meio de metodologias padronizadas, tendo como finalidade a busca de novas alternativas terapêuticas com atividade frente às doenças do TGI, em especial a úlcera péptica.

1.2 Úlcera péptica

1.2.1 Etiologia da úlcera péptica

A úlcera péptica é uma doença caracterizada por lesões profundas na mucosa do esôfago, estômago ou duodeno. No estômago as lesões localizam-se preferencialmente ao longo da pequena curvatura, na zona de transição entre o corpo e o antró (GIBSON; ODZE, 2011), enquanto que no duodeno localizam-se no bulbo ou ampola duodenal, sendo denominadas como úlcera esofágica, gástrica e duodenal, respectivamente (TARNAWSKI, 2010; NAJM, 2011). De acordo com a descrição histopatológica, engloba um dano epitelial,

que se estende por meio da camada muscular da mucosa em direção à submucosa, podendo atingir os tecidos musculares do trato gastrintestinal (LEONG, 2009) (Figura 1).

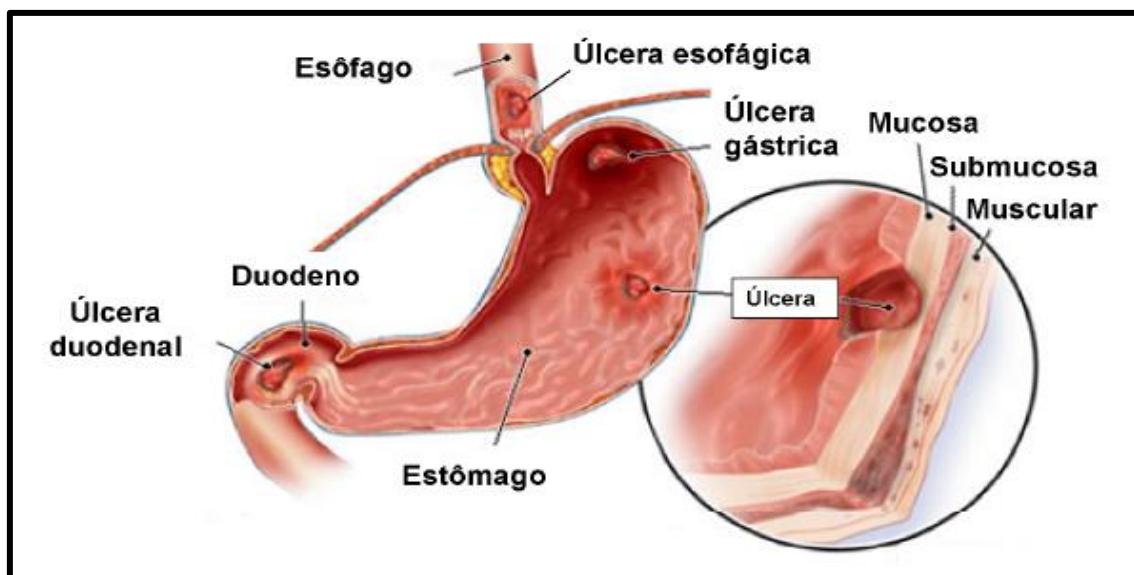


Figura 1 Representação esquemática da área de ocorrência das úlceras pépticas e camadas teciduais lesionadas. (Fonte: <http://hopkins-gi.nts.jhu.edu/images> com modificações).

Os principais sintomas da úlcera péptica são a dor ou desconforto na região superior do abdome (NIETO, 2012), a sensação de plenitude, náuseas, vômitos, refluxo, azia e fadiga (AWAAD et al., 2013). Entretanto, a hemorragia gastrintestinal superior, perfuração ou obstrução são os mais graves sintomas da úlcera péptica, os quais estão associados à elevada taxa de morbidade e mortalidade (SUNG et al., 2009; BARKUN; LEONTIADIS, 2010).

O desenvolvimento das lesões ulcerativas pode ser decorrente da alteração do equilíbrio entre os fatores agressivos e defensivos da mucosa gástrica (BANSAL; GOEL, 2012). Os fatores agressivos endógenos incluem secreção de ácido e pepsina, presença de radicais livres, refluxo biliar e processos isquêmicos, já os fatores agressivos exógenos incluem a presença da bactéria *Helicobacter pylori*, uso contínuo de anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), consumo excessivo de álcool, tabagismo e estresse. Dentre os fatores defensivos da mucosa, tem-se a produção de muco e bicarbonato, fluxo sanguíneo, óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGE₂),

fatores de crescimento e regeneração celular, além do sistema de defesa antioxidante (KALANT et al., 2007 apud AWAAD et al., 2013; VONKEMAN et al., 2007 apud TAKAYAMA et al., 2011; BRZOZOWSKI, et al., 2012; NIETO, 2012).

O consumo excessivo do álcool promove distúrbios da microcirculação, isquemia e geração de radicais livres (com decréscimo nos níveis de glutationa), liberação de endotelina, degranulação de mastócitos com liberação de mediadores vasoativos, a exemplo da histamina, aumento de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β e TNF α (BARBASTEFANO et al., 2007; TAKAYAMA et al., 2011), inibição de prostaglandinas e diminuição da produção de muco gástrico (ZHAO et a., 2009; ARAWWAWALA et al., 2010). Esse agente químico também aumenta o fluxo de Na $^+$ e K $^+$ para o lúmen, e principalmente íons H $^+$, que sofrem retrodifusão, atingindo a células da mucosa. Além disso, estimula a secreção de pepsina juntamente com a liberação de histamina (TAKAYAMA et al., 2011; MORAES et al., 2009).

De acordo com Umamaheswari et al. (2007), no processo de metabolização do etanol, ocorre formação de substâncias tóxicas, como o acetaldeído, o que culmina com a liberação do ânion superóxido e hidroperóxidos, ambos espécies reativas que causam graves danos teciduais, que afetam a integridade celular, especialmente, devido aos danos mitocondriais que conduzem ao estresse oxidativo (JAINU; DEVI, 2006).

Estresse também é considerado outro fator que contribui para o surgimento de lesões ulcerativas gástricas, o qual está intimamente relacionado ao estilo de vida moderno e consequentemente, ocasiona sintomas como irritabilidade, ansiedade, impulsividade, dificuldade de concentração, dentre outros (FILARETOVA et al., 2007; MARSELLA, 2009).

O comprometimento de mecanismos protetores, relacionados à microcirculação e sistema antioxidante, tem sido associado à patogênese da lesão da mucosa gástrica relacionada ao estresse. Nesse contexto, envolve reações como acúmulo de neutrófilos, produção de citocinas pró-inflamatórias, geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, redução do fluxo sanguíneo na mucosa e intensificação da secreção ácida gástrica (ODASHIMA et al., 2005; LIMA et al., 2008).

A descoberta da infecção do estômago por *Helicobacter pylori*, no início da década de 1980, foi o fator que motivou a reavaliação na compreensão da etiologia da úlcera péptica (SULLIVAN, 2010). O bacilo gram-negativo *H. pylori* tem sido associado ao desenvolvimento de úlceras gástricas, e os esquemas terapêuticos, em geral, são focados na sua erradicação (CORREA; HOUGHTON, 2007; MALFERTHEINER et al., 2009). Esta bactéria apresenta-se na forma de espiral e atua de modo a colonizar o epitélio gástrico, sobrevivendo num ambiente microaerófilo e inadequado a permanência de microorganismos comuns, devido a sua elevada acidez (USTUN et al., 2006).

Dentre os fatores de virulência relacionados à infecção por *H. pylori* tem-se aqueles associados ao processo de colonização gástrica, a exemplo dos flagelos, enzima urease e os fatores de adesão (codificados pelos genes BabA e BabB); além dos fatores lesivos à mucosa gástrica, como os produtos da urease, citotoxinas (CagA e VagA), proteína de choque térmico, proteases que destroem a camada protetora de muco, dentre outros (KONTUREK et al., 2006).

A característica especial, que permite a sobrevivência do *H. pylori* no ambiente gástrico, reside na intensa atividade da enzima urease, a qual é responsável pela conversão da ureia (principal produto do metabolismo proteico) em amônia (NH_3) e dióxido de carbono (CO_2). A amônia por sua vez, neutraliza os íons H^+ (tampona o meio) e forma hidróxido de amônio (NH_4OH), uma base fraca que só existe em solução aquosa, o que cria uma nuvem alcalina ao redor da bactéria, protegendo-a do ambiente ácido estomacal (RAMSAY; CARR, 2011; BANSAL et al., 2009).

A infecção por *H. pylori* causa hipergastrinemia decorrente da produção de amônia no epitélio e nas glândulas do antro, o que impede a sensibilidade das células D aos verdadeiros níveis de acidez, levando a inibição inadequada da somatostatina, ao aumento da gastrina, e por sua vez, secreção ácida em excesso. O efeito trófico de hipergastrinemia induzida por *H. pylori* produz também hiperplasia das células ECL e das células parietais (DIXON, 2000; USTUN et al., 2006; MALFERTHEINER et al., 2009).

O uso de AINEs é tido como a causa mais comum de lesão da mucosa gastrintestinal no mundo ocidental. Os efeitos sistêmicos dos AINEs ocorrem por meio da inibição da ciclooxygenase (COX), o que compromete a síntese de

prostaglandinas. Como resultado da inibição da síntese PGE₂ e PGl₂, tem-se uma diminuição da produção gástrica de muco e bicarbonato, além de alterações do fluxo sanguíneo, reduzindo assim a barreira protetora da mucosa normal e também a capacidade de reparação das células da mucosa (STEWART; ACKROYD, 2011).

A exposição a uma variedade de agentes presentes no ambiente pode resultar em estresse oxidativo. Uma gama de substâncias químicas, a exemplo daquelas presentes na fumaça do cigarro, pode causar oxidação direta de compostos biológicos, resultando em espécies reativas de oxigênio (ROS) (ZADÁK et al., 2009). Segundo Mehta; Bhargava (2010), o hábito de fumar é um dos fatores que predispõe a formação de úlceras induzidas por AINEs. Além disso, o tabagismo também pode determinar se a presença da bactéria *H. pylori* desencadeará lesões ulcerativas gástricas (MAJUMDAR et al., 2007). Desse modo, fumar *per se* não pode ser considerado um fator etiológico primário, no entanto, pode influenciar negativamente a cicatrização e favorecer as recidivas da úlcera péptica (NIETO, 2012).

1.2.2 Epidemiologia da úlcera péptica

A úlcera péptica é um agravo à saúde, que afeta aproximadamente 10% da população mundial em algum momento de suas vidas (NIETO, 2012). A úlcera duodenal é mais prevalente do que a gástrica, sendo que a primeira, predomina nos países ocidentais, enquanto a segunda, é mais descrita nos países orientais. Essas diferenças são atribuídas a fatores genéticos e a dieta (JAIN et al., 2007; LEE; SAROSI JR, 2011).

Com relação ao sexo, as úlceras duodenais e as gástricas acometem mais homens que mulheres, numa proporção de 4:1 e 3,5:1, respectivamente (JAIN et al., 2007). Quanto à faixa etária, estudos apontam para a prevalência de úlceras duodenais em pessoas mais jovens enquanto as úlceras gástricas são mais prevalentes em indivíduos idosos (GROENEM et al., 2009).

No Brasil, não se conhece de forma precisa a real incidência das úlceras pépticas, devido às subnotificações dos casos, justificadas pela variação das populações estudadas, diferenças na coleta dos dados e critérios selecionados

para o diagnóstico, o que compreende em torno de 1-20% (CASTRO et al., 2009).

Estima-se que mais da metade da população mundial esteja infetada por *H. pylori* (NIETO, 2012), presente em cerca de 25% dos adultos nos países mais desenvolvidos e ultrapassa 80% em países em desenvolvimento (MAJUMDAR et al., 2010). Contudo, aproximadamente 15% das pessoas infectadas chegam a desenvolver úlcera péptica em algum momento de sua vida. Isso se deve a fatores como virulência da cepa da bactéria, genética e hábito de fumar do hospedeiro (MAJUMDAR et al., 2010).

Segundo Ramakrishnan; Salinas (2007), a erradicação dessa bactéria reduz a recorrência da úlcera de 67 para 6% em pacientes com úlceras duodenais e de 59 para 4% em pacientes com úlceras gástricas.

A taxa de infecção por *H. pylori* tem diminuído ao longo do tempo, consequência tanto da melhoria do saneamento, quanto do tratamento da infecção e isto provavelmente explica a diminuição global da úlcera (NAJM, 2011; LEE; SAROSI JR, 2011). Nos países ocidentais, houve uma diminuição do número de casos de úlcera *H. pylori* positivas, ou seja, àquelas associadas à presença de *H. pylori* (SULLIVAN, 2010).

O uso contínuo de AINEs e a infecção por *H. pylori* são fatores relevantes no surgimento da úlcera péptica (STEWART; ACKROYD, 2011). Como a infecção está se tornando menos frequente nos países desenvolvidos, o uso de AINEs é tido como a causa mais comum de lesão, sobretudo de úlceras complicadas por hemorragia e que afetam, em geral, pacientes na sétima e oitava décadas de vida e apresenta uma predominância no sexo masculino, com aproximadamente 1,5 vezes mais casos do que em mulheres (NAJM, 2011; LEE; SAROSI JR, 2011).

A prevalência da úlcera péptica atingiu um pico no início do século XX. Entretanto, alguns estudos epidemiológicos demonstraram que há uma forte diminuição na incidência e no aparecimento de complicações decorrentes da úlcera gástrica ou duodenal, nas últimas décadas. Dados epidemiológicos da Ásia, Austrália, América do Norte, Japão, América do Sul e Europa revelaram um declínio evidente da mortalidade dessas doenças nos últimos anos (NAJM, 2011; SOSTRES; LANAS, 2011). A úlcera péptica e suas complicações ainda

estão fortemente associadas a significativa morbidade e mortalidade, esta última varia entre 7-10% (CHOW; SUNG, 2009).

1.3 Fisiologia gastrintestinal

1.3.1 Secreção ácida gástrica

São constituintes da secreção gástrica o pepsinogênio, o bicarbonato (HCO_3^-), o muco livre, os eletrólitos, o fator intrínseco e o ácido clorídrico (HCl) (FRY, 2009; RAMSAY; CARR, 2011). Todos apresentam importância fisiológica no processo digestório, quer seja por meio da ativação de zimogênios (pepsinogênio) ou eliminação de bactérias, assegurando um ambiente intragástrico estável (JAIN et al., 2007; SCHUBERT, 2011).

O epitélio do corpo e fundo do estômago (mucosa oxíntica) contém quatro tipos de células diferenciadas, células parietais (oxínticas), células principais (zimogênicas), células da superfície da mucosa e células secretoras endócrinas, responsáveis pela produção de HCl, pepsina, muco, além dos hormônios gastrintestinais, respectivamente (MILLS; SHIVDASANI, 2011; SCHUBERT, 2011).

A quantidade de HCl secretada pelas células parietais localizadas na mucosa gástrica oxíntica varia entre os períodos de jejum e alimentação. Porém, quando ocorre estimulação, a concentração pode aumentar para 10 mM (pH 2) ou 100 mM (pH 1), e em algumas situações, chegar a 140 mM (pH 0,85) (FRY, 2009).

A secreção gástrica pode ser dividida em três fases distintas: **a fase cefálica**, regulada parcialmente pelo hipotálamo e mediada pelo nervo vago, estimulada pela visão, cheiro e sabor dos alimentos; **a fase gástrica**, estimulada pelo contato do alimento com o lúmen gástrico, assim como pela distensão do estômago, que acarreta a ativação de receptores sensoriais do corpo e antro gástrico, com a ativação dos reflexos vagais e o consequente aumento da secreção gástrica; **e a fase intestinal**, em que a presença de aminoácidos e peptídeos provenientes do quimo, além da distensão mecânica são os principais fatores de estímulo (FRY, 2009; GOO et al., 2010; RAMSAY; CARR, 2011).

A regulação da secreção gástrica se faz necessária, a fim de evitar uma produção ácido-péptica excessiva que possa vir a sobrepujar os mecanismos de defesa de que a mucosa gástrica dispõe, tendo como consequência, danos aos tecidos (SCHUBERT; PEURA, 2008).

O controle da secreção ácida é realizado por meio da interação dos secretagogos ACh, histamina e gastrina com os receptores específicos na membrana basolateral da célula parietal (SCHUBERT, 2011).

Na estimulação neural, a ACh é liberada de fibras pós-ganglionares parassimpáticas que inervam a mucosa gástrica, e em menor proporção, de fibras do sistema nervoso entérico (SNE); na estimulação parácrina, a histamina é liberada das células semelhantes às enterocromafins (ECL) na mucosa do estômago; e na estimulação endócrina, a gastrina é liberada a partir das células G, localizadas na região do antro (pilórica) e também por células no duodeno. Dessa forma, há uma inter-relação entre as diferentes vias, o que garante a eficiência da secreção ácida, bem como sua regulação (SCHUBERT; PEURA, 2008; FRY, 2009; GOO et al., 2010). Outros estimulantes incluem grelina, glutamato e o peptídeo ativador da ciclase de adenilil pituitária (PACAP) (SCHUBERT, 2011).

Os secretagogos ACh, histamina e gastrina desempenham suas funções fisiológicas, por meio da ativação de receptores específicos acoplados as duas vias de transdução de sinal mais importantes. No caso da ACh e da gastrina pela ativação da fosfolipase C (PLC) e consequente liberação de cálcio intracelular (Ca^{2+}) como segundo mensageiro. Enquanto que a histamina promove aumento dos níveis do segundo mensageiro 3',5'- monofosfato cíclico de adenosina (AMP_c), pelo estímulo da ciclase de adenilil (AC) (SCARPIGNATO et al., 2006; SCHUBERT, 2011), como pode ser observado na (Figura 2).

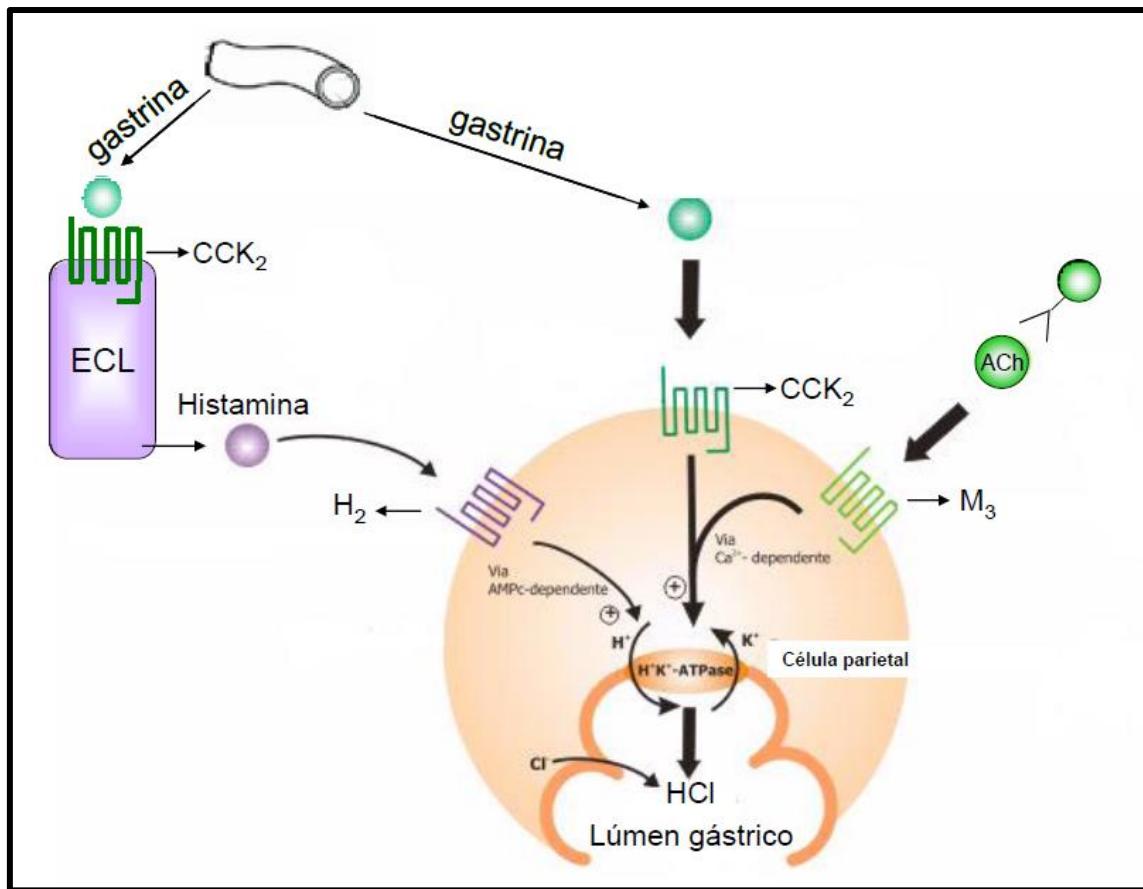


Figura 2 Principais mediadores da secreção ácida gástrica (OLBE et al., 2003 com modificações).

A ACh estimula diretamente a secreção de ácido gástrico ao ativar receptores muscarínicos do tipo M_3 , localizados na membrana basolateral das células parietais. Esses receptores estão acoplados a proteína trimérica $G_{q/11}$ induzindo a ativação de fosfolipase C (PLC), esta por sua vez, promove a hidrólise de fosfolipídios de membrana, o que culmina com a geração de 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG). Por conseguinte, o IP_3 induz aumento da concentração intracelular de cálcio $[Ca^{2+}]_i$, tal condição é fator determinante para que ocorra a fusão das vesículas contendo a bomba de prótons (H^+,K^+ -ATPase) com a membrana apical da célula parietal. (SCHUBERT; PEURA, 2008; RAMSAY; CARR, 2011; SCHUBERT, 2011).

Por estímulo indireto, a ACh também promove a ativação de receptores do tipo M_2 e M_4 , localizados nas células D, o que acarreta inibição da secreção de somatostatina, comprometendo dessa forma, a regulação deste peptídeo sobre a secreção (SCHUBERT; PEURA, 2008; SCHUBERT, 2011). Além

disso, fibras colinérgicas podem exercer efeitos diretos sobre as células G, estimulando a liberação do peptídeo gastrina (JAIN et al., 2007; FRY, 2009).

Durante as refeições, o principal estimulante da secreção ácida é a gastrina. Este hormônio é produzido nas células G e em quantidades muito menores e variáveis, no intestino delgado proximal, cólon e pâncreas (SCHUBERT; PEURA, 2008).

A gastrina pode estimular a secreção ácida de forma direta ao agir via receptores de colecistocinina 2 (CCK-2), localizados na célula parietal, os quais são acoplados a proteína $G_{q/11}$ e induzem aumento da $[Ca^{2+}]_i$ via PLC, como foi descrito anteriormente, o que acarreta fusão das vesículas contendo a H^+,K^+ -ATPase com a membrana apical (FRIIS-HANSEN, 2006; SCHUBERT; PEURA, 2008). De forma indireta, a gastrina estimula a liberação de histamina pelas células ECL, tendo em vista a presença dos receptores CCK-2 nestas células, e esta é considerada a principal forma pela qual este agonista contribui para a secreção ácida (RAMSAY; CARR, 2011; SCHUBERT, 2011).

A histamina pode estimular às células parietais de modo direto, por meio da ligação aos receptores H_2 acoplados a proteína G_s , que ao ser ativado, culmina na estimulação da AC e geração de AMP_c (CHEN et al., 2006; O'NEIL; LEONARD, 2011; RAMSAY; CARR, 2011). Esse agente também induz a secreção de ácido, indiretamente, pela interação aos receptores H_3 ligados à inibição da somatostatina e, portanto, à estimulação da secreção de histamina e da secreção ácida gástrica (SCHUBERT; PEURA, 2008).

Todas as ações estimulatórias dos secretagogos ACh, histamina e gastrina resultam na secreção ácida, via enzima H^+,K^+ -ATPase, formada pela subunidade α , que contém o sítio catalítico e a subunidade β , necessária para a ligação da enzima à membrana apical da célula parietal (SCHUBERT; PEURA, 2008; SCHUBERT, 2011).

A célula parietal secreta HCl por meio de uma troca eletro-neutra dependente de ATP, de um íon H^+ que sai da célula em direção ao lúmen, por um íon K^+ proveniente do lúmen gástrico. Dessa forma, o gradiente de H^+ criado é 10^6 vezes maior do que no sangue. Quando há estímulo, as túbulos-vesículas contendo a H^+,K^+ -ATPase se fundem aos canalículos na membrana apical, para que haja secreção (SCHUBERT, 2011). Existe um nível basal constante de secreção ácida, decorrente da histamina e acetilcolina, que é

aproximadamente 10% da capacidade total da célula parietal. Devido a grande necessidade de energia para o funcionamento da bomba de prótons, as células parietais tem a maior capacidade mitocondrial de todo corpo humano (RAMSAY; CARR, 2011).

Assim como há várias formas de estímulo da secreção ácida, a inibição deste processo também pode ser desencadeada por vários fatores. Dentre eles, pode-se destacar a ação da somatostatina, da colecistocinina (CCK), do peptídeo natriurético atrial (PNA) e pelas prostaglandinas. O principal agente com função de inibição da secreção ácida gástrica é a somatostatina, liberada a partir das células D pilóricas e oxínticas. Cada um desses agentes age diretamente na célula parietal bem como, indiretamente, modulando a secreção nas células neuroendócrinas (SCHUBERT; PEURA, 2008).

Para que ocorra liberação de somatostatina, produzida pelas células D que se localizam na mucosa do antro e fundo do estômago, é necessário que haja uma diminuição do pH, ou seja, que ele se torne mais ácido. Seus efeitos na secreção gástrica são mediados por receptores SST₂, acoplados a proteína G_i, capaz de inibir a atividade da AC e reduzir os níveis de AMP_c (SCARPIGNATO et al., 2006).

Em resposta à presença de lipídios luminais, a CCK é liberada a partir de células enteroendócrinas. Este hormônio gastrintestinal estimula a somatostatina e, portanto, inibe a secreção ácida. É possível encontrar receptores do tipo CCK-1 tanto nos terminais nervosos vagais aferentes, quanto nas células D gástricas (SCHUBERT, 2007).

O peptídeo natriurético atrial (PNA) pertence a uma família de proteínas que guardam semelhança estrutural e está presente em células ECL da mucosa gástrica, sendo sintetizado pelas células do fundo do estômago, seguido das células localizadas no antro e em menor proporção, nas células do corpo gástrico (LI et al., 2006). Em todas as regiões, o PNA estimula a secreção de somatostatina (GOWER et al., 2003), que na região do estômago, leva à inibição de histamina, enquanto que no antro inibe a secreção de gastrina, e, consequentemente, a produção de ácido (SCHUBERT, 2007).

Ao atuarem em seus diferentes subtipos de receptores EP (EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄) as prostaglandinas (PGs) também são capazes de modular a secreção ácida. O subtipo EP₃ ao ser ativado na célula parietal desencadeia

uma cascata de sinalização semelhante a da somatostatina, resultando na inibição da produção de ácido. Todas as vias convergem e modulam a atividade luminal da H^+,K^+ -ATPase (AIHARA et al., 2003; SCARPIGNATO et al., 2006).

1.3.2 Mecanismos de defesa da mucosa gástrica

A mucosa do estômago é permanentemente submetida a condições extremas, pH fortemente ácido (≈ 1), presença de enzimas proteolíticas ativas como a pepsina, refluxo de sais biliares, além de agentes irritantes exógenos, como o álcool e medicamentos (WALLACE, 2008). Porém, pode manter-se íntegra e funcional, devido a mecanismos de defesa que abrangem processos dinâmicos, os quais incluem ações locais e neuro-hormonais (LAINE et al., 2008; TULASSAY; HERSZÉNYI, 2010).

Entre os mecanismos de defesa pode-se destacar os fatores de defesa pré-epiteliais (muco, bicarbonato, fosfolipídios e ácido gástrico), fatores epiteliais (renovação do epitélio celular superficial, fatores de crescimento, PGE_2) e os fatores de defesa sub-epitelial ou endotelial (fluxo sanguíneo, ineração sensorial, reconstituição do epitélio gástrico, além de fatores moduladores da barreira gástrica como óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGs) e o sistema de defesa antioxidante) (LAINE et al., 2008; ZHU; KAUNITZ, 2008).

1.3.2.1 Defesa pré-epitelial

Constituem a primeira linha de defesa da mucosa, a barreira de muco, íons bicarbonato e fosfolipídios tensoativos, que se encontram sob constante renovação e funciona como uma barreira entre o conteúdo do lúmen gástrico e a mucosa (PHILLIPSON et al., 2008), retém íons bicarbonato (secretado pelas células epiteliais), contribuindo para manter o pH aproximadamente neutro. Além disso, a barreira física protege o tecido contra os efeitos danosos, sobretudo o HCl e a pepsina, o que evita a digestão proteolítica do epitélio (ALLEN; FLEMSTROM, 2005; WALLACE, 2008)

Devido a sua ação antimicrobiana, o ácido clorídrico também contribui com a primeira linha de defesa da mucosa gástrica, o que evita o crescimento de bactérias que possam ser ingeridas por meio da água e dos alimentos (SCHUBERT; PEURA, 2008).

O muco fica armazenado em grânulos citoplasmáticos, até que haja exocitose pela região apical das células epiteliais superficiais, quando estimuladas por hormônios gastrintestinais a exemplo da secretina, PGE₂ e agentes colinérgicos (MONTROSE et al., 2006). Trata-se de um gel transparente, viscoso e aderente, o qual contém em torno de 95% de água e 5% de glicoproteínas (mucinas), pequenas quantidades de lipídios, ácidos nucleicos e proteínas (REPETTO; LLESUY, 2002; ALLEN; FLEMSTRÖM, 2005). Reveste toda a mucosa do TGI, e sua proteção está diretamente relacionada à quantidade ou espessura que cobre a superfície da mucosa (LAINE et al., 2008).

Uma camada de fosfolipídios surfactantes, com fortes propriedades hidrofóbicas, reveste a superfície luminal do muco, o que impede que ocorra difusão de ácidos ionizáveis, como HCl proveniente do lúmen do estômago, contribuindo para manutenção da integridade da mucosa gástrica (KONTUREK et al., 2004; TULASSAY; HERSZÉNYI, 2010; RAMSAY; CARR, 2011). No entanto, em determinadas situações, pode haver diminuição da hidrofobicidade dos fosfolipídios, e promover lesões teciduais (ALLEN; FLEMSTRÖM, 2005).

As células superficiais do estômago e duodeno também secretam íons bicarbonato (HCO₃⁻), que tem papel fundamental na geração do gradiente de pH entre a superfície epitelial e o lúmen. Agentes como as PGs, óxido nítrico, além de peptídeos intestinais são considerados mediadores da secreção do bicarbonato (MONTROSE et al., 2006).

1.3.2.2 Defesa epitelial

Uma linha de defesa é formada por uma camada contínua de células epiteliais superficiais, que se encontram fortemente unidas por meio de junções tipo GAP (TULASSAY; HERSZÉNYI, 2010). Por meio de um processo coordenado de proliferação de células progenitoras, o epitélio é continuamente renovado, em torno de 3 a 7 dias, sem que ocorra perda significativa da

continuidade (LAINE et al., 2008). Isto faz com que se previna retrodifusão ácido-péptica, além de secretar muco, bicarbonato, prostaglandinas, proteínas de choque térmico (HSPs), catelicidinas, β -defensinas e peptídeos da família do fator trefoil (TFF) (HIARATA et al., 2009; TULASSAY; HERSZÉNYI, 2010).

As catelicidinas e β -defensinas, ambas expressas no epitélio gastrintestinal são peptídeos catiônicos que tem a capacidade de impedir a colonização bacteriana. Adicionalmente, aceleram a cicatrização das lesões nos tecidos epiteliais gástricos (YANG et al., 2006; WEHKAMP et al., 2007).

Com relação aos TFFs, são fatores que estão relacionados ao processo de proliferação e re-epitelização da mucosa lesionada, por meio da estimulação celular e inibição do processo inflamatório, que ocorre quando genes relacionados à codificação desses fatores são ativados nas células localizadas nas margens da lesão (TARNAWSKI, 2010; HERNÁNDEZ et al., 2009).

As HSPs são proteínas geradas por células epiteliais gástricas em resposta a situações de estresse oxidativo, como a presença de espécies reativas de oxigênio (ROS). Outros fatores como pH ácido, agentes citotóxicos e temperatura elevada também desencadeiam sua liberação (HIARATA et al., 2009; MAUCHLEY et al., 2010). Dentre as funções destas proteínas, pode-se destacar a prevenção da desnaturação proteica intracelular, estabilizando filamentos de actina, inibindo enzimas-chave envolvidas no processo de morte celular, e dessa forma, impedindo que as células iniciem o processo apoptótico (GARRIDO et al., 2006; LAINE et al., 2008).

1.3.2.3 Defesa sub-epitelial

Em situações nas quais há exposição da mucosa gástrica a substâncias irritantes ou quando ocorre o processo de retrodifusão de íons H^+ , é gerado um aumento significativo no fluxo sanguíneo, com consequente hiperemia tecidual (TULASSAY; HERSZÉNYI, 2010). A relação entre o fluxo sanguíneo gástrico e as lesões é devido ao equilíbrio ácido-base no tecido, já que o mesmo previne a acidose tecidual e os danos causados por esse processo. Além disso, é um componente importante na defesa da mucosa gástrica, por promover aporte de nutrientes e oxigênio às células (RAMSAY; CARR, 2011).

Os danos ocasionados por agentes vasoconstritores, tais como leucotrieno C₄, tromboxano A₂ e endotelina são contrabalanceados pelos potentes vasodilatadores, como óxido nítrico (NO) e prostaciclina (PGI₂), liberados, sobretudo das células endoteliais que revestem os microvasos. Tais agentes vasodilatadores mantém a viabilidade celular endotelial, impedindo a agregação plaquetária e aderência de leucócitos, o que previne o comprometimento da microcirculação (LAINE et al., 2008).

A microcirculação da mucosa é fundamental para garantir o suprimento de oxigênio e de nutrientes às células e eliminar substâncias nocivas, o que contribui para o processo de cicatrização das lesões e mantém o pH do microambiente relativamente elevado (WALLACE, 2008; TULASSAY; HERSZÉNYI, 2010).

1.3.2.4 Inervação sensorial da mucosa gástrica

A mucosa gástrica e os vasos localizados na camada submucosa são inervados por neurônios sensoriais aferentes, que em situações de agressão decorrente da presença de ácido ou outros agentes deletérios, desencadeiam uma resposta imediata (HOLZER, 2007; OHNO et al., 2008).

Quando esse sistema é ativado, ocorre liberação de neurotransmissores como a substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), o que culmina com o relaxamento do músculo liso que circunda as arteríolas, e elevação do fluxo sanguíneo que chega a mucosa. O efeito relaxante do CGRP no músculo liso vascular é mediado pelo óxido nítrico (agindo na ciclase de guanilil solúvel), mas também há indícios da participação de prostaglandinas nessa resposta vasodilatadora (EVANGELISTA, 2006; OHNO et al., 2008; TULASSAY; HERSZÉNYI, 2010).

1.3.2.5 Reconstituição do epitélio gástrico

Os processos de proliferação e de migração de células epiteliais são fundamentais para que haja recuperação e manutenção da arquitetura das camadas gástricas, caracterizados por serem eventos dinâmicos e que

constituem um processo chave na cicatrização de úlceras pépticas (TARNAWSKI, 2010; INEU et al., 2008).

Como exemplo de agentes que estimulam proliferação, deslocamento, contratilidade e diferenciação celular pode-se mencionar as citocinas e os fatores de crescimento (fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)), dentre outros (KUMAR et al., 2005; TARNAWSKI, 2010).

1.3.3 Fatores moduladores da barreira gástrica

1.3.3.1 Óxido nítrico (NO)

Um mediador endógeno, que exerce grande importância na manutenção da integridade da mucosa gástrica, compartilhando muitos efeitos biológicos com as prostaglandinas, é o óxido nítrico. Trata-se de um gás, lipossolúvel e instável, que atua como importante fator gastroprotetor (WALLACE, 2008; MUSUMBA et al., 2009).

Uma enzima denominada sintase de óxido nítrico (NOS), que catalisa a reação de oxidação de um nitrogênio guanidínico da L-arginina para formar óxido nítrico e L-citrulina, é a responsável pela produção desta pequena molécula, de estrutura simples, mas com fundamental importância na proteção da mucosa gástrica.

No organismo humano, existem pelo menos três isoformas desta enzima. As constitutivas são dependentes da via Ca^{2+} /calmodulina, empregando-os como cofatores na reação. Dentre elas, tem-se: 1) NOS **neuronal** (nNOS), a qual é expressa no sistema nervoso central e periférico e 2) NOS **endotelial** (eNOS), localizada nas células endoteliais. A terceira isoforma é a NOS **induzível** (iNOS), que atua de modo independente de cálcio/calmodulina e produz grandes quantidades de óxido nítrico. Esta isoforma é encontrada principalmente nos macrófagos, neutrófilos, além de células da musculatura vascular e do endotélio (PACHER et al., 2007; MUSUMBA et al., 2009; NAGESWARARAO et al., 2011).

Em geral, as isoformas constitutivas (eNOS e nNOS) são responsáveis por baixas quantidades de óxido nítrico, o qual executa muitas funções fisiológicas, a exemplo da reparação e cicatrização da úlcera, aumento do fluxo sanguíneo da mucosa e angiogênese por meio do estímulo do VEGF. Já a isoforma induzível (iNOS) pode participar da cicatrização da úlcera por promover o fluxo sanguíneo ou, inversamente, induzir a lesão da mucosa por meio do aumento da apoptose, dependendo de fatores como o tipo do tecido, a quantidade e duração da expressão enzimática e, provavelmente, do estado redox dos tecidos (CALATAYUD et al., 2001; MUSUMBA et al., 2009).

A via da enzima ciclase de guanilil solúvel (GCs), com a consequente produção do monofosfato cíclico de guanosina (GMP_c) e ativação da proteína quinase dependente de GMP_c (PKG) é um ponto chave, para que o NO desempenhe suas funções protetoras no estômago (MONCADA; HIGGS, 2006; LANAS, 2008), a exemplo do relaxamento da musculatura lisa gastrintestinal (PERRINO, 2011), além de acentuar a secreção de muco, bicarbonato e o fluxo sanguíneo na mucosa gástrica (por causar vasodilatação) e por inibir a secreção ácida gástrica, evitar a ativação de neutrófilos e aderência ao endotélio vascular, resultando em citoproteção (FERREIRA et al., 2008; BRZOZOWSKI et al., 2008).

1.3.3.2 Prostaglandinas (PGs)

As prostaglandinas são mediadores lipídicos resultantes do metabolismo do ácido araquidônico, um componente da membrana fosfolipídica das células. Inicialmente, estes componentes sofram ação da enzima fosfolipase A₂, que os libera da membrana, tornando-os alvo para as enzimas ciclooxygenases (COX). Existem três isoformas da COX (COX-1, COX-2 e COX-3), porém somente a COX-1 (constitutiva) e COX-2 (induzível), a partir de eventos enzimáticos levam à produção de eicosanoides, como as prostaglandinas (KAM; SO, 2009; FORNAL et al., 2010).

A manutenção da integridade da mucosa gástrica, frente a agentes necrosantes e ulcerogênicos, se encontra intimamente relacionada com a produção contínua de prostaglandina E2 (PGE₂) e prostaciclina (PGI₂), mediada pela COX-1 e COX-2, que catalisa a etapa limitante na conversão do

ácido araquidônico em prostaglandina endoperóxido (PGG2) e prostanoïdes. Desse modo, PGE₂ e PGI₂ exercem efeitos sobre quase todos os mecanismos de defesa da mucosa (DEY et al., 2006; STARODUB et al., 2008).

As PGs originadas da COX-1 estão envolvidas na citoproteção gástrica (regulação da acidez, fluxo sanguíneo e motilidade, além da produção de muco e bicarbonato). Enquanto que, aquelas geradas pela COX-2 controlam processos inflamatórios, regulação da aderência de leucócitos nos vasos sanguíneos, angiogênese e reparo celular (KONTUREK et al., 2005).

Segundo Wallace (2008), a PGE₂ tem a capacidade de inibir a liberação de histamina, fator de necrose tumoral α (TNF α), fator de agregação plaquetária (PAF), interleucina 1 (IL-1) de macrófagos e a liberação de leucotrieno B4 (LTB-4) e interleucina 8 (IL-8) de neutrófilos.

A partir de quatro receptores acoplados à proteína G (EP₁ a EP₄) é que a PGE₂ exerce suas diversas funções, enquanto que a PGI₂ atua em receptores IP, também acoplados à proteína G (DEY et al., 2006). Em se tratando dos receptores EP, eles utilizam diferentes vias de sinalização: PGE₂ induz a produção de Ca²⁺ intracelular quando ativa receptores EP₁ (inibindo motilidade gástrica e estimulando secreção de bicarbonato) (TANAKA et al., 2005; TAKEUCHI et al., 2006); aumenta AMP_c ao ativar receptores EP₂ (inibindo apoptose e aderência neutrofílica e suprimindo a expressão de TNF α) (TAIRA et al., 2007) e EP₄ (acentua a secreção de muco e bicarbonato, acelera o processo de cicatrização, além de inibir apoptose e aderência neutrofílica e suprimir a expressão de TNF α) (LARSEN et al., 2005; HATAZAWA et al., 2007; TAIRA et al., 2007).

Por fim, quando a PGE₂ se liga a receptores do tipo EP₃, os quais são acoplados a proteína G_i, promovem a diminuição da concentração de AMP_c na célula parietal, resultando na inibição da secreção ácida (KATO et al., 2005; NISHIO et al., 2007). A PGI₂ ocasiona redução da secreção ácida e aumenta a resistência aos danos gástricos induzidos por isquemia e reperfusão, se ligando ao receptor IP (KOTANI et al., 2006; WALLACE, 2008).

1.3.3.3 Grupamentos sulfidrílicos (SHs)

Compostos sulfidrílicos são formados por grupos químicos denominados tióis, os quais apresentam um átomo de enxofre. Podem estar presentes na barreira de muco gástrico, onde atuam estabilizando sua estrutura, por meio da formação de pontes dissulfeto e em inúmeras enzimas do sistema antioxidante. Dessa forma, são classificados em não proteicos e proteicos (JORDÃO-JÚNIOR et al., 1998).

Dentre estes compostos, destaca-se a glutationa, a qual é o mais abundante tiol celular de baixo peso molecular e possui papel central na defesa das células contra o estresse oxidativo (HUBER; ALMEIDA, 2008). Existe sob duas formas, glutationa reduzida (GSH) e glutationa oxidada (GSSG) (JOSEFEZAK et al., 2012). A GSH é considerada um excelente nucleófilo, devido a sua capacidade de doar elétrons a outros compostos, o que a torna um bom redutor (HUBER et al., 2008).

Devido ao fato de que a GSH é encontrada em grandes concentrações nos organismos aeróbios, foi estabelecida a hipótese de que esta molécula tenha surgido na evolução bioquímica, como um protetor contra espécies reativas geradas por processos oxidativos, sobretudo na mitocôndria (HUBER et al., 2008).

1.3.3.4 Sistema antioxidante

Quando existe a presença de um número ímpar de elétrons (um ou mais desemparelhados), posicionados em orbitais mais externos (atônicos ou moleculares), localizados em átomos de hidrogênio, carbono, nitrogênio ou enxofre, têm-se os radicais livres. Nessa situação, é verificada uma elevada instabilidade eletroquímica (VALKO et al., 2007; HENKEL, 2011).

Do ponto de vista fisiológico, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), a exemplo do ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de espécies reativas de nitrogênio (RNS), como o óxido nítrico (NO) e o radical peroxinitrito ($ONOO^-$), desempenham importantes funções biológicas, como na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor. Nesse sentido, constituem elementos fundamentais do metabolismo humano (VASCONCELOS et al., 2007; PAN et al., 2008; HENKEL, 2011).

No entanto, em determinadas situações de elevada produção destas espécies, por apresentarem alta reatividade química, tornam-se responsáveis por alterações celulares graves, o que caracteriza um quadro de estresse oxidativo. Moléculas e estruturas dentro da célula, como as proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos, passam a ser alvo, o que resulta no comprometimento de funções biológicas, na formação de compostos tóxicos e até em morte celular (necrose e apoptose), como consequência desse processo oxidativo (BARREIROS et al., 2006; INEU et al., 2008; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Quando se verifica a grande disponibilidade e susceptibilidade dos ácidos graxos, localizados na membrana celular, é fácil compreender os motivos pelos quais esse componente da célula é um alvo tão importante da ação das espécies reativas. Um biomarcador relevante de lesão oxidativa resultante desse processo é o malondialdeído (MDA), gerado pela decomposição dos produtos finais da reação (ZADÁK et al., 2009; SOUZA et al., 2006).

Além de causar oxidação de moléculas biológicas, ROS são capazes de modular vias de sinalização intracelular ou agir como substâncias parácrinas, por meio da ativação de citocinas, angiotensina e fatores de crescimento (GANGULY et al., 2006; FIALKOW et al., 2007).

Segundo Suzuki et al. (2012), existem evidências concretas que correlacionam o estado de estresse oxidativo com mecanismos que originam inúmeras afecções gástricas, tais como gastrites, úlceras pépticas e carcinomas, a exemplo das lesões na mucosa induzidas pelo etanol, as quais alteram o metabolismo nas mitocôndrias, o que favorece a produção em excesso de radicais livres. Outros agentes etiológicos envolvidos na patogênese da úlcera péptica também promovem aumento nas espécies reativas, como os processos isquêmicos, o uso contínuo de AINEs (induz recrutamento de leucócitos e consequente produção de radicais) e a infecção por *H. pylori* (aumento de ROS e RNS, mediado por neutrófilos e macrófagos).

A fim de evitar que grandes concentrações de espécies reativas, ocasionem danos celulares, o organismo possui um sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático (VALKO et al., 2007).

Caracterizado como a primeira linha de defesa, o sistema antioxidante enzimático é composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do ânion radical superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a catalase (CAT) que atua na decomposição de H_2O_2 a O_2 e H_2O , a glutationa peroxidase (GPx), que age sobre peróxidos em geral, neste caso, com participação da glutationa, além da glutationa redutase (GR), que catalisa a conversão da glutationa da forma oxidada (GSSG) para a forma reduzida (GSH), o que contribui para prevenir danos oxidativos às macromoléculas na célula (VASCONCELOS et al., 2007; ZABLOCKA; JANUSZ, 2008; BLAIR, 2010) (Figura 3).

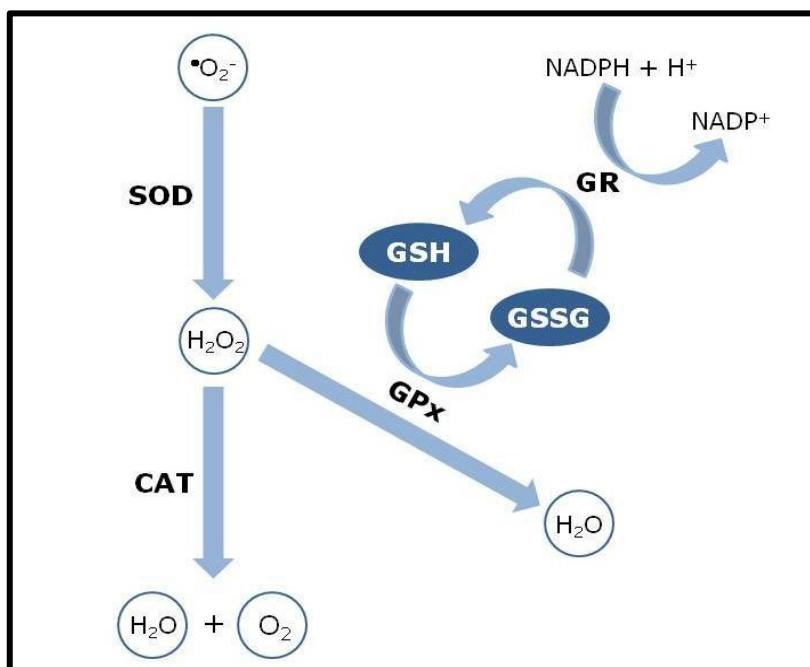


Figura 3 Representação esquemática do sistema antioxidante enzimático e não enzimático. Legenda: SOD = superóxido dismutase; CAT = catalase; GPx = glutationa peroxidase; GSH = glutationa reduzida; GSSG = glutationa oxidada; GR = glutationa redutase; NADP^+ = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (KWIECIEN et al., 2002 com modificações).

O sistema antioxidante não enzimático é composto pelos captadores de radicais livres de baixo peso molecular, com destaque para as substâncias que contém grupos tióis, a exemplo da GSH, principal composto antioxidante intracelular (Figura 3). Além disso, têm-se ainda os tocoferóis, vitamina C

(ácido ascórbico), vitamina E, ácido úrico e β -caroteno (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; VASCONCELOS et al., 2007).

1.4 Terapêutica da úlcera péptica

De uma forma geral, o tratamento da úlcera péptica está centrado no uso de dois grandes grupos de fármacos, aqueles que modulam a ação de fatores agressores (por neutralização ou inibição da secreção ácida), e aqueles que estimulam mecanismos citoprotetores da mucosa gástrica (UMAMAHESWARI et al., 2007; MEJIA; KRAFT, 2009). Dessa forma, com o entendimento da patogênese da doença, foram desenvolvidas várias classes de medicamentos, os antiácidos, antagonistas dos receptores muscarínicos, antagonistas dos receptores histaminérgicos H_2 , inibidores de bomba de prótons, agentes citoprotetores, além dos fármacos que combatem a infecção por *H. pylori* (BHATTACHARYA et al., 2007; BANSAL; GOEL, 2012).

Para neutralizar a acidez gástrica foi utilizado durante muito tempo os antiácidos ou suas associações. Porém, por alterar o pH gástrico e urinário, os antiácidos apresentam incompatibilidade com inúmeros fármacos, além de proporcionarem o surgimento de efeitos colaterais como constipação ou diarreia, dependendo do antiácido, sendo utilizados hoje basicamente como um paliativo dos sintomas (YUAN et al., 2006; BRUNTON et al., 2006; SCHUBERT; PEURA, 2008). Entre os mais utilizados tem-se bicarbonato de sódio (NaH_2CO_3), carbonato de cálcio ($CaCO_3$), hidróxido de alumínio ($Al(OH)_3$) e hidróxido de magnésio ($Mg(OH)_2$) ou associações (JAIN et al., 2007).

Na perspectiva de inibir a secreção ácida gástrica surgiram os anticolinérgicos, a exemplo da pirenzepina e telenzepina (JAIN et al., 2007). Entretanto, devido a sua eficácia relativamente baixa, uma vez que interagem com receptores muscarínicos do tipo M_1 e por apresentarem efeitos colaterais como taquicardia, secura na boca, cefaleia e confusão mental, o uso dessa classe de drogas tornou-se obsoleto (HOOGERWERF; PASRICHA, 2005; JAIN et al., 2007).

Os antagonistas de receptores H_2 como cimetidina, ranitidina, famotidina, nizatidina e roxatidina surgiram com o intuito de inibir a interação da histamina com o seu receptor H_2 , reduzindo o volume, a concentração de íons

H^+ do suco gástrico e inibindo efeitos cronotrópicos, inotrópicos e vasodilatadores da histamina. Os antagonistas do receptor H_2 são seletivos e tem poucos efeitos sobre o receptor H_1 . Inibem também a secreção ácida promovida pela gastrina, agonistas muscarínicos, alimentos, distensão fúnica, além da secreção ácida basal e noturna (JAIN et al., 2007; MAHDY; WEBSTER, 2011). Apresentam entre os efeitos colaterais: diarreia, cefaleia, tontura, fadiga, dor muscular, constipação e ainda ginecomastia em homens e galactorreia em mulheres (HOOGERWERF; PARSIRCHA, 2005; PARIKH; HOWDEN, 2010).

Embora os antagonistas de receptor H_2 sejam eficazes para reduzir a secreção de ácido, com um tratamento que conduz à cura em 80-90% das úlceras pépticas, eles não bloqueiam completamente a gastrina e a estimulação vagal ainda pode induzir a secreção de ácido pela célula parietal (STEWART; ACKROYD, 2011).

Com o avanço dos estudos surgiram os agentes antissecradores da classe benzimidazol sulfóxido, responsáveis pela inibição do bombeamento de prótons pela H^+ , K^+ -ATPase, como forma de controlar o pH gástrico (JAIN et al., 2007). Os inibidores de bomba (omeprazol, lansoprazol, rabeprazol, pantoprazol e esomeprazol) funcionam como pró-fármacos e são ativados em meio ácido, resultando na formação de uma sulfenamida ou ácido sulfênico (AIHARA et al., 2003; HOOGERWERF; PARSIRCHA, 2005; NIETO, 2012). Reduz as secreções de ácido gástrico basal e estimuladas por alimentos. O fármaco é uma base fraca e se acumula no ambiente ácido dos canalículos da célula parietal estimulada. A forma ativa reage de modo covalente (irreversível) com o grupo sulfidril de cisteína no domínio extracelular da H^+ , K^+ -ATPase, inibindo sua ação, o que leva a uma cicatrização mais rápida da úlcera comparado aqueles que utilizam somente antagonistas H_2 (HOOGERWERF; PARSIRCHA, 2005; STEWART; ACKROYD, 2011). O uso prolongado pode resultar em hipergastrinemia, hipersecreção ácida rebote, náuseas, diarreia, tontura e má absorção (JAIN et al., 2007; SCHUBERT; PEURA, 2008).

Em situações em que a doença ulcerativa encontra-se associada à infecção por *H. pylori*, a terapêutica a ser utilizada se constitui em uma combinação de antagonistas do receptor H_2 (ranitidina) ou inibidores da H^+ , K^+ -ATPase (omeprazol) a antimicrobianos (claritromicina e amoxicilina ou

metronidazol) (FUCCIO et al., 2007; SUNG et al., 2009; MAJUMDAR et al., 2010).

Nos últimos anos passou-se a ter uma preocupação não só com o controle da secreção ácida e remoção de agentes lesivos (AINEs e *H. pylori*) (SCHUBERT; PEURA, 2008), mas também, com agentes que possam aumentar os fatores protetores da mucosa como citoprotetores (LAINE et al., 2008) e entre os representantes dessa classe encontram-se o sucralfato, sais de bismuto, misoprostol (análogo da PGE₂ de uso hospitalar) e a carbenoxolona (ferramenta farmacológica) (MÖSSNER; CACA, 2005; ALTMAN, 2005; JAIN et al., 2007).

O sucralfato (complexo de hidróxido de alumínio e sacarose sulfatada), cuja forma residual, após a liberação do metal, é capaz de formar géis complexos com o muco, diminuindo sua degradação, limitando a retrodifusão de íons H⁺, além de inibir a ação da pepsina e estimular a secreção de muco, HCO₃⁻ e prostaglandinas. O misoprostol atua inibindo a secreção de ácido, aumentando o fluxo sanguíneo e a secreção de muco e de bicarbonato, mas ocasiona diarreias, cólicas abdominais e abortos) (BRUNTON, 2001; MÖSSNER; CACA, 2005; ALTMAN, 2005; JAIN et al., 2007). A carbenoxolona está relacionada com a possível habilidade da mesma em alterar a composição e quantidade de mucina (HOOGERWERF; PASRICHA, 2005), além de aumentar a produção, secreção e viscosidade do muco (ALTMAN, 2005).

Diante das considerações, se faz necessário buscar na pesquisa novos alvos terapêuticos, a exemplo das plantas medicinais, a fim de se garantir produtos seguros, de alta eficácia, poucos efeitos colaterais e ausência de recidiva.

1.5 Plantas como alternativa terapêutica

Nos últimos anos houve um aumento do interesse a respeito dos organismos vegetais como novas fontes terapêuticas, o que estimulou inclusive, o setor industrial farmacêutico (BRAZ-FILHO, 2010). A forte correlação dos produtos naturais com a funcionalidade biológica, juntamente com sua ampla diversidade química é a justificativa para impulsionar os esforços atuais na descoberta de novos fármacos, a partir destes produtos, em

especial, nas plantas medicinais (GANESAN, 2008). Estas características os distinguem de moléculas sintetizadas pelo homem e enfatizam seu papel como fonte complementar e relevante na pesquisa farmacêutica (ROSÉN et al., 2009 apud SCHMITT et al., 2011).

Com relação ao Brasil, quando se considera a grande diversidade da flora nacional, existem poucas espécies com atividade biológica comprovada cientificamente, sendo utilizadas principalmente pela população local de forma empírica, o que significa um potencial terapêutico ainda a ser descoberto (EDRIS, 2007 apud RABELO et al., 2013). Dispõe-se, portanto, de um grande acervo natural de vegetais nos ambientes aquáticos e terrestres; um potencial químico adormecido, de pujança inteiramente desproporcional ao esforço relativamente pequeno, das pesquisas desenvolvidas para seu conhecimento e utilização (BRAZ-FILHO, 2010).

Muitas drogas sintéticas usadas no tratamento atual da úlcera péptica estão relacionadas a possibilidade de interações medicamentosas, efeitos adversos e aumento dos casos de reincidência da doença (BANSAL; GOEL, 2012).

Nosso grupo de pesquisa tem estudado nos últimos anos, inúmeras espécies vegetais frente à atividade gastroprotetora, cicatrizante e antiulcerogênica a exemplo de *Syngonanthus arthrotrichus* (BATISTA, 2004), *Herissantia crispa* (LIMA, 2008), *Maytenus rigida* (SANTOS, 2008), *Maytenus obtusifolia* (MOTA, 2009), *Praxelis clematidea* (FALCÃO, 2011), *Combretum duarteanum* (LIMA, 2011), *Xylopia langsdorffiana* (MONTENEGRO, 2011) e *Hyptis suaveolens* (JESUS, 2012).

Dessa forma, a busca por um medicamento antiulcerogênico ideal ainda persiste, e tem sido estendida as plantas medicinais, devido a fatores como facilidade de acesso, melhores resultados que as drogas convencionais, custo reduzido e menores efeitos adversos (BANSAL; GOEL, 2012).

A literatura científica tem relacionado os efeitos gastroprotetores e antiulcerogênicos mediados por produtos vegetais, principalmente a mecanismos antissecrétórios de HCl (LAKSHMI et al., 2010); citoprotetores, estimulando muco e prostaglandinas (LUIZ-FERREIRA et al., 2011); anti-inflamatórios (ESCOBEDO-HINOJOSA et al., 2012), antioxidantes, tais como elevação nos níveis de compostos sulfidrila, varredura de radicais livres,

diminuição da peroxidação lipídica (FARIA et al., 2012) e atividade anti-*Helicobacter pylori* (ESCOBEDO-HINOJOSA et al., 2012), dentre outros.

1.5.1 *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek (Celastraceae)

As espécies da família Celastraceae são amplamente encontradas em regiões tropicais e subtropicais, incluindo o norte da África, América do Sul e algumas partes do leste da Ásia, particularmente na China. Esta família se constitui de aproximadamente 88 gêneros e 1300 espécies, as quais crescem como pequenas árvores e possuem cascas e folhas resinosas. São utilizadas desde a antiguidade devido a seus extratos apresentarem diversas propriedades medicinais (SPIVEY et al., 2002).

O gênero *Maytenus* é o maior da família Celastraceae e está inserido na subfamília Celastroideae. São reconhecidas cerca de 80 espécies distribuídas por todo território brasileiro (CARVALHO-OKANO; LEITÃO FILHO, 2005). Espécies de *Maytenus* são encontradas em diferentes formações vegetais, como a Mata Atlântica (*M. distichophylla* Mart. ex Reissek, *M. macrophylla* Mart.), Mata de Altitude (*M. erythroxylon* Reiss.) e Campos Rupestres (*M. opaca* Reiss.). Entretanto foi registrado um número maior de espécies em ambientes com vegetação de Caatinga (*M. truncata* Reiss., *M. imbricata* Mart. ex Reiss., *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss., *M. catingarum* Reiss., *M. impressa* Reiss., *M. obtusifolia* Mart.), distribuídas predominantemente entre a Bahia e o Ceará. Tradicionalmente utilizadas pelos indígenas em infusões, as folhas, de diversas espécies de *Maytenus* existentes no Brasil, são utilizadas no tratamento de afecções gástricas (hiperacidez, úlceras gástricas, duodenais e gastrite crônica) (ROCHA et al., 2004; BAGGIO et al., 2007).

Quimicamente, o gênero *Maytenus*, é caracterizado pela presença de metabólitos secundários como flavonoides, triterpenos, sesquiterpenos, alcaloides e taninos condensados (JOFFILY; VIEIRA, 2005). Entre os metabólitos secundários isolados de espécies deste gênero, tem-se os triterpenoides obtidos de *M. ilicifolia* (QUEIROGA et al., 2000; OHSAKI et al., 2004), alcaloides sesquiterpeno piridino de *M. aquifolium* (CORSINO et al., 1998), ácido maitenóico obtido de *M. senegalensis* (SOSA et al., 2007), além de flavonoides das duas primeiras espécies citadas.

A espécie *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek é conhecida popularmente como “casca amarela” ou “pau-colher”. Da fase acetato de etila (FaAcOEt-*Md*) foi isolado um novo triterpeno da classe friedelano, o composto 6,12-dihidroxi-friedelan-1-en-3,16,21-triona, denominado “Maytensifolona”, além de outros dois triterpenos da mesma classe, isolados da fase clorofórmica, 12-hidroxi-friedelan-3-ona e 29-hidroxi-friedelan-3-ona (DUARTE et al., 2012). Não há estudos farmacológicos descritos na literatura científica com esta espécie vegetal, e avaliações fitoquímicas mais aprofundadas estão sendo realizadas pelo grupo do Prof. Dr. Josean Fechine Tavares.

1.5.2 Considerações sobre os triterpenos

Os terpenos são metabólitos secundários que derivam biossinteticamente de unidades isoprénicas (C_5H_8) e compreendem uma das principais classes de produtos naturais com acentuada relevância em processos fisiológicos e patológicos. Sua classificação se dá de acordo com a quantidade de unidades de isopreno presentes em sua estrutura, podendo ser monoterpenos (C_5H_8)₂, sesquiterpenos (C_5H_8)₃, diterpenos (C_5H_8)₄, triterpenos (C_5H_8)₅ e tetraterpenos (C_5H_8)₆ (DEWICK, 2002; BREITMAIER, 2006).

Os triterpenos pertencem a um amplo grupo de compostos frequentemente isolados de fontes vegetais. As vias biossintéticas de muitos esqueletos moleculares são conhecidas e a gama de atividades biológicas descritas os tornam atrativos, como novas drogas em potencial (ALVARENGA; FERRO, 2005).

Estudos tem demonstrado atividade gastroprotetora de inúmeros triterpenos, a exemplo do ácido acetil aleurítolico, isolado de *Jatropha isabelli*, o qual foi eficaz em reduzir úlceras induzidas por etanol acidificado em camundongos (PERTINO et al., 2007) e do ácido 3 α -hidroximasticadienoico isolado de *Amphipterygium adstringens*, que protegeu a mucosa gástrica dos danos induzidos pelo etanol, com possível participação de grupamentos sulfidrílicos (ARRIETA et al., 2003). Sánchez et al. (2006) avaliou sete triterpenos, e verificou que todos apresentaram atividade gastroprotetora.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a atividade gastroprotetora do extrato metanólico bruto (EMeOH-*Md*) e da fase acetato de etila (FaAcOEt-*Md*) obtidos das folhas de *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek, em modelos animais que mimetizam a úlcera gástrica no homem.

2.2 Específicos

- ✓ Avaliar a toxicidade pré-clínica aguda do EMeOH-*Md*;
- ✓ Avaliar o efeito gastroprotetor do EMeOH-*Md* frente ao agente lesivo HCl/etanol;
- ✓ Avaliar o efeito do EMeOH-*Md* e da FaAcOEt-*Md* em modelos clássicos de indução aguda de úlceras (etanol, estresse, AINEs e contensão do suco gástrico);
- ✓ Investigar o efeito das amostras vegetais sobre os parâmetros bioquímicos da secreção gástrica (pH, concentração de íons H⁺, volume do conteúdo gástrico);
- ✓ Elucidar mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora de *Maytenus distichophylla*.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Material botânico

O material vegetal utilizado nos experimentos de toxicidade aguda e investigação da atividade gastroprotetora em animais foi obtido das folhas de *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek, coletadas no Pico do Jabre (serra de Teixeira) município de Maturéia, estado da Paraíba, em setembro de 2010. A espécie foi identificada pela Dra. Maria de Fátima Agra e uma exsicata encontra-se depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) da UFPB, sob código de identificação M. F. Agra et al., 5137.

O extrato etanólico bruto (EMeOH) e a fase acetato de etila (FaAcOEt) obtidos das folhas de *M. distichophylla* (Figura 4) foram obtidos da parceria com a equipe do Prof. Dr. Josean Fechine Tavares, integrante do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos/CCS/UFPB.



Figura 4 Partes aéreas de *Maytenus distichophylla*. (Foto: Alex Popovkin/2008)

3.1.2 Local da pesquisa

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Farmacologia do Trato Gastrintestinal localizado no Centro de Biotecnologia (CBiotec), da Universidade Federal da Paraíba, no período de outubro/2011 a janeiro/2013.

3.1.3 Procedimentos fitoquímicos: obtenção do extrato metanólico (EMeOH-*Md*) e fase acetato de etila (FaAcOEt-*Md*)

O material vegetal seco e pulverizado das folhas de *Maytenus distichophylla* (4000 g) foi submetido à maceração exaustiva com metanol, resultando numa solução metanólica, a qual foi filtrada e concentrada em rotaevaporador, obtendo-se o EMeOH-*Md*.

Parte do extrato metanólico bruto (100 g) foi ressuspensão em solução metanol/água (7:3) e submetido a sucessivas partições líquido-líquido, utilizando solventes de polaridades crescentes (hexano, diclorometano e acetato de etila), para obtenção das fases hexânica, diclorometânica e acetato de etila, respectivamente, conforme representado na (Figura 5).

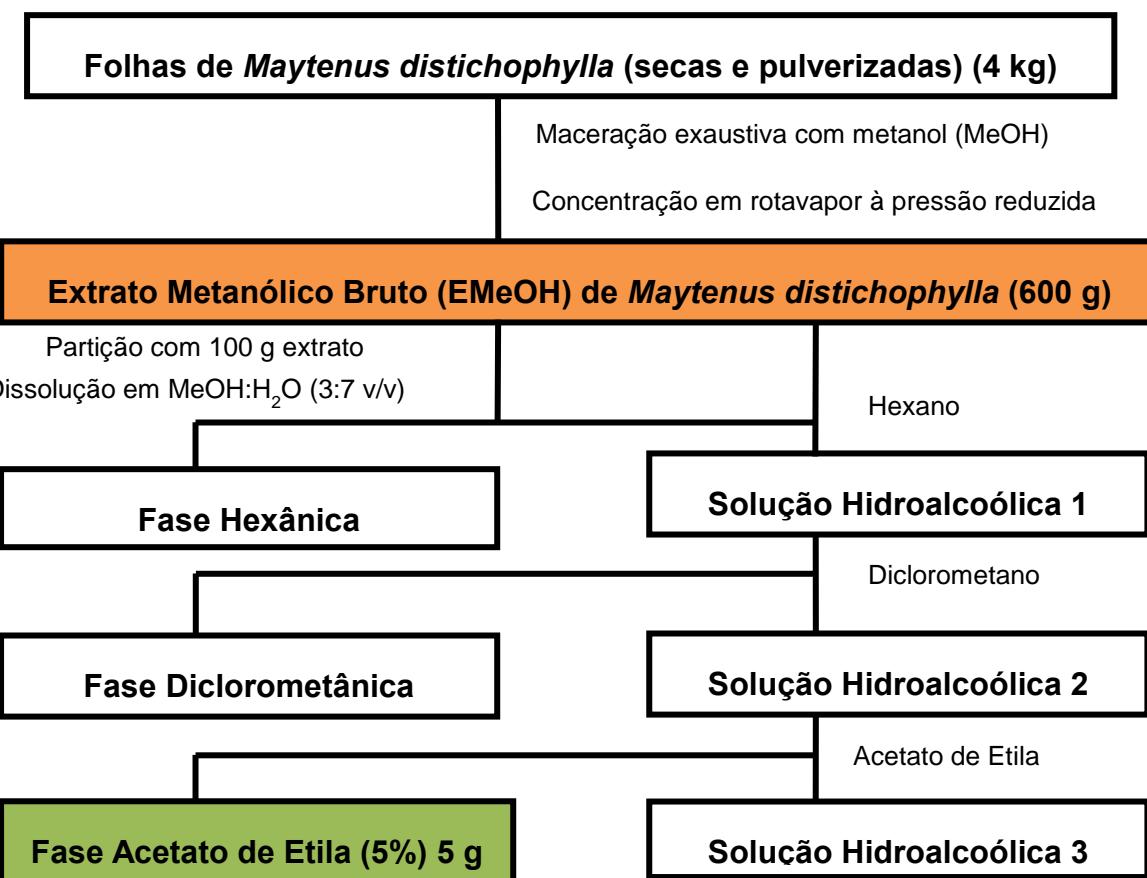


Figura 5 Marcha fitoquímica para obtenção do EMeOH e FaAcOEt das folhas de *Maytenus distichophylla*.

3.1.4 Animais

Para realização deste trabalho foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) albinos machos e fêmeas, linhagem Swiss, pesando entre 25-35 g (Figura 6A) ou ratos (*Rattus norvegicus*) albinos, linhagem Wistar, pesando entre 180-250 g (Figura 6B), provenientes do biotério Prof. Thomas George localizado no CBiotec/UFPB. Os animais foram aclimatados às condições do biotério local, por cerca de sete dias antes dos experimentos, mantidos sob temperatura de 21 ± 1 °C, ciclos claro-escuro de 12 horas, alimentados com ração Purina® tipo pellets e água *ad libitum*.

Os animais ($n = 5-8$) foram distribuídos em grupos controle negativo (solução salina 0,9%), controle positivo (droga de referência ou ferramenta farmacológica) e amostra vegetal (EMeOH-*Md* ou FaAcOEt-*Md*), os quais foram submetidos a um jejum de 12-24 horas, que variou de acordo com

estabelecido nas metodologias empregadas, e neste caso, foram mantidos em gaiolas especiais, contendo fundo falso (tela) para evitar a coprofagia, com livre acesso a água até 1 hora antes dos testes.

Todos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, seguindo os princípios internacionais para o estudo com animais de laboratório (ZIMMERNAM, 1983) e quando necessário de acordo com o protocolo experimental, foram anestesiados com cloridrato de quetamina 5% (anestésico) e cloridrato de xilazina 2% (relaxante muscular), no intuito de diminuir a dor e o sofrimento.

Os protocolos experimentais realizados neste trabalho foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA/UFPB) sob o registro nº 0508/11 (ANEXO 1).

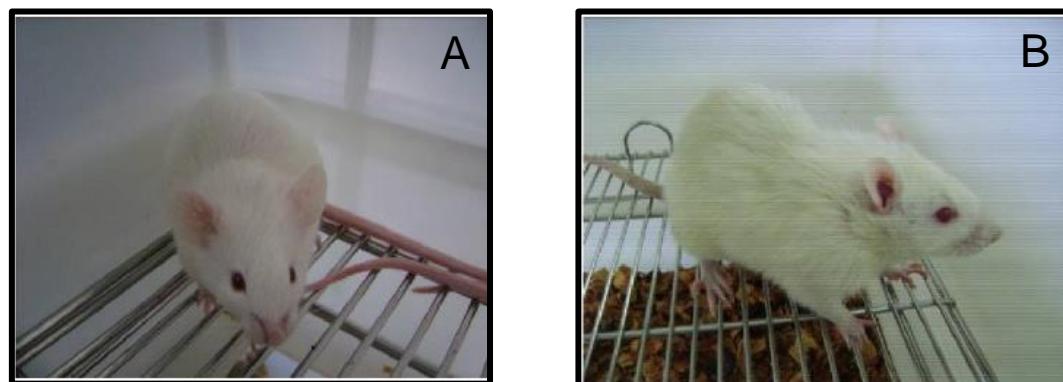


Figura 6 Animais utilizados nos modelos experimentais: camundongo Swiss (*Mus musculus*) (A) e rato Wistar (*Rattus norvegicus*) (B). (Foto: arquivo do Laboratório de Farmacologia do TGI).

3.1.5 Drogas utilizadas

Carbenoxolona (SIGMA Chemical Co, U.S.A), cimetidina (SIGMA Chemical Co, U.S.A), piroxicam 20 mg (HEXAL, Brasil), N-etilmaleimida (SIGMA Chemical Co, U.S.A), N-nitro-L-arginina-metil-éster (SIGMA Chemical Co, U.S.A), cloreto de sódio P.A. (QUIMEX-MERCK, Brasil), hidróxido de sódio (QUIMEX-MERCK, Brasil), fenolftaleína (RIEDEL-DE HAËN, Germany), etanol (MERCK, Germany), *alcian blue* (SIGMA Chemical Co, U.S.A), ácido clorídrico (MERCK, Germany), cloridrato de quetamina 5% (VETANARCOL), cloridrato

de xilazina 2% (DORCIPEC), cloreto de magnésio (MERCK) e sacarose (SIGMA Chemical Co, U. S. A).

O EMeOH-*Md* e a FaAcOEt-*Md* foram solubilizados em solução salina 0,9%, assim como as substâncias utilizadas como controle positivo, carbenoxolona e cimetidina, além dos inibidores da enzima sintase de óxido nítrico e dos grupamentos sulfidrílicos, N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) e N-etilmaleimida (NEM), respectivamente.

3.2 MÉTODOS

Os métodos utilizados neste estudo foram realizados conforme o fluxograma experimental apresentado na Figura 7.

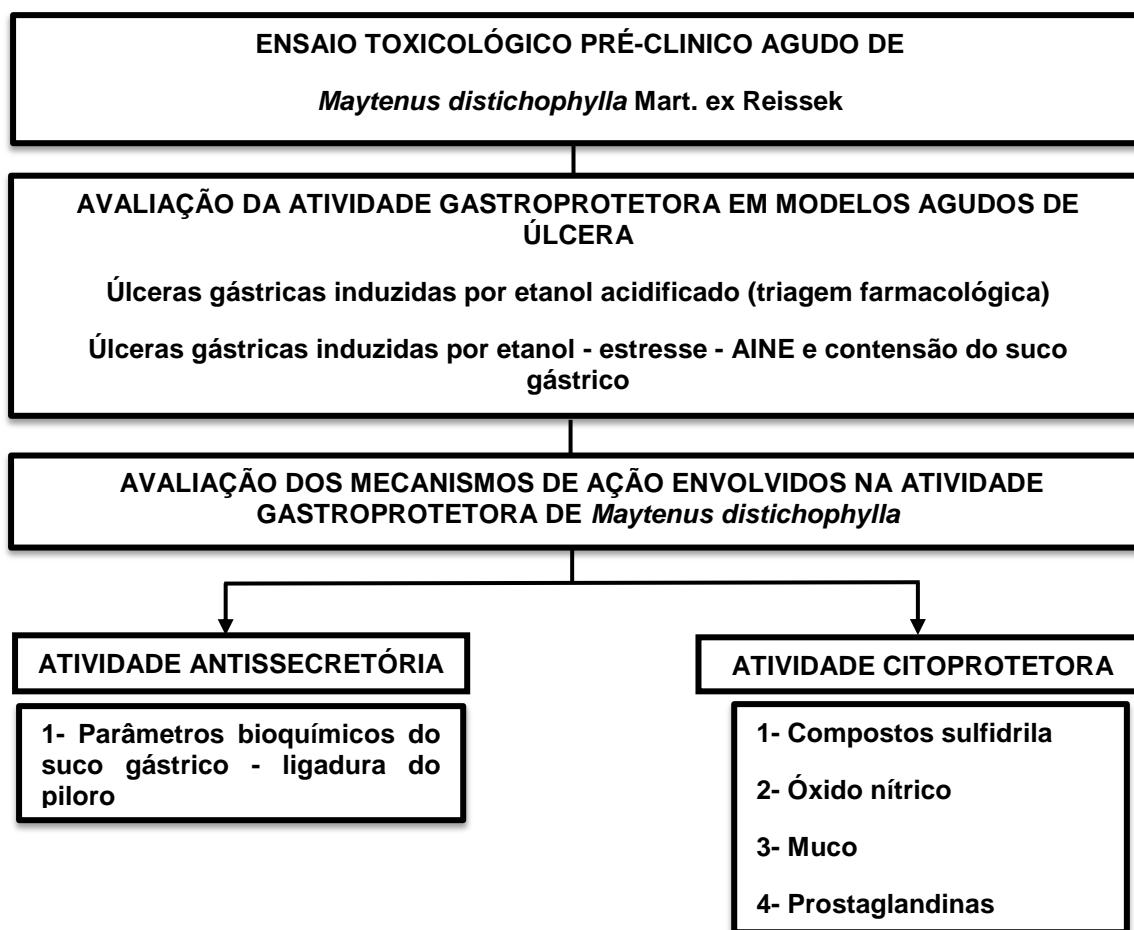


Figura 7 Fluxograma experimental

3.2.1 Ensaio toxicológico pré-clínico agudo de *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek

O EMeOH-*Md* e a FaAcOEt-*Md* foram submetidos ao ensaio toxicológico no intuito de avaliar as alterações comportamentais sobre o SNC e SNA, presença ou não de morte, conforme modelo descrito por Almeida et al. (1999) (ANEXO 2), evolução ponderal, consumo de água e ração, alterações e índice dos órgãos alvo. Nesta perspectiva foram utilizados camundongos albinos machos e fêmeas da linhagem Swiss pesando entre 25-35 g. Os animais foram divididos em 4 grupos, 2 grupos de animais machos e 2 grupos de animais fêmeas e posteriormente, submetidos a um jejum de 12 horas. Cada grupo recebeu o veículo solução salina 0,9% (10 mL/kg) que foi considerado controle negativo ou EMeOH-*Md* na dose de 2000 mg/kg, por via oral (gavagem).

Após a administração, os animais foram observados nos primeiros 30 minutos, 1, 2, 3 e 4 horas, e uma vez ao dia, até completar 72 horas (conforme preconizado pela RE 90/2004 da ANVISA) e comparados ao controle negativo. Além disso, foi verificada a ocorrência ou não de mortes ao longo dos 14 dias de observação.

Ao final desse período, os animais foram eutanasiados, seus órgãos (fígado, coração, baço, rins e pulmão) foram removidos, pesados e examinados macroscopicamente.

3.2.2 Avaliação da atividade gastroprotetora de *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek

Para avaliar se o EMeOH obtido de *M. distichophylla* apresentava atividade gastroprotetora, inicialmente foi realizada uma triagem farmacológica com diferentes doses usando o modelo de indução aguda de úlcera tendo como agente lesivo etanol acidificado.

Na avaliação da atividade antiulcerogênica do EMeOH-*Md* e FaAcOEt-*Md* foram utilizados modelos experimentais de indução aguda de úlceras gástricas (etanol absoluto, estresse por imobilização e frio, AINE (piroxicam) e contensão de suco gástrico por ligadura do piloro), os quais garantem reprodutibilidade e mimetizam as causas da úlcera gástrica no homem.

Para corroborar aos resultados obtidos nesses estudos, bem como inferir sobre a atividade antissecradora, foi realizada a avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico (volume do suco gástrico, pH e concentração de íons H⁺) utilizando o modelo de ligadura de piloro.

Uma vez constatado o efeito gastroprotetor do EMeOH-*Md* e da FaAcOEt-*Md*, partiu-se para a elucidação dos mecanismos de ação envolvidos nessa atividade farmacológica, avaliando a participação dos grupamentos sulfidrílicos, óxido nítrico, muco e prostaglandinas.

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e o estômago aberto ao longo da grande curvatura, as lesões ulcerativas foram quantificadas macroscopicamente por meio da utilização de uma lupa OLYMPUS Optical TL3 – SZ40 e expressas como índice de lesão ulcerativa (ILU) (Figura 8), conforme o número e a severidade de lesões (SZELENYI; THIEMER, 1978):

Nível 1: pontos hemorrágicos e ulcerações até 1mm;

Nível 2: ulcerações com 2 mm;

Nível 3: ulcerações profundas a partir de 3 mm.

$$\text{ILU} = \Sigma (\text{lesões nível 1} \times 1) + (\text{lesões nível 2} \times 2) + (\text{lesões nível 3} \times 3)$$

Para quantificação da área de lesão ulcerativa, nos modelos que avaliaram a participação dos grupamentos sulfidrílicos, óxido nítrico e prostaglandina na gastroproteção mediada pelas amostras vegetais de *M. distichophylla*, foi utilizado o programa AVSoft Bioview Spectra 4.0®

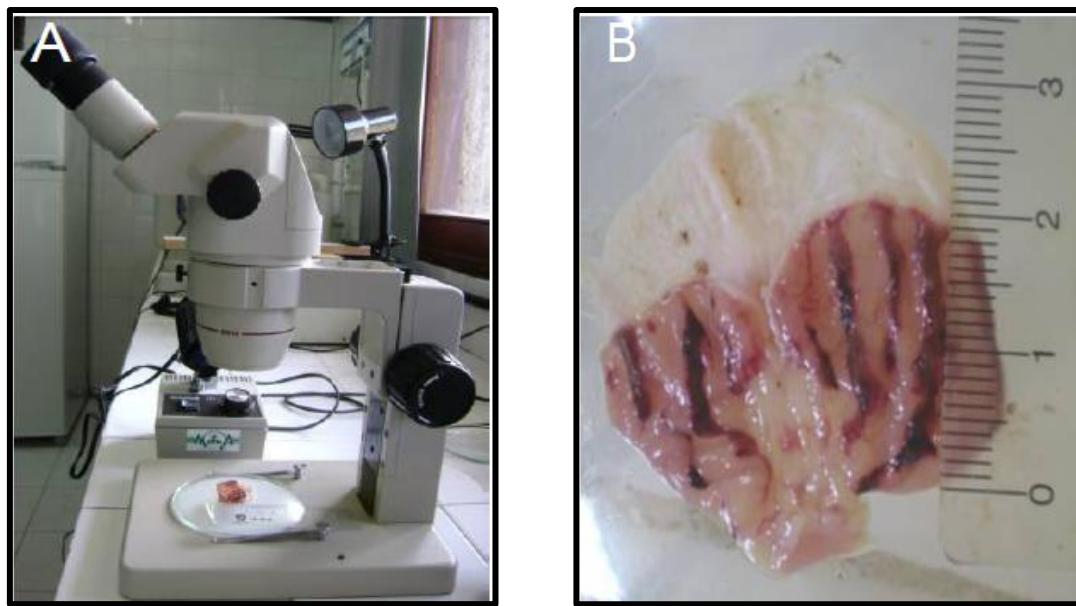


Figura 8 Lupa OLYMPUS Optical TL3 - SZ40 (A) e estômago de rato ulcerado com etanol absoluto (B) para determinação do ILU (Foto: arquivo do Laboratório de Farmacologia do TGI).

3.2.2.1 Modelos de indução aguda de úlcera gástrica

3.2.2.1.1 Úlceras gástricas induzidas por etanol acidificado (triagem farmacológica)

A triagem farmacológica visando a atividade gastroprotetora do EMeOH-*Md* foi realizada pelo modelo de indução de úlcera aguda utilizando como agente lesivo o etanol acidificado, segundo modelo proposto por Mizui; Doteuchi (1983) com modificações.

Os camundongos machos ($n=6-7$) foram submetidos a um jejum de 24 horas, com livre acesso a água até uma hora antes do experimento, divididos em grupos, em seguida pré-tratados oralmente com carbenoxolona 100 mg/kg, um agente indutor da produção de muco e bicarbonato (controle positivo), solução salina 0,9% - 10 mL/kg (controle negativo) e EMeOH-*Md* nas doses 62,5, 125, 250 e 500 mg/kg. Após 50 min foi administrada solução do agente lesivo 0,3 M HCl/etanol 60% - 0,2 mL, por via oral e uma hora após, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical, os estômagos

retirados e abertos ao longo da grande curvatura para determinação do índice de lesão ulcerativo (ILU) (SZELENYI; THIEMER, 1978).

3.2.2.1.2 Úlceras gástricas induzidas por etanol

De acordo com o modelo de Morimoto et al. (1991) com modificações, os ratos (n=5-7) foram submetidos a um jejum inicial de 24 horas, posteriormente, pré-tratados por via oral com carbenoxolona 100 mg/Kg (controle positivo), solução salina 0,9% - 10 mL/kg (controle negativo) e EMeOH-*Md* ou FaAcOEt-*Md* (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg). Após 1 hora, foi administrado 4mL/kg de etanol absoluto (agente lesivo) aos animais por via oral. Decorrida 1 hora dessa administração, os ratos foram eutanasiados por deslocamento cervical, os estômagos retirados e abertos para determinação do ILU (SZELENYI; THIEMER, 1978).

3.2.2.1.3 Úlceras gástricas induzidas por estresse (imobilização e frio)

Para avaliação da gastroproteção frente as úlceras induzidas por estresse por imobilização e frio, os camundongos (n=5-7) submetidos a um jejum de 24 horas, foram pré-tratados, por via oral, com cimetidina 100 mg/Kg (controle positivo), solução salina 0,9% (controle negativo) e EMeOH-*Md* ou FaAcOEt-*Md* (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg). Trinta minutos após a administração dos diferentes tratamentos, os animais foram imobilizados pelas patas dianteiras e traseiras, colocados em contenedores de policloreto de vinila (PVC) (9 cm de comprimento x 3,5 cm de diâmetro) e submetidos a uma temperatura de 4 ± 1 °C por um período de 3 horas, para indução das úlceras gástricas, conforme modelo preconizado por Levine et al. (1971) com modificações. Decorrido esse tempo, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, os estômagos retirados e abertos para determinação do ILU (SZELENYI; THIEMER, 1978).

3.2.2.1.4 Úlceras gástricas induzidas por anti-inflamatório não-esteroidal (piroxicam)

Para realização deste protocolo experimental, a partir da metodologia de Puscas et al. (1997) com modificações, camundongos ($n=5-7$) foram submetidos a um jejum de 24 horas, posteriormente pré-tratados, por via oral, com cimetidina 100 mg/kg, antagonista dos receptores H_2 (controle positivo), solução salina 0,9% - 10 mL/kg (controle negativo) e EMeOH-*Md* ou FaAcOEt-*Md* (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg). Decorridos 30 min do pré-tratamento, os animais receberam piroxicam 30 mg/kg (agente lesivo) por via subcutânea (s.c.) e 4 horas após essa administração, os camundongos foram eutanasiados, os estômagos retirados e abertos para determinação do ILU (SZELENYI; THIEMER, 1978).

3.2.2.1.5 Úlceras gástricas induzidas por contensão do suco gástrico

Conforme metodologia preconizada por Shay et al. (1945) com modificações, após jejum de 24 horas, os ratos ($n=6-7$) foram anestesiados com cloridrato de quetamina 5% (anestésico) e cloridrato de xilazina 2% (relaxante muscular) e submetidos a uma incisão longitudinal abaixo da apófise xifoide para ligadura (amarração) do piloro. Em seguida foi realizada a administração intraduodenal (i.d.) das substâncias: cimetidina 100 mg/kg (controle positivo), solução salina 0,9% - 10 mL/kg (controle negativo) e com a melhor dose do EMeOH-*Md* ou da FaAcOEt-*Md*. Logo após esse procedimento cirúrgico, as incisões dos animais foram suturadas e decorridas quatro horas após a ligadura, os ratos foram eutanasiados, os estômagos retirados e abertos para determinação do ILU (SZELENYI; THIEMER, 1978).

3.2.2.1.6 Avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico após ligadura do piloro (i.d.)

Após a ligadura descrita acima, os ratos foram eutanasiados por deslocamento cervical, as incisões reabertas e os estômagos retirados para coleta do conteúdo gástrico com a finalidade de se determinar os parâmetros bioquímicos do suco gástrico: volume, pH e concentração de íons hidrogênio na secreção gástrica, de acordo com o estabelecido por Shay et al. (1945) com modificações.

O conteúdo do estômago foi pesado e, em seguida, calculado o volume do suco gástrico expresso em g/4h. O pH foi verificado com o auxílio de um pHmetro digital PG 2000 (GEHAKA, Brasil) após centrifugação do conteúdo estomacal juntamente com 10 mL de água destilada a 3000 rpm por 10 minutos e expresso em unidades. Em seguida, foram retirados 10 mL do sobrenadante e distribuídos em alíquotas de 5 mL em 2 erlenmeyer para que fosse prosseguida a titulação do suco gástrico e determinada a concentração de H⁺ expressa em mEq/mL/4h. A titulação foi realizada utilizando-se hidróxido de sódio (NaOH) 0,01N e fenolftaleína, uma solução indicadora, com auxílio de uma bureta.

3.2.3 Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora de *Maytenus distichophylla*

3.2.3.1 Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrílicos (SHs) na gastroproteção

Segundo metodologia de Matsuda et al. (1999) ratos Wistar machos (n=5-7) foram colocados em jejum por 24 horas e distribuídos em oito grupos. Conforme o pré-tratamento, 4 grupos receberam previamente solução salina 0,9% - 10 mL/kg (i.p.) e os outros 4 grupos receberam previamente N-etilmaleimida (NEM) 10 mg/kg (i.p.), um bloqueador dos grupamentos sulfidrílicos. Após 30 minutos do pré-tratamento, os animais foram tratados (v.o.) com solução salina 0,9% - 10 mL/kg (controle negativo), carbenoxolona 100 mg/kg (controle positivo) e a melhor dose do EMeOH-*Md* e da FaAcOEt-*Md*. Após 1 hora do tratamento, os ratos receberam (v.o.) etanol absoluto - 4 mL/kg (agente lesivo). Decorridos mais 60 min, os animais foram eutanasiados, os estômagos retirados, abertos e fotografados. A área da lesão gástrica foi determinada utilizando o programa AVSoft Bioview Spectra 4.0®

3.2.3.2 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) na gastroproteção

De acordo com o modelo descrito por Sikiric et al. (1997), após jejum de 24 horas, ratos Wistar machos (n=5-7) foram divididos em 8 grupos conforme o

pré-tratamento: 4 grupos receberam solução salina 0,9% - 10 mL/kg (i.p.) e 4 grupos receberam N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) 70 mg/kg (i.p.), um agente bloqueador da enzima sintase de óxido nítrico. Após 30 minutos do pré-tratamento, os animais foram tratados (v.o.) com solução salina 0,9% - 10 mL/kg (controle negativo), carbenoxolona 100 mg/kg (controle positivo), e com a melhor dose do EMeOH-*Md* e da FaAcOEt-*Md*. Após 1 hora do tratamento, os ratos receberam (v.o.) etanol absoluto - 4 mL/kg (agente lesivo). Decorridos mais 60 min, os animais foram eutanasiados, os estômagos retirados, abertos e fotografados. A área da lesão gástrica foi determinada utilizando o programa AVSoft Bioview Spectra 4.0®

3.2.3.3 Determinação da concentração de muco aderido à parede gástrica

A avaliação da participação de muco aderido à parede gástrica foi realizada segundo a metodologia proposta por Raffatullah et al. (1990) com modificações. Após o jejum de 24 horas, os ratos (n=7-8) foram distribuídos em grupos e posteriormente tratados (v.o.) com solução salina 0,9% - 10 mL/kg (controle negativo), carbenoxolona 200 mg/kg (controle positivo), melhor dose do EMeOH e da FaAcOEt obtidos das folhas de *M. distichophylla*. Após 1 hora de cada administração, os animais, previamente anestesiados com cloridrato de quetamina 5% e de xilazina 2%, submetidos a um procedimento cirúrgico abaixo da apófise xifoide para que fosse realizada a ligadura do piloro. Transcorrido 4 horas de cada ligadura, os animais foram eutanasiados, o esôfago foi pinçado para que não ocorressem perdas de conteúdo estomacal, o estômago retirado e lavado em água gelada e aberto ao longo da grande curvatura. A porção glandular do estômago foi separada, pesada e imersa, por duas horas, em 10 mL de solução de *alcian blue*. O excesso de *alcian blue* foi removido por lavagem do estômago por duas vezes consecutivas, com 7 mL de solução sacarose 0,25 mol/L; sendo a primeira por 15 minutos e a segunda por 45 minutos. O corante, complexado ao muco aderido à parede estomacal, foi extraído com 10 mL de cloreto de magnésio 0,5 mol/L, agitando-se intermitentemente por um minuto, a cada 30 min, durante 2 horas.

Desse material, foi retirada uma alíquota de 4 mL e adicionada a 4 mL de éter etílico e esta foi agitada por 2 min. A emulsão obtida foi centrifugada

por 10 min a 3600 rpm e o sobrenadante, descartado. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro (modelo Multisca, marca Labsystems) a 570 nm. A determinação da concentração de *alcian blue* foi feita por intercalação em uma curva padrão com várias concentrações de *alcian blue*. Os resultados foram expressos em µg de *alcian blue*/g de tecido.

3.2.3.4 Avaliação da participação das prostaglandinas (PGs) na gastroproteção

A participação das prostaglandinas na gastroproteção mediada pelas amostras de *Maytenus distichophylla*, foi avaliada segundo modelo de Rodrigues et al. (2010) com modificações. Ratos Wistar machos foram mantidos em jejum por 24 horas, divididos em grupos de 7 animais e tratados (v.o.) com solução salina - 10 mL/kg (controle negativo), misoprostol 50 µg/kg, análogo das prostaglandinas (controle positivo), EMeOH-*Md* e FaAcOEt-*Md*. Uma hora antes dessa administração, 4 grupos de animais foram pré-tratados com indometacina 30 mg/kg (inibidor da ciclooxygenase) e 4 grupos receberam o veículo (solução salina 0,9%), por via oral. Após 1 hora do tratamento, todos os animais receberam (v.o.) o agente lesivo etanol absoluto e após 60 min, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, os estômagos removidos, abertos e fotografados. A área da lesão gástrica foi determinada utilizando o programa AVSoft Bioview Spectra 4.0®

3.3 Análise estatística

Para os resultados obtidos a partir dos ensaios de toxicidade aguda foi realizado o teste “t” de Student. Já para os resultados farmacológicos obtidos em ensaios de indução aguda de úlcera gástrica foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo pós-teste (Dunnett e/ou Tukey). Também foi utilizado o teste “t” de Student para verificar diferença estatística entre os grupos bloqueados e não bloqueados, na avaliação da participação de grupamentos sulfidrílicos, do óxido nítrico e das prostaglandinas. Todos os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (d.p.) da média e o nível de significância mínimo foi de p<0,05.

Todos os resultados foram analisados com o software, GraphPad Prism 5.0, San Diego, CA, EUA.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Ensaio toxicológico pré-clínico agudo de *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek

No ensaio de toxicidade aguda em camundongos, com base nos parâmetros preconizados por Almeida et al. (1999), foi possível observar que o EMeOH-*Md* na dose de 2000 mg/kg (v.o.) não promoveu alterações comportamentais, nem induziu mortes nos animais avaliados, durante o período de 14 dias após o tratamento, impossibilitando dessa forma, a determinação da DL₅₀.

Com relação à evolução ponderal, não ocorreu alteração significativa no peso corporal ao longo das duas semanas, nas fêmeas e machos tratados com o EMeOH-*Md* quando comparados aos seus respectivos grupos controle negativo (Tabela 1).

Não foi observada nenhuma mudança significativa no peso nem nas características macroscópicas dos órgãos dos animais que receberam o EMeOH-*Md* em comparação ao grupo controle negativo (solução salina 0,9%), ao passo que ocorreu redução significativa do consumo de água e ração apenas nos animais machos (Tabela 1).

Tabela 1 Efeito da administração oral do EMeOH-*Md* na evolução ponderal, índice dos órgãos, consumo de água e ração em camundongos fêmeas e machos, após 14 dias de observação

Parâmetros	Sexo	Tratamentos	
Evolução ponderal (g)		Controle Sol. Salina 0,9%	EMeOH (2000 mg/kg)
Fêmeas			
Inicial		27,80 ± 3,38	29,60 ± 3,81
Final		31,94 ± 1,72	32,10 ± 2,09
Machos			
Inicial		30,61 ± 2,69	31,61 ± 1,98
Final		35,16 ± 4,24	36,83 ± 2,52
Índice dos órgãos (mg/g)			
Fêmeas			
Fígado		53,28 ± 3,69	51,94 ± 6,66
Coração		4,76 ± 0,73	5,01 ± 0,51
Rins		11,91 ± 0,80	12,19 ± 2,36
Baço		6,49 ± 1,71	5,68 ± 0,56
Pulmões		6,79 ± 0,79	6,10 ± 0,39
Machos			
Fígado		61,00 ± 4,65	61,83 ± 8,29
Coração		5,65 ± 0,88	5,10 ± 0,76
Rins		14,97 ± 0,78	15,03 ± 1,40
Baço		5,83 ± 0,67	5,55 ± 0,87
Pulmões		21,35 ± 4,10	19,22 ± 4,24
Consumo de água (mL)			
Fêmeas		7,05 ± 0,82	7,43 ± 0,81
Machos		10,50 ± 1,29	8,21 ± 0,88***
Consumo de ração (g)			
Fêmeas		6,14 ± 0,32	6,00 ± 0,50
Machos		7,00 ± 0,45	6,21 ± 0,29***

Os resultados estão expressos como média ± d.p. (n=8-9). Teste “t” de Student: ***p<0,001 comparado a solução salina 0,9%. Para avaliação dos órgãos, os valores foram expressos como média ± d.p. da divisão do peso dos órgãos (mg) pelo peso dos animais (g).

4.2 Avaliação da atividade gastroprotetora de *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek

4.2.1 Úlceras gástricas induzidas por etanol acidificado (triagem farmacológica)

Para avaliar se o EMeOH-*Md* apresentava efeito gastroprotetor, foi realizada uma triagem farmacológica utilizando como agente lesivo o etanol acidificado (v.o.), em camundongos.

Os resultados obtidos nesse modelo mostram que o EMeOH-*Md* (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg) e carbenoxolona (100 mg/kg) reduziram de forma significativa o Índice de Lesão Ulcerativa (ILU) em 68, 84, 81, 80 e 62% respectivamente, quando comparados ao grupo que recebeu solução salina 0,9% (controle negativo). Estes resultados estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2 Efeito da administração oral do EMeOH-*Md* e carbenoxolona em úlceras gástricas induzidas por etanol acidificado em camundongos

Tratamentos	Dose (mg/kg)	I.L.U	% Inibição
Solução Salina 0,9%	-	112 ± 28,8	-
Carbenoxolona	100	42 ± 14,2***	62
EMeOH-<i>Md</i>	62,5	36 ± 8,9***	68
	125	17 ± 5,4***	84
	250	21 ± 7,3***	81
	500	22 ± 6,0***	80

Os resultados estão expressos como média ± d.p. Foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(5,34)} = 26$ seguido do teste de Dunnett: *** $p < 0,001$, comparado com o grupo controle negativo (solução salina 0,9%) ($n = 5-7$). ILU= Índice de Lesão Ulcerativo.

4.2.2 Úlceras gástricas induzidas por etanol

Os resultados obtidos para este modelo de indução de úlceras gástricas por etanol em ratos demonstram que o EMeOH-*Md* (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg) e carbenoxolona (100 mg/kg) administrados por via oral diminuíram, de forma significativa o ILU em cerca de 40, 56, 65, 86 e 67%, respectivamente, quando comparado com o grupo controle negativo (solução salina 0,9%). Estes resultados estão expressos na Tabela 3A e ilustrados na Figura 9. Resultados semelhantes foram observados quando se avaliou a FaAcOEt-*Md* (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg) e carbenoxolona (100 mg/kg) via oral, em que os danos na mucosa gástrica foram significativamente reduzidos em 12, 34, 46, 71 e 63%,

respectivamente, em comparação ao controle negativo. Os resultados estão expressos na Tabela 3B e podem ser melhor visualizados na Figura 10.

Tabela 3 Efeito da administração oral do EMeOH-*Md*, FaAcOEt-*Md* e carbenoxolona em úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos

Tratamentos	Dose (mg/kg)	I.L.U	% Inibição
^(A) Solução Salina 0,9%	-	421 ± 41,9	-
Carbenoxolona	100	139 ± 11,2***	67
EMeOH-<i>Md</i>	62,5	255 ± 45,9***	40
	125	186 ± 61,7***	56
	250	149 ± 51,9***	65
	500	58 ± 10,6***	86
^(B) Solução Salina 0,9%	-	257 ± 26,8	-
Carbenoxolona	100	94 ± 13,0***	63
FaAcOEt-<i>Md</i>	62,5	225 ± 30,4*	12
	125	169 ± 19,7***	34
	250	139 ± 7,2***	46
	500	73 ± 10,0***	71

Os resultados estão expressos como média ± d.p. Foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(5,30)} = 53$ (n=5-7) para EMeOH-*Md* e $F_{(5,29)} = 76$ (n=5-6) para FaAcOEt-*Md*, seguido pelo teste de Dunnett: *p<0,05, ***p<0,001 comparado ao grupo controle negativo (solução salina 0,9%). ILU= Índice de Lesão Ulcerativo.

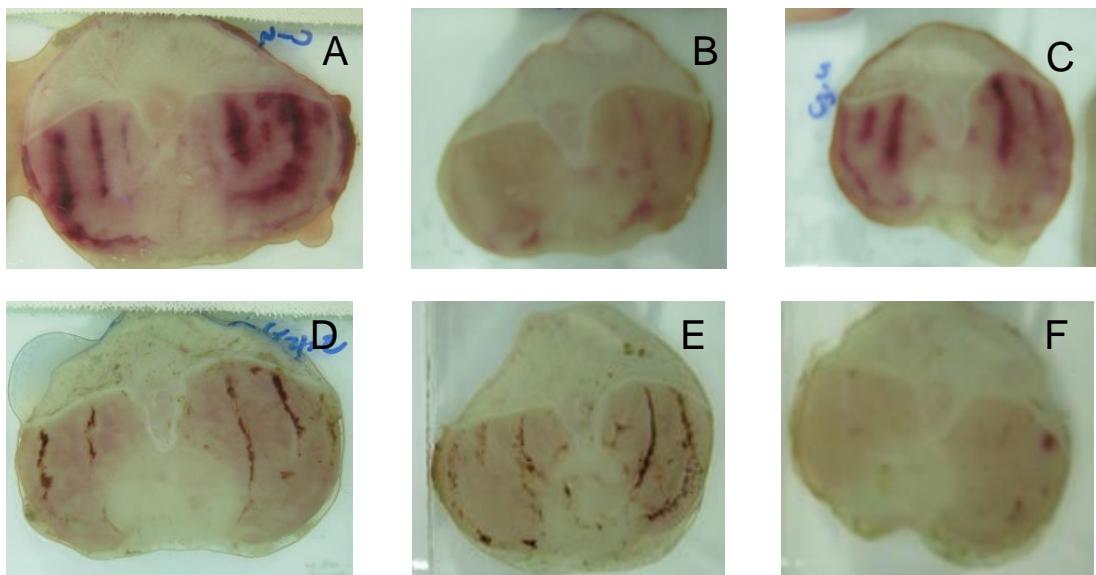


Figura 9 Estômagos de ratos pré-tratados (v.o.) com solução salina 0,9% (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B), EMeOH-*Md* (62,5 mg/kg) (C), EMeOH-*Md* (125 mg/kg) (D), EMeOH-*Md* (250 mg/kg) (E) e EMeOH-*Md* (500 mg/kg) (F) em modelo de etanol

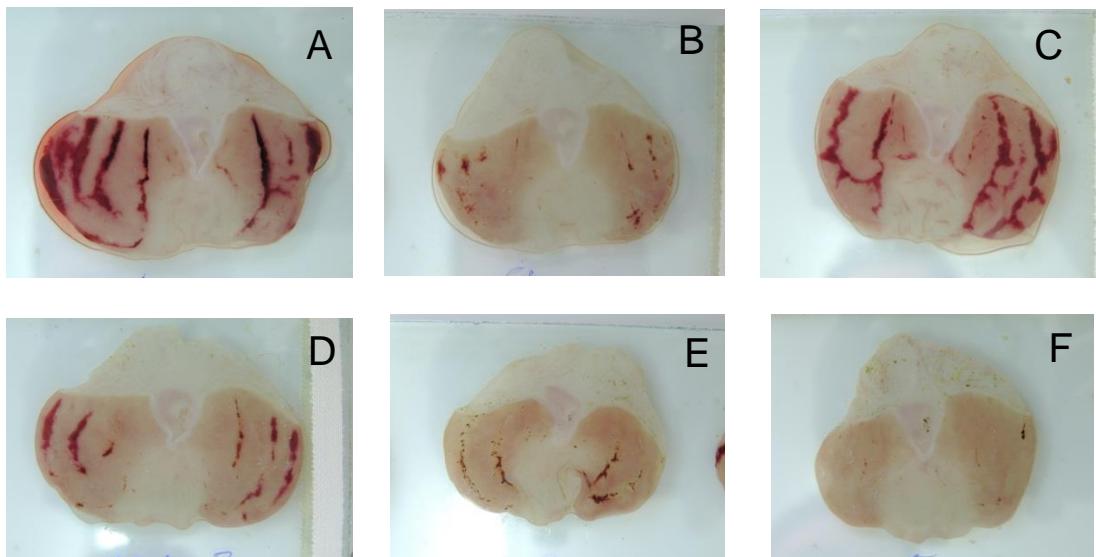


Figura 10 Estômagos de ratos pré-tratados (v.o.) com solução salina 0,9% (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B), FaAcOEt-*Md* (62,5 mg/kg) (C), FaAcOEt-*Md* (125 mg/kg) (D), FaAcOEt-*Md* (250 mg/kg) (E) e FaAcOEt-*Md* (500 mg/kg) (F) em modelo de etanol

De acordo com os resultados obtidos nesse modelo, foi realizada uma comparação entre as diferentes doses dos grupos tratados com EMeOH-*Md* e FaAcOEt-*Md*, utilizando-se o teste de Tukey, o que permitiu escolher a dose de 500 mg/kg, em ambas as amostras vegetais, como a mais efetiva em inibir as

lesões gástricas. Essa dose foi selecionada para os experimentos de avaliação dos parâmetros bioquímicos e modelos de elucidação dos mecanismos de ação.

4.2.3 Úlceras gástricas induzidas por estresse (imobilização e frio)

No modelo de indução aguda de úlcera gástrica tendo como agente lesivo o estresse por imobilização e frio em camundongos, os resultados mostram que o EMeOH-*Md* (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg) e a cimetidina (100 mg/kg) (v.o.) apresentaram redução significativa das lesões ulcerativas em 58, 72, 79, 84 e 58%, respectivamente, quando comparados com o grupo controle negativo (solução salina 0,9%). Resultados semelhantes foram observados quando a FaAcOEt-*Md*, nas mesmas doses, reduziu o ILU em 29, 38, 50, 52 e 47%, respectivamente, quando comparado ao controle negativo (solução salina 0,9%), conforme pode ser observado na (Tabela 4A e B).

Tabela 4 Efeito da administração oral do EMeOH-*Md*, FaAcOEt-*Md* e cimetidina em úlceras gástricas induzidas por estresse (imobilização e frio) em camundongos

Tratamentos	Dose (mg/kg)	I.L.U	% Inibição
^(A) Solução Salina 0,9%	-	159 ± 10,9	-
Cimetidina	100	66 ± 9,6***	58
EMeOH-<i>Md</i>	62,5	67 ± 5,4***	58
	125	45 ± 4,6***	72
	250	34 ± 3,8***	79
	500	25 ± 4,9***	84
^(B) Solução Salina 0,9%	-	109 ± 14,6	-
Cimetidina	100	57 ± 9,2***	47
FaAcOEt-<i>Md</i>	62,5	78 ± 16,1***	29
	125	67 ± 10,0***	38

	250	55 ± 10,8***	50
	500	53 ± 9,6***	52

Os resultados estão expressos como média ± d.p. Foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(5,31)} = 295$ (n=6-7) para EMeOH-*Md* e $F_{(5,31)} = 19$ (n=6-7) para FaAcOEt-*Md*, seguido pelo teste de Dunnett: ***p<0,001 comparado ao grupo controle negativo (solução salina 0,9%). ILU= Índice de Lesão Ulcerativo.

4.2.4 Úlceras gástricas induzidas por anti-inflamatório não-esteroidal (piroxicam)

De acordo com os resultados obtidos nesse modelo, pode-se observar que tanto o EMeOH-*Md* quanto a FaAcOEt-*Md*, quando administrados v.o. nas doses de 62,5, 125, 250 e 500 mg/kg e cimetidina (100 mg/kg), inibiram de forma significativa o ILU em cerca de 46, 65, 81, 82 e 50% respectivamente, e em 26, 40, 58, 69 e 46% para a FaAcOEt-*Md* e cimetidina, quando comparados ao grupo controle negativo (solução salina 0,9%), o que indica um efeito gastroprotetor das amostras, no modelo de indução de úlcera avaliado. Os resultados estão expressos na Tabela 5A e B.

Tabela 5 Efeito da administração oral do EMeOH-*Md*, FaAcOEt-*Md* e cimetidina em úlceras gástricas induzidas por AINE (piroxicam) em camundongos

Tratamentos	Dose (mg/kg)	I.L.U	% Inibição
^(A) Solução Salina 0,9%	-	212 ± 24,6	-
Cimetidina	100	107 ± 7,8***	50
EMeOH-<i>Md</i>	62,5	115 ± 18,7***	46
	125	73 ± 9,8***	65
	250	40 ± 3,9***	81
	500	39 ± 5,2***	82
^(B) Solução Salina 0,9%	-	110 ± 25,4	-
Cimetidina	100	60 ± 15,0***	46

FaAcOEt-Md	62,5	81 ± 19,7*	26
	125	66 ± 19,8**	40
	250	46 ± 18,4***	58
	500	34 ± 10,3***	69

Os resultados estão expressos como média ± d.p. Foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(5,32)} = 136$ (n=6-7) para EMeOH-*Md* e $F_{(5,30)} = 12,6$ (n=6) para FaAcOEt-*Md*, seguido pelo teste de Dunnett: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 comparado ao grupo controle negativo (solução salina 0,9%). ILU= Índice de Lesão Ulcerativo.

4.2.5 Úlcera gástrica induzida por contaminação do suco gástrico

Na avaliação das amostras vegetais de *M. distichophylla* administradas por via intraduodenal, frente à secreção gástrica, utilizando o modelo de ligadura do piloro em ratos, verificou-se que o EMeOH-*Md* (500 mg/kg), FaAcOEt-*Md* (500 mg/kg) e cimetidina (100 mg/kg) inibiram significativamente o ILU em 75, 77 e 46% respectivamente, quando comparado ao grupo que recebeu solução salina 0,9%. Estes resultados encontram-se expressos na (Tabela 6).

Tabela 6 Efeito da administração intraduodenal do EMeOH-*Md*, FaAcOEt-*Md* e cimetidina em úlcera gástrica induzida por contaminação do suco gástrico por meio da ligadura do piloro em ratos

Tratamentos	Dose (mg/kg)	I.L.U	% Inibição
Solução Salina 0,9%	-	284 ± 37,4	-
Cimetidina	100	154 ± 31,8***	46
EMeOH-<i>Md</i>	500	70 ± 6,9***	75
FaAcOEt-<i>Md</i>	500	67 ± 11,4***	77

Os resultados estão expressos como média ± d.p. Foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(5,21)} = 74$ (n=6-7) para EMeOH-*Md* e FaAcOEt-*Md*, seguido pelo teste de Dunnett: ***p<0,001 comparado ao grupo controle negativo (solução salina 0,9%). ILU= Índice de Lesão Ulcerativo.

4.2.6 Avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico após ligadura do piloro (i.d.)

No modelo de ligadura do piloro, também foram avaliados parâmetros bioquímicos do conteúdo estomacal dos ratos, como pH, concentração de íons H^+ e volume do suco gástrico, após a administração intraduodenal de solução salina 0,9%, cimetidina (100 mg/kg), EMeOH-*Md* (500 mg/kg) ou FaAcOEt-*Md* (500 mg/kg).

Quando administradas por via i.d., as amostras vegetais não alteraram o pH nem a concentração de H^+ , no entanto, houve redução significativa no volume do conteúdo gástrico, quando comparado com o controle negativo. Entretanto, no grupo de animais que recebeu a cimetidina (antagonista do receptor H_2), como já era esperado, foi observado aumento significativo do pH, além da redução da $[H^+]$ e do volume gástrico. Esses resultados encontram-se expressos na Tabela 7.

Tabela 7 Efeito da administração intraduodenal do EMeOH-*Md*, FaAcOEt-*Md* e cimetidina sobre os parâmetros bioquímicos do suco gástrico após a ligadura do piloro em ratos

Tratamentos	pH (unidades)	$[H^+]$ (mEq/mL/4h)	Volume gástrico (g)
Solução Salina 0,9%	$2,4 \pm 0,4$	$9,7 \pm 2,7$	$5,5 \pm 1,7$
Cimetidina	$6,2 \pm 1,7^{***}$	$5,4 \pm 0,6^{**}$	$2,2 \pm 0,7^{***}$
EMeOH-<i>Md</i> (500 mg/kg)	$2,2 \pm 0,3$	$12,8 \pm 2,0$	$3,3 \pm 1,2^*$
FaAcOEt-<i>Md</i> (500 mg/kg)	$2,5 \pm 0,4$	$12,4 \pm 2,4$	$3,4 \pm 1,3^*$

Os resultados estão expressos como média \pm d.p. Foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(3,21)} = 26$ para pH; $F_{(3,21)} = 16$ para $[H^+]$ e $F_{(3,20)} = 6,7$ para volume gástrico, seguido do teste de Dunnett: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ comparado ao grupo controle negativo (solução salina 0,9%). ILU= Índice de Lesão Ulcerativo. (n=6-7)

4.3 Avaliação de mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora de *Maytenus distichophylla*

No intuito de elucidar os mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora do EMeOH-*Md* e da FaAcOEt-*Md* foram avaliadas a participação dos grupamentos sulfidrílicos, do óxido nítrico, do muco aderido à mucosa e das prostaglandinas.

4.3.1 Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrílicos (SHs) na gastroproteção

No modelo que avaliou a participação dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção mediada por *M. distichophylla*, foi observado que no grupo de animais previamente tratados com solução salina 0,9% e depois tratados com EMeOH-*Md* (500 mg/kg), FaAcOEt-*Md* (500 mg/kg) ou carbenoxolona (100 mg/kg) ocorreu uma inibição significativa da Área de Lesão Ulcerativa (ALU), em 96, 96 e 89%, respectivamente. Entretanto, quando foram avaliados os grupos pré-tratados com N-etilmaleimida 10 mg/kg (i.p.) (bloqueador de grupamentos sulfidrílicos) e tratados com EMeOH-*Md*, FaAcOEt-*Md* ou carbenoxolona, observou-se uma exacerbção da ALU, respectivamente 34, 45 e 64% de inibição, quando comparados com seu controle negativo, conforme pode ser observado no Gráfico 1 e ilustrado na Figura 11.

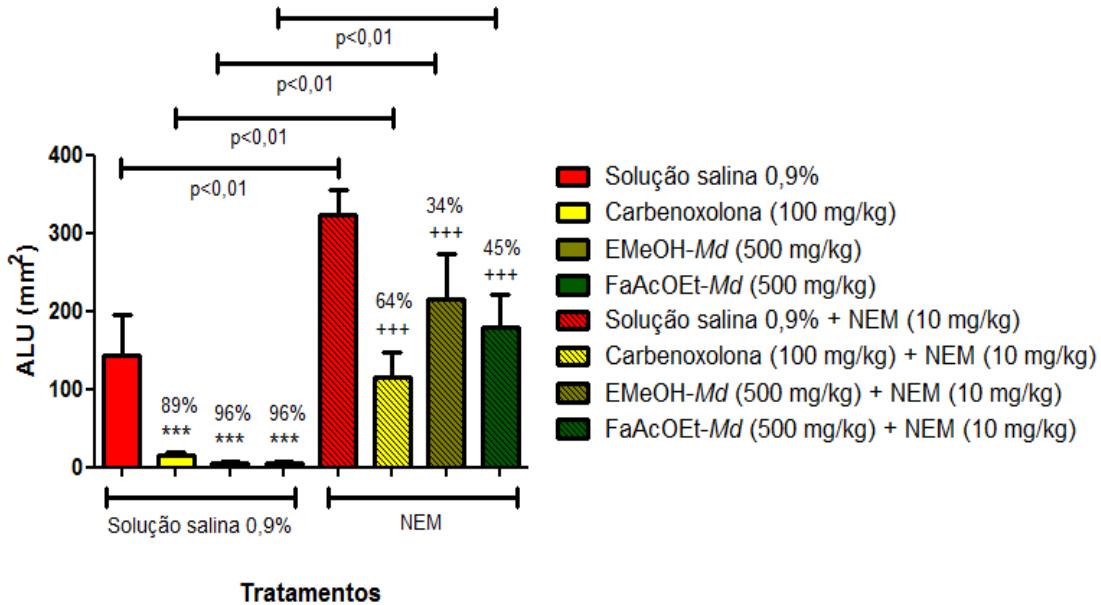


Gráfico 1 Efeito da administração oral do EMeOH-*Md*, FaAcOEt-*Md* e carbinoxolona após pré-tratamento com NEM (i.p.), na úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos. Os resultados foram expressos como média \pm d.p. ($n=5-7$). Foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(3,19)} = 37/F_{(3,20)} = 30$ seguido do teste de Dunnett: *** $p < 0,001$ comparados à solução salina 0,9%; *** $p < 0,001$ comparados à solução salina 0,9% + NEM. A comparação entre os grupos não bloqueados e bloqueados foi feita pelo teste “t” de Student. A porcentagem indica a proteção em relação ao respectivo controle negativo.

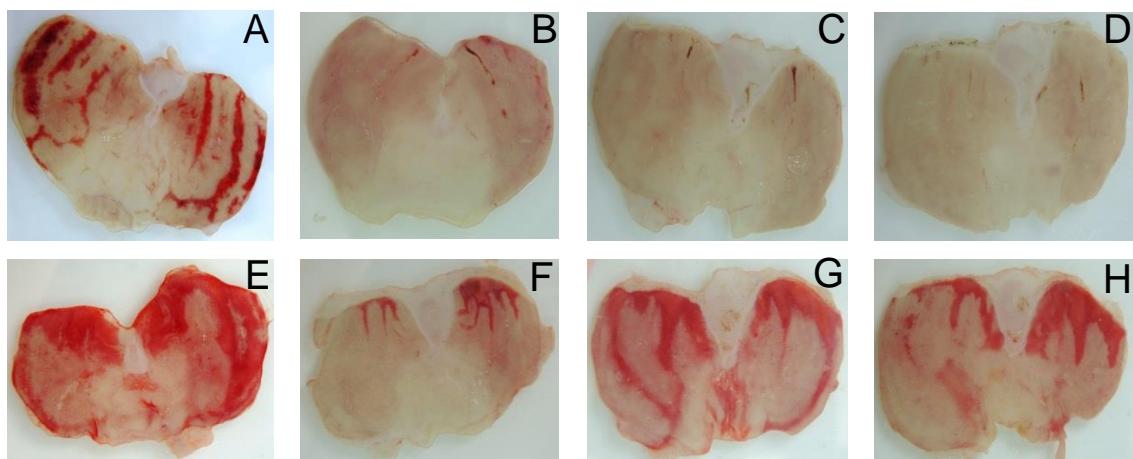


Figura 11 Estômagos de ratos pré-tratados com sol. salina 0,9% e tratados com sol. salina 0,9% (A), carbinoxolona 100 mg/kg (B), EMeOH-*Md* (500 mg/kg) (C) e FaAcOEt-*Md* (500 mg/kg) (D) ou pré-tratados com NEM e tratados com sol. salina 0,9% (E), carbinoxolona 100 mg/kg (F), EMeOH-*Md* (500 mg/kg) (G) e FaAcOEt-*Md* (500 mg/kg) (H) em modelo de grupamentos sulfidrílicos.

4.3.2 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) na gastroproteção

No modelo que avaliou a gastroproteção mediada pelo EMeOH-*Md* (500 mg/kg), FaAcOEt-*Md* (500 mg/kg) e carbenoxolona (100 mg/kg), os animais foram pré-tratados, por via intraperitoneal, com solução salina 0,9% ou L-NAME 70 mg/kg (inibidor da enzima sintase de óxido nítrico), utilizando o etanol como agente lesivo.

De acordo com os resultados apresentados, pode-se observar que houve inibição significativa da ALU nos animais em 96, 96 e 89%, respectivamente, quando comparados com o controle negativo (solução salina 0,9%). Entretanto, quando se avaliou os animais pré-tratados (i.p.) com L-NAME, houve exacerbação da Área de Lesão Ulcerativa somente naqueles que foram tratados (v.o.) com solução salina 0,9% e carbenoxolona, enquanto que o EMeOH-*Md* e a FaAcOEt-*Md* mantiveram a capacidade de proteger a mucosa gástrica das lesões promovidas pelo etanol, mesmo quando pré-tratados com o inibidor da enzima sintase de óxido nítrico, respectivamente em 96 e 97%, quando comparados ao seu controle negativo. Estes dados podem ser observados no Gráfico 2 e ilustrados na Figura 12.

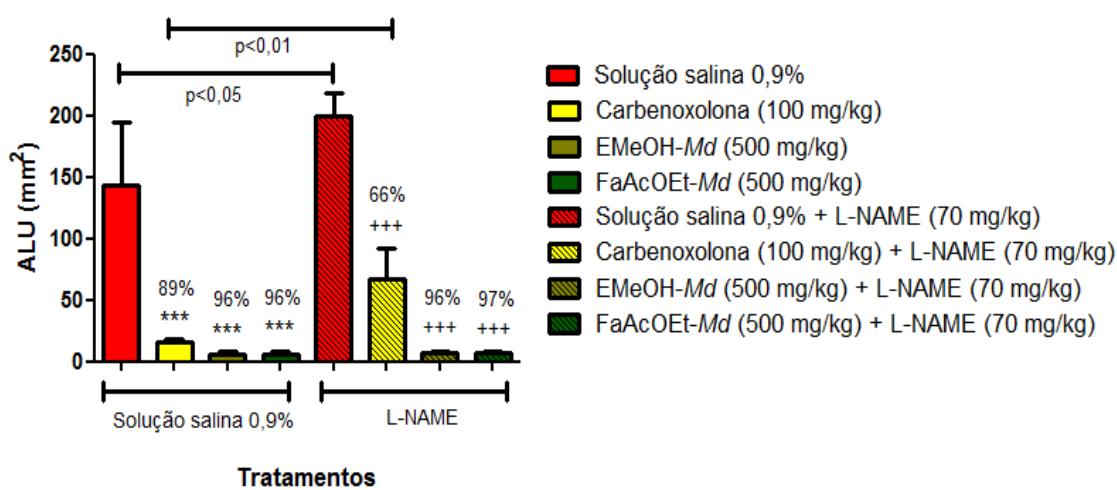


Gráfico 2 Efeito da administração oral do EMeOH-*Md*, FaAcOEt-*Md* e carbenoxolona após pré-tratamento com L-NAME (i.p.), na úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos. Os resultados estão expressos como média \pm d.p. (n=5-7). Foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(3,19)} = 37/F_{(3,22)} = 240$, seguido do teste de Dunnett: ***p<0,001 comparados à solução salina 0,9%; ***p<0,001 comparados à solução salina 0,9% + L-NAME. A comparação entre os grupos não

bloqueados e bloqueados foi feita pelo teste “t” de Student. A porcentagem indica a proteção em relação ao respectivo controle negativo.

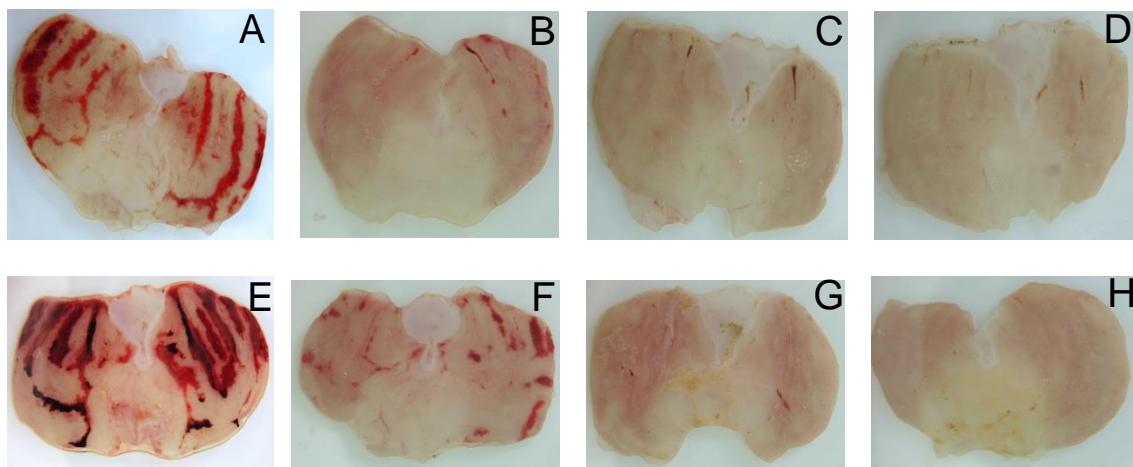


Figura 12 Estômagos de ratos pré-tratados com sol. salina 0,9% e tratados com sol. salina 0,9% (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B), EMeOH-*Md* (500 mg/kg) (C) e FaAcOEt-*Md* (500 mg/kg) (D) ou pré-tratados com L-NAME e tratados com sol. salina 0,9% (E), carbenoxolona 100 mg/kg (F), EMeOH-*Md* (500 mg/kg) (G) e FaAcOEt-*Md* (500 mg/kg) (H) em modelo de óxido nítrico.

4.3.3 Determinação da concentração de muco aderido à parede gástrica

Os resultados obtidos no modelo que investiga a participação do muco na gastroproteção induzida pelo EMeOH-*Md* (500 mg/kg), FaAcOEt-*Md* (500 mg/kg) e carbenoxolona (200 mg/kg), por meio da concentração de *alcian blue* ligado ao muco do estômago, mostraram que não houveram alterações significativas na concentração de muco aderido à parede gástrica, induzida pelas amostras vegetais quando comparado ao controle negativo. Porém, conforme o esperado a carbenoxolona, agente estimulador da produção de muco e bicarbonato, aumentou significativamente os níveis do muco, quando comparado ao controle negativo (solução salina 0,9%), conforme pode ser evidenciado no Gráfico 3.

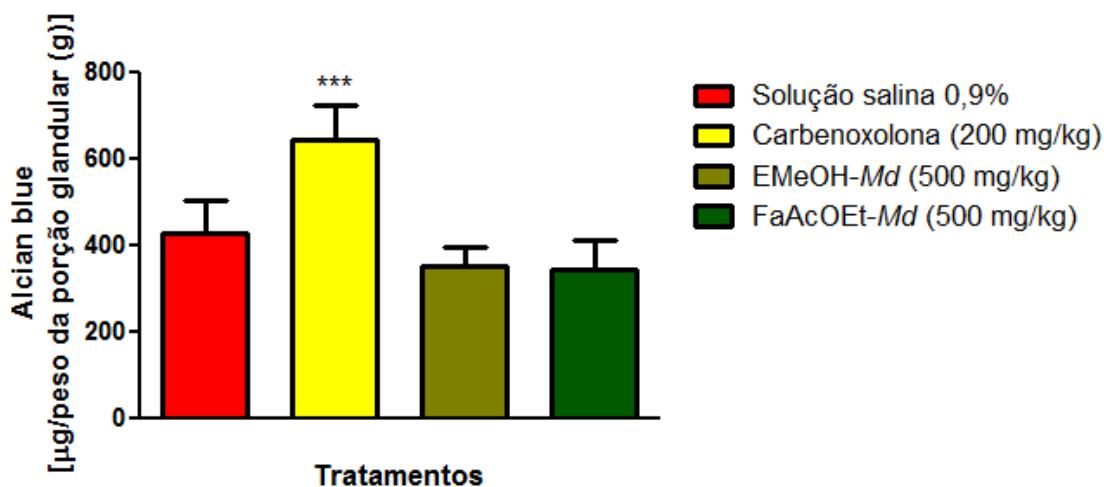


Gráfico 3 Efeito da administração oral do EMeOH-*Md*, FaAcOEt-*Md* e carbenoxolona sobre o conteúdo de muco gástrico após ligadura do piloro em ratos. Os resultados estão expressos como média \pm d.p. Foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(3,19)} = 23$ ($n=5-7$), seguido do teste de Dunnett: *** $p<0,001$ comparado ao controle negativo (solução salina 0,9%).

4.3.4 Avaliação da participação das prostaglandinas (PGs) na gastroproteção

No protocolo experimental que investigou a participação das prostaglandinas na gastroproteção mediada por *M. distichophylla*, foi observada uma inibição significativa da ALU nos animais pré-tratados (v.o.) com o veículo (solução salina 0,9%) e tratados (v.o.) com EMeOH-*Md* (500 mg/kg), FaAcOEt-*Md* (500 mg/kg) ou misoprostol (50 µg/kg), um análogo da prostaglandina, em 92, 87 e 98%, respectivamente, quando comparados com o controle negativo (grupo tratado com solução salina 0,9%). Contudo, quando foram avaliados os grupos pré-tratados (v.o.) com indometacina (inibidor da enzima ciclooxygenase) e tratados (v.o.) com EMeOH-*Md* (500 mg/kg), FaAcOEt-*Md* (500 mg/kg) ou misoprostol (50 µg/kg), observou-se uma exacerbação da Área de Lesão Ulcerativa, respectivamente com 78, 80 e 96% de inibição das lesões gástricas, quando comparados com seu controle negativo. Os resultados encontram-se expressos no Gráfico 4 e ilustrados na Figura 13.

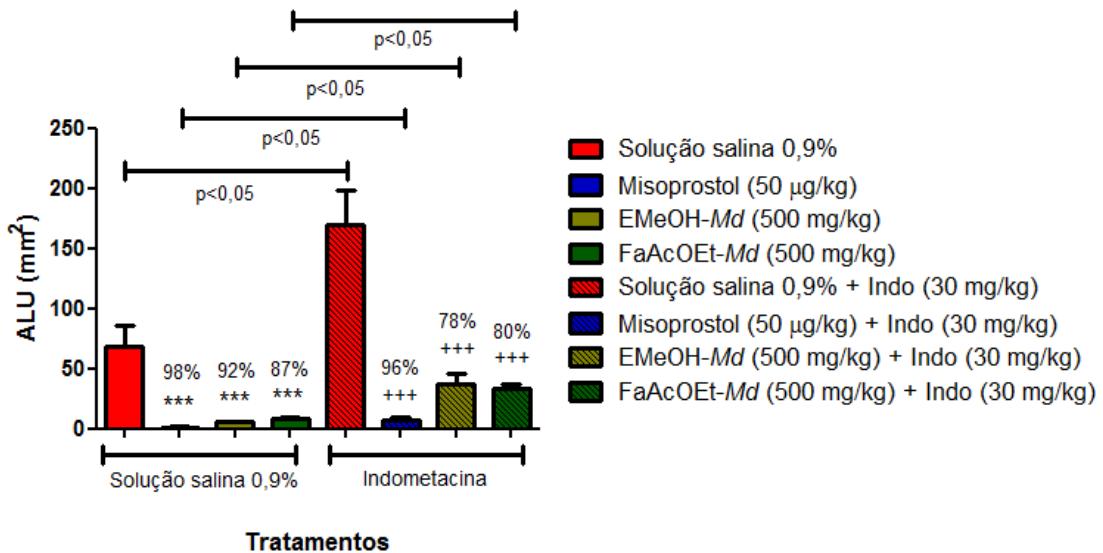


Gráfico 4 Efeito da administração oral do EMeOH-*Md*, FaAcOEt-*Md* e misoprostol após pré-tratamento com indometacina (v.o.), um inibidor da enzima ciclooxygenase, na úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos. Os resultados estão expressos como média \pm d.p. ($n=5$). Foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(3,16)} = 62/F_{(3,16)} = 120$ seguido do teste de Dunnett: *** $p<0,001$ comparados à solução salina 0,9%; +++ $p<0,001$ comparados à solução salina 0,9% + Indo. A comparação entre os grupos não bloqueados e bloqueados foi feita pelo teste “t” de Student. A porcentagem indica a proteção em relação ao respectivo controle negativo.

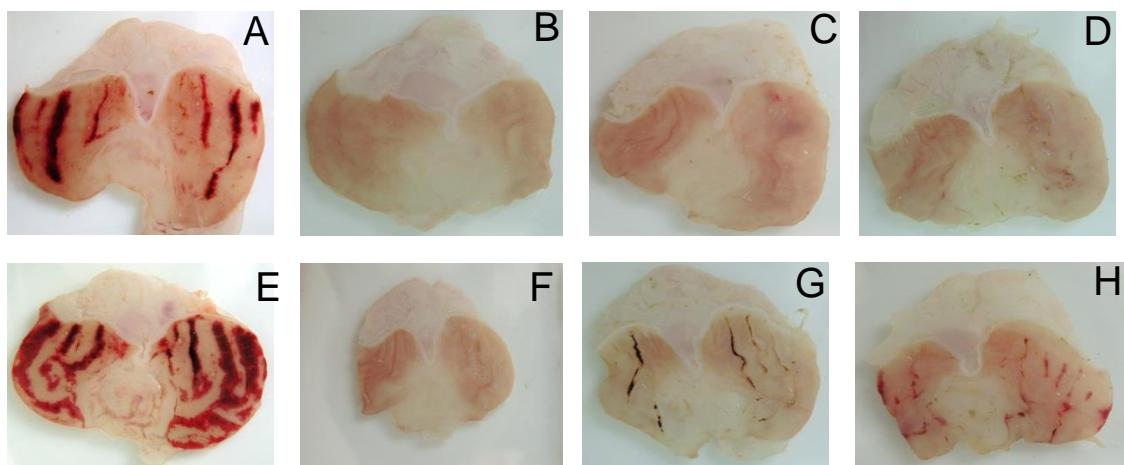


Figura 13 Estômagos de ratos pré-tratados com sol. salina 0,9% e tratados com sol. salina 0,9% (A), misoprostol 50 µg/kg (B), EMeOH-*Md* (500 mg/kg) (C) e FaAcOEt-*Md* (500 mg/kg) (D) ou pré-tratados com indometacina e tratados com sol. salina 0,9% (E), misoprostol 50 µg/kg (F), EMeOH-*Md* (500 mg/kg) (G) e FaAcOEt-*Md* (500 mg/kg) (H) em modelo de prostaglandina.

Discussão

5 DISCUSSÃO

O emprego de espécies vegetais como fontes de substâncias detentoras de atividades biológicas tem crescido nos últimos anos, o que reativou interesses sociais e econômicos, superando obstáculos e incentivando a percepção das lideranças industriais que se ocupavam, quase que exclusivamente, da fabricação de produtos sintéticos (BRAZ-FILHO, 2010).

Apesar da disponibilidade de diferentes metodologias para o desenvolvimento de novos fármacos, os produtos naturais permanecem como a melhor fonte de novos tipos estruturais. Logo, a importância dessas moléculas não é definida necessariamente pelos seus efeitos terapêuticos ou quimioterápicos, mas também no papel que as mesmas exercem como modelo para produção de novas drogas (MAHOMOODALLY et al., 2012).

Uma parcela significativa da população mundial não tem acesso à utilização de medicamentos industrializados, mesmo considerando o desenvolvimento da medicina moderna, que tem conseguido avanços em inúmeras áreas (VEIGA-JÚNIOR et al., 2005). Nesse contexto, nos últimos anos, tem-se buscado novas alternativas terapêuticas, uma vez que na medicina tradicional ou popular, várias espécies vegetais têm sido usadas para tratar enfermidades, a exemplo dos distúrbios gastrintestinais, incluindo as úlceras pépticas (CALVO et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2008; SILVA et al., 2009).

A úlcera péptica permanece como uma das principais doenças que acometem o trato gastrintestinal (TAKAYAMA et al., 2011). A grande maioria dos casos é decorrente da infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* ou uso contínuo de anti-inflamatórios não-esteroidais. Como a infecção tem se tornado cada vez menos frequente, sobretudo nos países desenvolvidos, atribui-se aos AINEs a causa mais importante de ulcerações, particularmente úlceras complicadas por hemorragias (MAJUMDAR et al., 2010). Trata-se de um problema de saúde pública mundial, visto que os sintomas gastrintestinais e suas complicações podem prejudicar a qualidade de vida, além de reduzir a produtividade no trabalho (BARKUN; LEONTIADIS, 2010).

Atualmente, os medicamentos empregados no tratamento das úlceras pépticas atuam quer seja pela modulação de fatores que agridem a mucosa, ou

pelo estímulo de mecanismos de citoproteção (MEJIA; KRAFT, 2009). Contudo, muitos deles permitem a possibilidade de desencadearem efeitos colaterais, interagem com outros fármacos, são de custo elevado e não proporcionam a cura total das lesões, possibilitando situações de recidiva da doença (MASSIGNANI et al., 2009; PARIKH; HOWDEN, 2010; O'NEIL; LEONARD, 2011)

Diante dessas considerações, o presente trabalho foi realizado com o intuito de investigar a toxicidade e a atividade gastroprotetora da espécie vegetal *Maytenus distichophylla* em modelos animais, avaliando o efeito do EMeOH e da FaAcOEt obtidos das folhas desta espécie, em modelos de indução aguda de lesões gástricas por etanol acidificado, etanol absoluto, estresse por imobilização e frio, AINEs (piroxicam) e contensão da secreção gástrica (ligadura do piloro), modelos estes que mimetizam as principais causas de úlcera no homem, além de investigar os mecanismos de ação envolvidos na gastroproteção.

A descoberta de que determinadas espécies vegetais apresentam substâncias potencialmente tóxicas é decorrente da sua utilização milenar. Do ponto de vista científico, pesquisas mostram que muitas espécies possuem agentes químicos agressivos e, por esta razão, devem ser utilizadas com cautela, respeitando seus riscos toxicológicos (VEIGA-JÚNIOR et al., 2005). O uso inadequado das plantas com finalidades terapêuticas, sem o conhecimento toxicológico necessário, pode provocar efeitos adversos retardados e/ou assintomáticos (VENDRUSCOLO et al., 2005).

Nos últimos anos, as autoridades regulatórias tem se preocupado com a normatização dos medicamentos fitoterápicos, o que propicia a avaliação de aspectos importantes, como a eficácia e segurança do uso destes produtos, visto que, o uso tradicional das plantas medicinais não garante a segurança do medicamento fitoterápico, sendo necessário realizar ensaios pré-clínicos e clínicos (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

No Brasil, a Resolução - RDC nº 14/2010 e a Resolução - RE nº 90/2004, tratam do registro dos medicamentos fitoterápicos e apresentam um guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos, respectivamente. A RE nº 90/2004 sugere ensaios de toxicidade aguda, doses repetidas, além de estudos de genotoxicidade, quando o houver indicação de

uso contínuo ou prolongado do medicamento em humanos (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006; CARVALHO et al., 2008).

Com relação aos estudos pré-clínicos *in vivo*, a toxicidade aguda é empregada para investigar o potencial de letalidade ou presença de sinais tóxicos, promovidos por determinada substância, conforme estabelece a legislação vigente de cada país (MARIZE, 2006), caracterizada, portanto, como um dos principais testes com o qual é possível observar sinais de intoxicação, determinar a DL_{50} conforme preconizado pela RE 90/2004 e definir doses a serem usadas em estudos posteriores.

Dessa forma, os ensaios toxicológicos foram iniciados com a realização de estudo comportamental utilizando a metodologia padronizada por Almeida et al. (1999), a qual objetiva identificar alterações em nível de SNC e SNA, pelo registro de alguns sinais ou alterações de comportamento apresentados pelos animais, após serem tratados por via oral, com o EMeOH-*Md* na dose única de 2000 mg/kg. Dentro dos parâmetros comportamentais que foram avaliados, foi observado que o EMeOH-*Md* não promoveu alterações comportamentais, nem presença de morte, não sendo possível determinar a DL_{50} .

Variações na evolução ponderal de animais que recebem determinada droga são um fator considerado indicador de efeitos adversos, para tanto, é preconizado que os animais que permanecem vivos, não percam mais de 10% do peso corpóreo inicial (RAZA et al., 2002; TEO et al., 2002).

Na avaliação ponderal, foi observado que nos grupos de camundongos fêmeas e machos tratados com o EMeOH-*Md*, não houve alteração significativa nos pesos ao longo dos 14 dias de avaliação, em comparação aos animais do grupo controle negativo.

De modo adicional aos parâmetros citados anteriormente, quando investigados o consumo de água e ração pelos camundongos, foi verificada uma diminuição no grupo dos animais machos que receberam o EMeOH-*Md*, para ambos os critérios avaliados, comparando-se ao grupo que recebeu somente solução salina 0,9%. Contudo, ainda que o consumo alimentar seja uma característica importante no estudo da segurança de um produto com fins terapêuticos, tal resultado não é suficiente para inferir toxicidade à amostra vegetal, nas condições avaliadas, especialmente porque os animais recuperaram o peso ao final do tratamento.

Alterações na massa relativa dos órgãos possui uma estreita relação com sinais de toxicidade conforme descrito por Dallegrave (2003). Na perspectiva de se comprovar essa teoria, o índice dos órgãos foi avaliado ao término do ensaio de toxicidade aguda e foi observado que o EMeOH-*Md* não ocasionou mudança significativa nesse parâmetro, quando comparado ao grupo controle negativo (solução salina 0,9%). Além disso, não foram verificadas alterações macroscópicas para os animais tratados com o extrato, em comparação aos animais controle.

Diante destes resultados, e apesar das alterações observadas, nas condições relatadas, não foi possível inferir toxicidade ao extrato, uma vez que se tornam necessários experimentos complementares para tal conclusão. Dessa maneira, é possível sugerir que o EMeOH de *Maytenus distichophylla* na dose de 2000 mg/kg apresentou sinais de baixa toxicidade, nas condições avaliadas, o que confere segurança na continuidade do estudo, passando dessa forma a ser investigada a atividade farmacológica dessa espécie frente a atividade gastroprotetora. Os resultados da avaliação toxicológica corroboram aos apresentados pelo estudo de *Maytenus rigida* (SANTOS, 2008) e *M. obtusifolia* (MOTA, 2009).

Na perspectiva de avaliar a atividade gastroprotetora da espécie *Maytenus distichophylla* e com base na ausência de DL₅₀ para o extrato, foi possível estabelecer com segurança as doses de 62,5, 125, 250 e 500 mg/kg para o extrato metanólico e fase acetato de etila. De acordo com o preconizado por Souza-Brito (1994), as doses selecionadas para estudos farmacológicos com extratos e derivados não devem ultrapassar 1000 mg/kg.

Para avaliar o efeito gastroprotetor, promovido pelo EMeOH obtido das folhas de *Maytenus distichophylla*, foi realizada uma triagem farmacológica utilizando como agente lesivo o etanol acidificado (HCl/etanol), em camundongos.

A lesão causada pelo etanol acidificado é decorrente de um efeito tópico direto na mucosa gástrica, o que causa transtornos na integridade dessa camada, neste sentido, trata-se de um bom modelo para investigar produtos com possível atividade citoprotetora (MIZUI; DOTEUCHI, 1983).

As lesões necrosantes formadas na mucosa gástrica, após administração desse agente são decorrentes da diminuição da proteção

promovida pela camada de muco, como consequência da solubilização dos componentes desta barreira, o que acarreta influxo de íons H⁺ provenientes do lúmen (MIZUI; DOTEUCHI, 1983; LIMA et al., 2009). Nesse processo agressivo, há também a geração de radicais livres (RODRÍGUEZ et al., 2006) que causam estresse oxidativo e peroxidação lipídica, podendo ainda, danificar outras macromoléculas celulares, a exemplo do DNA (GONÇALES et al., 2001 apud LIMA et al., 2009). Ainda, de acordo com SZABO et al. (1987), nesse tipo de lesão, ocorre aumento do fluxo dos íons Na⁺ e K⁺ em direção ao lúmen gástrico, associada a intensificação da secreção de pepsina. Portanto, a capacidade da amostra vegetal, em proteger a mucosa gástrica contra danos agudos, é avaliada neste protocolo.

Os resultados obtidos na triagem farmacológica mostraram que o EMeOH-*Md* inibiu significativamente as lesões gástricas provocadas pelo etanol acidificado, o que leva a sugerir que a espécie avaliada apresenta atividade gastroprotetora, o que permitiu a continuidade do trabalho, utilizando outros modelos de indução aguda de úlceras. Estudos realizados com o extrato etanólico das espécies *Maytenus rigida* (SANTOS, 2008) e *M. obtusifolia* (MOTA, 2009) corroboram com estes resultados.

O etanol é um dos agentes mais empregados para induzir úlceras em ratos (NGUELEFACK et al., 2008; RAO et al., 2008), o que o torna útil na avaliação da atividade gastroprotetora de produtos naturais (UMAMAHESWARI et al., 2007). Ocasiona danos às células e distúrbios no fluxo sanguíneo (BRZOZOWSKI, 2003), provocando edema agudo do tecido, hiperemia, hemorragias sub-epiteliais, esfoliação celular, degranulação de mastócitos com liberação de histamina, infiltração de células inflamatórias (neutrófilos) com geração de espécies reativas de oxigênio (PARK et al., 2004 apud ARAWWAWALA et al., 2010; PAN et al., 2008).

A patogênese da úlcera pelo etanol também está relacionada ao comprometimento do sistema de defesa antioxidante, levando a redução dos níveis de compostos sulfidrila, além da modulação do óxido nítrico (KONTUREK et al., 2003; LA CASA et al., 2000).

Devido ao fato de possuírem elevada reatividade química, as ROS causam alterações graves, que podem culminar em morte celular (BHARTI et al., 2010). Em nível molecular, essas espécies reativas atacam os

componentes celulares essenciais, como proteínas, lipídios e ácidos nucléicos, o que pode causar a perda de sua função biológica e formação de compostos tóxicos (KAHARAMAN et al., 2003; INEU et al., 2008).

O acetaldeído, um metabólito tóxico resultante da oxidação do etanol, atua complexando-se à glutationa, o que resulta em diminuição da disponibilidade deste componente do sistema de defesa antioxidant não enzimático, intensificando os danos à mucosa gástrica (SALASPURO, 2003).

Nesta perspectiva, foi avaliado se o EMeOH-*Md* e FaAcOEt-*Md*, nas doses anteriormente definidas, protegem a mucosa gástrica das lesões induzidas pela administração oral de etanol absoluto, em ratos. Com isso, foi observado que as amostras vegetais foram capazes de proteger a mucosa gástrica de forma significativa, das lesões decorrentes deste agente lesivo. Tais resultados corroboram aos obtidos para *Maytenus aquifolium* (GONZALEZ et al., 2001), *M. robusta* (ANDRADE et al., 2007), *M. rigida* (SANTOS, 2008) e *M. obtusifolia* (MOTA, 2009).

Contudo, por se tratar de um modelo inespecífico, é possível relacionar tal efeito farmacológico a vários fatores, tais como aumento na produção de óxido nítrico, com restabelecimento do fluxo sanguíneo local, estímulo ao sistema antioxidant, diminuição da peroxidação lipídica, produção aumentada de muco e bicarbonato, em decorrência da elevação dos níveis de prostaglandinas citoprotetoras, além de melhora no processo de regeneração das células epiteliais gástricas (RODRIGUES et al., 2010; TAKAYAMA et al., 2011).

O próximo passo desse trabalho foi investigar a influência do EMeOH-*Md* e da FaAcOEt-*Md* sobre os reflexos vagovagais e sobre a redução de fatores citoprotetores, por meio dos modelos de indução aguda de úlceras por estresse (imobilização e frio) e por AINEs (piroxicam), respectivamente.

A sensibilidade do TGI, em especial a do estômago, aos diversos estímulos estressantes é marcante (FILARETOVA, 2006), e nos últimos anos, tem-se relacionado à crescente tendência ao desenvolvimento e complicações da úlcera gástrica ao estresse, o qual é visto como importante fator etiológico desta doença (BHATIA; TANDON, 2005; METZ, 2005).

Em situações de estresse ocorre estimulação do sistema nervoso simpático (SNS) e parassimpático (SNP). A estimulação simpática promove

vasoconstricção arteriolar, por ativação de receptores α_1 , o que ocasiona redução no fluxo sanguíneo na mucosa, promovendo hipóxia local e isquemia, o que gera ROS, peroxidação lipídica e depleção dos níveis de glutatona. O estímulo do SNP aumenta a motilidade com consequente acentuação da contração do músculo gastrintestinal, levando a isquemia mucosal e aumento da secreção de ácido (RAMSAY; CARR, 2011; MORSY et al., 2012).

As lesões decorrentes de ulcerações causadas pelo estresse são caracterizadas como difusas, e localizam-se na parede mucosa do estômago, no entanto, podem surgir também no esôfago e intestino. Em geral, eventos como queimaduras, choques, sepse, procedimentos cirúrgicos e traumas são eventos que provocam este tipo de lesão (JIA et al., 2007).

Existem vários modelos de indução de estresse em animais, e nesse contexto, o modelo de imobilização e frio é responsável por proporcionar resultados mais reproduzíveis, além de apresentar relevância clínica, visto que é comumente usado (SENAV; LEVINE, 1967; JIA et al., 2007).

O aumento na secreção e na motilidade gástrica, que ocorre no estresse por imobilização e frio, é decorrente de alterações no SNC, as quais são dependentes do nervo vago e mediadas pela secreção do hormônio liberador de tireotrofina (TRH). Este hormônio em associação com a diminuição da temperatura corporal, durante o estresse, promove liberação do hormônio estimulante da tireoide ou tireotrofina (TSH) (TAKEUCHI et al., 1999; TANAKA et al., 2007).

O sistema neuro-imuno-endócrino pode exercer influência nos danos ao estômago de animais, ocasionados por estresse. Neste caso, ocorre estímulo do sistema nervoso autônomo (BANDYOPADHYAY et al., 2001), ativação do eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal (HPA) (PRUETT, 2003; FILARETOVA, 2006) e estímulo do sistema termogênico no cérebro (TANAKA et al., 2007), que tem como resultado, a modulação do sistema imune e, consequentemente, a resposta inflamatória (HAMAGUCHI et al., 2001; PRUETT, 2003; ODASHIMA et al., 2005; TANAKA et al., 2007; FILARETOVA et al., 2007).

Em contrapartida, acredita-se que esses hormônios podem exercer um papel gastroprotetor compensatório nos casos de comprometimento de mecanismos protetores da mucosa promovidos pelo NO e PGs (FILARETOVA

et al., 2007), o que indica que a ativação do eixo HPA pode ser considerada um importante fator citoprotetor (FILARETOVA et al., 2007).

No modelo de indução de úlcera por estresse (imobilização e frio), o EMeOH e a FaAcOEt de *M. distichophylla* reduziram significativamente o índice de lesão ulcerativo. Devido ao aumento da secreção ácida, inibição da secreção de muco e bicarbonato (pela estimulação da via histaminérgica, além da inibição da ação das PGs), e ainda, aumento na geração de radicais livres no modelo de estresse, é possível inferir que a atividade gastroprotetora das amostras vegetais pode estar relacionada a mecanismos antissecrétórios, citoprotetores e/ou antioxidantes.

Resultados semelhantes foram obtidos para *Maytenus robusta* (ANDRADE et al., 2007), *M. rigida* (SANTOS, 2008) e *M. obtusifolia* (MOTA, 2009).

A partir deste resultado, passou-se a investigação do efeito das amostras vegetais de *M. distichophylla* frente às úlceras gástricas induzidas por anti-inflamatório não-esteroidal (piroxicam), as quais representam um modelo mais específico relacionado com a citoproteção.

A ocorrência continuada de úlceras pépticas é atribuída, pelo menos em parte, ao uso generalizado de anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), especialmente nos países ocidentais, que associado ao envelhecimento da população, faz com que os pacientes mais idosos e com comorbidades utilizem com frequência esse tipo de medicamento. (LEE; SAROSI JR, 2011; NAJM, 2011). Dessa forma, os AINEs são considerados atualmente, como um dos principais fatores de desenvolvimento da úlcera péptica (SUNG et al., 2009).

A úlcera gástrica induzida por anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), como piroxicam, indometacina e aspirina, é um processo multifatorial que ocorre devido a efeitos locais e sistêmicos.

Com relação à ação citotóxica local, os AINEs tem demonstrado diminuir a secreção de muco e bicarbonato (PHILLIPSON et al., 2002; BAUMGARTNER et al., 2004), provocar injúrias severas à camada de fosfolipídios que recobre a superfície da mucosa, em virtude de se associarem quimicamente aos mesmos, danificando suas propriedades hidrofóbicas (LICHENBERGER et al., 2006) o que resulta na quebra da integridade da membrana, aumentando sua permeabilidade, fluidez e a formação de poros. Tudo isso contribui para

que haja retrodifusão dos íons H^+ sobre as células mucosas e, como consequência, há a ocorrência dos danos pelo ácido, os quais podem desencadear processos de apoptose e necrose (LICHTENBERGER et al., 2006; WALLACE, 2008).

A ação sistêmica dos AINEs é mediada pela inibição da enzima ciclooxigenase (COX), que bloqueia a síntese de prostaglandinas citoprotetoras, o que compromete mecanismos de proteção à mucosa gástrica, a exemplo da produção de muco e bicarbonato, além da regulação da secreção ácida (MUSUMBA et al., 2009). Os danos ao TGI vão desde sintomas dispépticos, erosões gástricas até úlceras pépticas com complicações graves, como sangramento ou perfuração (BLANDIZZI et al., 2009).

A habilidade dos AINEs em suprimir a síntese das prostaglandinas é causa fundamental para a formação das lesões gástricas, decorrentes deste agente lesivo (WALLACE, 2008; MUSUMBA et al., 2009). Complicações hemorrágicas são decorrentes da inibição da COX-1, que reduz os níveis de tromboxano, o que reflete numa maior tendência ao sangramento (MUSUMBA et al., 2009).

A COX-1 e COX-2 participam da reação de catalisação de uma etapa limitante, na conversão do ácido araquidônico em endoperóxido de prostaglandina e prostanoides (MUSUMBA et al., 2009). Contudo, ao bloquear essa via por meio do emprego dos AINEs, o ácido araquidônico que seria consumido pelas COX será deslocado para a síntese de leucotrienos na via 5-lipoxigenase, atuando como mediadores inflamatórios, o que culmina com o aumento da migração de neutrófilos para a mucosa, com peroxidação lipídica e formação de espécies reativas de oxigênio (LAINE et al., 2008).

No entanto, a capacidade dos AINEs em promover danos à mucosa gástrica também é relacionada a mecanismos independentes de COX, por meio de inúmeros agentes que atuam em conjunto com as prostaglandinas, na manutenção da integridade da mucosa gástrica, além de mecanismos de restituição do tecido lesionado (MUSUMBA et al., 2009). Nesse contexto, a inibição dos níveis do óxido nítrico (NO), do sulfeto de hidrogênio (H_2S) e de poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) exerce influência no desenvolvimento das úlceras gástricas induzidas por AINEs (OH et al., 2006; SAUNDERS et al., 2008; MUSUMBA et al., 2009).

Adicionalmente, há geração de ROS a partir da infiltração neutrofílica decorrente do aumento da permeabilidade vascular (JAINU; DEVI, 2006). Dentre esses agentes reativos, considera-se que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) age como segundo mensageiro, no processo de ativação do fator nuclear κB (NF- κB), o que culmina na produção do fator de necrose tumoral α (TNF- α) (CHATTOPADHYAY et al., 2006).

De acordo com os resultados, foi possível observar que o EMeOH-*Md* e a FaAcOEt-*Md*, nas doses avaliadas, inibiram de forma significativa as lesões gástricas, no modelo de indução de úlcera por AINEs (piroxicam), sugerindo que *M. distichophylla* apresenta atividade gastroprotetora via mecanismos citoprotetores, uma vez que as lesões promovidas por AINEs envolvem, principalmente, a inibição das PGs, principais mediadores da citoproteção na mucosa gástrica. Em estudos realizados com as espécies *Maytenus rigida* (SANTOS, 2008) e *M. obtusifolia* (MOTA, 2009), foram observados resultados semelhantes.

A partir dos resultados obtidos nos diferentes modelos experimentais avaliados, a próxima etapa foi selecionar a melhor dose do extrato e da fase obtidos de *M. distichophylla* para a elucidação dos prováveis mecanismos de ação ligados à atividade gastroprotetora. Já que o modelo de etanol comprehende amplos mecanismos de indução de lesões gástricas, além de ser um protocolo experimental simples, com garantia de reproduzibilidade e é o agente indutor dos modelos selecionados para investigação dos mecanismos de ação, o mesmo foi selecionado para a definição da dose mais efetiva, a qual foi determinada em 500 mg/kg tanto para o EMeOH, quanto para a FaAcOEt.

Dessa forma, o próximo passo do estudo do efeito gastroprotetor das amostras vegetais obtidas de *M. distichophylla*, foi avaliar a atividade antissecradora gástrica, por meio de parâmetros bioquímicos, tais como pH, concentração de íons H^+ e volume do suco gástrico, além da análise do ILU, no modelo úlceras induzidas por ligadura do piloro.

A secreção e o acúmulo de ácido no estômago, que caracterizam a patogênese das lesões induzidas por ligadura pilórica, são decorrentes dos reflexos gerados pela via vago-vagal, que por sua vez, é consequência do estímulo dos mecanorreceptores (localizados na mucosa antral) (MUTHURAMAN; SOOD, 2010), estímulo este, desencadeado pela expansão

gástrica provocada pelo aumento do volume desse órgão, devido à sua obstrução. Este procedimento provoca a secreção do hormônio gastrina, cuja função é estimular as células parietais a secretar HCl (BAGGIO et al., 2003). Um processo de autodigestão e ulceração da mucosa pode ser estabelecido neste modelo experimental, ao qual é atribuída a elevação dos níveis de pepsina (GOEL; BHATTACHARYA, 1991; BHARTI et al., 2010).

De acordo com Singh e colaboradores (2008), a ligadura do piloro interfere na resistência da mucosa gástrica e altera os níveis de prostaglandinas, citocinas, além de levar a uma situação de peroxidação lipídica, por reduzir as concentrações de glutationa endógena. Adicionalmente, neste modelo de indução de úlceras, também é observado o aumento do nível de cálcio, que por sua vez é um conhecido gerador de radicais livres (LUTNICKI et al., 2006; MUTHURAMAN; SOOD, 2010).

As alterações bioquímicas, promovidas pela geração em excesso de radicais livres, podem ser verificadas experimentalmente pelo aumento nos níveis de TBARS, cálcio e atividade da mieloperoxidase (MPO), e sobretudo, pela diminuição nos níveis de glutationa na forma reduzida (MUTHURAMAN; SOOD, 2010).

Após a ligadura do piloro, foi verificado que a administração intraduodenal do EMeOH-*Md* (500 mg/kg) e da FaAcOEt-*Md* (500 mg/kg) reduziu de forma significativa o índice de lesão ulcerativo, frente às lesões decorrentes da contensão do suco gástrico.

Na avaliação dos parâmetros bioquímicos, observou-se que as amostras vegetais não alteraram a concentração de H⁺, bem como o pH. Todavia, tanto o extrato quanto a fase diminuíram significativamente o volume do conteúdo gástrico, quando administrados por via intraduodenal, em comparação ao grupo controle negativo, em que os ratos receberam apenas solução salina 0,9%, o que sugere que a gastroproteção promovida pelas amostras vegetais está relacionada a mecanismos antissecrétórios, nas condições avaliadas. Para tanto, faz-se necessário executar estudos complementares, a exemplo do ensaio enzimático da bomba de prótons. Esses resultados corroboram aos estudos realizados com o extrato etanólico e a fase acetato de etila obtidos de *Maytenus obtusifolia*, em que foi observada também redução significativa apenas no volume do suco gástrico (MOTA, 2009).

Tendo em vista os resultados apresentados anteriormente e no intuito de compreender os mecanismos envolvidos na ação gastroprotetora, promovida pelo EMeOH e pela FaAcOEt de *Maytenus distichophylla*, foram realizados modelos experimentais com a finalidade de se investigar a participação dos grupamentos sulfidrílicos, do óxido nítrico, do muco e das prostaglandinas, no efeito farmacológico promovido por esta espécie vegetal.

Os compostos sulfidrílicos não protéicos (NP-SH) são agentes que desempenham um papel chave na proteção da mucosa contra injúria gástrica produzida pelo etanol (FERREIRA et al., 2008). A concentração relativamente elevada de NP-SH, que é principalmente glutationa reduzida (GSH), além de cisteína (CSH), coenzima A e outros tióis, indica suas possíveis implicações para gastroproteção (NAGY et al., 2007).

O aumento nos danos à mucosa gástrica está acompanhado pelo decréscimo na concentração de compostos NP-SH, devido aos grupos SH ligarem-se aos radicais livres formados pela ação dos agentes nocivos. Também podem estar envolvidos no sequestro de radicais livres de oxigênio e no controle da produção natural de muco, além de estar envolvidos na estabilização do mesmo, visto que os NP-SH formam pontes dissulfeto com as glicoproteínas (SALIM, 1993; FERREIRA et al., 2008).

A partir do modelo de indução aguda de úlcera pelo etanol absoluto, na ausência e na presença de NEM (um bloqueador de compostos sulfidrílicos, que potencializa as lesões induzidas pelo etanol), foi verificada a participação dos grupamentos SHs na proteção da mucosa gástrica promovida por *Maytenus distichophylla*. Neste experimento o EMeOH-*Md* (500 mg/kg) e a FaAcOEt-*Md* (500 mg/kg) administrados por via oral após pré-tratamento (i.p.) com solução salina 0,9%, inibiram de forma significativa as lesões ulcerativas induzidas por etanol absoluto. Porém, o pré-tratamento (i.p.) com o bloqueador diminuiu a proteção das amostras vegetais, visto que houve diferença significativa em relação aos grupos não bloqueados, sugerindo que o efeito gastroprotetor fornecido pelo EMeOH-*Md* e pela FaAcOEt-*Md* depende parcialmente da participação dos compostos SHs e que a gastroproteção ocorre em decorrência de sua atividade antioxidante. Segundo Al-Mofleh (2010), substâncias que possuem atividade antioxidante desempenham um papel importante no tratamento da úlcera péptica. A atividade gastroprotetora

das espécies *Maytenus rigida* (SANTOS, 2008) e *M. obtusifolia* (MOTA, 2009) também está relacionada à participação de grupamentos sulfidrílicos.

Objetivando investigar a participação de outro agente gastroprotetor endógeno, no que tange ao mecanismo de ação citoprotetor, da espécie vegetal *M. distichophylla*, passou-se a investigar o envolvimento do óxido nítrico (NO) na gastroproteção fornecida pelas amostras vegetais.

O óxido nítrico é uma molécula relativamente simples, que apresenta propriedades vasoativas, o que lhe confere a capacidade de mediar várias funções biológicas no trato gastrintestinal. Sua meia-vida é curta, e é produzido pela enzima sintase de óxido nítrico (NOS), a partir da conversão da L-arginina para quantidades equimolares de L-citrulina (LOIBL et al., 2006; LANAS, 2008).

A integridade do epitélio gástrico também é mantida por ação do NO, que desempenha um papel central em processos defensivos da mucosa por regulação do fluxo sanguíneo no estômago, a partir da dilatação dos vasos sanguíneos (CALVO et al., 2007). Todavia, NO é responsável tanto por mediar funções teciduais normais, quanto por originar lesões na mucosa gástrica. Nesse contexto, o NO produzido pela sintase de óxido nítrico do tipo constitutiva (cNOS) está envolvido nas defesas e no reparo tecidual, já aquele produzido pela isoforma induzível (iNOS) relaciona-se a mecanismos pró-ulcerogênicos (KOBATA et al., 2007).

Com base nos dados obtidos foi verificado que no modelo agudo de úlcera induzida por etanol em ratos, na ausência e na presença de L-NAME (um inibidor da enzima NOS), o EMeOH-*Md* e a FaAcOEt-*Md*, ambos administrados por via oral, na dose de 500 mg/kg, inibiram de forma significativa as lesões ulcerativas, não havendo diferença estatística entre os grupos pré-tratados com solução salina 0,9% e com L-NAME, o que leva a sugerir que o NO, provavelmente, não está envolvido na gastroproteção promovida por *M. distichophylla*. Esse resultado corrobora com o observado para *Maytenus obtusifolia* (MOTA, 2009).

O muco produzido no trato gastrintestinal é um importante fator de proteção tecidual que atua como agente antioxidante, reduzindo os danos à mucosa gástrica, mediados por espécies reativas de oxigênio (BERENGUER et al., 2007). Ele é produzido a partir das células mucosas (que também secretam bicarbonato), e tem como características a viscosidade e aderência, o que

impede a retrodifusão de íons H^+ na mucosa gástrica e possibilita a neutralização da acidez luminal (SATYANARAYANA, 2006). Caso essas células secretoras sejam danificadas por ROS, o muco intracelular pode ser liberado para o tecido gástrico, e evitar danos adicionais à parede gástrica por eliminação desses radicais livres (BERENGUER et al., 2007).

Constituindo a primeira linha de defesa da mucosa gástrica, essa camada de muco serve como uma barreira contra a autodigestão do tecido (ALLEN; FLEMSTROM, 2005). Além disso, outras funções importantes deste componente do sistema de defesa pré-epitelial são agir como lubrificante, durante o processo peristáltico, o que reduz acentuadamente os possíveis danos mecânicos, bem como impedir o acesso das bactérias ao epitélio (LIÉVIN-LE; SERVIN, 2006; MEYER-HOFFERT et al., 2008).

O estímulo à produção do muco pode ser decorrente de agentes que empregam o sistema colinérgico, por meio das prostaglandinas citoprotetoras, e ainda, a participação de hormônios gastrintestinais, tais como gastrina e secretina (MONTROSE et al., 2006). Morsy et al. (2012) relaciona o aumento na concentração de mucina, um dos componentes da barreira de muco, ao aumento observado experimentalmente nos níveis de NO, e isso ocorre, por meio da ativação da enzima ciclase de guanilil solúvel.

Com base nos resultados obtidos, foi possível constatar que o EMeOH-*Md* e a FaAcOEt-*Md* (500 mg/kg) não foram capazes de aumentar de forma significativa os níveis de muco, quando comparado ao controle negativo. Contudo, para os animais tratados com a ferramenta farmacológica carbenoxolona, foi verificado aumento significativo na produção de muco, como já era esperado, devido ao seu mecanismo de ação. Dessa forma, pode-se inferir a partir desses dados que, a atividade gastroprotetora de *M. distichophylla* não tem relação com esse agente protetor da mucosa, nas condições avaliadas. Resultados semelhantes foram obtidos para a fração rica em flavonoides de *Maytenus ilicifolia* (BAGGIO et al., 2007).

Para que a mucosa gástrica permaneça íntegra, se faz necessário uma produção permanente de prostaglandina E_2 (PGE $_2$) e prostaciclina (PGI $_2$) (MUSUMBA et al., 2009). Portanto, ao bloquear a biossíntese de prostaglandinas, os AINEs alteram o equilíbrio da mucosa, induzindo o recrutamento e adesão endotelial dos neutrófilos, visto que formação de PGI $_2$

pelo endotélio da microcirculação da mucosa é condição necessária para assegurar uma inibição tônica da adesão destes mediadores da inflamação (WHITTLE, 2002; BLANDIZZI et al., 2009).

No intuito de verificar a participação das prostaglandinas na gastroproteção mediada pelo EMeOH-*Md* e FaAcOEt-*Md*, foi realizado o modelo de indução de úlceras por etanol em ratos pré-tratados (v.o.) com indometacina, um inibidor da COX e consequentemente da produção de PGE₂ citoprotetora na mucosa gástrica. Neste protocolo, foi observado que nos grupos tratados com as amostras vegetais, por via oral na dose 500 mg/kg, houve exacerbação das lesões gástricas, quando se compara os respectivos grupos que foram pré-tratados com veículo e aqueles pré-tratados com indometacina, sugerindo desta maneira, que as prostaglandinas parecem estar envolvidas na gastroproteção mediada por *M. distichophylla*.

De acordo com Muthuraman; Sood (2010), a contensão do suco gástrico pela ligadura do piloro, reduz as concentrações de glutationa e também promove aumento na geração de radicais livres. Isto pode estar relacionado ao fato de que o EMeOH-*Md* e a FaAcOEt-*Md* não alteraram a concentração de muco na mucosa gástrica, possivelmente devido a produção excessiva de radicais livres, que sobrecarregaram a barreira protetora de muco (EL-ABHAR, 2010).

Embora tenha sido verificado que o efeito gastroprotetor das amostras vegetais *M. distichophylla* envolve a participação das prostaglandinas, o estímulo à produção de muco parece ter sido sobrepujado pela grande quantidade de espécies reativas geradas pela contensão do suco gástrico, o que nos leva a inferir que a reconstituição completa do muco requer a presença de níveis elevados de prostaglandina para o seu restabelecimento (EL-ABHAR, 2010).

Em face aos resultados obtidos, foi possível verificar que as amostras de *Maytenus distichophylla* apresentaram promissora atividade gastroprotetora, provavelmente relacionada a mecanismos citoprotetores e antissecrétórios, nas condições avaliadas. Contudo, se faz necessário estudos complementares.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

A partir da análise dos resultados obtidos para a espécie vegetal *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek, frente a avaliação da atividade gastroprotetora promovida pelo EMeOH e FaAcOEt, foi possível concluir que:

- ✓ O EMeOH-*Md* apresentou baixa toxicidade nas condições e parâmetros avaliados;
- ✓ O EMeOH-*Md* e a FaAcOEt-*Md*, nas doses avaliadas, apresentaram atividade gastroprotetora frente aos agentes clássicos de indução de úlceras gástricas;
- ✓ A atividade gastroprotetora exercida pelo EMeOH-*Md* e pela FaAcOEt-*Md* não envolve a participação do óxido nítrico, nem aumento de muco;
- ✓ O efeito citoprotetor gástrico promovido pelo EMeOH-*Md* e pela FaAcOEt-*Md* envolve a participação dos grupos sulfidrílicos e das prostaglandinas;
- ✓ A atividade gastroprotetora do EMeOH-*Md* e da FaAcOEt-*Md* provavelmente envolve mecanismos antissecrétórios e citoprotetores.

Perspectivas

7 PERSPECTIVAS

- ✓ Realizar o ensaio toxicológico pré-clínico agudo da FaAcOEt-*Md*;
- ✓ Investigar o efeito cicatrizante do EMeOH-*Md* e da FaAcOEt-*Md* por meio do modelo crônico de indução de úlceras por ácido acético, além de realizar análise histológica e imunohistoquímica das amostras do estômago, no intuito de investigar os fatores envolvidos no processo de cicatrização da úlcera;
- ✓ Pesquisar a proteção frente às lesões gástricas induzidas por ligadura do piloro e parâmetros bioquímicos do suco gástrico, após administração oral do EMeOH-*Md* e da FaAcOEt-*Md*.
- ✓ Determinar o efeito antiulcerogênico das amostras vegetais em modelo de úlcera duodenal induzida por cisteamina;
- ✓ Avaliar o mecanismo antioxidante envolvido na gastroproteção do EMeOH-*Md* e da FaAcOEt-*Md* por meio do modelo de isquemia e reperfusão e realizar os seguintes ensaios bioquímicos a partir das amostras do estômago:
 - Determinação do índice de peroxidação lipídica;
 - Dosagem de grupamentos sulfidrílicos não proteicos;
 - Atividade das enzimas glutationa peroxidase, glutationa redutase, superóxido dismutase, catalase e óxido nítrico sintase.
- ✓ Avaliar o efeito do EMeOH-*Md* e da FaAcOEt-*Md* nas doenças inflamatórias intestinais, pelo modelo de retocolite ulcerativa induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS);
- ✓ Realizar análise histológica e imunohistoquímica com as amostras do cólon provenientes do modelo de retocolite ulcerativa, e proceder aos seguintes ensaios:
 - Quantificação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-12);
 - Quantificação de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e IL-13);
 - Atividade das enzimas fosfatase alcalina e mieloperoxidase (MPO).

- ✓ Determinar a influência das amostras vegetais de *Maytenus distichophylla* na motilidade gastrintestinal, por meio dos modelos de esvaziamento gástrico, trânsito intestinal e diarreia.

Referências

REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 17, p. 114-140, 2007.
- AIHARA, T.; NAKAMURA, E.; AMAGASE, K.; TOMITA, K.; FUJISHITA, T.; FURUTANI, K.; OKABE, S. Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: past, present, and future. **Pharmacol. Ther.**, v. 98, p. 109-27, 2003.
- ALLEN, A.; FLEMSTRÖM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 288, p. C1-C19, 2005.
- ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANAS-JÚNIOR, L. J.; POLARI, R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. de F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 80, p. 72-76, 1999.
- AL-MOFLEH, I. A. Spices, herbal xenobiotics and the stomach: Friends or foes? **World J. Gastroenterol.**, v. 16, p. 2710-2719, 2010.
- ALTMAN, D. F. Fármacos utilizados nas doenças gastrointestinais. Em: KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica & Clínica**, 9^a ed., Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 867-891, 2005.
- ALVARENGA, N.; FERRO, E. A. Bioactive triterpenes and related compounds from Celastraceae. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 30, p. 635-702, 2005.
- ANDRADE, S. F.; LEMOS, M.; COMUNELLO, E.; NOLDIN, V.F.; CECHINEL FILHO, V.; NIERO, R. Evaluation of the antiulcerogenic activity of *Maytenus robusta* (Celastraceae) in different experimental ulcer models. **J. Ethnopharmacol.**, v. 113, p. 252-257, 2007.
- ARAWWAWALA, L. D. A. M.; THABREW, M. I.; ARAMBEWELA, L. S. R.; Gastroprotective activity of *Trichosanthes cucumerina* in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 127, p. 750-754, 2010.
- ARRIETA, J.; BENITEZ, J.; FLORES, E.; CASTILLO, C.; NAVARRETE, A. Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*: role of prostaglandins, sulphydryls, nitric oxide a capsaicin-sensitive neurons. **Planta Med.**, v. 69, p. 905-909, 2003.
- AWAAD, A. S.; EL-MELIGY, R. M.; SOLIMAN, G. A. Natural products in treatment of ulcerative colitis and peptic ulcer. **J. Saudi Chem. Soc.**, v. 17, p. 101-124, 2013.
- BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; RIECK, L.; MARQUES, M. C. A. Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC in rats. **Pharmacol. Res.**, v. 47, p. 93-98, 2003.

- BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; OTOFUJI, G. M.; CIPRIANI, T. R.; SOUZA, L. M.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; MARQUES, M. C. A.; MESIAVELA, S. Flavonoid-rich fraction of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss protects the gastric mucosa of rodents through inhibition of both H⁺, K⁺-ATPase activity and formation of nitric oxide. **J. Ethnopharmacol.**, v. 113, p. 433-440, 2007.
- BANDYOPADHYAY, D.; BISWAS, K.; BHATTACHARYYA, M.; REITER, R. J.; BANERJEE, R. K. Gastric toxicity and mucosal ulceration induced by oxygen derived reactive species: protection by melatonin. **Curr. Mol. Med.**, v.1, p. 501-513, 2001.
- BANSAL, V. K.; GOYAL, S. K.; GOSWAMI, D.S.; SINGLA, S.; RAHAR, S.; KUMAR, S. Herbal approach to peptic ulcer disease-review. **J. Biosci.Tech.**, v. 1 (1), p. 52-58, 2009.
- BANSAL, V. K.; GOEL, R. K. Gastroprotective effect of *Acacia nilotica* young seedless pod extract: role of polyphenolic constituents. **Asian Pac. J. Trop. Med.**, p. 523-528, 2012.
- BARBASTEFANO, V.; COLA, M.; FERREIRA, A. L.; SILVA, E. F.; HIRUMA-LIMA, C. A.; RINALDO, D.; VILEGAS, W., SOUZA-BRITO, A. R. M. *Vernonia polyanthes* as a new source of antiulcer drugs. **Fitoterapia**, v. 78, p. 545-551, 2007.
- BARKUN, A.; LEONTIADIS, G. Systematic review of the symptom burden, quality of life impairment and costs associated with peptic ulcer disease. **Am. J. Med.**, v. 123, p. 358-366, 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.
- BATISTA, L. M.; ALMEIDA, A. B. A.; MAGRI, L. P.; TOMA, W.; CALVO, T. C.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A. R. M. Gastric antiulcer activity of *Syngonanthus arthrotrichus* SILVEIRA. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, p. 328-332, 2004.
- BAUMGARTNER, H. K.; STARODUB, O. T.; JOEHL, J. S.; TACKETT, L.; MONTROSE, M. H. Cyclooxygenase 1 is required for pH control at the mouse gastric surface. **Gut**, v. 53, p. 1751-1757, 2004.
- BERENGUER, B.; TRABADELA, C.; SÁNCHEZ-FIDALGO, S.; QUÍLEZ, A.; MIÑO, P.; DE LA PUERTA, R.; MARTÍN-CALERO, M. J. The aerial parts of *Guazuma ulmifolia* Lam. Protect against NSAID-induced gastric lesions. **J. Ethnopharmacol.**, v. 114, p. 153-160, 2007.
- BHARTI, S.; WAHANE, V. D.; KUMAR, V. L. Protective effect of *Calotropis procera* latex extracts on experimentally induced gastric ulcers in rat. **J. Ethnopharmacol.**, v. 127, p. 440-444, 2010.
- BHATIA, V.; TANDON, R. K. Stress and gastrointestinal tract. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 20, p. 332-339, 2005.

BHATTACHARYA, S.; BANERJEE, D.; BAURI, A. K.; CHATTOPADHYAY, S.; BANDYOPADHYAY, S. K. Healing property of the *Piper betel* phenol, allylpyrocatechol against indomethacin-induced stomach ulceration and mechanism of action. **World J. Gastroenterol.**, v. 13 (27), p. 3705-3713, 2007.

BLANDIZZI, C.; COLUCCI, M. T. R. FORNAI, M.; ANTONIOLI, L.; GHISU, N.; TACCAC, M. D. Role of coxibs in the strategies for gastrointestinal protection in patients requiring chronic non-steroidal anti-inflammatory therapy. **Pharmacol. Res.**, v. 59, p. 90–100, 2009.

BLAIR, I. L. Analysis of endogenous glutathione-adducts and their metabolites. **Biomed. Chromatogr.**, v. 24 (1), p. 29-38, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006a. 92p. (Série B. Textos Básicos de Saúde). Disponível em: <<http://dab.saude.gov.br/docs/publicacoes/geral/pnpic.pdf>>. Acesso em: 15 dez. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006b. 60p. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Anvisa. **Nota técnica do comitê nacional de plantas medicinais e fitoterápicos a respeito do que foi veiculado sobre plantas medicinais e fitoterápicos na imprensa televisiva e escrita no último mês**. 2010. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d37e2180474580a88c98dc3fbc4c6735/Nota+t%C3%A9cnica+n%C2%BA+1+do+CNPMF_06+10+2010.pdf?MOD=AJPERES&useDefaultText=0&useDefaultDesc=0>. Acesso em: 15 dez. 2012.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Quim. Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

BREITMAIER, E. **Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones**. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006.

BRUNTON, L. L. In Goodman. **The Pharmacological Basis of Therapeutic's**; HARDMAN, J. G.; LIMBERD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R.W.; GOODMAN, A.G.; Eds., 10th ed.; McGraw-Hill: New York, p. 1006-1019, 2001.

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

BRZOZOWSKI, T. Experimental production of peptic ulcer, gastric damage and cancer models and their use in pathophysiological studies and pharmacological treatment - Polish achievements. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 54, p. 99-126, 2003.

BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P. C.; PAJDO, R.; PTAK-BELOWSKA, A.; KWIECIEN, S.; PAWLIK, M.; DROZDOWICZ, D.; SLIWOWSKI, Z.; BRZOZOWSKI, B.; KONTUREK, S. J.; PAWLIK, W. W. Physiological mediators in nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)-induced impairment of gastric mucosal defense and adaptation. Focus on nitric oxide and lipoxins. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 59, p. 89-102, 2008.

BRZOZOWSKI, T.; DROZDOWICZ, D.; KONTUREK, S. J.; KORBUT, R.; KRZYSIEK-MACZKA, G.; KWIECIEN, S.; OLSZANECKI, R.; PJADO, R.; PTAK-BELOWSKA, A.; STRZALKA, M.; PAWLIK, W. W. Novel concept in the mechanism of injury and protection of gastric mucosa: role of renin-angiotensin system and active metabolites of angiotensin. **Curr. Med. Chem.**, v. 19 (1), p. 55-62, 2012.

CALATAYUD, S.; BARRACHINA, D.; ESPLUGUES, J. V. Nitric oxide: relation to integrity, injury, and healing of the gastric mucosa. **Microsc. Res. Tech.**, v. 53, p. 325-335, 2001.

CALVO, T. R.; LIMA, Z. P.; SILVA, J. S.; BALLESTEROS, K. V.; PELLIZZON, C. H.; HIRUMA-LIMA, C. A.; TAMASHIRI, J.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; TAKAHIRA, R. K.; VILEGAS, W. Constituents and antiulcer effect of *Alchornea glandulosa*: activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 30, p. 451-459, 2007.

CARVALHO-OKANO, R. M.; LEITÃO FILHO, H. F. O gênero *Maytenus* Mol. emend. Mol. (Celastraceae) no Brasil extra-amazônico, 2005.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 18 (2), p. 314-319, 2008.

CASTRO, L. P.; COELHO, L. G. V.; VIEIRA, W. L. S. V.; RODRIGUES, M. A. G. Úlcera péptica gastroduodenal. **Tratado Clínica Médica**. 2ª ed. São Paulo: Ed. Roca, 2009.

CHATTOPADHYAY, I.; BANDYOPADHYAY, U.; BISWAS, K.; MAITY, P.; BANERJEE, R.K. Indomethacin inactivates gastric peroxidase to induced reactive oxygen mediated gastric mucosal injury and curcumin protects it by preventing peroxidase inactivation and scavenging reactive oxygen. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 40, p. 1397-1408, 2006.

CHEN, D.; AIHARA, T.; ZHAO, C.; HAKANSON, R.; OKABE, S. Differentiation of the gastric mucosa I. Role of histamine in control of function and integrity of oxytic mucosa: understanding gastric physiology through disruption of targeted genes. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 291, p. G549-G544, 2006.

CHOW, D. K. L.; SUNG, J. J. Y. Non-NSAID non-*H. pylori* ulcer disease. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 23, p. 3-9, 2009.

CINDRIĆ, I. J.; ZEINER, M.; GLAMUZINA, E.; STINGEDER, G. Elemental characterisation of the medical herbs *Salvia officinalis* L. and *Teucrium montanum* L. grown in Croatia. **Microchem. J.**, v. 107, p. 185-189, 2013.

- CORREA, P.; HOUGHTON, J. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol.*, v. 133, p. 659-672, 2007.
- CORSINO, J.; BOLZANI, V. S.; PEREIRA, A. M. S. P.; FRANÇA, S. C.; FURLAN, M. Further sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus aquifolium*. *Phytochemistry*, v. 49, p. 2181-2183, 1998.
- DALLEGRAVE, E. Toxicidade reprodutiva do herbicida glifosato - Roundupâ em ratos Wistar. 225 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.
- DEY, I.; LEJEUNE, M.; CHADEE, K. Prostaglandin E₂ receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. *Br. J. Pharmacol.*, v. 149, p. 611-23, 2006.
- DEWICK, P. M. The mevalonate and deoxyxylulose phosphate pathways: terpenoids and steroids. In: DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach**. 2^a ed. United Kingdom, School of Pharmaceutical Sciences University of Nottingham, John Wiley & Sons, Ltd, Cap. 5, p. 167, 2002.
- DIXON, M. F. Patterns of inflammation linked to ulcer disease. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, v. 14, p. 27-40, 2000.
- DUARTE, M. C.; SILVA, A. K. M.; COSTA, V. C. O.; SILVA FILHO, R. N.; TAVARES, J. F.; AGRA, M. F. SILVA, M. S. Maytensifolona, um novo Triterpeno Friedelano de *Maytenus distichophylla*. **35^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2012.
- EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother. Res.*, v. 21, p. 308-323, 2007.
- EL-ABHAR, H. S. Coenzyme Q10: A novel gastroprotective effect via modulation of vascular permeability, prostaglandin E₂, nitric oxide and redox status in indomethacin-induced gastric ulcer model. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 649, p. 314-319, 2010.
- ESCOBEDO-HINOJOSA, W. I.; DEL CARPIO, J. D.; PALACIOS-ESPINOSA, J. F.; ROMERO, I. Contribution to the ethnopharmacological and anti-*Helicobacter pylori* knowledge of *Cyrtocarpa procera* Kunth (Anacardiaceae). *J. Ethnopharmacol.*, v. 143, p. 363-371, 2012.
- EVANGELISTA, S. Role of sensory neurons in restitution and healing of gastric ulcers. *Curr. Pharm. Des.*, v. 12, p. 2977-84, 2006.
- FALCÃO, H. S. Mecanismos de ação referentes à atividade antiulcerogênica das fases clorofórmica e acetato de etila obtidas de *Praxelis clematidea* (Griseb.) R. M. King & H. Robinson (Asteraceae). Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, 2011.
- FARIA, F. M.; ALMEIDA, A. C. A.; FERREIRA, A. L.; TAKAYAMA, C.; DUNDER, R. J.; SILVA, M. A.; SALVADOR, M. J.; ABDELNUR, P. V.; EBRLIN, M. N.; VILEGAS, W.; TOMA, W.; SOUZA-BRITO, A. R. M. Antioxidant action of

mangrove polyphenols against gastric damage induced by absolute ethanol and ischemia-reperfusion in the rat. **Sci. World J.**, v. 2012, p. 1-9, 2012.

FERREIRA, M. P.; NISHIJIMA, C. M.; SEITO, L. N.; DOKKEDAL, A. L.; LOPES-FERREIRA, M.; DI STASI, L. C.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A.; Gastroprotective effect of *Cissus sicyoides* (Vitaceae): Involvement of microcirculation, endogenous sulfhydryls and nitric oxide. **J. Ethnopharmacol.**, v. 117, p. 170-174, 2008.

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

FILARETOVA, L. The hypothalamic-pituitary-adrenocortical system: Hormonal brain-gut interaction and gastroprotection. **Auton. Neurosci.**, v. 125, p. 86-93, 2006.

FILARETOVA; L.; PODVIGINA, T.; BAGAEVA, T.; BOBRYSHOV, P.; TAKEUCHI, K. Gastroprotective role of glucocorticoid hormones. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 104, p. 195-201, 2007.

FORNAI, M.; ANTONIOLI, L.; COLUCCI, R.; BERNARDINI, N.; GHISU, N.; TUCCORI, M.; DE GIORGIO, R.; DEL TACCA, M.; BLANDIZZI, C. Emerging role of cyclooxygenase isoforms in the control of gastrointestinal neuromuscular functions. **Pharmacol. Ther.**, v. 125, p. 62-78, 2010.

FRIIS-HANSEN, L.; RIENECK, K.; NILSSON, H.; WADSTRÖM, T.; REHFELD, J. F. Gastric inflammation, metaplasia and tumor development in gastrin-deficient mice. **Gastroenterol.**, v. 131, p. 246-258, 2006.

FRY, C. Secretions of the salivary glands and stomach. **Basic Science**, v. 27, p. 503-506, 2009.

FUCCIO, L.; MINARDI, M. E.; ZAGARI, R. M.; GRILLI, D.; MAGRINI, N.; BAZZOLI, F. Meta-analysis: duration of first-line proton-pump inhibitor based triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. **Ann. Intern. Med.**, v. 147, p. 553-562, 2007.

GANESAN, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 12, p. 306-317, 2008.

GANGULY, K.; KUNDU, P.; BANERJEE, A.; REITER, R. J.; SWARNAKAR, S. Hydrogen peroxide-mediated downregulation of matrix metalloprotease-2 in indomethacin-induced acute gastric ulceration is blocked by melatonin and other antioxidants. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 41, p. 911-925, 2006.

GARRIDO, C.; BRUNET, M.; DIDELOT, C.; ZERMATI, Y.; SCHMITT, E.; KROEMER, G. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. **Cell Cycle**, v. 5, p. 2592-601, 2006.

GIBSON, J. A.; ODZE, R. D. Pathology of diseases that cause upper gastrointestinal tract bleeding. **Gastrointest. Endoscopy Clin. N. Am.**, v. 21, p. 583-596, 2011.

- GOEL, R. K.; BHATTACHARYA, S. K. Gastroduodenal mucosal defence and mucosal protective agents. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 29, p. 701-714, 1991.
- GONÇALES, F.; PORTELA, T.; STIPP, E.; DI STASI, L. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 77, p. 441-447, 2001.
- GONZALEZ, F. G.; PORTELA, T. Y.; STIPP, E. J.; DI STASI, L. C. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 77, p. 41-47, 2001.
- GOO, T.; AKIBA, Y.; KAUNITZ, J. D. Mechanisms of intragastric pH sensing. **Curr. Gastroenterol. Rep.**, v. 12, p. 465-470, 2010.
- GOWER JR, W. R.; PREMARATNE, S.; MCCUEN, R. W.; ARIMURA, A.; MCAFEE, Q.; SCHUBERT, M. L. Gastric atrial natriuretic peptide regulates endocrine secretion in antrum and fundus of human and rat stomach. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 284, p. G638-G64, 2003.
- GROENEM, M. J. M.; KUIPERS, E. J.; HANSEN, B. E.; OUWENDDIJIK, T. J. T. Incidence of duodenal ulcers and gastric ulcers in a Western population: Back to where it started. **Can. J. Gastroenterol.**, v. 23 (9), p. 604-608, 2009.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radical in Biology and Medicine**, 3^a ed., Oxford University Press: Oxford, 2002; 4^a ed., 2007.
- HAMAGUCHI, M.; WATANABE, T.; HIGUCHI, K.; TOMINAGA, K.; FUJIWARA, Y.; ARAKAWA, T. Mechanisms and roles of neutrophil infiltration in stress induced gastric injury in rats. **Dig. Dis. Sci.**, v. 46, p. 2708-2715, 2001.
- HATAZAWA, R.; TANAKA, A.; TANIGAMI, M.; AMAGASE, K.; KATO, S.; ASHIDA, Y.; TAKEUCHI, K. Cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 accelerates the healing of gastric ulcers via EP₄ receptors. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 293, p. G788-797, 2007.
- HENKEL, R. R. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. **Asian J. Androl.**, v. 13, p. 43-52, 2011.
- HERNÁNDEZ, C.; SANTAMATILDE, E.; MCCREATH, K. J.; CERVERA, A.M.; DÍEZ, I.; ORTIZ-MASIÁ, D.; MARTÍNEZ, N.; CALATAYUD, S.; ESPLUGUES, J. V.; BARRACHINA, M. D. Induction of trefoil factor (TFF)1, TFF2 and TFF3 by hypoxia is mediated by hypoxia inducible factor-1: implications for gastric mucosal healing. **Br. J. Pharmacol.**, v. 156 (2), p. 262-272, 2009.
- HIARATA, T.; NAITO, Y.; HANNA, O. Heat-shock protein 70-overexpressing gastric epithelial cells are resistant to indomethacin-induced apoptosis. **Digestion**, v. 79, p. 243-250, 2009.
- HOLZER, P. Role of visceral afferent neurons in mucosal inflammation and defense. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 7, p. 563-569, 2007.
- HOOGERWERF, W. A.; PASRICHA, P. J. Agentes usados para o controle da acidez gástrica e no tratamento de úlceras pépticas e da doença do refluxo

gastroesofágico. Em: Goodman & Gilman. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10 ed. New York: Mc Graw Hill, p. 757-768, 2005.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; DE FÁTIMA, A. Glutationa e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quim. Nova**, v. 31, p. 1170-1179, 2008.

INEU, R. P.; PEREIRA, M. E.; ASCHNER, M.; NOGUEIRA, C. W.; GENI, G.; ROCHA, J. B. T. Diphenyl diselenide reverses gastric lesions in rats: Involvement of oxidative stress. **Food Chem. Toxicol.**, v. 46 (9), p. 3023-3029, 2008.

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

JAINU, M.; DEVI, C. S. S. Gastroprotective action of *Cissus quadrangularis* extract against NSAID induced gastric ulcer: Role of proinflammatory cytokines and oxidative damage. **Chem. Biol. Interact.**, v. 161, p. 262-270, 2006.

JESUS, N. Z. T. Avaliação da atividade antiulcerogênica do extrato etanólico bruto e da fase hexânica de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae) em modelos animais. Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, 2012.

JIA, Y. T.; WEI, W.; MA, B.; XU, Y.; LIU, W. J.; WANG, Y.; LVKAI, Y.; TANG, H. T.; WEI, D.; XIA, Z. F. Activation of p38 mapk by reactive oxygen species is essential in a rat model of stress-induced gastric mucosal injury. **J. Immunol.**, v. 179, p. 7808-7819, 2007.

JOFFILY, A.; VIEIRA, R. C. Anatomia foliar de *Maytenus Mol. Emend Mol.* (Celastraceae), ocorrente no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v. 19, p. 549-561, 2005.

JORDÃO-JÚNIOR, A. A.; CHIARELLO, P. G.; BERNARDES, M. M.; VANNUCCI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutationa reduzida e da vitamina E. **Medicina**, v. 31, p. 434- 449, 1998.

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

KALANT, H.; GRANT, D.; MITCHELL, J. **Principles of medical pharmacology**. 7 ed. Elsevier Canada Ltd., p. 557-559, 2007.

KAM, P. C. A ; SO, A. COX-3: Uncertainties and controversies. **Curr. Anaesth. Crit. Care**, v. 20, p. 50-53, 2009.

KATO, S.; AIHARA, E.; YOSHII, K.; TAKEUCHI, K. Dual action of prostaglandin E2 on gastric acid secretion through different EP receptor subtypes in the rat. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 289, p. G64-69, 2005.

- KOBATA, A.; KOTANI, T.; KOMATSU, Y.; AMAGASE, K.; KATO, S.; TAKEUCHI, K. Dual action of nitric oxide in the pathogenesis of ischemia/reperfusion-induced mucosal injury in mouse stomach. **Digestion**, v. 75, p. 188-197, 2007.
- KONTUREK, P. C.; BRZOZOWSKI, T.; KANIA, J.; KONTUREK, S. J.; HAHN, E. G. Nitric oxide releasing aspirin protects gastric mucosal against ethanol damage in rats with functional ablation of sensory nerves. **Inflamm. Res.**, v. 52, p. 359-365, 2003.
- KONTUREK, P. C.; KONTUREK, J. S.; OCHMANSKI, W. Neuroendocrinology of gastric H⁺ and duodenal HCO₃⁻ secretion: the role of brain-gut axis. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 499, p. 15-27, 2004.
- KONTUREK, S. J.; KONTUREK, P. C.; BRZOZOWSKI, T. Prostaglandins and ulcer healing. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 56, p. 5-31, 2005.
- KONTUREK, S. J.; KONTUREK, P. C.; KONTUREK, J. W.; PLONKA, M.; CZESNIKIEWICZ-GUZIK, M.; BRZOZOWSKI, T.; BIELANSKI, W. *Helicobacter pylori* and its involvement in gastritis and peptic ulcer formation. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 57, p. 29-50, 2006.
- KOTANI, T.; KOBATA, A.; NAKAMURA, E.; AMAGASE, K.; TAKEUCHI, K. Roles of cyclooxygenase-2 and prostacyclin/IP receptors in mucosal defense against ischemia/reperfusion injury in mouse stomach. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 316, p. 547-555, 2006.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Tecido de renovação e reparações: Regeneração, Cicatrização e Fibrose. Em: **Robbins & Cotran - Patologia**. 7^a ed. Elsevier Ltda. Rio de Janeiro p. 99, 2005.
- KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S. J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 53, p. 39-50, 2002.
- LA CASA, C.; VILLEGAS, I.; ALARCON DE LA LASTRA, C.; MOTILVA, V.; MARTIN CALERO, M. J. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone against ethanol induced gastric lesions. **J. Ethnopharmacol.**, v. 71, p. 45-53, 2000.
- LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. Reviews in Basic and a Clinical Gastroenterology. **Gastroenterol.**, v. 135, p. 41-60, 2008.
- LAKSHMI , V.; SINGH, N.; SHRIVASTVA, S.; MISHRA, S. K.; DHARMANI, P.; MISHRA, V.; PALIT, G. Gedunin and photogedunin of *Xylocarpus granatum* show significant anti- secretory effects and protect the gastric mucosa of peptic ulcer in rats. **Phytomedicine**, v. 17, p. 569-574, 2010.
- LANAS, A. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract. **Arthritis Res. Ther.**, v. 10, p. 1-6, 2008.

LARSEN, R.; HANSEN, M. B.; BINDSLEV N. Duodenal secretion in humans mediated by the EP₄ receptor subtype. **Acta Physiol. Scand.**, v. 185, p. 133-140, 2005.

LEE, C. W.; SAROSI JR., G. A. Emergency ulcer surgery. **Surg. Clin. N. Am.**, v. 91, p. 1001-1013, 2011.

LEONG, R.W. Differences in peptic ulcer between the east and the west. **Gastroenterol. Clin. N. Am.**, v. 38, p. 363-379, 2009.

LEVINE, R. J. A method for rapid production of stress ulcers in rats. In: C. J. PFEIFFER. Peptic Ulcer. **Munksgaard**, Copenhagen. p. 92-97, 1971.

LI, C. H.; PAN, L. H.; LI, C. Y.; ZHU, C. L.; XU, W. X. Localization of ANP-synthesizing cells in rat stomach. **World J. Gastroenterol.**, v. 21, p. 5674-5679, 2006.

LICHTENBERGER, L. M.; ZHOU, Y.; DIAL, E. J.; RAPHAEL, R. M. NSAID injury to the gastrointestinal tract: evidence that NSAIDs interact with phospholipids to weaken the hydrophobic surface barrier and induce the formation of unstable pores in membranes. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 58, p. 1421-1428, 2006.

LIÉVIN-LE, M. V.; SERVIN, A. L. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiots. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, p. 315-37, 2006.

LIMA, G. R. M. Atividade gastroprotetora de *Combretum duarteanum* Cambess em modelos animais. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, 2011.

LIMA, I. O. Avaliação farmacológica do extrato metanólico bruto e da fase n-butanólica obtida da espécie *Herissantia crispa* (L.) Brizicky em modelos animais frente à atividade antiulcerogênica. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, 2008.

LIMA, Z. P.; SANTOS, R. C.; TORRES, T. U.; SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C. M.; SANTOS, L. C.; PELLIZZON, C. H.; ROCHA, L. R. M.; VILEGAS, W.; SOUZABRITO, A. R. M.; CARDOSO, C. R. P.; VARANDA, E. A.; MORAES, H. P.; BAUAB, T. M.; CARLI, C.; CARLOS, I. Z.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Byrsonima fagifolia*: An integrative study to validate the gastroprotective, healing, antidiarrheal, antimicrobial and mutagenic action. **J. Ethnopharmacol.**, v. 120, p. 149-160, 2008.

LOIBL, S.; BRATENGEIER, J.; FARINES, V.; VON MINCKWITZ, G.; SPANKUCH, B.; SHINI-KERTH, V.; NEPVEU, F.; STREBHARDT, K.; KAUFMANN, M. Investigations on the inducible and endothelial nitric oxide synthases in human breast cancer cell line MCF-7-estrogen has an influence on e-NOS, but not on i-NOS. **Pathol. Res. Pract.**, v. 202, p. 1-7, 2006.

- LUIZ-FERREIRA, A.; COLA, M.; BARBASTEFANO, V.; FARIAS-SILVA, E.; CALVO, T. R.; ALMEIDA, A. B. A.; PELLIZZON, C. H.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W.; SOUZA-BRITO, A. R. M. *Indigofera suffruticosa* Mill as new source of healing agent: Involvement of prostaglandin and mucus and heat shock proteins. *J. Ethnopharmacol.*, v. 137, p. 192-198, 2011.
- LUTNICKI, K.; SZPRINGER, E.; WRÓBEL, J.; JAWORSKA-ADAMU, J. in: Verapamil and calcium ions in ethanol evoked gastric mucosa injury, *Ann. Univ. Mariae Curie Skłodowska Sect. DDD XIX*, p. 275-281, 2006.
- MAHDY, A. M.; WEBSTER, N. R. Histamine and antihistamines. *Anaesth. Intensive Care Med.*, v. 12 (7), p. 324-329, 2011.
- MAHOMOODALLY, F.; MESAIK, A.; CHOUDHARY, M. I.; SUBRATTY, A. H.; GURIB-FAKIM, A. In vitro modulation of oxidative burst via release of reactive oxygen species from immune cells by extracts of selected tropical medicinal herbs and food plants. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, p. 440-447, 2012.
- MAJUMDAR, D.; BEBB, J.; ATHERTON, J. *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcers. *Medicine*, v. 35, p. 204-209, 2007.
- MAJUMDAR, D.; BEBB, J.; ATHERTON, J. *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcers. *Medicine*, v. 39 (3), p. 154-161, 2010.
- MALFERTHEINER, P.; CHAN, F. K. L; MCCOLL, K. E. L. Peptic ulcer disease. *Lancet*, v. 374, p. 1449-61, 2009.
- MARIZE, C. V. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL₅₀”. *Rev. Elet. Farm.*, v. 3, p. 93-98, 2006.
- MARSOLLA, P. Gastrite e Úlceras. Publicado 13/12/2009. <Disponível em: <http://www.webartigos.com/articles/29949/1/ESTRESSE-E-LESOESGASTRICAS/pagina1.html#ixzz1CFXkJ0xG>> Acesso em: 27 out 2012.
- MASSIGNANI, J. J.; LEMOS, M.; MAISTRO, E. L.; SCHAPHAUSER, H. P.; JORGE, R. F.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; DE ANDRADE, S. F. Antilcerogenic activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* on different experimental models in rats. *Phytother. Res.*, v. 23, p. 1355-1360, 2009.
- MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulphhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by mormodin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol induced gastric mucosal lesion in rats. *Life Sci.*, v. 65, p. 27-32, 1999.
- MAUCHLEY, D.; MENG, X.; JOHNSON, T.; TEITELBAUM, J.; BABU, A.; FULLERTON, D. A.; WEYANT, M. J. Heat shock protein 27: Induction by gastroduodenal reflux in vivo and augmentation of human esophageal mucosal cell growth in vitro. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, v. 139 (4), p. 1019-1025, 2010.
- MEGALA, J.; GEETHA, A. Free radical-scavenging and H⁺, K⁺-ATPase inhibition activities of *Pithecellobium dulce*. *Food Chemistry*, v. 121, p. 1120-1128, 2010.

- MEHTA, D.; BHARGAVA, D.K. Non-steroidal anti inflammatory drugs and gastrointestinal toxicity. **Apollo Medicine**, v. 7 (4), p. 251-262, 2010.
- MEJIA, A.; KRAFT, W. K. Acid peptic diseases: Pharmacological approach to treatment. **Expert Rev. Clin. Pharmacol.**, v. 2 (3), p. 295-314, 2009.
- METZ, D. C. Preventing the gastrointestinal consequences of stress-related mucosal disease. **Curr. Med. Res Op.**, v. 21, p.11-18, 2005.
- MEYER-HOFFERT, U.; HORNEF, M. W.; HENRIQUES-NORMARK, B. Secreted enteric antimicrobial activity localises to the mucus surface layer. **Gut**, v. 57, p. 764-71, 2008.
- MILLS, J. C.; SHIVDASANI, R. A. Gastric epithelial stem cells. **Gastroenterol.**, v. 140, p. 412-424, 2011.
- MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol induced gastric lesions in rats. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 33, p. 939-945, 1983.
- MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **Br. J. Pharmacol.**, v. 147, p. S193-S201, 2006.
- MONTENEGRO, C.A. Atividade gastroprotetora de *Xylopia langsdorffiana* A. St.-Hil. & Tul. (Annonaceae) em modelos animais. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, 2011.
- MONTROSE, M. H.; YASUTADA, A.; TAKEUCHI, K.; KUANITZ, J. D. **Gastroduodenal mucosal defense**. In: JOHNSON, L.R. (ed) New York: Academic Press, p. 1259-1291, 2006.
- MORAES, T. M.; KUSHIMA, H.; MOLEIRO, F. C.; SANTOS, R. C.; ROCHA, L. R. M.; MARQUES, M. O.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A.; Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: Role of prostaglandins and gastric mucus secretion. **Chem. Biol. Interact.**, v. 180, p. 499-505, 2009.
- MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; SUKAMOTO, T. Effects of the new antiulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 57, p. 495-505, 1991.
- MORSY, M. A.; HEEBA, G. H.; ABDELWAHAB, S. A.; ROFAEIL, R. R. Protective effects of nebivolol against cold restraint stress-induced gastric ulcer in rats: Role of NO, HO-1, and COX-1,2. **Nitric Oxide**, v. 27, p. 117-122, 2012.
- MÖSSNER, J.; CACA, K. Developments in the inhibition of gastric acid secretion. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 35, p. 469-475, 2005.
- MOTA, K. S. L. Avaliação da atividade antiulcerogênica de *Maytenus obtusifolia* Mart. (Celastraceae) em modelos animais. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, 2009.

MUSUMBA, C.; PRITCHARD, D. M.; PIRMOHAMED, M. Cellular and molecular mechanisms of NSAID-induced peptic ulcers. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 30, p. 517-531, 2009.

MUTHURAMAN, A.; SOOD, S. Antisecretory, antioxidative and antiapoptotic effects of montelukast on pyloric ligation and water immersion stress induced peptic ulcer in rat. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 83, p. 55-60, 2010.

NAGESWARARAO, K.B.; LAKSHMI, K.; RAMAKRISHNA, R. Nitric oxide: A novel therapeutic target. **Int. J. Pharm. Sci. Res.**, v. 2, n. 7, p. 1603-1615, 2011.

NAGY, L.; NAGATA, M.; SZABO, S. Protein and non-protein sulfhydryls and disulfides in gastric mucosa and liver after gastrototoxic chemicals and sucralfate: Possible new targets of pharmacologic agents. **World J. Gastroenterol.**, v. 13 (14), p. 2053-2060, 2007.

NAJM, W.I. Peptic ulcer disease. **Prim. Care Clin. Office Pract.**, v. 38, p. 383-394, 2011.

NGUELEFACK, T. B.; FEUMEBO, C. B.; ATEUFACK, G.; WATCHO, P.; TATSIMO, S.; ATSAMO, A. D.; TANE, P.; KAMANYI, A. Antiulcerogenic properties of the aqueous and methanol extracts from the leaves of *Solanum torvum* Swartz (Solanaceae) in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 119, p. 135-140, 2008.

NIETO, Y. B. Úlcera péptica. **Medicine**, v. 11, n. 3, p. 137-141, 2012.

NISHIO, H.; TERASHIMA, S.; NAKASHIMA, M.; AIHARA, E.; TAKEUCHI, K. Involvement of prostaglandin E receptor EP₃ subtype and prostacyclin IP receptor in decreased acid response in damaged stomach. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 58, p. 407-421, 2007.

ODASHIMA, M.; OTAKA, M.; JIN, M.; KOMATSU, K.; WADA, I.; MATSUHASHI, T.; HORIKAWA, Y.; HATAKEYAMA, N.; OYAKE, J.; OHBA, R.; LINDEN, J.; WATANABE, S. Selective adenosine A2A receptor agonist, ATL 146e, attenuates stress-induced gastric lesions in rats. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 20, p. 275-280, 2005.

OH, G.S.; PAE, H. O.; LEE, B. S.; KIM, B. N.; KIM, J. M.; KIM, H. R.; JEON, S. B.; JEON, W. K.; CHAE, H. J.; CHUNG, H. T. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor- κ B via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 41, p. 106-119, 2006.

OHNO T.; HATTORI Y.; KOMINE R.; MIZUGUCHI, S.; ARAI, K.; SAEKI, T.; SUZUKI, T.; HOSONO, K.; HAYASHI, I.; OH-HASHI, Y.; KURIHARA, Y.; KURIHARA, H.; AMAGASE, K.; OKABE, S.; SAIGENJI, K.; MAJIMA, M. Roles of calcitonin gene-related peptide in maintenance of gastric mucosal integrity and in enhancement of ulcer healing and angiogenesis. **Gastroenterol.**, v. 134, p. 215-25, 2008.

OHSAKI, A.; IMAI, Y.; NARUSE, M.; AYABE, S.; KOMIYAMA, K.; TAKASHIMA, J. Four New Triterpenoids from *Maytenus ilicifolia*. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 469-471, 2004.

OLBE, L.; CARLSSON, E.; LINDBERG, P. A proton-pump inhibitor expedition: The case histories of omeprazole and esomeprazole. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 2, p. 132-139, 2003.

O'NEIL, D. H. R.; LEONARD, A. Gastric disorders: modifications of gastric content, antacids and drugs influencing gastric secretions and motility. **Anaesth. Intensive Care Med.**, v. 13 (2), p. 67-70, 2011.

PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol. Res.**, v. 87, n. 1, p. 315-424, 2007.

PAN, J. S.; HE, S. Z.; XU, H. Z.; ZHAN, X. J.; YANG, X. N.; XIAO, H. M.; SHI, H. X.; REN, J. L. Oxidative stress disturbs energy metabolism of mitochondria in ethanol-induced gastric mucosa injury. **J. Gastroenterol.**, v. 14, n. 38, p. 5857-5867, 2008.

PARIKH, N.; HOWDEN, C.W. The safety of drugs used in acid-related disorders and functional gastrointestinal disorders. **Gastroenterol. Clin. N. Am.**, v. 39, p. 529-542, 2010.

PARK, S.; HAHM, K.; OH, T.; Jin, J.; CHOUE, R. Preventive effect of the flavonoid, Wogonin, against ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. **Dig. Dis. Sci.** 49, 384-394, 2004.

PERRINO, B. A. Regulation of gastrointestinal motility by Ca^{2+} /calmodulin-stimulated protein kinase II. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 510, p. 174-181, 2011.

PERTINO, M.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RODRÍGUEZ, J. A.; THEODULOZ, C. Gastroprotective effect and cytotoxicity of terpenes from the Paraguayan crude drug "yagua rova" (*Jatropha isabelli*). **J. Ethnopharmacol.**, v. 111, p. 553-559, 2007.

PHILLIPSON, M.; ATUMA, C.; HENRIKSNAS, J.; HOLM, L. The importance of mucus layers and bicarbonate transport in preservation of gastric juxtamucosal pH. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 282, n. 2, p. G211-G219, 2002.

PHILLIPSON, M.; JOHANSSON, M. E. V.; HENRIKSNAS, J.; PETERSSON, J.; GENDLER, S. J.; SANDLER, S.; PERSSON, A. E. G.; HANSSON, G. C.; HOLM, L. The gastric mucus layers: constituents and regulation of accumulation. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 295, p. G806-G812, 2008.

PRUETT, S. B. Stress and the immune system. **Pathophysiology**, v. 9, p. 133-153, 2003.

PUSCAS, I.; PUSCAS, C.; COLTAU, M.; PASÇA, R.; TORRES, J.; MÁRQUEZ, M.; HERRERO, E.; FILLAT, O.; ORTIZ, J. A. Comparative study of the safety and efficacy of ebrotidine versus ranitidine and placebo in the prevention of

piroxicam induced gastroduodenal lesions. **Arzneimittelforschung**, v. 47, p. 568-572, 1997.

QUEIROGA, C. L.; SILVA, G. F.; DIAS, P. C.; POSSENTI, A.; CARVALHO, J. E. Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelan-3 β -ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 72, p. 465-468, 2000.

RABELO, A. S.; OLIVEIRA, I. D.; GUIMARÃES, A. G.; QUINTANS, J. S. S.; PRATA, A. P. N.; GELAIN, D. P.; VENCESLAU, E. M.; SANTOS, J. P. A.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; BONJARDIM, L. R.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; SANTOS, A. D. C.; NOGUEIRA, P. C. L.; COSTA, E. V.; MORAES, V. R. S.; ARAÚJO, A. A. S. Antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant activities of aqueous extract from *Remirea maritima* (Cyperaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 145, p. 11-17, 2013.

RAFFATULLAH, S.; TARIQ, M.; AL-YAHYA, M. A.; MOSSA, J. S.; AGEEL, A. M. Evaluation of turmeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 29, p 25-34, 1990.

RAMAKRISHNAN, K.; SALINAS, R. C. Peptic Ulcer Disease. **Am. Fam. Physician.**, v. 76, p. 1005-1012, 2007.

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

RAO, C. V.; VERMA, A. R.; VIJAYAKUMAR, M.; RASTOGI, S. Gastroprotective effect of standardized extract of *Ficus glomerata* fruit on experimental gastric ulcers in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 115, p. 323-326, 2008.

RAZA, M.; AL-SHABANAH, O. A.; EL-HADIYAH, T. M.; AL-MAJED, A. A Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. **Sci. Pharm.**, v. 70, p. 135-145, 2002.

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

ROCHA, C. S.; PIMENTEL, R. M. M.; RANDAU, K. P.; XAVIER, H. S. Morfoanatomia de folhas de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae): uma espécie utilizada como medicinal no nordeste do Brasil. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 23, p. 472-476, 2004.

RODRIGUES, P. A.; MORAIS, S. M.; SOUZA, C. M.; SILVA, A. R.; ANDRADE, G. M. SILVA, M. G. V.; ALBUQUERQUE, R. L.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. Gastroprotective effect of barbatusin and 3- beta- hydroxy-3 – deoxibarbatusin, quinonoid diterpenes isolated from *Plectranthus grandis*, in ethanol- induced gastric lesions in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 127, p. 725-730, 2010.

RODRÍGUEZ, J. A.; THEODULOZ, C.; YÁNEZ, T.; BECERRA, J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Gastroprotective and ulcer healing effect of ferruginol in

mice and rats: assessment of its mechanism of action using in vitro models. **Life Sci.**, v. 78, p. 2503-2509, 2006.

ROSÉN, J.; GOTTFRIES, J.; MURESAN, S.; BACKLUND, A.; OPREA, T. I. Novel chemical space exploration via natural products. **J. Med. Chem.**, v. 52, p. 1953-1962, 2009.

SALASPURO, M. P. Alcohol consumption and cancer of the gastrointestinal tract. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 17, p. 679-694, 2003.

SALIM, A. S. Sulfhydryl-containing agents: new approach to the problem of refractory peptic ulcer. **Pharmacol.**, v. 46, p. 281-288, 1993.

SÁNCHEZ, M.; THEODULOZ, C.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RAZMILIC, I.; YÁÑEZ, T.; RODRÍGUEZ, J.A. Gastroprotective and ulcer-healing activity of oleanolic acid derivatives: In vitro–in vivo relationships. **Life Sci.**, v. 79, p. 1349-1356, 2006.

SANTOS, V. L. Avaliação da atividade antiulcerogênica, antidiarréica e antiespasmódica do extrato etanólico bruto e fase acetato de etila obtidos da entrecasca do caule de *Maytenus rigida* mart. (celastraceae) em modelos animais. Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, 2008.

SATYANARAYANA, M. N. Capsaicin and gastric ulcers. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 46, p. 275-328, 2006.

SAUNDERS, F. R.; HUGHES, A.; WALLACE, H. M. Investigating the effects of NSAIDs on the expression of regulatory components of the polyamine pathway. **Toxicology**, v. 253, p.22-23, 2008.

SCARPIGNATO, C.; PELOSINI, I.; DI MARIO, F. D. Acid suppression therapy: Where do we go from here? **Dig. Dis.**, v. 24, p. 11-46, 2006.

SCHMITT, E. K.; MOORE, C. M.; KRASTEL, P.; PETERSEN, F. Natural products as catalysts for innovation: a pharmaceutical industry perspective. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 15, p. 497-504, 2011.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v. 10, Nº 4 – Jul/Ago, 2004.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 23, p. 595-601, 2007.

SCHUBERT, M. L.; PEURA, D. A. Control of gastric acid secretion in health and disease. Reviews in basic and clinical gastroenterology. **Gastroenterol.**, v. 134, p.1842-1860, 2008.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 27, p. 536-542, 2011.

SENEY, E. C.; LEVINE, R. J. Synergism between cold and restraint for rapid production of stress ulcers in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 124, p. 1221-1223, 1967.

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

SIKIRIC, P.; SEIWERTH, S.; GRABAREVIC, Z. The influence of a novel pentadcapeptide, BPC 157, on NG-nitro-L-arginine methylester and L-arginine effect on stomach mucosa integrity and blood pressure. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 332, p. 23-33, 1997.

SILVA, N. C. B.; ESQUIBEL, M. A.; ALVES, I. M.; VELOZO, E. S.; ALMEIDA, M. Z.; SANTOS, J. E. S.; CAMPOS-BUZZI, F.; MEIRA, A. V.; CECHINEL-FILHO, V. Antinociceptive effects of *Abarema cochliacarpus* (B.A. Gomes) Barneby & J. W. Grimes (Mimosaceae). *Braz. J. Pharmacogn.*, v. 19, p. 46-50, 2009.

SOSA, S.; MORELLIB, C. F.; TUBAROA, A.; CAIROLIB, P.; SPERANZAB, G.; MANITTOB, P. Anti-inflammatory activity of *Maytenus senegalensis* root extracts and of maytenoic acid. *Phytomedicine*, v. 14, p 109-114, 2007.

SOSTRES, C.; LANAS, A. Epidemiology and demographics of upper gastrointestinal bleeding: prevalence, incidence, and mortality. *Gastrointest. Endoscopy Clin. N. Am.*, v. 21, p. 567-581, 2011.

SOUZA-BRITO, A. R. M. **Manual De Ensaios Toxicológicos in vivo**. Campinas - SP: Editora UNICAMP, p. 122, 1994.

SOUZA, C. F.; FERNANDES, L. C.; CYRINO, E. S. Produção de espécies reativas de oxigênio durante o exercício aeróbio e anaeróbio. *Rev. Bras. Cineantropom. Desempenho Hum.*, v. 8, p. 102-109, 2006.

SPIVEY, A. C.; WESTON, M.; WOODHEAD, S. Celastraceae sesquiterpenoids: biological activity and synthesis. *Chem. Soc. Rev.*, v. 31, p. 43-59, 2002.

STARODUB, O. T.; DEMITRACK, E. S.; BAUMGARTNER, H. K.; MONTROSE, M. H. Disruption of the Cox-1 gene slows repair of microscopic lesions in the mouse gastric epithelium. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, v. 294, p. C223-232, 2008.

STEWART, D. J.; ACKROYD, R. Peptic ulcers and their complications. *Surgery*, v. 29, n. 11, p. 568-574, 2011.

SULLIVAN, P. B. Peptic ulcer disease in children. *Paediatr. Child Health*, v. 20 (10), p. 462-464, 2010.

SUNG, J. J. Y.; KUIPERS, E. J.; EL-SERAG, H. B. Systematic review: the global incidence and prevalence of peptic ulcer disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, v. 29, p. 938-946, 2009.

SUZUKI, H.; NISHIZAWA, T.; TSUGAWA, H.; MOGAMI, S.; HIBI, T. Roles of oxidative stress in stomach disorders. **J. Clin. Biochem. Nutr.**, v. 50 (1), p. 35-39, 2012.

SZABO, S. Mechanism of mucosal injury in the stomach and duodenum: time sequence analysis of morphologic, functional biochemical and histochemical studies. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 22, p.21-28, 1987.

SZELENYI, I.; THIEMER, K. Distention ulcer as a model for testing of drugs for ulcerogenic side effects. **Arch. Toxicol.**, v. 41, p. 99-105, 1978.

TAIRA, K.; WATANABE, T.; TANIGAWA, T.; SHIBA, M.; TOMINAGA, K.; FUJIWARA, Y.; OSHITANI, N.; HIGUCHI, K.; ARAKAWA, T. Roles of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E receptors in gastric mucosal defence in *Helicobacter pylori*-infected mice. **Inflammopharmacology**, v. 15, p. 132-138, 2007.

TAKAYAMA, C.; FARIA, F. M.; ALMEIDA, A. C. A.; VALIM-ARAÚJO, D. A. O.; REHEN, C. S.; DUNDER, R. J.; SOCCA, E. A. R.; MANZO, L. P.; ROZZA, A. L.; SALVADOR, M. J.; PELLIZON, C. H.; HIRUMA-LIMA, C. A.; FERREIRA, A. L.; SOUZA-BRITO, A. R. M. Gastroprotective and ulcer healing effects of essential oil from *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 135, p. 147-155, 2011.

TAKEUCHI, K.; SUZUKI, H. K.; ARAKI, H.; MIZOGUCHI, H.; SUGAMOTO, S.; UMEDA, A. Roles of endogenous prostaglandins and nitric oxide in gastroduodenal ulcerogenic responses induced in rats by hypothermic stress. **J. Physiol.**, v. 93, p. 423-431, 1999.

TAKEUCHI, K.; AIHARA, E.; SASAKI, Y.; NOMURA, Y.; ISE, F. Involvement of cyclooxygenase-1, prostaglandin E2 and EP1 receptors in acid-induced. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 57, p. 661-676, 2006.

TANAKA, A.; MATSUMOTO, M.; HAYASHI, Y.; TAKEUCHI, K. Functional mechanism underlying cyclooxygenase-2 expression in rat small intestine following administration of indomethacin: relation to intestinal hypermotility. **J. Gastroenterol.**, v. 20, p. 38-45, 2005.

TANAKA, A.; HATAZAWA, R.; TAKAHIRA, Y.; IZUMI, N.; FILARETOVA, L.; TAKEUCHI, K. Preconditioning Stress Prevents Cold Restraint Stress-Induced Gastric Lesions in Rats: Roles of COX-1, COX-2, and PLA₂. **Dig. Dis. Sci.**, v. 52, p. 478-487, 2007.

TARNAWSKI, A. S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing: state of the art. **Gastroenterol. Polska**, v. 17, (3), p. 171-179, 2010.

TEO, S.; STIRLING, D.; THOMAS, S.; HOBERMAN, A.; KIOPPES, A.; KHETANI, V. A 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague Dawley rats. **Toxicology**, v. 179, p. 183-196, 2002.

TULASSAY, Z.; HERSZÉNYI, L. Gastric mucosal defense and cytoprotection. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 24, p. 99-108, 2010.

TUROLLA M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v.42 (2), p. 289-306, 2006.

USTUN, O.; ELIK, B. O.; AKYON, Y.; ABBASOGLU, U.; YESILADA, E. Flavonoids with anti-*Helicobacter pylori* activity from *Cistus laurifolius* leaves. **J. Ethnopharmacol.**, v. 108, p. 457-461, 2006.

UMAMAHESWARI, M.; ASOKKUMAR, K.; RATHIDEVI, R.; SIVASHANMUGAM, A. T.; SUBHADRADEVI, V.; RAVI, T. K. Antiulcer and *in vitro* antioxidant activities of *Jasminum grandiflorum* L. **J. Ethnopharmacol.**, v. 110, p. 464-470, 2007.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.

VASCONCELOS, P. C. P.; KUSHIMA, H.; ANDREO, M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W.; TAKAHIRA, R. K.; PELLIZZON, C. H. Studies of gastric mucosa regeneration and safety promoted by Mouriri pusa treatment in acetic acid ulcer model. **J. Ethnopharmacol.**, v. 115, p. 293-301, 2008.

VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

VENDRUSCOLO, G. S.; RATES, S. M.; MENTZ, L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 15 (4), p. 361-372.

VONKEMAN, H. E.; KLOK, R. M.; POSTMA, M. J.; BROUWERS, J. R.; VAN DE LAAR, M. A. Direct medical costs of serious gastrointestinal ulcers among users of NSAID. **Drugs Aging**, v. 24, p. 681-690, 2007.

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

WEHKAMP, J.; SCHAUBER, J.; STANGE, E. F. Defensins and cathelicidins in gastrointestinal infections. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 23, p. 32-38, 2007.

WHITTLE, B. J. Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 17, p. 301-13, 2002.

YANG, Y. H.; WU, W. K.; TAI, E. K.; WONG, H. P. S.; LAM, E. K. Y.; SO, W. H. L.; SHIN, V. Y.; CHO, C. H. The cationic host defense peptide rCRAMP promotes gastric ulcer healing in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 318, p. 547-554, 2006.

YUAN, Y.; PADOL, I. T.; HUNT, R. H. Peptic ulcer disease today. **Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 3, p. 80-89, 2006.

ZABLOCKA, A.; JANUSZ, M. The two faces of reactive oxygen species. **Postepy Hig. Med. Dosw.**, v. 62, p. 118-124, 2008.

ZADÁK, Z.; HYSPLER, R.; TICHÁ, A.; HRONEK, M.; FIKROVÁ, P.; RATHOUSKÁ, J.; HRNCIARIKOVÁ, D.; STETINA, R. Antioxidants and vitamins in clinical conditions. **Physiol. Res.**, v. 58 (1), p. S13-S17, 2009.

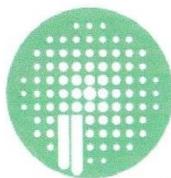
ZIMMERNAM, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, p. 109-110, 1983.

ZHAO, W.; ZHU, F.; SHEN, W.; FU, A.; ZHENG, L.; YAN, Z. ZHAO, L. FU, G. Protective effects of DIDS against ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. **Acta Biochim. Biophys. Sin.**, v. 41, p. 301, 2009.

ZHU, A.; KAUNITZ, J. Gastroduodenal mucosal defense. **Curr. Gastroenterol. Rep.**, v. 10, p. 548-54, 2008.

Anexos

ANEXO 1



PgPNSB

Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL

C E R T I D Ã O

João Pessoa, 05 de outubro de 2011

CEPA Nº0508/11

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Prof(a) Dr(a) LEÔNIA MARIA BATISTA

Orientando(a): MARCELO RICARDO DUTRA CALDAS FILHO

Departamento/Setor: LTF

Ref: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DE *Maytenus erythroxylon* REISSEK (CELASTRACEAE)

O Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, em reunião, **ANALISOU** e **APROVOU** a execução do projeto acima.

Número de animais: 306 camundongos e 210 ratos.

Período: 10/2011 até 12/2012.

Atenciosamente,

Sandra Rodrigues Mascarenhas

Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB

ANEXO 2

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	até 30'	1h	2h	3h	4h
1 - SNC					
a - Estimulante					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras _____					
b - Depressora					
Hipnose					
Prose					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonia					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
c - Outros comportamentos					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotipia					
2 - SN AUTÔNOMO					
Diarreia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tônus muscular					
Força para agarrar					
3 - MORTE					

Observações complementares: _____

Responsável Técnico