

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA
“PROF. DELBY FERNANDES DE MEDEIROS”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS**

KELLY SAMARA DE LIRA MOTA

**ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA DE *Maytenus obtusifolia*
Mart. (CELASTRACEAE) EM MODELOS ANIMAIS**

**JOÃO PESSOA – PB
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

KELLY SAMARA DE LIRA MOTA

**ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA DE *Maytenus obtusifolia*
Mart. (CELASTRACEAE) EM MODELOS ANIMAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de
Ciências da Saúde/Laboratório de Tecnologia
Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” da
Universidade Federal da Paraíba, para obtenção do título
de MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Leônia Maria Batista

**JOÃO PESSOA – PB
2009**

M917a Mota, Kelly Samara de Lira.

Atividade antiulcerogênica de *Maytenus obtusifolia* Mart.
(Celastraceae) em modelos animais/Kelly Samara de Lira
Mota.- João Pessoa, 2009.

149p. : il.

Orientadora: Leônia Maria Batista

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CE

1. Produtos Naturais. 2. *Maytenus obtusifolia*. 3. Plantas
Medicinais. 4. Atividade gastroprotetora. 5. Atividade
cicatrizante.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

KELLY SAMARA DE LIRA MOTA

**ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA DE *Maytenus obtusifolia*
Mart. (CELASTRACEAE) EM MODELOS ANIMAIS**

APROVADA EM 06/03/2009

BANCA EXAMINADORA:

**Profa. Dra. Leônia Maria Batista
(Universidade Federal da Paraíba)**

Orientadora

**Prof. Dr. Julianeli Tolentino de Lima
(Universidade Federal do Vale do São Francisco)
Examinador Externo**

**Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral Castello Branco
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora Interna**

DEDICATÓRIA

“Você pode dizer adeus a sua família e a seus amigos e afastar-se milhas e milhas e, ao mesmo tempo, carregá-los em seu coração, em sua mente, em seu estômago, pois você não apenas vive no mundo, mas o mundo vive em você.”

Frederick Buechner

Dedico este trabalho...

...À minha mãe Cleide, por todo o amor, carinho e compreensão, pelo apoio incondicional em todas as minhas decisões, por sempre me mostrar a importância dos estudos e por tudo que representa em minha vida.

...Aos meus irmãos Wescley, Werley, Wesney, Kamilla e Romário pelo amor, companheirismo e presença marcante em minha vida.

...Ao meu sobrinho Stanley, que sempre me proporciona momentos mágicos de alegria e descontração, e com o seu sorriso inocente de criança me transmite paz e esperança.

...À minha família, o “alicerce” que me ampara em todos os momentos da minha vida, que mesmo à distância, no decorrer desta caminhada, se fazem presentes, pelo amor, carinho e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Leônia Maria Batista pela orientação, amizade e confiança; pelos contínuos ensinamentos e conselhos imprescindíveis na realização deste trabalho e para a vida, pela dedicação ao ensino, à pesquisa e aos seus alunos (“mãezona”), um exemplo de pessoa e orientadora.

Aos professores Dr. Marcelo Sobral Silva e Dr. Josean Fechine Tavares, e a aluna de doutorado Viviane Marcelino de Medeiros, pelo fornecimento do extrato etanólico bruto e da fase acetato de etila obtidos de *M. obtusifolia*.

À Profa. Dra. Maria de Fátima Agra pela identificação da espécie vegetal em estudo.

À Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz e sua equipe, por terem cedido o ambiente de trabalho para que fosse possível a execução deste trabalho, em especial Thiene Estevam pela ajuda no experimento de toxicidade aguda e pela amizade.

À Profa. Dra. Alba R. M. Souza Brito e sua equipe de pesquisa da UNICAMP, pela colaboração para a realização deste trabalho e amizade, em especial Anderson Luiz Ferreira e Ana Cristina que me acolheram e deram apoio durante a minha estadia em Campinas.

À Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma Lima e sua equipe da UNESP pela amizade e por terem contribuído para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Paloma Liz de Medeiros, Profa. Dra. Eliete Cavalcanti e a técnica dona Fátima da UFPE, bem como a Profa. Dra. Cláudia Helena Pessizzon da UNESP pela colaboração na realização das etapas referentes à análise histológica.

À Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva, quem primeiro me deu a oportunidade de conhecer o fascinante mundo da pesquisa.

Aos amigos que fazem parte do Laboratório de Úlcera Gástrica e aos que já passaram por ele: Igara, Guilherme, Juliana, Heloína, Gedson, Camila, Patrícia, Jonh, Cynthia, Mariana, Sabrina, Vanda e Jacqueline, pela dedicação e ajuda nos experimentos, mas acima de tudo pelo apoio constante, amizade e pelos momentos de descontração e alegria.

À Igara Oliveira Lima e Guilherme Eduardo Nunes Dias (Pivetinho), pelo apoio e dedicação constantes em todas as etapas experimentais deste trabalho, pela amizade, incentivo e força, principalmente nos momentos mais complicados.

À minha turma de pós-graduação, em especial a Naiana, Gláucia, Meri e Fabíola, pela amizade construída, pelo companheirismo e apoio.

Aos meus amigos que me ajudaram na iniciação científica, Rita, Sílvia, Marcos, Luciano e especialmente a Julianeli (tutor de iniciação científica), pela valiosa amizade, por sempre me incentivarem e apoiarem.

Às amigas e companheiras de apartamento, Gabriela Gonçalves Barbosa e Fabíola Fialho Furtado, por todos os momentos compartilhados juntas, pelo apoio constante e amizade sincera, fundamentais, principalmente na fase final deste trabalho.

Aos amigos que indiretamente contribuíram para realização deste trabalho: “Os dez mais” ou “Leoninos”, Filipe, Elise, Vivian, Gisiane, Gisvânia, Renata, Cláudia, Júnior e Pedro; e a todos os amigos de Sousa, por serem o meu refúgio, e minha força, pelo companheirismo e incentivo, essenciais, principalmente nas horas mais difíceis.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Julianeli Tolentino de Lima e Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral Castello Branco, pelo interesse e dedicação na análise desta dissertação e pelas valiosas sugestões apresentadas.

Ao apoio técnico de Luís Cordeiro, Adriano Cordeiro, em especial a José Crispim Duarte, pela amizade e por me ensinar a melhor forma a manusear os animais, indispensável para mim e para toda a nossa equipe.

À Tânia Maria Alves de Araújo, secretaria do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, por toda ajuda e amizade.

À Coordenação, funcionários e a todos os professores pela contribuição para a minha formação.

À Universidade Federal da Paraíba, ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Professor Delsby Fernandes de Medeiros” (LTF/UFPB) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo apoio financeiro e grande capacidade de formar recursos humanos.

A todos que direta ou indiretamente participaram da produção desta dissertação.

Ao amigo dos amigos, DEUS, por ser a força maior que guia os meus passos, o principal responsável por esta conquista, por ter proporcionado a minha vida e por colocar em meu caminho pessoas especiais que contribuíram para minha formação.

Muito obrigada!!!

Kelly Samara de Lira Mota

RESUMO

Maytenus obtusifolia Mart. (Celastraceae) é conhecida popularmente como "bom-nome", "carne-de-anta" ou "carrancudo", e utilizada na medicina popular para o tratamento de "úlceras graves", inflamações gerais e câncer. Mesmo considerando a importância etnofarmacológica desta espécie, são escassos os estudos a respeito das suas atividades tóxicas e farmacológicas. Neste estudo, foi avaliada a toxicidade, atividade antiulcerogênica e os prováveis mecanismos de ação relacionados ao extrato etanólico bruto (EEtOH) e a fase acetato de etila (FAcOEt) obtidos das folhas de *M. obtusifolia*. No ensaio toxicológico agudo, a dose única de 2000 mg/kg do EEtOH administrado via oral (v.o.), provocou sinais de analgesia nos camundongos, não alterou o peso corporal e dos órgãos, mas aumentou o consumo de água dos machos e diminuiu o consumo de ração das fêmeas. Durante este estudo não foram observadas mortes e nem alterações macroscópicas nos órgãos dos camundongos. Os testes para indução de úlcera foram realizados usando os agentes lesivos HCl/etanol, estresse (imobilização e frio) e antiinflamatório não-esteroidal (AINE) piroxicam em camundongos, etanol e contensão do suco gástrico (ligadura de piloro) em ratos. No modelo HCl/etanol, o EEtOH (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg, v.o.) reduziu o índice de lesão ulcerativa (ILU) em 20, 47, 81 e 33 %, respectivamente. Também foi observado no modelo de etanol que o EEtOH e a FAcOEt (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg, v.o.) reduziram o ILU em 22, 49, 61, 79 e 48, 69, 77, 84 %, respectivamente. No modelo de estresse o EEtOH e a FAcOEt (62,5, 125 e 250 mg/kg, v.o.) reduziram o ILU em 41, 31, 60 e 54, 53, 50 %, respectivamente. Resultado semelhante foi evidenciado no modelo de AINE, cujas porcentagens de proteção foram 63, 66, 63 % (EEtOH) e 36, 50, 76 % (FAcOEt). Nas úlceras induzidas por contensão do suco gástrico (ligadura de piloro) o EEtOH e a FAcOEt (250 mg/kg, v.o.) apresentaram proteção gástrica de 26 e 40 %, respectivamente. Neste modelo, o EEtOH e a FAcOEt administrados via intraduodenal (i.d.) reduziram o volume do suco gástrico, porém não alteraram o pH e a concentração de H⁺. No entanto, quando administrados v.o., o EEtOH não alterou esses parâmetros avaliados, entretanto, a fase aumentou o volume do suco gástrico, o pH e reduziu a concentração de H⁺. Na avaliação do mecanismo de ação citoprotetor foi observado que a FAcOEt (125 e 250 mg/kg, v.o.) não aumentou os níveis de PGE₂ na mucosa. O efeito gastroprotetor do EEtOH e da FAcOEt (250 mg/kg, v.o.) é independente do óxido nítrico e depende da participação dos grupamentos sulfidrilas. No modelo de úlcera induzida por ácido acético 30 %, o tratamento crônico com o EEtOH e a FAcOEt (250 mg/kg, v.o.) apresentaram porcentagens de cicatrização de 52 e 57 %, respectivamente. Neste modelo, durante os 14 dias de tratamento, foi observado que o extrato promoveu diminuição na ingestão de água e aumento nos níveis séricos de uréia dos animais testados. Estes dados indicam que *M. obtusifolia* apresenta atividade antiulcerogênica, que pode estar relacionada à participação dos grupamentos sulfidrilas, validando o uso popular desta espécie.

Palavras-chave: úlcera gástrica, *Maytenus obtusifolia*, atividade gastroprotetora e atividade cicatrizante

ABSTRACT

Maytenus obtusifolia Mart. (Celastraceae) is popularly known as “bom-nome”, “carne-de-anta” or “carrancudo”. It is used in the folk medicine for the treatment of ulcers, general inflammations and cancer. Despite of the ethnopharmacologic importance of this species there are few studies about the toxic and pharmacological activities. In this study it was evaluated the toxicity, antiulcerogenic activity and the likely action mechanisms related to the crude ethanolic extract (EEtOH) and the phase ethyl acetate obtained of the leaves of *M. obtusifolia*. In the acute toxicity assay, the single dose of 2000 mg/kg of EEtOH administered p.o. caused signs of analgesy in mice did not change the body and organs weight of the mice, but it was observed an increase in the males' water consumption and decrease in the females' food consumption. During the study no deaths and no macroscopic changes in the organs were observed in the mice. The antiulcer assays were performed using the lesive agents HCl/ethanol, stress (cold-restraint) and nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) in mice, ethanol and contention of the gastric juice (pylorus ligature) in rats. In the HCl/ethanol-induced ulcer model the EEtOH (62,5 125, 250 e 500 mg/kg, p.o.) reduced the ulcerative lesion index (ULI) in 20, 47, 81 e 33 %, respectively. It was also observed in the ethanol-induced ulcer model that the EEtOH and FAcOEt (62,5 125, 250 e 500 mg/kg, p.o.) reduced the ULI in 22, 49, 61, 79 e 48, 69, 77, 84 %, respectively. In the stress-induced ulcer model the EEtOH and FAcOEt (62,5, 125 e 250 mg/kg, p.o.) reduced the ULI for 41, 31, 60 e 54, 53, 50 %, respectively. Similar results were evidenced in NSAID-induced lesion model, whose percentages of protection were 63, 66, 63 % (EEtOH) and 36, 50, 76 % (FAcOEt). Ulcers induced by contention of the gastric juice (pylorus ligature) the EEtOH and FAcOEt (250 mg/kg, p.o.) showed gastric protection of 26 e 40 %, respectively. In this model the EEtOH and FAcOEt administered i.d. reduced the volume of the gastric juice, but it didn't change the pH and the concentration of H⁺. However, when administered p.o. the EEtOH did not change these parameters evaluated, but the FAcOEt increased the volume of gastric juice and pH and it decreased the concentration of H⁺. In the evaluation of cytoprotective action mechanism it was observed that the FAcOEt (125 and 250 mg/kg, p.o.) did not increase the levels of PGE₂ in the mucosa. The gastroprotective effect of EEtOH and FAcOEt (250 mg/kg, p.o.) is independent of nítric oxide and dependent on the participation of sulphydryl groups. In the acetic acid-induced ulcer model, the chronic treatment with EEtOH and FAcOEt (250 mg/kg, p.o.) showed healing of 52 and 57 %, respectively. In this model, during the 14 days of treatment, it was observed that the extract showed the reduction of water intake and increase in serum urea of the animals tested. These data indicate that *M. obtusifolia* show antiulcerogenic activity, which may be related to the participation of sulphydryl groups, supporting the popular use of this species.

Key words: gastric ulcer, *Maytenus obtusifolia*, gastroprotective activity and healing activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Células das glândulas gástricas e suas secreções.....	27
Figura 2. Anatomia neurofuncional do estômago.....	28
Figura 3. Secreção de HCl pela célula parietal	29
Figura 4. Vias de sinalização dos principais mediadores da secreção ácida.....	31
Figura 5. Mecanismos de sinalização neuronal, parácrina e endócrina envolvidos na regulação da secreção ácida.....	34
Figura 6. Fatores protetores da mucosa.....	35
Figura 7. Sistema antioxidante enzimático e não-enzimático.....	43
Figura 8. Úlcera péptica e as camadas lesionadas.....	44
Figura 9. Terapêutica da úlcera péptica.....	48
Figura 10. Estrutura básica dos flavonóides.....	51
Figura 11. Principais classes de flavonóides.....	51
Figura 12. Fotos de <i>Maytenus obtusifolia</i> Mart.....	54
Figura 13. Marcha fitoquímica para obtenção do EEtOH e da FAcOEt das folhas de <i>Maytenus obtusifolia</i> Mart.....	59
Figura 14. Animais utilizados: (A) camundongos Swiss (<i>Mus musculus</i>) e (B) ratos Wistar (<i>Ratus norvegicus</i>).....	60
Figura 15. (A) lupa OLYMPUS Optical TL3 – SZ40 e (B) estômago de rato ulcerado com etanol absoluto.....	63
Figura 16. Indução de úlcera com ácido acético 30 %.....	68
Figura 17. Estômagos de ratos ulcerados com etanol absoluto e tratados com (A) salina 0,9 %, (B) EEtOH 62,5 (C) EEtOH 125, (D) EEtOH 250, (E) EEtOH 500 mg/kg e (F) lansoprazol 30 mg/kg.....	77
Figura 18. Estômagos de ratos ulcerados com etanol absoluto e tratados com (A) salina 0,9 %, (B) FAcOEt 62,5 (C) FAcOEt 125, (D) FAcOEt 250, (E) FAcOEt 500 mg/kg e (F) lansoprazol 30 mg/kg	78
Figura 19. Estômagos de ratos ulcerados com etanol absoluto e tratados com salina/salina (A) salina/EEtOH (B), salina/FAcOEt (C), (D) salina/carbenoxolona, L-NAME/salina (E), L-NAME/EEtOH (F), L-NAME/FAcOEt (G) ou L-NAME/carbenoxolona (H).....	87
Figura 20. Estômagos de rato ulcerados e tratados com salina/salina (A) salina/EEtOH (B), salina/FAcOEt (C), (D) salina/carbenoxolona, NEM/salina	

(E), NEM/EEtOH (F), NEM/FAcOEt (G) ou NEM/carbenoxolona (H).....	89
Figura 21. Fotomicrografias de estômagos de ratos com úlceras promovidas por ácido acético e tratados com EEtOH obtido de <i>Maytenus obtusifolia</i> . Cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina.....	93
Figura 22. Fotomicrografias de estômagos de ratos com úlceras promovidas com ácido acético e tratado com FAcOEt obtida de <i>Maytenus obtusifolia</i> . Cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina.....	94
Figura 23. Fotomicrografias de estômagos de ratos com úlceras promovidas por ácido acético e tratados com EEtOH obtido de <i>Maytenus obtusifolia</i> , corados com PAS (marcador de glicoproteínas), para visualização do muco gástrico	95
Figura 24. Fotomicrografias de estômagos de ratos com úlceras promovidas por ácido acético e tratados com FAcOEt obtida de <i>Maytenus obtusifolia</i> , corados com PAS (marcador de glicoproteínas), para visualização do muco gástrico.....	96

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito gastroprotetor do EEtOH obtido de <i>Maytenus obtusifolia</i> no modelo de úlcera gástrica induzida por HCl/etanol em camundongos.....	75
Gráfico 2 - Efeito gastroprotetor do EEtOH obtido de <i>Maytenus obtusifolia</i> no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos.....	77
Gráfico 3 - Efeito gastroprotetor da FAcOEt obtida de <i>Maytenus obtusifolia</i> no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos.....	78
Gráfico 4 - Efeito gastroprotetor do EEtOH e da FAcOEt obtidos de <i>Maytenus obtusifolia</i> no modelo de úlcera gástrica induzida por estresse (imobilização e frio) em camundongos.....	79
Gráfico 5 - Efeito gastroprotetor do EEtOH e da FAcOEt obtidos de <i>Maytenus obtusifolia</i> no modelo de úlcera gástrica induzida por piroxicam em camundongos.....	80
Gráfico 6 - Efeito gastroprotetor do EEtOH e da FAcOEt obtidos de <i>Maytenus obtusifolia</i> no modelo de ligadura de piloro em ratos.....	81
Gráfico 7 - Efeito gastroprotetor da FAcOEt obtida de <i>Maytenus obtusifolia</i> nos níveis de PGE ₂ na mucosa gástrica de ratos.....	85
Gráfico 8 - Efeito gastroprotetor do EEtOH e da FAcOEt obtidos de <i>Maytenus obtusifolia</i> após pré-tratamento com L-NAME, um inibidor da enzima NO sintase, na úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos.....	87
Gráfico 9 - Efeito gastroprotetor do EEtOH e da FAcOEt obtidos de <i>Maytenus obtusifolia</i> após pré-tratamento com NEM, um inibidor dos grupamentos sulfidrilas, na úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos.....	89
Gráfico 10 - Efeito cicatrizante do EEtOH e da FAcOEt obtidos de <i>Maytenus obtusifolia</i> no modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético em ratos.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito da administração oral do extrato etanólico bruto obtido de <i>M. obtusifolia</i> na evolução ponderal e peso dos órgãos, consumo de água e ração em camundongos machos e fêmeas.....	74
Tabela 2 - Efeito gastroprotetor do EEtOH e da FAcOEt obtidos de <i>Maytenus obtusifolia</i> sobre os parâmetros bioquímicos do suco gástrico no modelo de ligadura de piloro (i.d.) em ratos.....	82
Tabela 3 - Efeito gastroprotetor do EEtOH e da FAcOEt obtidos de <i>Maytenus obtusifolia</i> sobre os parâmetros bioquímicos do suco gástrico no modelo de ligadura de piloro (v.o.) em ratos.....	83
Tabela 4 - Efeito da administração oral do EEtOH e da FAcOEt obtidos de <i>M. obtusifolia</i> durante 14 dias sobre o peso corporal dos ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético.....	97
Tabela 5 - Efeito da administração oral do EEtOH e da FAcOEt obtidos de <i>M. obtusifolia</i> durante 14 dias sobre o consumo de água e ração dos ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético.....	98
Tabela 6 - Efeito da administração oral do EEtOH e da FAcOEt obtidos de <i>M. obtusifolia</i> durante 14 dias sobre o peso dos órgãos dos ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético.....	99
Tabela 7 - Efeito da administração oral do EEtOH e da FAcOEt obtidos de <i>M. obtusifolia</i> durante 14 dias sobre os parâmetros bioquímicos em ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético.....	100
Tabela 8 - Efeito da administração oral do EEtOH e da FAcOEt obtidos de <i>M. obtusifolia</i> durante 14 dias sobre os parâmetros hematológicos em ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético.....	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Ciclase de adenilil
ACh	Acetilcolina
AcetilCoA	Acetilcoenzima A
ADP	Difosfato de adenosina
AcOEt	Acetato de Etila
AINE	Antiinflamatório não-esteroidal
ALT	Alanina aminotransferase
ALU	Área de Lesão Ulcerativa
AMP_c	3',5'- Monofosfato cíclico de adenosina
ANP	Peptídeo natriurético atrial
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca²⁺	Íon cálcio
[Ca²⁺]_i	Concentração intracelular de cálcio
CAT	Catalase
CCK-2	Receptor de colecistocinina 2
CCK_B	Receptor de colecistocinina B
CHCM	Concentração hemoglobínica corporcular média
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene de calcitonina
Cl⁻	Íon cloreto
COX	Enzima ciclooxygenase
CRF	Fator liberador de corticotropina
DAG	Diacilglicerol
EC	Células enterocromafins
ECL	Células enterocromafins “like”
EtOH	Etanol
EEtOH	Extrato etanólico bruto
EGF	Fator de crescimento epidermal
EROs	Espécies reativas de oxigênio
eNOs	Sintase do óxido nítrico endotelial
FAcOEt	Fase acetato de etila
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo

FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
GCs	Ciclase guanilil solúvel
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GSH	Glutationa
GSH-Px	Glutationa peroxidase
GSH-Rd	Glutationa redutase
GRP	Peptídeo liberador de gastrina
GSSG	Glutationa oxidada
HCl	Ácido clorídrico
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HE	Hematoxilina-eosina
HGF	Fator de crescimento do hepatócito
HSP	Proteína de choque térmico
HCO₃⁻	Íon bicarbonato
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
H⁺	Próton
H⁺,K⁺-ATPase	Bomba de prótons
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
i.d.	Intraduodenal
ILU	Índice de Lesão Ulcerativa
IL-1β	Interleucina 1 beta
iNOS	Sintase do óxido nítrico induzida
i.p.	Intrapерitoneal
IP₃	1,4,5-trifosfato de inositol
K⁺	Íon potássio
L-NAME	N ^ω -nitro-L-arginina-metil-ester
LTB-4	Leucotrienos B ₄
LTC-4	Leucotrienos C ₄
NANC	Neurônios não adrenérgicos não colinérgicos
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídio-fosfato-hidrogênio
NADP⁺	Fosfato de dinucleotídeo adenina nicotinamida
NEM	N-etilmaleimida
NO	Óxido nítrico

NOS	Sintase do óxido nítrico
nNOS	Sintase do óxido nítrico neuronal
O₂⁻	Ânion superóxido
-OH	Radical hidroxil
PACAP	Peptídeo ativador da ciclase de adenilil pituitária
PAS	Ácido periódico de Schiff
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE₂	Prostaglandina da série E
PGs	Prostaglandinas
PGI₂	Prostaciclina 2
PKA	Proteína cinase dependente de AMP _c
PKG	Proteína cinase dependente de GMP _c
PLC	Fosfolipase C
PPIs	Inibidores da bomba de prótons
s.c.	Subcutânea
SHs	Grupamentos sulfidrilas
SNC	Sistema Nervoso Central
SNE	Sistema Nervos Entérico
SOD	Superóxido desmutase
SST₂	Receptor de somatostatina 2
TGF-α	Fator de crescimento transformador alfa
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRH	Hormônio liberador da tirotropina
TSH	Hormônio estimulante da tireóide
VCM	Volume corporcular médio
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
v.o.	Via oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
1.1 Considerações gerais.....	25
1.2 Anatomia funcional do estômago.....	26
1.2.1 Anatomia da mucosa.....	26
1.2.2 Anatomia neuronal do estômago.....	27
1.3 Secreção ácida gástrica.....	28
1.4 Controle da secreção ácida gástrica.....	30
1.4.1 Mediadores e mecanismos envolvidos.....	31
1.5 Proteção da mucosa gástrica.....	34
1.5.1 Defesa pré-epitelial: barreira de muco-bicarbonato-fosfolipídio.....	35
1.5.2 Defesa epitelial.....	36
1.5.3 Defesa sub-epitelial: fluxo sanguíneo.....	37
1.5.4 “Maré alcalina”.....	37
1.5.5 Inervação sensorial da mucosa gástrica.....	38
1.5.6 Renovação celular.....	38
1.5.7 Fatores moduladores da barreira gástrica.....	39
1.5.7.1 Prostaglandinas.....	39
1.5.7.2 Óxido nítrico.....	40
1.5.7.3 Grupamentos sulfidrilas (SHs).....	41
1.5.7.4 Sistema antioxidante.....	42
1.6 Fisiopatologia da úlcera péptica.....	43
1.6.1 Etiologia.....	43
1.6.2 Epidemiologia.....	47
1.7 Terapêutica da úlcera péptica.....	47
1.8 Plantas como uma nova alternativa terapêutica.....	50
1.8.1 Plantas com atividade antiulcerogênica.....	50
1.8.2 Flavonóides com atividade antiulcerogênica.....	50
1.8.3 Considerações sobre a família Celastraceae e <i>Maytenus obtusifolia</i>	52
2 OBJETIVOS.....	56
2.1 Objetivo geral.....	56
2.2 Objetivos específicos.....	56

3 MATERIAL E MÉTODOS.....	58
3.1 Material.....	58
3.1.1 Local da pesquisa.....	58
3.1.2 Coleta do material vegetal.....	58
3.1.3 Obtenção do extrato etanólico bruto e da fase de <i>M. obtusifolia</i>	58
3.1.4 Animais.....	60
3.1.5 Drogas utilizadas.....	60
3.2 Métodos.....	61
3.2.1 Avaliação toxicológica de <i>Maytenus obtusifolia</i>	61
3.2.1.1 Ensaio toxicológico pré-clínico agudo.....	61
3.2.2 Investigaçāo da atividade gastroprotetora de <i>Maytenus obtusifolia</i>	62
3.2.2.1 Indução da úlcera gástrica pelo HCl/etanol.....	63
3.2.2.2 Indução da úlcera gástrica por etanol absoluto.....	63
3.2.2.3 Indução de úlcera gástrica por estresse (imobilização e frio).....	64
3.2.2.4 Indução de úlcera gástrica por antiinflamatório não-esteroidal (piroxicam).....	64
3.2.2.5 Indução da úlcera gástrica por contensão do suco gástrico.....	65
3.2.2.6 Avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico através do modelo de ligadura do piloro.....	65
3.2.3 Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora de <i>Maytenus obtusifolia</i>	66
3.2.3.1 Determinação dos névies de PGE ₂ produzida na mucosa gástrica.....	66
3.2.3.2 Investigaçāo da participação do NO na citoprotecção.....	66
3.2.3.3 Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrila na gastroproteção.....	67
3.2.4 Avaliação da atividade antiulcerogênica (cicatrizante) de <i>Maytenus obtusifolia</i>	67
3.2.4.1 Lesão gástrica induzida por ácido acético 30 %.....	67
3.2.4.2 Análise histológica.....	69
3.2.4.3 Avaliação da toxicidade do EEtOH e da FAcOEt durante os 14 dias de tratamento da úlcera induzida com ácido acético 30 %.....	69
3.2.4.3.1 Avaliação do peso corporal.....	69
3.2.4.3.2 Avaliação do consumo de água e ração.....	70

3.2.4.3.3 Avaliação do peso dos órgãos.....	70
3.2.4.3.4 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos do sangue...	70
3.3 Análise estatística.....	71
4 RESULTADOS.....	73
4.1 Avaliação toxicológica de <i>Maytenus obtusifolia</i>	73
4.1.1 Toxicidade aguda via oral.....	73
4.2 Avaliação da atividade gastroprotetora de <i>Maytenus obtusifolia</i>	75
4.2.1 Indução aguda da úlcera gástrica por HCl/etanol.....	75
4.2.2 Indução aguda da úlcera gástrica por etanol absoluto.....	76
4.2.3 Indução aguda de úlcera gástrica por estresse (imobilização e frio).....	79
4.2.4 Indução de úlcera gástrica por AINEs (piroxicam).....	80
4.2.5 Indução de úlcera gástrica por contensão do suco gástrico.....	81
4.2.6 Avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico no modelo de ligadura do piloro i.d.....	82
4.2.7 Avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico no modelo de ligadura do piloro v.o.....	83
4.3 Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora de <i>Maytenus obtusifolia</i>	84
4.3.1 Determinação dos níveis de PGE ₂ na mucosa gástrica.....	84
4.3.2 Avaliação da participação do NO.....	86
4.3.3 Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrilas.....	88
4.4 Investigação da atividade cicatrizante de <i>Maytenus obtusifolia</i>	90
4.4.1 Úlcera gástrica induzida por ácido acético 30 %.....	90
4.4.2 Análise histológica.....	92
4.4.3 Avaliação da toxicidade do EEtOH e da FAcOEt durante os 14 dias de tratamento da úlcera induzida com ácido acético 30 %.....	97
4.4.3.1 Avaliação do peso corporal.....	97
4.4.3.2 Avaliação do consumo de água e ração.....	98
4.4.3.3 Avaliação do peso dos órgãos.....	99
4.4.3.4 Análise laboratorial dos parâmetros bioquímicos e hematológicos.....	100
4.4.3.4.1 Avaliação dos parâmetros bioquímicos.....	100
4.4.3.4.2 Avaliação dos parâmetros hematológicos.....	101

5 DISCUSSÃO	103
6 CONCLUSÕES	119
7 PERSPECTIVAS	121
REFERÊNCIAS	123
ANEXOS	149

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

As plantas têm sido utilizadas de forma empírica no tratamento de vários males que acometem a humanidade, desde os tempos mais remotos (TAYLOR et al., 2001; VEIGA-JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). O emprego de plantas medicinais, como medicamento, é de grande valia (KINGHORN, 2002), uma vez que segundo a Organização Mundial de Saúde, cerca de 80 % da população mundial, principalmente em países em desenvolvimento, faz uso de plantas medicinais para tratar suas enfermidades (GURIB-FAKIM, 2006).

A possibilidade de encontrar novas moléculas a partir de produtos naturais é imensurável (GURBUZ et al., 2002). Por essa razão as plantas e seus derivados são as maiores fontes de fármacos, movimentando consideravelmente o mercado farmacêutico (KIRKPATRICK, 2002).

De acordo com Newman; Cragg; Snader (2003), das 877 novas moléculas introduzidas no mercado entre os anos de 1981 e 2002, 49 % foram substâncias isoladas de produtos naturais, semi-sintéticos ou moléculas sintetizadas a partir de estruturas de origem natural. No entanto, o estudo com plantas medicinais não se restringe apenas à procura de novas moléculas, já que estas plantas podem ser empregadas em diferentes formas de preparações farmacêuticas, como infusões, tinturas, extratos, frações ou no desenvolvimento de fitomedicamentos (RATES, 2001).

O Brasil possui um relevante patrimônio genético, sendo considerado o país com a maior biodiversidade do mundo, com cerca de 20 % do número total de espécies do planeta (CALIXTO, 2003; OMENA, 2007; SOUZA; FELFILI, 2006). Além disto, a utilização de plantas medicinais é uma prática muito difundida no Brasil, como resultado do conhecimento empírico passado de geração a geração. No entanto, as plantas medicinais da flora brasileira são utilizadas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas (VEIGA-JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005), caracterizando apenas 10 % das plantas com relação às suas propriedades biológicas e 5 % com objetivo fitoquímico (LUNA et al., 2005). Com base nestas informações, a pesquisa com plantas medicinais se torna muito relevante, uma vez que, busca a validação de suas

propriedades farmacológicas, através de uma avaliação minuciosa da eficácia e segurança das mesmas (RATES, 2001).

Para se obter sucesso na pesquisa com plantas são necessários critérios adequados na seleção das espécies vegetais. Segundo Holetz et al. (2002), a escolha com base no conhecimento popular (etnofarmacologia) deve-se ao acúmulo milenar das informações, o que aumenta a possibilidade de se descobrir novos compostos. Porém, a seleção com base nos constituintes químicos (quimiotaixonomia) encontrados em um dado gênero ou família torna-se interessante principalmente pela possibilidade de se obter quantidades elevadas de compostos ativos.

Desta forma a pesquisa envolvendo plantas medicinais é complexa e apresenta um caráter multidisciplinar, envolvendo as áreas de botânica, química, farmacologia e toxicologia, principalmente quando o objetivo da pesquisa é encontrar substâncias ativas úteis à terapêutica (SOUZA-BRITO, 1996; RATES, 2001).

O uso de plantas medicinais no tratamento dos distúrbios gastrintestinais, em particular da úlcera péptica, é uma prática muito difundida na medicina popular em todo o mundo (SCHMEDA-HIRSCHMANN; YESILADA, 2005). Neste contexto o presente trabalho propõe-se a estudar produtos de plantas medicinais com possível atividade antiulcerogênica, visando contribuir para a validação, o uso seguro e racional das plantas medicinais.

1.2 Anatomia funcional do estômago

1.2.1 Anatomia da mucosa

O estômago consiste de três áreas topográficas (fundo, corpo e antro) e duas áreas funcionais, compostas pelas glândulas oxínticas e pilóricas. As glândulas oxínticas, que são constituídas de células parietais ou oxínticas, compreendem 80 % do órgão e estão localizadas no fundo e no corpo. As glândulas pilóricas constituídas principalmente de células G, ocupam 20 % do estômago (antro). São constituídas por unidades tubulares verticais que consistem em uma fenda na região apical

(fovélolas), um istmo (zona progenitora) e região da glândula que forma a parte baixa da unidade (base) (SCHUBERT; PEURA, 2008).

Além das células parietais e células G produtoras de gastrina, estas glândulas possuem células neuroendócrinas, que contém agentes de sinalização parácrina e endócrina, que controlam a secreção gástrica, sendo as principais: células enterocromafins (EC), que possuem peptídeo natriurético atrial (ANP), serotonina e adrenomedulina; células enterocromafins “like” (ECL), onde é produzida e armazenada a histamina; células D, que produzem somatostatina e amilina; células A-“like” ou Gr contendo grelina e obestatina; e célula principal que secreta pepsinogênio (SCHUBERT; PEURA, 2008) (Figura 1).

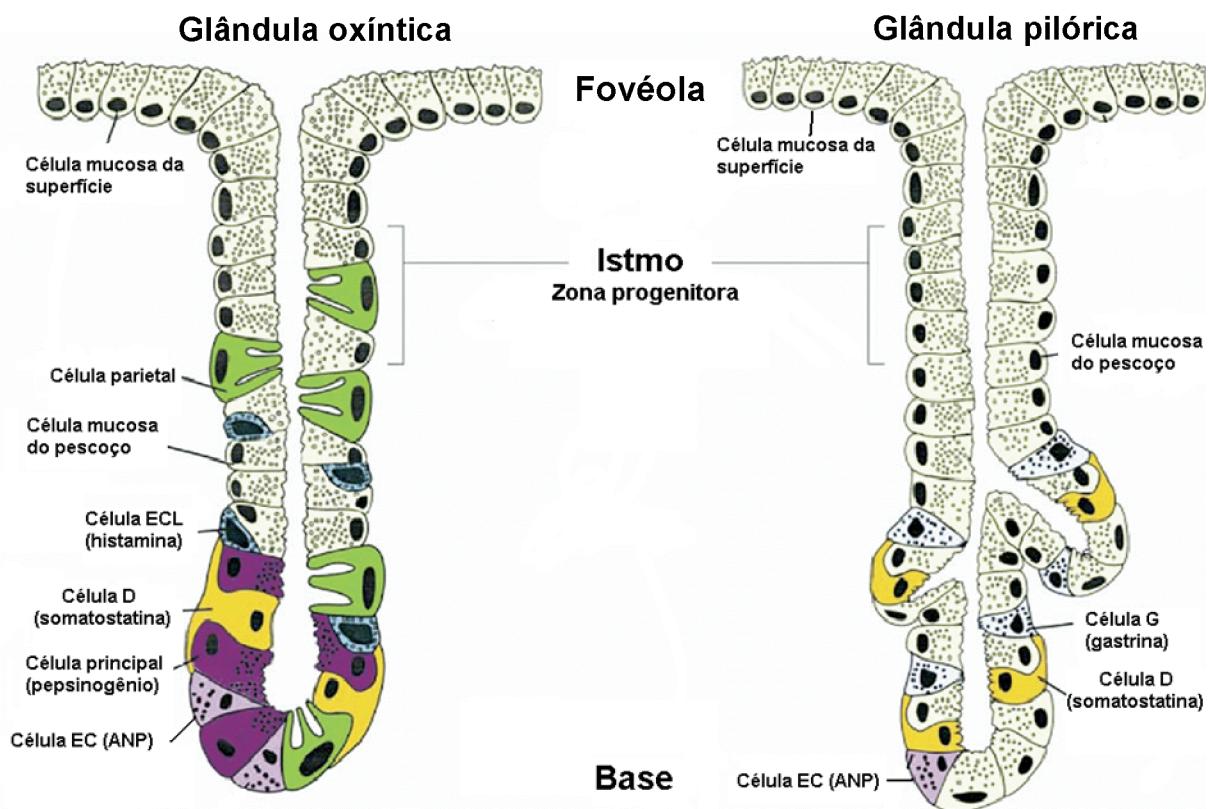


Figura 1. Células das glândulas gástricas e suas secreções (Adaptado de Schubert; Peura 2008).

1.2.2 Anatomia neuronal do estômago

O estômago é inervado por uma rede neuronal, sistema nervoso entérico (SNE), que possui neurônios intrínsecos e extrínsecos aferentes e eferentes. O SNE

também é conhecido como pequeno cérebro e constitui a terceira divisão do sistema nervoso autônomo (SCHUBERT; PEURA, 2008).

Os neurônios pós-ganglionares são divididos em neurônios colinérgicos, que liberam acetilcolina (ACh) e neurônios não-adrenérgicos não-colinérgicos (NANC), que liberam os neurotransmissores: peptídeo liberador de gastrina (GRP), peptídeo intestinal vasoativo (VIP), peptídeo ativador da ciclase de adenilil pituitária (PACAP), óxido nítrico (NO) e substância P. Estes neurônios atuam sobre células alvo de forma direta e indireta regulando a liberação de gastrina, histamina, somatostatina e ANP, os quais regulam a secreção ácida gástrica (SCHUBERT; PEURA, 2008) (Figura 2).

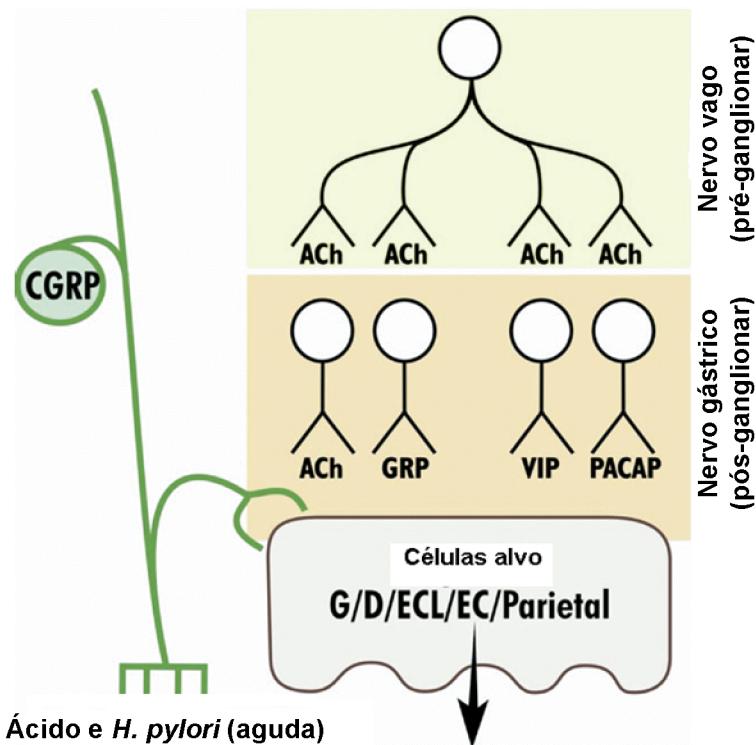


Figura 2. Anatomia neurofuncional do estômago (Adaptado de Schubert; Peura, 2008).

1.3 Secreção ácida gástrica

O suco gástrico é composto de muco fluido, eletrólitos, íon bicarbonato (HCO_3^-), pepsinogênio, fator intrínseco e o ácido clorídrico (HCl), considerado o seu principal constituinte (KONTUREK; KONTUREK; OCHMANSKI, 2004).

O HCl é liberado no lúmen do estômago através da bomba de prótons (H^+,K^+ -ATPase) presente na membrana apical da célula parietal e envolve o transporte de próton (H^+) para os canalículos da célula parietal em troca do íon potássio (K^+) (ANDERSON; CARLSSON, 2005). A secreção de H^+ é acompanhada pela extrusão do íon cloreto (Cl^-) via canal de cloreto e K^+ via canal de potássio (MALINOWSKA et al., 2004; ROEPKE et al., 2006), presentes na membrana apical destas células. Para cada H^+ que é deslocado para o canalículo pela ação da H^+,K^+ -ATPase, um íon HCO_3^- é transportado para fora do citoplasma da célula parietal por um trocador Cl^-/HCO_3^- , que também desloca Cl^- para o citosol (ANDERSON; CARLSSON, 2005) (Figura 3).

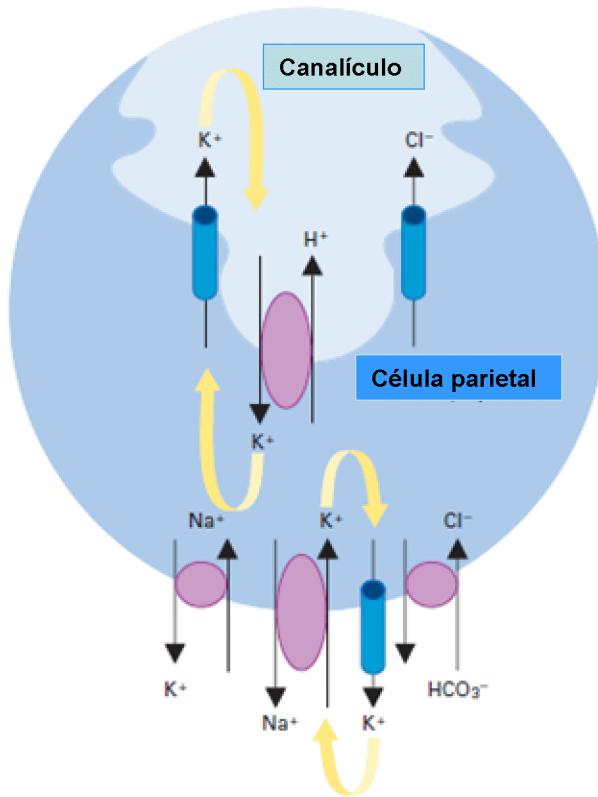


Figura 3. Secreção de HCl pela célula parietal (Adaptado de Scarpignato; Pelosini; Di Mario, 2006).

As células parietais secretam HCl na concentração de aproximadamente 160 mmol/L e pH = 0,8. Este ácido desempenha várias funções fisiológicas como, por exemplo, facilita a digestão de proteínas e absorção de ferro, cálcio e vitamina B-12, previne o crescimento bacteriano e infecções entéricas (HOU, SCHUBERT, 2006).

A secreção ácida gástrica envolve mecanismos neurais e humorais, os quais compreendem três fases distintas: a fase cefálica, mediada pelo nervo vago,

resultante da atividade no Sistema Nervoso Central (SNC), envolvendo estímulos visuais, gustativos e olfativos; a fase gástrica, que ocorre na presença do alimento no estômago, resultando em estímulos químicos e mecânicos, mediados por reflexos neuronais locais; e a fase intestinal, que é ativada por estímulos químicos no duodeno, inibindo a secreção ácida pelo estômago (SCHUBERT, 2005).

Quando a acidez gástrica se torna elevada e os mecanismos de defesa não são suficientes, ocorre a formação de lesões ulcerativas na mucosa do trato gastrintestinal. Neste sentido, para que não ocorram danos na mucosa, se faz necessário o controle da secreção ácida (SCHUBERT; PEURA, 2008).

1.4 Controle da secreção ácida gástrica

O controle da secreção ácida é realizado através da interação coordenada das vias neuronal, endócrina e parácrina, que podem ser ativadas por estímulos provenientes diretamente do sistema nervoso central ou reflexivamente por estímulos originários do estômago, como a distensão, as proteínas e o ácido (KONTUREK; KONTUREK; OCHMANSKI, 2004; SCHUBERT, 2006; CHEN et al., 2006; SCHUBERT; PEURA, 2008).

Os principais estimulantes da secreção ácida são ACh, liberada dos neurônios entéricos pós-ganglionares (neurócrina), gastrina, liberada das células G (endócrina) e histamina, liberada das células ECL (parácrina). Estes agentes interagem com receptores acoplados às duas maiores vias de transdução de sinal, ciclase de adenilil (AC), para a histamina e fosfolipase C (PLC), para gastrina e ACh. O principal inibidor da secreção ácida é a somatostatina, liberada das células D oxínticas e pilóricas (parácrina). Cada um destes hormônios age diretamente sobre a célula parietal, e indiretamente modulam a secreção de células neuroendócrinas (CHEN et al., 2006; SCHUBERT; PEURA, 2008) (Figura 4).

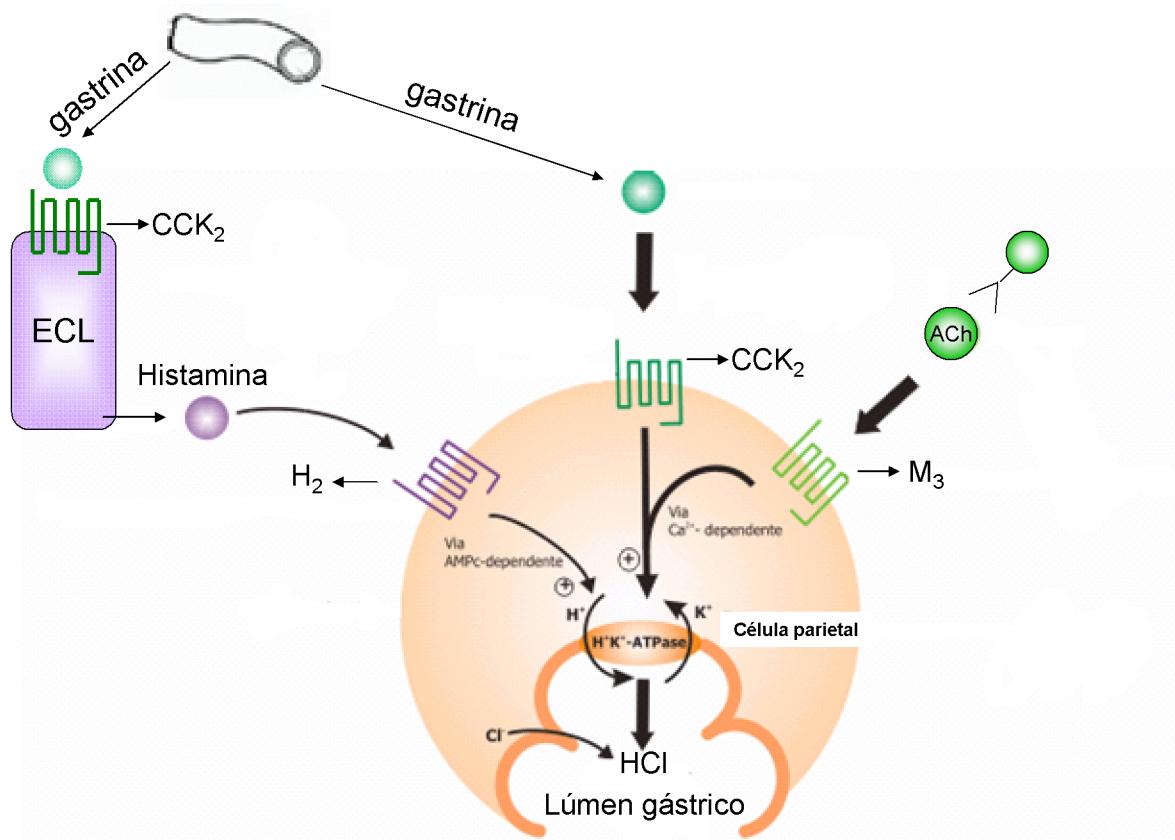


Figura 4. Vias de sinalização dos principais mediadores da secreção ácida (Adaptado de Olbe, Carlsson; Lindberg, 2003).

1.4.1 Mediadores e mecanismos envolvidos

A ACh é liberada da fibra nervosa vagal no sistema nervoso entérico ou nas proximidades das células epiteliais gástricas. Este neurotransmissor interage com receptores muscarínicos M_3 expressos nas células parietais, que ativados, acoplam-se a proteína trimérica $G_{q/11}$, promovendo, via PLC, a hidrólise de fosfolipídeos presentes na membrana, levando, a formação de 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 , por sua vez, promove a liberação de cálcio (Ca^{2+}) por ligar-se aos receptores de IP_3 presentes no retículo endoplasmático, o que resulta no aumento da concentração intracelular de cálcio ($[Ca^{2+}]_i$) promovendo a ativação de proteínas cinases, que regulam a fusão das vesículas que contém a H^+,K^+ -ATPase com a membrana apical destas células (ATHMANN et al., 2000; AIHARA et al., 2005; ANDERSON; CARLSSON, 2005) (Figura 4).

Indiretamente a ACh estimula a secreção ácida por ativação dos receptores M_2 e M_4 presentes nas células D (ATHMANN et al., 2000; AIHARA et al., 2005;

CHEN et al., 2006; SCHUBERT; PEURA, 2008) e por inibição da liberação de ANP. Estes dois processos impedem a secreção de somatostatina, removendo a regulação deste peptídeo sobre as células G, ECL e parietais (Figura 5) (GOWER et al., 2003a e b; HOU; SCHUBERT, 2006). Este neurotransmissor ativa também os receptores M₃ presentes nas células G, estimulando a cascata de sinalização do Ca²⁺ descrita anteriormente, promovendo a liberação de gastrina (AIHARA et al., 2005; SCHUBERT; PEURA, 2008) (Figuras 4 e 5).

Uma vez liberada na circulação sanguínea, a gastrina estimula a secreção ácida gástrica por ação direta nos receptores de colecistocinina 2 (CCK-2), também conhecido como receptor de colecistocinina B (CCK_B), presentes nas células parietais (KULAKSIZ et al., 2000; BAROCELLI; BALLABENI, 2003). Estes receptores são acoplados a proteína trimérica G_q (ATHMANN et al., 2000), que pela via da PLC e, consequentemente, aumento da [Ca²⁺]_i (KULAKSIZ et al., 2000; ATHMANN et al., 2000) promove a fusão das vesículas contendo a H⁺,K⁺-ATPase com a membrana apical das células parietais (ANDERSON; CARLSSON, 2005; SCHUBERT; PEURA, 2008). De forma indireta, a gastrina ativa os receptores CCK₂ presentes nas células ECL, e via cascata de sinalização do Ca²⁺ (Figura 4) (KULAKSIZ et al., 2000; ATHMANN et al., 2000) estimula de maneira bifásica a síntese e liberação de histamina. A primeira fase envolve liberação de histamina armazenada (BAROCELLI; BALLABENI, 2003; CHEN et al., 2006), enquanto que, a segunda fase está relacionada à reconstituição dos estoques de histamina e envolve um aumento na atividade da enzima histidina descarboxilase, seguida por um aumento na transcrição genética desta enzima, a qual converte histidina à histamina (ZANNER et al., 2002).

A histamina é um secretagogo que desempenha um papel chave no controle da secreção ácida. Uma vez liberada, se difunde do seu local de liberação até a célula parietal, onde interage com receptores H₂ presentes na membrana desta célula (YAO, FORTE, 2003; AIHARA et al., 2005; CHEN et al., 2006). Estes receptores estão acoplados a ambas as vias de sinalização das proteínas triméricas G_q e G_s (ATHMANN et al., 2000). A principal via de transdução envolvida na secreção ácida é a G_s, cuja ativação resulta na estimulação da AC, aumentando os níveis intracelulares de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMP_c) (ATHMANN et al., 2000; CHEN et al., 2006; SCHUBERT; PEURA, 2008) que promove a estimulação da proteína cinase dependente de AMP_c (PKA), iniciando a

cascata de eventos de fosforilação, o que culmina com fusão das vesículas contendo a H⁺,K⁺-ATPase com a membrana apical das células parietais, bem como, na ativação desta bomba (Figura 4) (YAO; FORTE, 2003; SCHUBERT; PEURA, 2008). A histamina também estimula indiretamente a secreção ácida, ativando os receptores H₃ presentes na célula D, possivelmente mediando à inibição da liberação de somatostatina, estimulando a liberação de gastrina e histamina, consequentemente, da secreção ácida (YAO; FORTE, 2003; KONTUREK et al., 2004) (Figura 5).

Outros mediadores estão envolvidos na secreção ácida gástrica, o GR'P, que é liberado pelas fibras pós-ganglionares do nervo vago e estimula diretamente a liberação de gastrina e, consequentemente, a secreção ácida (SCHUBERT; PEURA, 2008), e os neuropeptídeos PACAP e VIP, quando liberados dos neurônios não-colinérgicos, ativam os receptores PCA₁ e VAPAC₂ presentes nas células ECL, resultando na liberação de histamina (ATHMANN et al., 2000; AIHARA et al., 2005; CHEN et al., 2006). Entretanto, PACAP e VIP podem inibir a secreção ácida ao estimular de forma direta e indireta a secreção de somatostatina (ZENG et al., 1999; LI et al., 2000) (Figura 5).

A somatostatina, liberada pelas células D da mucosa antral e fúndica, é o principal inibidor fisiológico da secreção ácida (PATEL et al., 1996; SCHUBERT; PEURA, 2008), cuja ação é mediada via ativação do receptor de somatostatina 2 (SST₂), que ativado acopla-se a proteína trimérica G_i. A somatostatina indiretamente inibe a secreção ácida, por atuar nas células G e ECL, suprimindo a secreção de gastrina e histamina, respectivamente, via ação inibitória da G_i sobre a via de sinalização celular acoplada à G_q. A somatostatina atua de forma direta na célula parietal e via G_i inibe a cascata de sinalização da AC (ATHMANN et al., 2000; AIHARA et al., 2003; ZHAO et al., 2008).

As prostaglandinas da série E (PGE₂) são especialmente importantes na regulação da secreção ácida gástrica, uma vez que atua no receptor EP₃, acoplado à G_i, inibindo a via da AC, causando supressão da acidez gástrica na célula parietal (KATO et al., 2005). Além disso, as prostaglandinas (PGs) inibem a secreção de histamina (SACHS; ZENG; PRINZ, 1997).

O peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (CGRP) pertence a uma família de neuropeptídeos que incluem a calcitonina, a adrenomedulina e a amilina. O CGRP está presente nos neurônios sensoriais extrínsecos e seus receptores já

foram identificados nas células D antral e oxíntica (HAGNER; STAHL; KNOBLAUCH, 2002; KAWASHIMA; ISHIHARA; RUMI, 2002). Em resposta ao ácido ou a infecção aguda por *Helicobacter pylori*, os neurônios sensoriais extrínsecos são ativados e liberam o CGRP, este por sua vez, estimula os receptores SST₂ que via liberação da somatostatina inibe a secreção de gastrina, resultando na inibição de histamina e secreção ácida (SCHUBERT; PEURA, 2008) (Figura 5).

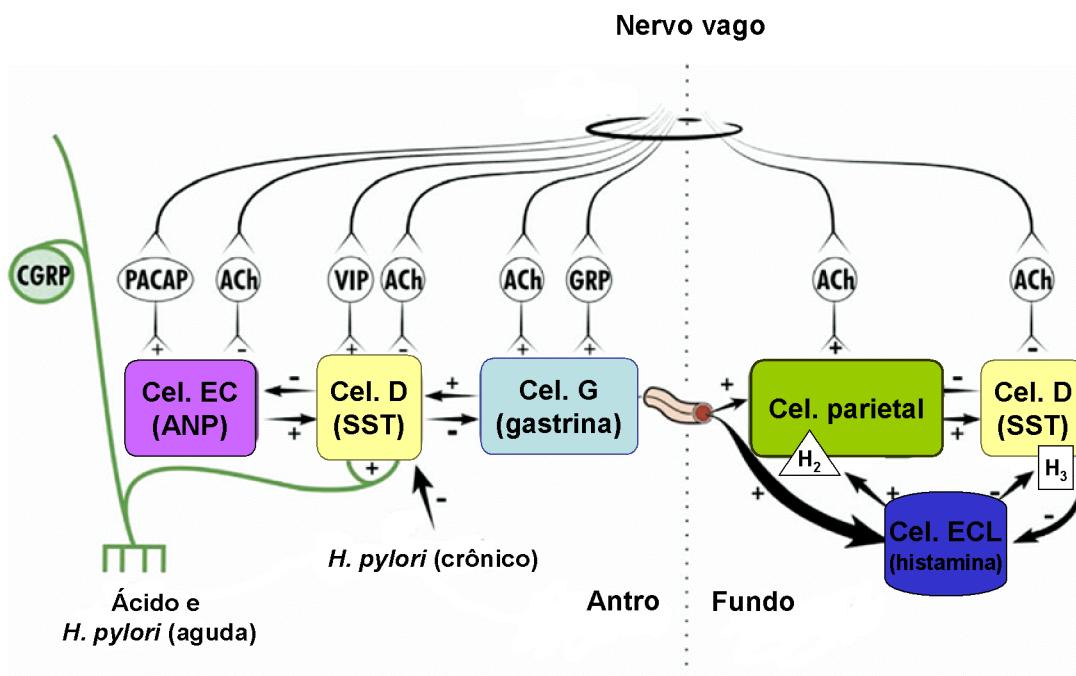


Figura 5. Mecanismos de sinalização neuronal, parácrina e endócrina envolvidos na regulação da secreção ácida (Adaptado de Schubert; Peura, 2008).

1.5 Proteção da mucosa gástrica

A mucosa gástrica diariamente é exposta a fatores irritantes endógenos como HCl e pepsina e exógenos a exemplo de bactérias e substâncias capazes de causar reações inflamatórias locais e sistêmicas (LAINÉ; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008; WALLACE, 2008). A integridade desta mucosa é garantida por fatores pré-epiteliais, epiteliais e subepiteliais. Entretanto, outros fatores também participam da defesa da mucosa como maré alcalina, inervação sensorial, renovação celular e os moduladores da barreira gástrica (FLEMSTRÖM; ISENBERG, 2001; BI; KAUNITZ, 2003) (Figura 6).

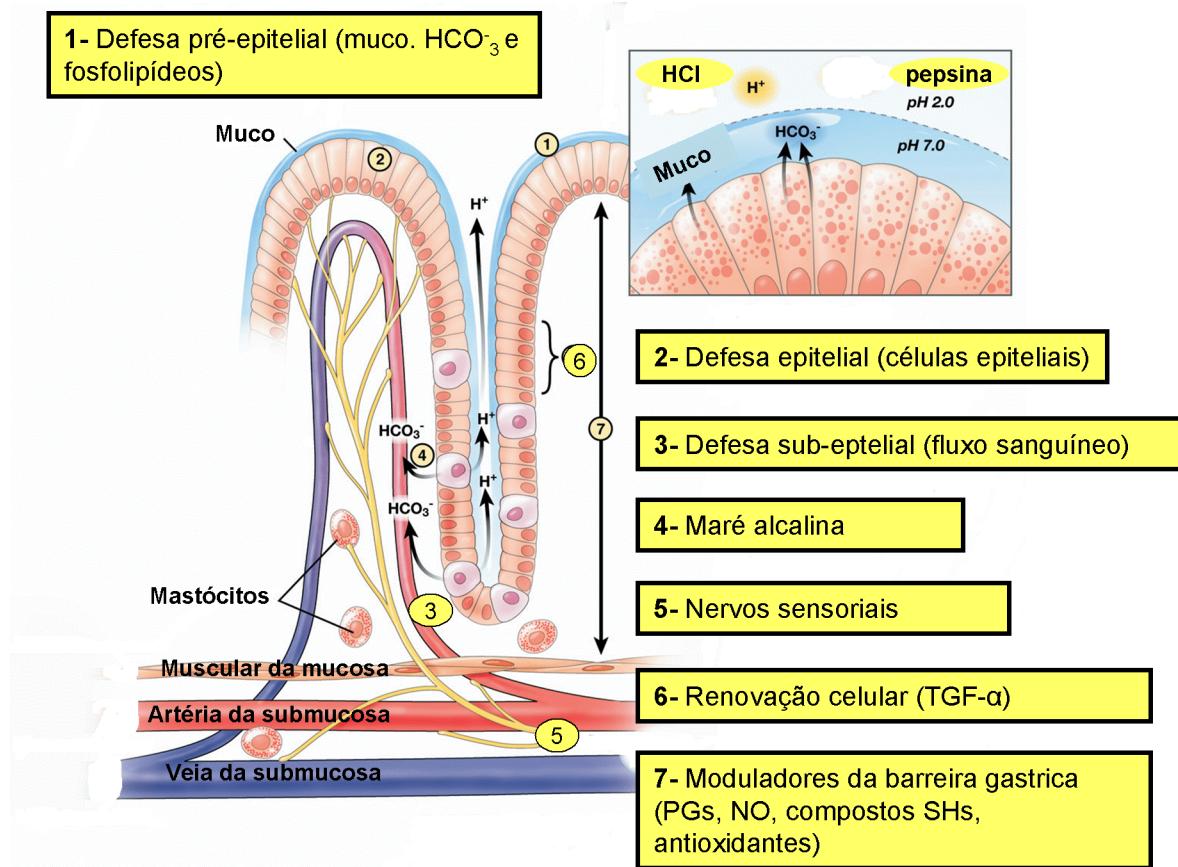


Figura 6. Fatores protetores da mucosa (Adaptado de Laine; Takeuchi; Tarnawski, 2008).

1.5.1 Defesa pré-epitelial: barreira de muco-bicarbonato-fosfolipídio

A barreira de muco-bicarbonato-fosfolipídeo constitui uma barreira pré-epitelial localizada entre o lúmen e o epitélio, sendo considerada a primeira linha de defesa da mucosa contra agentes agressores endógenos (ácido gástrico e pepsina) e agentes agressores exógenos (etanol, antiinflamatórios e bactérias). Esta barreira é formada por gel viscoso, bicarbonato e fosfolipídeos tensoativos que cobrem a superfície da mucosa e retém o bicarbonato secretado pelas células epiteliais superficiais, a fim de manter um microambiente neutro ($\text{pH} = 7,0$) na superfície das células epiteliais, impedindo desta forma a entrada da pepsina e consequentemente a digestão proteolítica da superfície epitelial (ATUMA et al., 2001; ALLEN; FLEMSTRÖM, 2005).

A superfície do gel viscoso é revestida por uma película de fosfolipídeos com alta polaridade, que impede a difusão de ácidos minerais ionizáveis, como HCl do

lúmen gástrico em direção à mucosa gástrica (KONTUREK et al., 2004). O muco é composto de 95 % de água e 5 % de glicoproteínas (mucinas), juntamente com pequenas quantidades de lipídeos, ácidos nucléicos e proteínas (REPETTO; LLESUY, 2002; ALLEN; FLEMSTRÖM, 2005).

O muco é armazenado em grânulos contidos no citoplasma apical das células epiteliais superficiais e liberados por exocitose. A secreção de muco é estimulada por hormônios gastrintestinais (secretina), PGE₂ e agentes colinérgicos (MONTROSE et al., 2006).

A secreção de HCO₃⁻ dentro de uma estável e aderente camada de gel viscoso cria um gradiente de pH na superfície do epitélio do estômago e do duodeno, que tem a finalidade de proteger a mucosa contra o ácido gástrico (ALLEN; FLEMSTRÖM, 2005). A secreção de HCO₃⁻ é estimulada por PGs, pela presença de ácido luminal e fator liberador de corticotropina (CRF), melatonina, uroguanilina e orexina A (MONTROSE et al., 2006).

1.5.2 Defesa epitelial

A próxima linha de defesa da mucosa é constituída de uma camada contínua de células epiteliais, que estão fortemente interconectadas formando uma barreira que previne a retro-difusão de ácido e pepsina (ALLEN; FLEMSTRÖM, 2005). Além disto, a presença de fosfolípidos nas superfícies das células as torna hidrofóbicas, o que resulta na repulsão de ácidos e agentes nocivos solúveis em água (LICHTENBERGER, 1999).

As células epiteliais secretam muco e bicarbonato, além de gerar PGs, proteínas de choque térmico (HSPs) e catelicidinas (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008). As HSPs são geradas em resposta ao estresse, por aumento na temperatura, estresse oxidativo e agentes citotóxicos (TANAKA et al., 2007a). Em resposta a esses agentes, as HSPs, incluindo a HSP70, previnem a desnaturação de proteínas e protegem a célula contra a injúria. O aumento na expressão destas proteínas pode estar implicado como um fator adicional no mecanismo de defesa da mucosa gastrintestinal (REPETTO; LLESUY, 2002), além de acelerar o processo de cicatrização de úlceras gástricas (OKABE; AMAGASE, 2005). Outras substâncias importantes na defesa da mucosa são as catelicidinas e β-defensinas, que são

peptídeos catiônicos que apresentam papel chave no sistema de defesa inato da superfície da mucosa, prevenindo a colonização bacteriana (YANG et al., 2006).

1.5.3 Defesa sub-epitelial: fluxo sanguíneo

A microcirculação mucosal é essencial para transportar oxigênio e nutrientes, remover substâncias tóxicas (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008), manter a secreção de bicarbonato e participar da cicatrização da úlcera péptica (KAWANO; TSUJI, 2000).

Quando a mucosa gástrica é exposta a agentes irritantes ou quando há retro-difusão de ácido, ocorre um forte e rápido aumento no fluxo sanguíneo o que permite a remoção e/ou diluição da retro-difusão ácida e/ou agentes nocivos. Esta resposta parece ser essencial para a defesa da mucosa, visto que a sua abolição através da restrição mecânica do fluxo sanguíneo leva à necrose hemorrágica. A resposta hiperêmica é mediada por nervos sensoriais aferentes (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

O fluxo sanguíneo é controlado pelo SNC e entérico, pela regulação parácrina de hormônios, fatores de crescimento, eicosanoides, principalmente as PGs produzidas pela mucosa local (BI; KAUNITZ, 2003). A geração contínua de PGs e NO, protege a mucosa gástrica da injúria e contra a ação danosa dos vasoconstrictores como leucotrieno C₄ (LTC-4), tromboxano A₂ e endotelina. Estes mediadores endógenos também mantêm a viabilidade das células endoteliais, evita agregação plaquetária e aderência de leucócitos nas células endoteliais microvasculares, prevenindo assim, o comprometimento da microcirculação (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

1.5.4 “Maré alcalina”

O fenômeno da “Maré alcalina” ocorre quando as células parietais secretam o íon H⁺ dentro do lúmen e simultaneamente transportam o íon bicarbonato pela membrana basolateral através da troca Cl⁻/HCO₃⁻, para o interstício e lúmen dos

vasos sanguíneos capilares. Este HCO_3^- é transportado ascendentemente para a base da superfície das células epiteliais e para o lúmen, fortalecendo a camada de muco e bicarbonato (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

1.5.5 Inervação sensorial da mucosa gástrica

A mucosa gástrica e os vasos da submucosa são inervados por neurônios aferentes primários e nervos, formando um denso plexo na base mucosal. As fibras nervosas deste plexo entram na lámina própria (acompanha os vasos capilares) e termina logo abaixo da superfície das células epiteliais (HOLZER, 2007). As terminações nervosas podem detectar o conteúdo luminal e/ou a entrada de ácido na mucosa, resultando na ativação das fibras nervosas, que pode diretamente afetar o tônus das arteríolas da submucosa, regulando o fluxo sanguíneo mucosal (GUTH, 1992). A estimulação dos nervos sensoriais leva a liberação de neurotransmissores nos terminais nervosos localizados no interior ou na proximidade de grandes vasos submucosos, que podem desempenhar um papel fundamental na proteção da mucosa (HOLZER, 2007).

1.5.6 Renovação celular

O epitélio é continuamente renovado através do processo de proliferação das células pró-genitoras, permitindo a substituição das células epiteliais das superfícies danificadas ou envelhecidas. A completa renovação da superfície das células epiteliais gástricas ocorre normalmente em 3-7 dias e a substituição das células glandulares ocorre durante meses (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

A restituição da superfície do epitélio depois de um dano superficial ocorre dentro de minutos por migração das células epiteliais preservadas, as quais estão localizadas no pescoço das glândulas. Esta migração acontece independente das células de proliferação pró-genitoras, que ocorre horas depois da injúria (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

A proliferação das células pró-genitoras é controlada por fatores de crescimento, via receptor do fator de crescimento epidermal (EGF), estimulados

principalmente pelo fator de crescimento transformador α (TGF- α) e PGE₂. O peptídeo EGF não se encontra na mucosa normal, entretanto, está presente no lúmen gástrico, derivado de glândulas salivares e esofágicas e podem estimular as células pró-genitoras em caso de dano (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

1.5.7 Fatores moduladores da barreira gástrica

1.5.7.1 Prostaglandinas

As prostaglandinas são sintetizadas a partir do ácido araquidônico, através das enzimas ciclooxigenases (COX). Existem três isoformas desta enzima: COX-1 (constitutiva) que produz PGs envolvidas na manutenção das funções fisiológicas, como a proteção da mucosa gastrintestinal, a COX-2 induzível em muitas células em resposta a injúria do tecido por agentes pró-inflamatórios e mitogênicos (HALTER et al., 2001), e a mais recente isoforma, a COX-3, expressa no córtex cerebral de cães e em baixas quantidades em outros tecidos. Em humanos, esta enzima é expressa no córtex cerebral e no coração (CHANDRASEKHARAN et al., 2002).

As principais PGs produzidas na mucosa gástrica de humanos e animais são PGE₂ e prostaciclina 2 (PGI₂) (PESKAR; GUNTER; PESKAR; 1980), importantes para a manutenção da integridade mucosal e proteção contra agentes ulcerogênicos e necrotisantes (HALTER et al., 2001; BRZOZOWSKI et al., 2005). No entanto, a ação citoprotetora destes prostanoides ocorre principalmente pela PGE₂ (BOTTING, 2006).

As PGs modulam todos os aspectos de defesa da mucosa (WALLACE, 2008), uma vez que inibem a secreção ácida, estimulam a secreção de muco, bicarbonato e fosfolipídeo, aumentam o fluxo sanguíneo da mucosa, aceleram a restituição epitelial, bem como, a cicatrização da mucosa (HALTER et al., 2001; BRZOZOWSKI et al., 2005; LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

As PGE₂ endógenas e exógenas e seus análogos exercem suas ações biológicas via receptores EP (EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄), pertencentes a grande família de receptores de membrana acoplados a proteínas G triméricas, também conhecidos como receptores metabotrópicos que, dependendo do estímulo, vão mediar os

efeitos citoprotetores ativando diferentes vias intracelulares de transdução de sinal (SUGIMOTO; NARUMIYA; ICHIKAWA, 2000).

1.5.7.2 Óxido nítrico

Outra molécula sinalizadora, envolvida na proteção da mucosa é o NO, um mediador endógeno gasoso, que produz muitos efeitos semelhantes aos das PGs no TGI (WALLACE, 2008).

O NO é gerado através de uma série de etapas de transferência de elétrons, por uma família de enzimas conhecidas como sintase do óxido nítrico (NOS). A reação inicia-se através da oxidação do átomo de nitrogênio terminal da L-arginina, na presença de nicotinamida-adenina-dinucleotídio-fosfato-hidrogênio (NADPH) e Ca^{2+} , resultando no intermediário $\text{N}^{\text{G}}\text{-hidroxi-L-arginina}$, que na presença de NADPH e O_2 forma L-citrulina e NO (FILHO; ZILBERSTEIN, 2000; MARTIN; JIMÉNEZ; MOTILVA, 2001).

Esta enzima pode se apresentar em duas isoformas, a constitutiva (cNOS), enzima normalmente encontrada em células e tecidos normais, cuja expressão e atividade não é afetada no processo inflamatório; e a induzível (iNOS), expressa de forma elevada na inflamação aguda e crônica (MONCADA; HIGGS, 2006).

Existem duas formas de NOS constitutiva, a neuronal (nNOS), expressa no sistema nervoso central e periférico, e a endotelial (eNOS), localizada nas células endoteliais. Ambas as enzimas são dependentes da via de sinalização do Ca^{2+} -calmodulina (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; MONCADA; HIGGS, 2006).

A isoforma iNOS está localizada nos macrófagos, neutrófilos, células da musculatura vascular e endoteliais, responsável pela produção de grande quantidade de NO, por uma via independente da Ca^{2+} -calmodulina (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; BARRETO; CORREIA; MUSCARÁ, 2005; MONCADA; HIGGS, 2006).

A principal via envolvida em muitas das funções fisiológicas do NO é da ciclase de guanilil solúvel (GCs), cuja cascata de sinalização inicia quando o NO se liga ao grupamento heme dessa enzima GCs, produzindo o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), que ativa a proteína cinase dependente de GMPc (PKG), iniciando uma cascata de fosforilação, que resulta na ativação de enzimas alvos,

responsáveis pela manutenção da integridade fisiológica (MONCADA; HIGGS, 2006).

O NO desempenha um papel importante na defesa da mucosa, principalmente por modulação da circulação mucosal, por ser uma molécula vasodilatadora, e tal ação resulta no aumento do fluxo sanguíneo mucosal. Além disso, esse mediador endógeno é um potente inibidor da aderência de leucócitos para o endotélio vascular (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008). O NO também medeia a gastroproteção por regular a secreção de muco e bicarbonato, inibir a secreção ácida e acelerar o processo de cicatrização da úlcera (MARTIN; JIMÉNEZ; MOTILVA, 2001; WALLACE, 2008).

O NO está envolvido na manutenção da integridade homeostática mediada pela COX, devido a estimulação da síntese de PGs, resultando nos efeitos citoprotetores mediados pelas PGs (MARTIN; JIMÉNEZ; MOTILVA, 2001). O NO em baixas concentrações tem demonstrado ação antioxidante, que protege as células contra os efeitos deletérios do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou peróxidos alquil, resultando na prevenção ou inibição da peroxidação lipídica (KRÖNCKE; FEHSEL, KOLB-BACHOFEN, 1997).

1.5.7.3 Grupamentos sulfidrilas (SHs)

Os grupamentos SHs estão presentes no muco gástrico e em diversas enzimas do sistema antioxidante. Os compostos SHs são substâncias que apresentam em sua composição grupamentos tiólícos (SHs), que podem ser classificados em não protéicos (tripeptídeo glutationa – GSH) e protéicos a exemplo da glutationa complexada a albumina (FAURE; LAFOND, 1995; JORDÃO-JÚNIOR et al., 1998).

A GSH é o composto SH mais abundante no meio intracelular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; GATÉ et al., 1999) e está presente em grande quantidade na mucosa gástrica (KONTUREK et al., 1987), onde desempenha um importante papel na manutenção da integridade gástrica, particularmente quando as espécies reativas de oxigênio (EROs) estão envolvidas na fisiopatologia do tecido lesado (KIMURA et al., 2001), além de atuarem direta ou indiretamente em diversos processos biológicos, como síntese de proteínas, manutenção do fluxo sanguíneo,

integridade da camada de muco-bicarbonato gástrico e metabolismo (ROVER; HOEHR; VELLASCO, 2001).

1.5.7.4 Sistema antioxidante

Radicais livres são todas as espécies de radicais que possuem um ou mais elétrons desemparelhados, centrado no átomo de hidrogênio, carbono, enxofre, nitrogênio ou oxigênio. Quando o elétron desemparelhado se encontra no átomo de oxigênio, são denominados EROs (ROVER; HOEHR; VELLASCO, 2001; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Os radicais livres são conhecidos por desempenhar um importante papel na etiologia e fisiopatologia das doenças humanas em geral, e em particular nas desordens do sistema digestório (REPETTO; LLESUY, 2002).

As EROs, como o ânion superóxido (O_2^-), o H_2O_2 e o radical hidroxil (-OH) são moléculas reativas, sendo as duas primeiras espécies potencialmente tóxicas. Os danos nos sistemas biológicos são causados principalmente por radicais -OH os quais interagem com um grande número de moléculas, incluindo proteínas com macromoléculas essenciais como o DNA e lipídeos, prejudicando assim as funções celulares, causando a peroxidação lipídica. Para manter a homeostasia são necessários eficientes mecanismos de defesa antioxidantes (CNUBBEN et al., 2001; REPETTO; LLESUY, 2002).

O sistema antioxidante pode ser subdividido em enzimático (primeira linha de defesa) e não-enzimático (segunda linha de defesa) (Figura 7). O primeiro sistema de defesa antioxidante é constituído por superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GSH-Px) e glutationa redutase (GSH-Rd). O sistema de defesa secundário é representado por captadores de radicais livres de baixo peso molecular como os tióis, glutationa, vitamina E e C, carotenóides e metionina (CNUBBEN et al., 2001; POHLE et al., 2001).

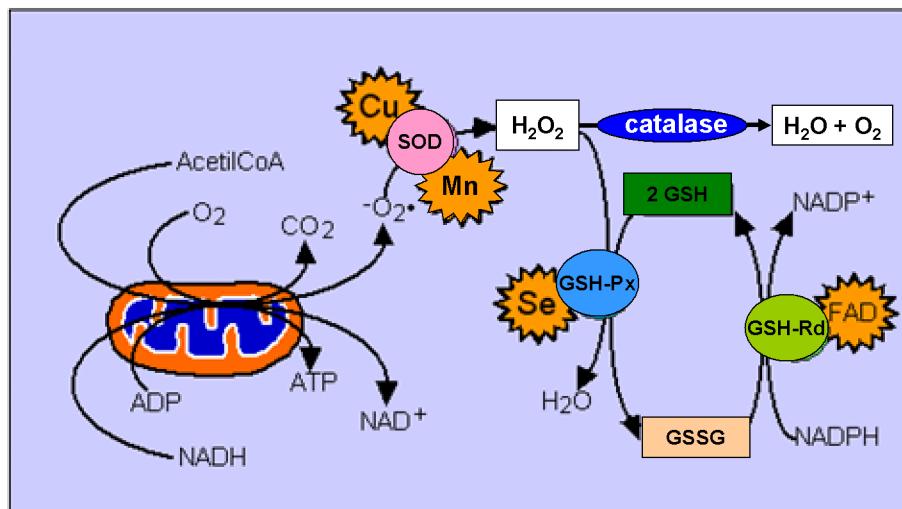


Figura 7. Sistema antioxidante enzimático e não-enzimático. Legenda: superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GSH-Px), glutationa não-protéica ou reduzida (GSH), glutationa oxidada (GSSG), glutationa redutase (GSH-Rd), fosfato de dinucleotídeo adenina nicotinâmida (NADP^+), fosfato de nicotinâmida adenina reduzida (NADPH), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), acetilcoenzima A (AcetylCoA), difosfato de adenosina (ADP), trifosfato de adenosina (ATP) (Fonte: <http://biobioradiciais.blogspot.com/2008/11/antioxidantes.html>).

1.6 Fisiopatologia da úlcera péptica

1.6.1 Etiologia

A úlcera péptica é uma doença de evolução geralmente crônica e recorrente considerada a mais predominante das doenças gastrintestinais (MINCIS, 2002). É caracterizada por inflamação severa, composta de pontos hemorrágicos e lesões necrotizantes (CALAM; BARON, 2001) que pode ultrapassar os limites da camada submucosa e penetrar na muscular da mucosa do esôfago (úlcera esofágica), estômago (úlcera gástrica) e duodeno (úlcera duodenal) (TARNAWSKI, 2005; CALAM; BARON, 2001) (Figura 8).

Os sintomas mais freqüentes desta enfermidade são a sensação de mal estar, dores freqüentes na região central e superior do abdome, podendo ocorrer com menor freqüência náuseas e vômitos (PRADOS; MIQUEL, 2004; RAMAKRISHNAN; SALINAS, 2007).

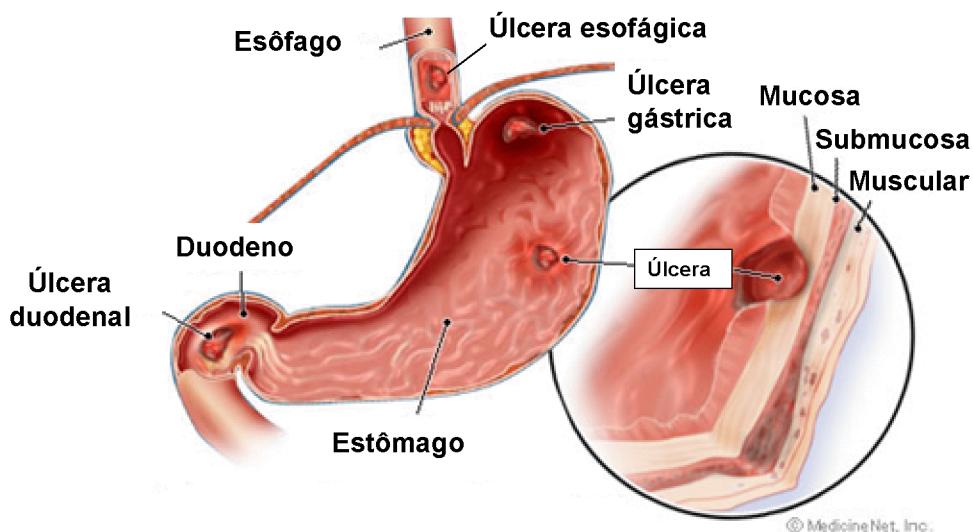


Figura 8. Úlcera péptica e as camadas lesionadas. (Modificado de <http://hopkins-gi.nts.jhu.edu/images>).

As lesões gástricas ocorrem principalmente devido ao desequilíbrio entre os fatores citoprotetores (muco, bicarbonato, PGs, NO, sistema antioxidante e fatores de crescimento) e citoagressores endógenos (HCl, pepsina, refluxo biliar, leucotrienos e EROs) (BANDYOPADHYAY et al., 2001; RAINSFORD, 2001; MAITY et al., 2003).

Diversos fatores de risco contribuem para a patogênese da úlcera gástrica, dos quais se pode destacar o consumo excessivo de álcool, o estilo de vida estressante, uso crônico de antiinflamatórios não-esteróidais (AINEs), infecção por *H. pylori*, fumo, ingestão de determinados alimentos e predisposição genética, que isolados ou em associação, contribuem de maneira significativa para o aumento da secreção de ácido clorídrico na mucosa gástrica e para a redução dos fatores de proteção da mesma, promovendo a formação de lesões ulcerativas (WOLFE; SACHS, 2000; YUAN; PADOL; HUNT, 2006).

O consumo excessivo de álcool representa uma das principais causas de úlcera péptica no homem, causando erosões hemorrágicas gástricas e gastrite caracterizada por edema, hemorragia subepitelial, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias (KO; CHO; LAM, 2004). Tais danos ocorrem devido a liberação de mediadores vasoativos (leucotrienos e histamina), formação de EROs, resultando em peroxidação lipídica e, consequentemente, lesões gástricas (OATES; HAKKINEN, 1988; KAY; GRINDER; MAGNESS, 2000; REPETTO; LLESUY, 2002).

Outro fator de risco para úlcera gástrica no homem está relacionado ao estilo de vida estressante (FILATEROVA et al., 2007). O estresse gástrico envolve o acúmulo neutrofílico, produção de citocinas pró-inflamatórias, geração de EROs, diminuição do fluxo sanguíneo mucosal e aumento da secreção ácida. Entretanto, não se sabe qual destes fatores é o mais importante para o desenvolvimento das lesões gástricas induzidas por este agente lesivo (ODASHIMA et al., 2005).

Os AINEs pertencem a uma classe de antiinflamatórios prescritos na terapêutica de diversas desordens inflamatórias, como artrite reumatóide, osteoartrites e dor aguda (KATO et al., 2002; KATO et al., 2007). Entretanto, quando usados cronicamente provocam danos gastrintestinais, incluindo úlceras gástricas e duodenais e suas complicações (hemorragia ou perfuração), além de danificar o intestino delgado (WALLACE, 2001; DOAN; MASSAROTTI, 2005; KATO et al., 2007).

As úlceras induzidas por AINEs envolvem principalmente a redução dos níveis de PGs, resultando em distúrbios na microcirculação gástrica, aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, migração neutrofílica para o local inflamado, liberação de radicais livres concomitante com a redução dos níveis de glutationa, desequilíbrio na expressão de NO e apoptose (KONTUREK et al., 2002).

H. pylori é um bacilo gram negativo, que possui habilidade em colonizar a mucosa gástrica (MAJUMDAR; BEBB; ATHERTON, 2007), causando inflamação gástrica crônica, que pode progredir para gastrite crônica, úlcera péptica, linfomas e adenocarcinoma gástrico (GRAHAM, 1997; LEE; SHIN; BHAHM, 2008). Os mecanismos pelos quais essa infecção bacteriana induz danos na mucosa gástrica incluem efeitos diretos dos fatores de virulência produzidos pelo *H. pylori*, cagA, vacA ou urease, além da propagação e perpetuação da inflamação, estresse oxidativo e a indução de apoptose (DHAR et al., 2003; STOICOV et al., 2004).

A diminuição da acidez no lúmen gástrico facilita a sobrevivência e colonização do *H. pylori* no estômago. Os mecanismos envolvidos na inibição ácida promovida por tal bactéria é multifatorial e incluem a hidrólise da uréia em amônia, através da ação da urease, favorecendo um pH neutro (BERESWILL; KIST, 2002; RADOSZ-KOMONIEWSKA et al., 2005), e a síntese de lipases e proteases responsáveis pela degradação dos componentes do muco, facilitando a migração da bactéria em direção ao epitélio gástrico (LADEIRA; SALVADOR; RODRIGUES, 2003).

O gene *vacA* produz a citoxina vacuolizante, que induz a formação de canais aniônicos nas células epiteliais, promovendo a saída de uréia (NAITO; YOSHIKAWA, 2002).

O fator de virulência *cagA* induz a expressão de interleucina-8 nas células epiteliais, o que resulta na migração neutrofílica para o local da infecção e produção de radicais livres pelos neutrófilos, e consequentemente danos celulares (NAITO; YOSHIKAWA, 2002).

O tabagismo é uma prática comum na população mundial, representando um fator de risco para o desenvolvimento de úlceras pépticas. O cigarro (nicotina) não somente promove ulcerações como também potencializa as úlceras causadas por álcool, estresse, AINEs e *H. pylori* (MAITY et al., 2003).

As lesões gástricas induzidas pelo cigarro (nicotina) estão relacionadas com o aumento da secreção ácida do pepsinogênio via estimulação vagal e aumento da liberação de histamina; além destes eventos o cigarro promove a diminuição da secreção de muco e bicarbonato, diminuição da síntese de PGE₂ (MAITY et al., 2003), fatores de crescimento e aumento da resposta inflamatória (SHIN et al., 2002) com conseqüente geração de EROs (MAITY et al., 2003).

As EROs possuem uma grande projeção na atualidade como indutores de lesões em diferentes sistemas ao promoverem danos oxidativos em diversas macromoléculas como lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos (KANEKO; BABA; MATSUO, 2003; KAHRAMAN et al., 2003), que são particularmente sensíveis aos níveis elevados de radicais livres. Os radicais hidroxídos e peróxidos são os principais agentes lesivos relacionados às desordens gastrintestinais, a exemplo das úlceras gástricas e duodenais, gastrite crônica, câncer gastrintestinal, gastroenterite bacteriana, diarréia e doenças inflamatórias intestinais, a exemplo da colite ulcerativa (BARRACHINA; PANES; ESPLUGUES, 2001; MARTIN; JIMENEZ; MOTILVA, 2001).

O envolvimento destas espécies reativas na patogênese da ulceração gástrica e duodenal tem sido evidenciado em vários estudos clínicos e experimentais, os quais mostram que a lesão gástrica produzida por etanol, drogas antiinflamatórias não-esteroidais, *H. pylori* e vários tipos de estresse é mediada pelas EROs (YU et al., 1997; MARTIN; JIMENEZ; MOTILVA, 2001; BARRACHINA; PANES; ESPLUGUES, 2001).

1.6.2 Epidemiologia

A úlcera péptica é uma doença de elevada incidência e prevalência global, que acomete cerca de 14,5 milhões de pessoas no mundo inteiro (SRIKANTA; SIDDARAJU; DHARMESH, 2007).

A prevalência mundial da úlcera péptica se porta de forma diferenciada. As úlceras duodenais são mais freqüentes nos países ocidentais, enquanto que úlceras gástricas são mais prevalentes nos países asiáticos, especialmente no Japão (YUAN; PADOL; HUNT, 2006). Os homens são mais suscetíveis ao desenvolvimento desta doença do que as mulheres (LIO; WONG; CHO, 2001).

Atualmente acredita-se que a infecção por *H. pylori* e o uso de AINEs são as maiores causas de úlcera péptica (PAWLIK et al., 2002), uma vez que 15 % das pessoas infectadas por *H. pylori* desenvolve úlcera péptica (MAJUMDAR; BEBB; ATHERTON, 2007).

Os usuários crônicos de AINEs apresentam uma alta incidência de úlceras gastroduodenais, com uma prevalência de 35 a 60 % (SCHMASSMANN, 1998), sendo que as úlceras gástricas são aproximadamente quatro vezes mais comuns que as úlceras duodenais (ROSTOM et al., 2007).

No Brasil, os casos relacionados a esta afecção não são rigorosamente notificados, o que torna praticamente impossível obter dados epidemiológicos confiáveis com relação à sua incidência.

1.7 Terapêutica da úlcera péptica

A secreção ácida é reconhecida como um componente central da úlcera péptica, dessa forma o seu controle ainda é o principal alvo terapêutico para o tratamento desta desordem ácido-péptica. Neste sentido, vários fármacos foram desenvolvidos com o intuito de neutralizar ou inibir a acidez, a exemplo dos antiácidos, anticolinérgicos, antagonistas do receptor H₂ e inibidores da bomba de prótons (Figura 9) (AIHARA et al., 2003; JAIN et al., 2007; SCHUBERT; PEURA, 2008).

Os antiácidos foram desenvolvidos na perspectiva de neutralizar a acidez, a exemplo do bicarbonato de sódio, carbonato de cálcio, hidróxido de alumínio,

hidróxido de magnésio que foram amplamente utilizados (JAIN et al., 2007), entretanto, são raramente úteis como terapia primária de úlceras, considerando que apenas alivia os sintomas e apresentam vários efeitos colaterais, incluindo diarréia, constipação e interferência na absorção de drogas (BEALL et al., 2006).

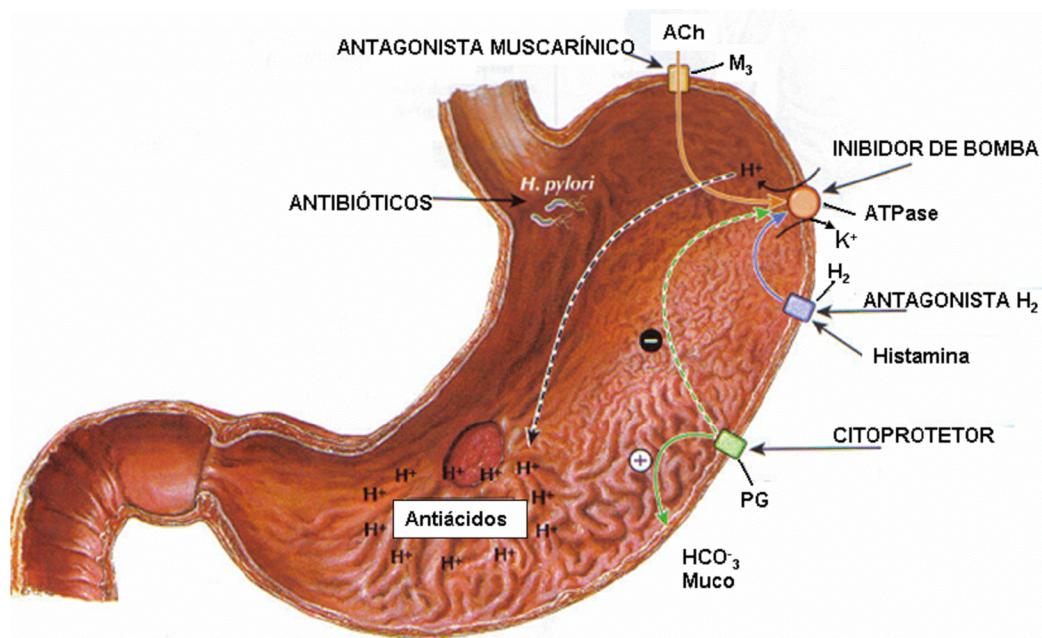


Figura 9. Terapêutica da úlcera péptica (Adaptado de Raffa; Rawls; Beyzarov, 2006).

Com o intuito de inibir a secreção ácida surgiram os anticolinérgicos (pirenzepina e telenzepina), antagonistas dos receptores muscarínicos, os quais podem reduzir a dor por diminuição da motilidade duodenal, além de inibirem a secreção ácida (JAIN et al., 2007). No entanto, o uso dos anticolinérgicos é limitado, uma vez que essas drogas promovem inúmeros efeitos adversos, como boca seca, visão turva, taquicardia e disfunção da bexiga (AIHARA et al., 2003).

A descoberta dos antagonistas dos receptores H₂ por James Black em 1972 revolucionou a terapêutica da úlcera. Drogas como a cimetidina, ranitidina e famotidina bloqueiam os receptores H₂, impedindo a ligação da histamina no seu receptor e, consequentemente, promovem a redução da secreção ácida (CHENTER; RODRIGUES-JÚNIOR, 2002). Os antagonistas dos receptores H₂ são bem tolerados, com efeitos adversos observados em apenas 1,5 % dos pacientes, os quais incluem confusão mental, ginecomastia, nefrite intersticial, além de interagir com enzimas do complexo enzimático citocromo P450 (SCHUBERT; PEURA, 2008).

A identificação da H⁺, K⁺-ATPase, como a bomba de próton da célula parietal responsável pela secreção de H⁺, representou um novo avanço no entendimento e tratamento das desordens ácido-pépticas (AIHARA et al., 2003; SCHUBERT; PEURA, 2008). Os inibidores da bomba de prótons (PPIs) são os medicamentos mais eficazes no controle da secreção ácida atualmente disponíveis no mercado farmacêutico e são considerados os mais prescritos na terapêutica antiulcerogênica (SCHUBERT; PEURA, 2008). Os principais representantes dessa classe são omeprazol, lansoprazol, pantoprazol e rabeprazol. Os PPIs mesmo sendo considerados seguros e eficazes, têm manifestado efeitos adversos relacionados com hipergastrinemia, hipersecreção ácida rebote, má absorção, infecção e câncer (JAIN et al., 2007).

Quando a úlcera péptica está associada à infecção por *H. pylori* o tratamento constitui uma combinação de PPIs (omeprazol) ou antagonista do receptor H₂ (ranitidina), mais dois antibióticos, claritomicina e amoxicilina ou claritomicina e metronidazol, ou ainda, o PPI associado aos dois antibióticos e em conjunto com sais de bismuto (Figura 9) (CHENTER; RODRIGUES-JÚNIOR, 2002; MAJUMDAR; BEBB; ATHERTON, 2007). No entanto, as limitações terapêuticas desta tripla terapia incluem náuseas, diarréias e tonturas (JAIN et al., 2007).

A terapia da úlcera gástrica, além de centrada em drogas que promovem a inibição da secreção ácida e a remoção de agentes lesivos (AINEs e *H. pylori*) (SCHUBERT; PEURA, 2008), envolve também agentes farmacológicos que aumentam os fatores protetores da mucosa, como os citoprotetores (Figura 9) (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008). São representantes dessa classe o sucralfato, misoprostol (análogo da PGE₂) e a carbenoxolona, entretanto todos induzem vários efeitos colaterais (MÖSSNER; CACA, 2005), sendo que a carbenoxolona é atualmente utilizada como ferramenta farmacológica.

A terapêutica da úlcera gástrica tem apresentado um grande avanço nos últimos anos no desenvolvimento de novos fármacos, entretanto, apresenta fatores limitantes quanto à eficácia, produção de efeitos colaterais (DEBASHIS et al., 2002) e alta taxa de recorrência de úlcera (40-80 %) um ano após o tratamento com os antagonistas dos H₂ e os PPIs (SZABO; VINCZE, 2000).

Outro fator limitante na terapêutica antiulcerogênica é o uso prolongado dos antagonistas do receptor H₂ e PPIs, que resulta na supressão da secreção ácida

gástrica prolongada, provocando hipergastrinemia, que pode estar associada à formação de alterações pré-cancerígenas na mucosa gástrica (JAIN et al., 2007).

Diante destas considerações, se torna necessário buscar nas plantas medicinais uma nova abordagem terapêutica para as desordens gastrintestinais na perspectiva de apresentar menos efeitos colaterais e menor índice de recidiva que as drogas existentes no mercado.

1.8 Plantas como uma nova alternativa terapêutica

1.8.1 Plantas com atividade antiulcerogênica

No Brasil várias plantas são usadas na medicina popular para o tratamento de distúrbios gastrintestinais, em particular da úlcera gástrica (CORRÊA, 1984). Diversos estudos científicos têm comprovado a atividade antiulcerogênica de várias plantas brasileiras, destacando-se a *Syngonanthus arthrotrichus* (BATISTA et al., 2004), *Alchornea castaneaefolia* (HIRUMA-LIMA et al., 2006), *Praxelis clematidea* (FALCÃO, 2007), *Hancornia speciosa* (MORAES et al., 2008), *Herissantia crispa* (LIMA, 2008), *Maytenus rigida* (SANTOS, 2008), dentre outras, sendo que muitas dessas atividades estão relacionadas aos seus metabólitos secundários, tais como alcalóides, lignóides, saponinas, sesquiterpenos e compostos polifenólicos (BORRELI; IZZO, 2000).

Os compostos fitoquímicos acima relacionados são de grande importância na atividade antiulcerogênica. Entretanto, a classe dos compostos polifenólicos (ácido fenólico, taninos, flavonóides, etc), deve ser ressaltada por possuírem significativa atividade gastroprotetora e cicatrizante relacionadas a atividade antioxidante.

1.8.2 Flavonóides com atividade antiulcerogênica

Flavonóides constituem uma importante classe de metabólitos secundários com cerca de 9.000 estruturas identificadas, sendo considerado o principal grupo de compostos polifenólicos (HARBORNE; BAXTER, 1999; WILLIAMS; GRAYER, 2004).

O termo flavonóides é usado para descrever os pigmentos vegetais, também são conhecidos como derivados de benzo- γ -pirano, sinônimo de cromano (anéis A e C na Figura 10). Todos os flavonóides derivam de esqueletos com 15 carbonos (C6-C3-C6), formados a partir de dois metabólitos básicos, malonil-CoA e p-coumaroil-CoA (HASSIG et al., 1999; HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

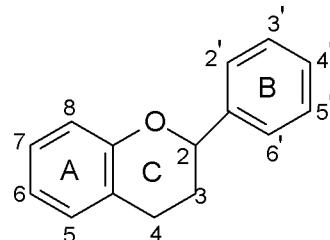


Figura 10. Estrutura básica dos flavonóides.

De acordo com a natureza química da molécula e as substituições nos anéis A, B e C, os flavonóides são divididos em 14 diferentes grupos (HAVSTEEN, 2002), dos quais sete grupos são particularmente bem conhecidos e caracterizados, a exemplo de flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, flavanols (catequinas), flavanolols e antocianidina (HAVSTEEN, 2002; BEECHER, 2003) (Figura 11).

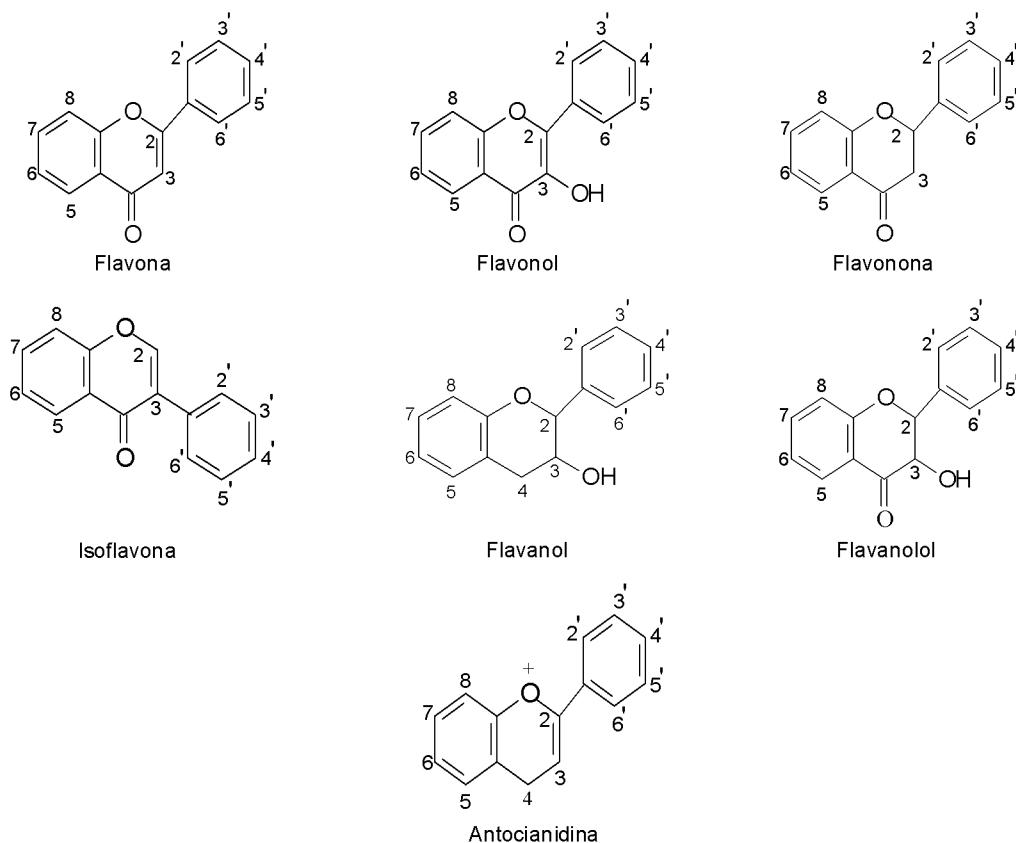


Figura 11. Principais classes de flavonóides.

Os flavonóides têm chamado a atenção na pesquisa envolvendo produtos naturais devido a variedade de atividade biológicas que possuem: antivirais (CRITCHFIELD; BUTERA; FOLKS, 1996), antialérgicas (CHEONG et al., 1998), antiplaquetários (CAROTENUTO et al., 1997), antiestrogênica, anticarcinogênicas, antiinflamatórias, antiproliferativas, antiangiogênicas e atividades antioxidantes. A sua ingestão produz pouca ou nenhuma toxicidade (HAVSTEEN, 2002). Os flavonóides também foram relatados por apresentarem atividade antiespasmódica (LIMA et al., 2005), anti-secretória, antidiarréica (DI CARLO et al., 1993) e antiulcerogênica (LA CASA et al., 2000).

Os flavonóides estão envolvidos em vários mecanismos vinculados à gastroproteção: inibição da H⁺,K⁺-ATPase (BEIL; BIRKHOFER; SEWING, 1995), aumento do fluxo sanguíneo gástrico (SAZIKI et al., 1983), da secreção de muco (LEWIS; SHAW, 2001) e dos níveis de PGs na mucosa gástrica (SAZIKI et al., 1984), além de promoverem diminuição da peroxidação lipídica, elevação no conteúdo de GSH (antioxidante não-enzimático) (KAHRAMAN et al., 2003) e aumento da atividade da GSH-Px (LA CASA et al., 2000) e da SOD (antioxidantes enzimáticos) (KAHRAMAN et al., 2003). Estas atividades antioxidantas dos flavonóides devem-se a presença na sua estrutura de o-dihidroxi no anel B (catecol), dupla ligação 2,3 em conjugação com a função 4-oxo e a presença adicional de grupos hidroxilas nas posições 3, 5 e 7 do anel heterocíclico (RUSSO et al., 2000).

Dessa forma os flavonóides podem representar um potencial terapêutico eficaz e seguro para o tratamento de doenças gastrintestinais, principalmente no tratamento da úlcera péptica.

1.8.3 Considerações sobre a família Celastraceae e sobre a espécie *Maytenus obtusifolia*

Celastraceae é uma grande família de árvores e arbustos, a qual compreende 92 gêneros e 1350 espécies (STEVENS, 2001), distribuídas principalmente em climas tropicais e subtropicais (SPIVEY, WESTON; WOODHEAD, 2002). Dentre estes gêneros destaca-se o *Maytenus*, com cerca de 270 espécies, considerado o segundo maior gênero (STEVENS, 2001). Atualmente são conhecidas cerca de 80

espécies distribuídas em todo o território brasileiro, das quais 16 são endêmicas da Amazônia (JORGE et al., 2004; JOFFILY; VIEIRA, 2005).

O gênero *Maytenus* é caracterizado quimicamente pela presença de metabólitos secundários como flavonóides, triterpenos, sesquiterpenos, alcalóides e taninos condensados. Foram isolados metabólitos secundários de várias espécies pertencentes a esse gênero, entre eles destacam-se triterpenos obtidos da *M. ilicifolia* (QUEIROGA, et al., 2000; OHSAKI et al., 2004), alcalóides sesquiterpeno piridino da *M. aquifolium* (CORSINO et al., 1998), ácido maitenóico obtido da *M. senegalensis* (SOSA et al., 2007), de *M. rigida* foram isolados flavonóis (TIBERTI et al., 2007), alcalóides (DELLE; MARINI; BERNAYS, 1984), quinonas (ALMEIDA et al., 2005) triterpenos da série lupano (OLIVEIRA et al., 1999; ALMEIDA et al., 2005) e n-alcanos (OLIVEIRA; SALATINO, 2000).

Várias espécies de *Maytenus* são usadas na medicina popular devido suas atividades analgésica, antiinflamatória, antiulcerogênica, entre outras (CORRÊA, 1984).

Muitas dessas espécies têm suas atividades biológicas comprovadas experimentalmente a exemplo de *Maytenus ilicifolia*, uma das espécies mais estudadas, a qual apresentou atividades antinociceptiva, antiinflamatória (JORGE et al., 2004), antioxidante (VELLOSA et al., 2006; MELO et al., 2001) e antiulcerogênica (SOUZA-FORMIGONI et al., 1991; JORGE et al., 2004; BAGGIO et al., 2007). Atividades antimicrobiana (KLOUCEK et al., 2007) e antileishmanicida (PEREZ-VICTORIA et al., 1999) foram encontradas em *M. macrocarpa*. Foram demonstradas propriedades antimutagênica, antioxindante e antimicrobiana para *M. krukovi* (BRUNI et al., 2006), bem como, atividade inibitória da DNA polimerase β -liase de *M. putterlickoides* (FENG et al., 2004). Foi também relatado um efeito analgésico para a *M. aquifolium* (GONZÁLES et al., 2001) e atividade antiulcerogênica de *M. robusta* (ANDRADE et al., 2007). *M. senegalensis* revelou atividades antiplasmódial (GESSLER et al., 1995; EL TAHIR; SATTI; KHALID, 1999), antiviral (OTAKÉ et al., 1995) e antitumoral (GESSLER et al., 1995).

Em estudos farmacológicos recentes, o nosso grupo mostrou que o extrato etanólico bruto e a fase acetato de etila obtidos de *Maytenus rigida* Mart. possui atividades antiinflamatória, antidiarréica, antiespasmódica, e antiulcerogênica (SANTOS et al., 2007; SANTOS, 2008). Adicionalmente esta fase apresentou uma excelente atividade cicatrizante da mucosa gástrica (SANTOS, 2008).

Maytenus obtusifolia Mart. (Figura 12) encontra-se distribuída em muitos estados do Nordeste e Sudeste do Brasil. É conhecida popularmente como “bom-nome” ou “carne-de-anta” ou “carrancudo”, sendo suas folhas utilizadas na medicina popular para o tratamento de “úlceras graves” na forma de decócto e no tratamento de inflamações gerais e câncer (CORRÊA, 1984) e o pó seco das cascas do caule para úlceras externas na pele (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007).



Figura 12. Fotos de *Maytenus obtusifolia* Mart. (Josean FechineTavares, 2007).

Em estudos fitoquímicos realizados com *M. obtusifolia* foram isolados vários metabólitos secundários, destacando-se os celastrolóides, como pristimerina, tingenona e 22-hidroxitingenona (LUCA; MONACHE; MARINI-BETTOLO 1978) e triterpenos pentacíclicos da série friedelano e lupano (FREIRE, 1998). Também foram isolados alcalóides como, N-metilflindersina, triterpenos pentacíclicos como o ácido 3,4-secofriedelan-3-óico, 3 β -hidroxi-11,13-en-oleanano, 7-oxofriedelina, 3-oxo-29-hidroxifriedelano, friedelina, 3 β -hidroxi-9,12-en-oleanano e o 3 β -hidroxi-9,12-en-ursana e quatro flavonóides do tipo 4'-O-metil(-)-epigallocatequina, ouratea proantocianidina A, catequina e epicatequina (SILVA et al., 2008).

Estudos farmacológicos mostraram que a espécie selecionada apresenta atividade neuroléptica e analgésica (SOUSA; ALMEIDA, 2005; FREIRE, 1998).

Diante dessas premissas e levando em consideração a necessidade de buscar novos produtos como alternativa terapêutica no tratamento da úlcera gástrica, o presente estudo é de grande relevância, uma vez que busca a comprovação da difundida atividade antiulcerogênica de *M. obtusifolia* Mart. na medicina popular, bem como, contribuir para uma nova proposta terapêutica no tratamento da úlcera gástrica.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antiulcerogênica do extrato etanólico bruto e da fase acetato de etila obtidos das folhas de *Maytenus obtusifolia* Mart. em modelos animais que mimetizam as úlceras gástricas no homem.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a toxicidade aguda do EEtOH obtido das folhas de *Maytenus obtusifolia*;
- Avaliar, através de triagem farmacológica, o efeito gastroprotetor do EEtOH frente ao agente lesivo HCl/etanol;
- Investigar a atividade gastroprotetora do EEtOH e da FAcOEt em modelos clássicos de indução aguda de úlcera gástrica;
- Avaliar o efeito do EEtOH e da FAcOEt sobre os parâmetros bioquímicos da secreção gástrica (volume do suco gástrico, pH e concentração ácida);
- Elucidar os prováveis mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora de *M. obtusifolia*, avaliando para tanto o envolvimento das PGs, do NO e dos compostos SHs;
- Investigar a atividade cicatrizante do EEtOH e da FAcOEt no modelo de ácido acético 30 % em ratos;
- Avaliar a toxicidade do EEtOH e da FAcOEt durante 14 dias de tratamento da úlcera induzida com ácido acético 30 %.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Local da pesquisa

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Ensaios Toxicológicos (LABETOX), localizado no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) "Prof. Delby Fernandes de Medeiros" da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e no Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP) em Botucatu, São Paulo, no período de Março 2007 a Fevereiro de 2009.

3.1.2 Coleta do material vegetal

O material vegetal utilizado nos experimentos de toxicidade aguda e indução de úlcera gástrica foram as folhas da espécie *Maytenus obtusifolia* Mart. coletadas no município de Santa Rita, estado da Paraíba, em maio de 2002. Esta espécie foi identificada pela Dra. Maria de Fátima Agra, do Setor de Botânica do LTF/UFPB e um exemplar da planta encontra-se depositado no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) da UFPB sob código de identificação M. F. Agra et al., 3230.

3.1.3 Obtenção do extrato etanólico bruto e da fase acetato de etila de *M. obtusifolia*

O material vegetal seco e pulverizado das folhas de *M. obtusifolia* (3.453,6 g) foi submetido à maceração exaustiva com etanol (EtOH) a 95 %, obtendo-se uma solução etanólica, que foi filtrada e concentrada em um rotaevaporador, que resultou em 815,7 g (23,62 % em relação ao peso seco da planta) de extrato etanólico bruto (EEtOH).

Após esse processo 100 g do EEtOH foi particionado utilizando seguidamente os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol, para obtenção das fases hexânica, clorofórmica, acetato de etila (FAcOEt) e n-butanólica, respectivamente (Figura 13).

As amostras vegetais foram sedidas pela equipe dos professores: Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva e Prof. Dr. Josean Fechine Tavares, todos do LTF/UFPB. O EEtOH e a FAcOEt, objetos de estudo deste trabalho, foram preparados por Medeiros (2007).

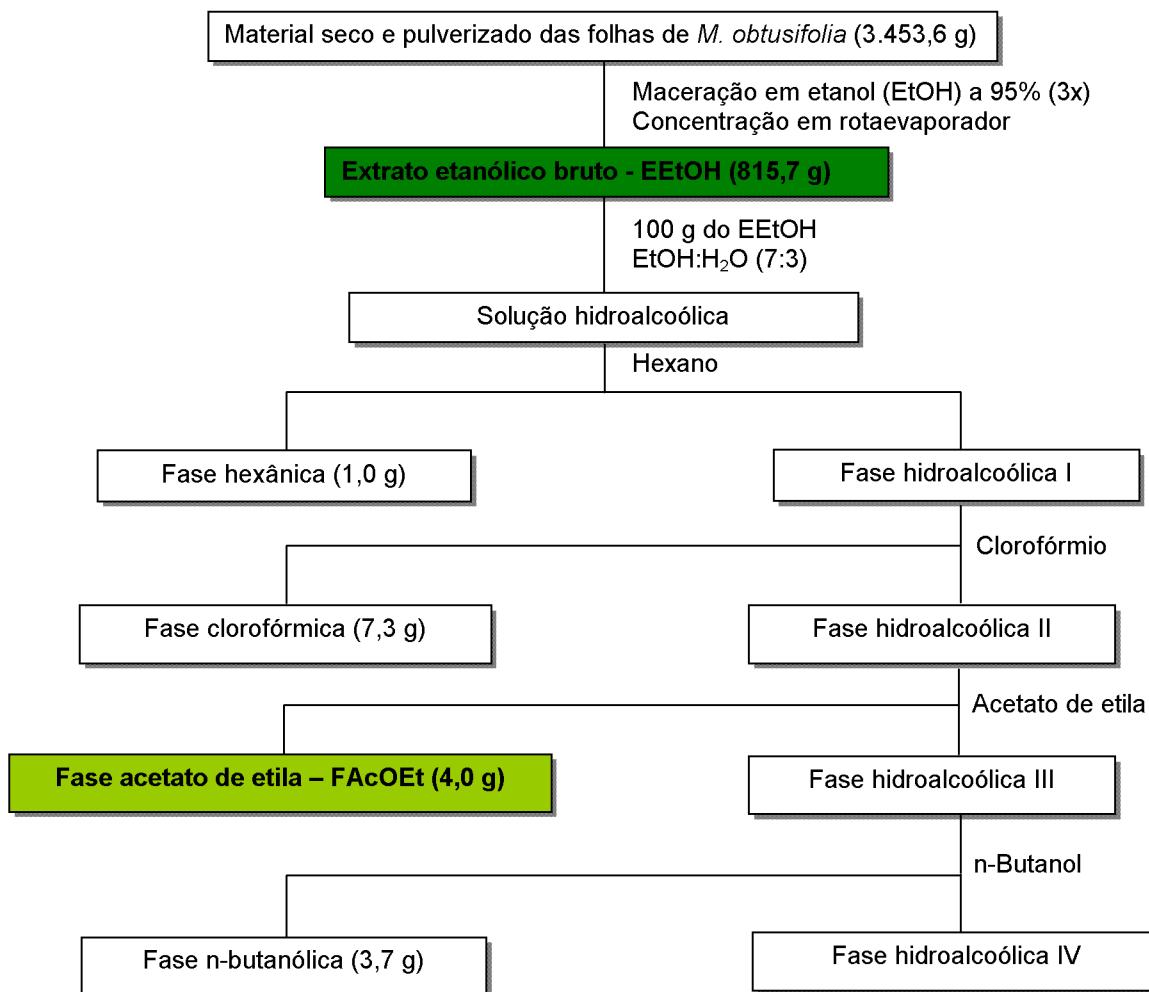


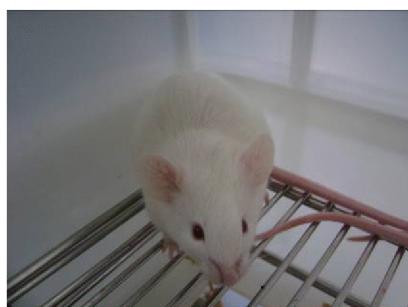
Figura 13. Marcha fitoquímica para obtenção do EEtOH e da FAcOEt das folhas de *Maytenus obtusifolia* Mart.

3.1.3 Animais

Os animais utilizados nos experimentos foram camundongos (*Mus musculus*) albinos machos e fêmeas, linhagem Swiss, pesando entre 25-35 g (Figura 14 A) e ratos (*Rattus norvegicus*) albinos machos, linhagem Wistar, pesando entre 180-250 g (Figura 14 B), todos provenientes do Biotério Prof. Dr. Thomas George do LTF, do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP e do Centro de Bioterismo da UNESP. Os animais foram aclimatados às condições do biotério local sob temperatura 21 ± 1 °C, ciclo claro-escuro de 12 h, alimentados com ração tipo *pellets* (Purina) e água *ad libitum*.

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal – CEPA/LTF/UFPB com o registro nº 0205/07. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, segundo os princípios internacionais para o estudo com os animais de laboratório (ZIMMERNAN, 1983).

(A)



(B)



Figura 14. Animais utilizados: (A) camundongo Swiss (*Mus musculus*) e (B) rato Wistar (*Rattus norvegicus*) (Kelly Samara de Lira Mota, 2008).

3.1.4 Drogas utilizadas

Para a realização dos experimentos, foram utilizadas: carbenoxolona (100 mg/kg), cimetidina (100 mg/kg), N-etilmaleimida (10 mg/kg), e N^ω-nitro-L-arginina-metil-ester (L-NAME, 70 mg/kg) obtidos da Sigma-Aldrich (E.U.A). Cloreto de sódio P.A. (NaCl) e hidróxido de sódio (NaOH) da Quimex-Merck (Brasil),

fenoftaleína da Riedel-De Haën (Germany); etanol absoluto da Merck (Germany), lansoprazol (30 mg) da Aché (Brasil) e piroxicam (20 mg) da Hexal (Brasil).

Todas as soluções com as substâncias foram preparadas imediatamente antes de cada experimento, utilizando como veículo solução salina 0,9 %.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE *Maytenus obtusifolia*

3.2.1.1 Ensaio toxicológico pré-clínico agudo

O extrato etanólico bruto obtido das folhas de *M. obtusifolia* foi submetido ao ensaio toxicológico agudo com o objetivo de avaliar as alterações comportamentais frente ao SNC e ao Sistema Nervoso Autônomo, utilizando-se o protocolo experimental, descrito por Almeida et al. (1999), avaliar consumo de água e ração, investigar os órgãos alvos e o índice de letalidade.

Foram utilizados camundongos machos ($n = 6$) e fêmeas ($n = 6$), agrupados separadamente em caixas de polietileno, os quais receberam por via oral (v.o.) uma dose única de 2000 mg/kg (OECD, 2001) do EEtOH. Após o tratamento foram observados os efeitos gerais apresentados pelos animais nos intervalos de 30, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos no primeiro dia e uma vez ao dia, sempre no mesmo horário, nos 13 dias seguintes a administração e comparado ao respectivo grupo controle (salina 0,9 %).

Como parâmetro foi avaliado o consumo de ração na forma de pellets pelos animais, no intervalo de 1-14 dias após a administração da dose. A ração foi colocada diariamente e, no dia seguinte foi avaliado o consumo de ração. Para avaliar o consumo de água, seguiu-se a mesma metodologia. Foram colocadas mamadeiras graduadas e no dia seguinte, o volume de água ingerido pelos animais foi mensurado.

A pesagem dos camundongos foi realizada antes da administração do EEtOH e no 14º dia após o tratamento. Após esse período os animais sobreviventes foram eutanasiados, suas vísceras (coração, fígado e rins) pesadas e examinadas macroscopicamente. Ao final do experimento foi avaliada a DL₅₀.

3.2.2 INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DE *Maytenus obtusifolia*

Inicialmente para avaliar se o EEtOH obtido de *M. obtusifolia* apresenta atividade gastroprotetora foi realizada uma triagem farmacológica com diferentes doses utilizando um modelo de indução aguda de úlcera tendo como agente lesivo o HCl/etanol.

Após a realização da triagem farmacológica preliminar, foram realizados experimentos objetivando demonstrar a atividade gastroprotetora do EEtOH e da FAcOEt obtidos das folhas de *Maytenus obtusifolia* nos modelos experimentais de indução aguda de úlcera gástrica por etanol absoluto, estresse por imobilização, frio, AINEs (piroxicam) e contensão do suco gástrico, os quais mimetizam as principais causas de úlcera no homem.

Para corroborar com os resultados obtidos nesses estudos, 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.

Para elucidar os mecanismos de ação envolvidos no efeito gastroprotetor do EEtOH e da FAcOEt foi avaliada a participação da PGE₂, do NO e dos compostos sulfidrilas.

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e o estômago aberto ao longo da grande curvatura, as lesões ulcerativas foram quantificadas macroscopicamente através da utilização de uma lupa OLYMPUS Optical TL3 - SZ40 e expressas como índice de lesão ulcerativa (ILU) (Figura 15), 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.

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

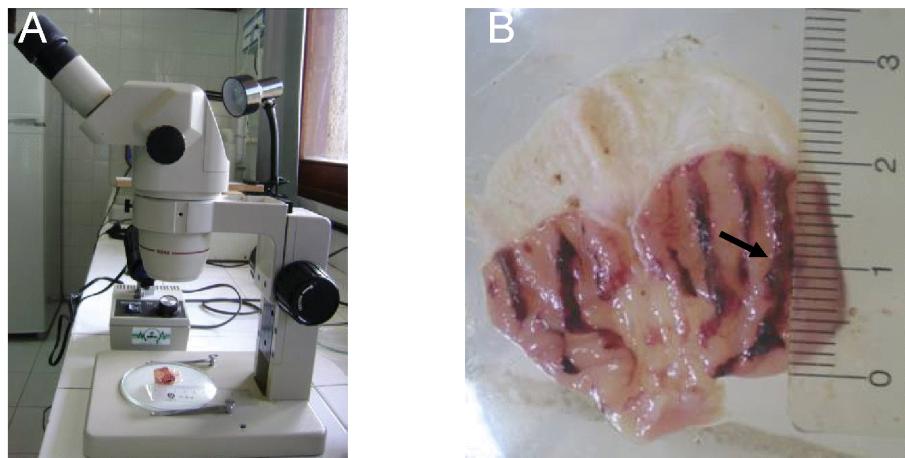


Figura 15. (A) lupa OLYMPUS Optical TL3 – SZ40 e (B) estômago de rato ulcerado com etanol absoluto (→), para determinação do ILU (Kelly Samara de Lira Mota, 2008).

3.2.2.1 Indução da úlcera gástrica pelo HCl/etanol

Para a realização desse experimento, foi seguido o modelo de Mizui; Doteuchi (1983) com modificações. Camundongos Swiss machos ($n = 6-8$) foram submetidos a jejum de 24 horas e posteriormente, divididos em grupos, conforme o pré-tratamento (v.o.) com solução salina 0,9 % 10 mL/kg (controle negativo), Iansoprazol 30 mg/kg (controle positivo), EEtOH (62,5 125, 250 e 500 mg/kg) obtido de *Maytenus obtusifolia*. Após 50 minutos, foi administrado aos animais por via oral 0,2 mL/kg de uma solução 0,3 M HCl/etanol 60 % (agente lesivo). Uma hora após os camundongos foram eutanasiados, os estômagos retirados e abertos ao longo da grande curvatura para a determinação do ILU conforme Szelenyi; Thiemer (1978).

3.2.2.2 Indução da úlcera gástrica por etanol absoluto

Este experimento foi baseado no modelo de Morimoto et al. (1991) com modificações. Ratos Wistar machos ($n = 6-8$) foram submetidos a jejum de 24 horas e pré-tratados por via oral com solução salina 0,9 % 10 mL/kg (controle negativo), Iansoprazol 30 mg/kg (controle positivo), EEtOH ou FAcOEt (62,5 125, 250 e 500 mg/kg). Após 60 minutos, foi administrado etanol absoluto (4 mL/kg, v.o.).

Decorrido 1 hora dessa administração, os ratos foram eutanasiados, os estômagos retirados e abertos ao longo da grande curvatura para a determinação do ILU (SZELENYI; THIEMER, 1978).

3.2.2.3 Indução de úlcera gástrica por estresse (imobilização e frio)

Para a realização desse experimento, foi seguido o modelo de Levine (1971), com modificações. Os camundongos ($n = 6-7$) foram submetidos a jejum de 24 horas e posteriormente pré-tratados com solução salina 0,9 % 10 mL/kg (controle negativo), lansoprazol 30 mg/kg (controle positivo), EEtOH ou FAcOEt (62,5 125 e 250 mg/kg) por via oral. Trinta minutos após a administração dos diferentes tratamentos, os animais foram imobilizados pelas patas dianteiras e traseiras, colocados em contenedores de PVC (9 cm de comprimento x 3,5 cm de diâmetro) e submetidos a uma temperatura de $4^{\circ}\text{C} \pm 1$ por um período de 3 horas para indução das lesões ulcerativas. Ao final deste período, os camundongos foram eutanasiados, os estômagos retirados e abertos para a determinação do ILU (SZELENYI; THIEMER, 1978).

3.2.2.4 Indução de úlcera gástrica por antiinflamatório não-esteroidal (piroxicam)

O experimento foi realizado segundo a metodologia descrita por Puscas et al. (1997) com modificações. Após o jejum de 24 h, os camundongos ($n = 6-8$) foram pré-tratados por via oral com solução salina 0,9 % 10 mL/kg (controle negativo), cimetidina 100 mg/kg (controle positivo), EEtOH ou FAcOEt (62,5 125 e 250 mg/kg). Após 30 minutos, os animais receberam piroxicam 30 mg/kg (agente lesivo) por via subcutânea (s.c.) e 4 horas após essa administração, os animais foram eutanasiados, os estômagos retirados e abertos ao longo da grande curvatura para a determinação do ILU (SZELENYI; THIEMER, 1978).

3.2.2.5 Indução da úlcera gástrica por contensão do suco gástrico

Esse experimento foi realizado de acordo com o modelo de ligadura de piloro descrito por Shay et al. (1945), com modificações. Após jejum de 36 horas, os ratos ($n = 6-7$) foram anestesiados com cloridrato de quetamina 5 % (relaxante muscular) e cloridrato de xilazina 2 % (anestésico) e submetidos a uma incisão longitudinal abaixo da apófise xifóide para ligadura do piloro. Quatro horas após esse procedimento os animais foram eutanasiados, em seguida foi determinado o ILU.

3.2.2.6 Avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico através do modelo de ligadura do piloro

Esse experimento segue o protocolo anteriormente citado e descrito por Shay et al. (1945). Para isso foi avaliado o efeito do EEtOH ou da FAcOEt administrados por via intraduodenal (i.d.) e v.o. sobre os parâmetros do suco gástrico. Após a ligadura do piloro descrita acima, as substâncias foram administradas conforme o pré-tratamento: com solução salina 0,9 % (controle negativo), cimetidina 100 mg/kg (controle positivo) e com a melhor dose do EEtOH ou da FAcOEt (250 mg/kg) intraperitonealmente. No entanto, o pré-tratamento oral foi realizado 30 minutos antes da ligadura do piloro. Quatro horas após a amarração do piloro as incisões foram abertas e os estômagos retirados cuidadosamente. O conteúdo estomacal foi coletado e os parâmetros bioquímicos do suco gástrico (volume, pH e concentração de íons hidrogênio) foram determinados.

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 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 ($NaOH$) 0,01 N e fenolftaleína, uma solução indicadora, com auxílio de uma bureta digital Solarus® (HIRSHMANN LABORGERATE, U.S.A.).

3.2.3 AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DE *Maytenus obtusifolia*

3.2.3.1 Determinação dos níveis de PGE₂ produzida na mucosa gástrica

Esse experimento foi realizado segundo a metodologia descrita por Curtis et al. (1995), com pequenas modificações. Ratos ($n = 5$) foram submetidos a um jejum de 24 horas e foram divididos aleatoriamente em 4 grupos: 1) solução salina 0,9 %, 2) solução salina 0,9 % + indometacina, 3) FAcOEt, e 4) FAcOEt + indometacina. Nos animais dos grupos 1 e 2 foi administrada solução salina 0,9 % (10 mL/kg, v.o.) e nos animais dos grupos 3 e 4 foi administrada a FAcOEt (125 e 250 mg/kg, v.o.). Após trinta minutos a indometacina (inibidor não seletivo da COX) na dose de 20 mg/kg subcutânea foi administrada aos grupos 2 e 4. Uma hora após o tratamento inicial os ratos foram eutanasiados, os estômagos retirados e abertos, a mucosa raspada até sua total remoção. O raspado foi suspenso em 1 mL de tampão fosfato de sódio a 10 mM, pH = 7,4. A solução obtida foi incubada a 37 °C por 20 minutos. A prostaglandina foi mensurada a partir da solução obtida com o tampão, utilizando um “kit” de dosagem imunoenzimático de PGE₂ (RPN222-Amersham) e a leitura realizada em leitor de ELISA Biosistem a 490 nm.

3.2.3.2 Investigação da participação do NO na citoproteção

Esse método foi baseado no modelo modificado de Sikiric et al. (1997), com modificações. Ratos Wistar machos foram submetidos a jejum de 24 horas e distribuídos em oito grupos ($n = 6-9$). Conforme o pré-tratamento, 4 grupos receberam solução salina 0,9 % (10 mL/kg, i.p.) e os outros 4 grupos receberam L-NAME (70 mg/kg i.p.), um agente inibidor da enzima sintase de óxido nítrico. Após 30 minutos da administração, cada quatro grupos foram tratados oralmente com solução salina 0,9 % (controle negativo), carbenoxolona 100 mg/kg (controle positivo) e com a melhor dose do EEtOH ou da FAcOEt (250 mg/kg). Após 1 hora, os ratos receberam etanol absoluto (4 mL/kg, v.o.). Decorridos mais 60 min., os

animais foram eutanasiados, os estômagos retirados e abertos ao longo da grande curvatura para determinação do ILU (SZELENYI; THIEMER, 1978).

3.2.3.3 Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrilas na gastroproteção

Para realização do experimento foi utilizado o modelo modificado de Matsuda; Li; Yoshikawa (1999). Ratos Wistar machos ($n = 6-8$) foram colocados em jejum por 24 horas e distribuídos em oito grupos. Conforme o pré-tratamento, 4 grupos receberam solução salina 0,9 % e os outros 4 grupos receberam N-etilmaleimida (NEM) 10 mg/kg i.p., um bloqueador dos grupamentos sulfidrilas. Após 30 minutos da administração, cada quatro grupos foram tratados oralmente com solução salina 0,9 % (controle negativo), carbenoxolona 100 mg/kg (controle positivo), com a melhor dose do EEtOH ou da FAcOEt (250 mg/kg). Após 1 hora, os ratos receberam etanol absoluto (4 mL/kg, v.o.). Decorridos mais 60 min., os animais foram eutanasiados, os estômagos retirados e abertos ao longo da grande curvatura para determinação do ILU (SZELENYI; THIEMER, 1978).

3.2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA (CICATRIZANTE) DE *Maytenus obtusifolia*

3.2.4.1 Lesão gástrica induzida por ácido acético 30 %

O experimento foi realizado conforme descrito por Takagi; Okabe; Saziki (1969). Após o jejum de 24 horas os ratos ($n = 10$) foram divididos aleatoriamente nos grupos Sham, salina 0,9 %, cimetidina e EEtOH ou FAcOEt e anestesiados com cloridrato de quetamina 5 % (relaxante muscular) e cloridrato de xilazina 2 % (anestésico) para realização de uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide. A parede anterior do estômago foi exposta e um volume de 0,05 mL de ácido acético a 30 % foi injetado na camada subserosa da junção do fundo com o antro, com auxílio de uma seringa (Figura 16), com exceção do grupo Sham. No segundo dia após a cirurgia foram iniciados os tratamentos uma vez ao dia, durante 14 dias

com o EEtOH ou a FAcOEt (250 mg/kg), cimetidina 100 mg/kg (controle positivo) e solução salina 0,9 % 10 mL/kg (controle negativo) utilizando a via oral. Ao final do tratamento, após jejum de 12 horas, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e seus estômagos foram removidos e abertos no sentido da grande curvatura, para a determinação da área da lesão ulcerativa - ALU (mm^2) com a ajuda de um paquímetro digital Digimatic (Mitutoyo Corporation da Caliper-Japão).

As fórmulas utilizadas para obtenção da ALU e % da taxa de cura estão descritas a seguir:

$$c = \text{comprimento (mm)}$$

$$l = \text{largura (mm)}$$

$\text{ALU (C)} = \text{área da lesão ulcerativa do grupo controle negativo;}$

$\text{ALU (T)} = \text{área da lesão ulcerativa do grupo tratado.}$

$$\text{ALU} = (c) . (l) = \text{mm}^2$$

$$(\%) \text{ da taxa de cura} = \frac{(\text{ALU}) \text{ C} - (\text{ALU}) \text{ T}}{(\text{ALU}) \text{ C}} \times 100$$

Após a determinação da ALU, a região que circunscreve a lesão foi removida para posterior análise histológica. Ao final dos 14 dias de tratamento o sangue foi coletado e as vísceras retiradas para avaliação da toxicidade, conforme descrito a seguir.

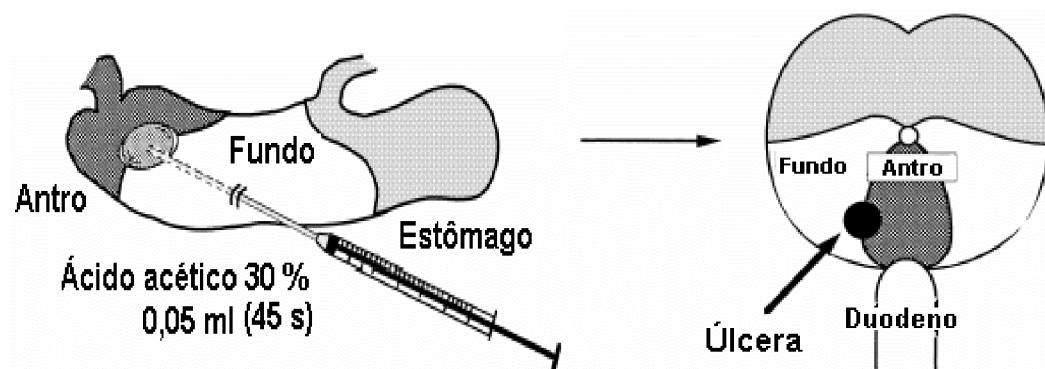


Figura 16. Indução da úlcera com ácido acético 30 % (Adaptado de Okabe; Amagase, 2005).

3.2.4.2 Análise histológica

Os cortes histológicos dos estômagos e as lâminas foram preparados no laboratório de histologia da Universidade Federal de Pernambuco e no laboratório de histologia da UNESP-Botucatu. Após o experimento de úlcera gástrica induzida por ácido acético (30 %), os estômagos dos animais foram abertos no sentido da maior curvatura, a lesão foi medida em área (mm^2) e, após cuidadosa fixação em placa de isopor com alfinetes, o material foi fixado em solução de formalina (solução de formol 10 %) tamponado com carbonato de cálcio, onde ficou imerso por 24 horas. As peças foram desidratadas em séries crescentes de álcoois (70-100 %) e diafanizadas em xilol. Após a diafanização as peças foram incluídas em paraplast e cortadas (7 μm de espessura) em micrótomo de maneira semi-seriada. As lâminas obtidas segundo esse processo foram submetidas à coloração por hematoxilina-eosina (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS) para análises morfológicas em microscopia de luz.

3.2.4.3 Avaliação da toxicidade de doses repetidas do EEtOH e da FAcOEt durante 14 dias no modelo de ácido acético 30 %

Como parâmetros adicionais da atividade biológica, foram avaliados os possíveis efeitos das amostras vegetais sobre os animais submetidos ao tratamento diário com o EEtOH ou a FAcOEt (250 mg/kg) durante 14 dias. Os parâmetros analisados foram: peso corporal, consumo de água e ração, bem como avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos.

3.2.4.3.1 Avaliação do peso corporal

A pesagem dos ratos foi realizada no 1º dia antes de iniciar os respectivos tratamentos com o EEtOH ou a FAcOEt (250 mg/kg), cimetidina 100 mg/kg (controle positivo) e solução salina 0,9 % 10 mL/kg (controle negativo), e no 14º dia.

3.2.4.3.2 Avaliação do consumo de água e ração

Durante os 14 dias de tratamento, foi avaliada a quantidade de água e ração. A ração foi colocada diariamente e, no dia seguinte foi avaliada a quantidade consumida pelos ratos. Para avaliar o consumo de água, seguiu-se a mesma metodologia colocando-se mamadeiras graduadas e, no dia seguinte, o volume de água ingerido pelos animais foi mensurado.

3.2.4.3.3 Avaliação do peso dos órgãos

Outro parâmetro avaliado foi o peso dos órgãos. Ao final do experimento, de úlcera induzida por ácido acético, os ratos foram eutanasiados e tiveram seus órgãos (coração, fígado, rins, baço e pulmão) pesados.

3.2.4.3.4 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos do sangue

Ao final dos 14 dias de tratamento, os animais passaram por um jejum de 12 horas, em seguida foram eutanasiados e amostras de sangue foram coletadas através de sangria do plexo braquial. Para análises bioquímicas, o sangue foi acondicionado em tubos contendo gel separador, que foram centrifugados por 10 minutos a 3500 rpm, para obtenção do soro, destinado às dosagens dos seguintes parâmetros: uréia e creatinina, marcadores da função renal, bem como aspartato aminotransferase (AST), e alanina aminotransferase (ALT) através de um analisador bioquímico automático – Cobas Mira Plus® - Roche Diagnostic System.

Para a análise hematológica o sangue foi coletado em tubos contendo anticoagulante EDTA para avaliação dos seguintes parâmetros: contagem de hemácias, hematócrito, hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM), contagem global e diferencial de leucócitos e contagem de plaquetas através de um analisador hematológico celular automático – ABX Vet ABC® - Horiba. Foram realizados esfregaços sanguíneos que após coloração foram

analisados em microscópio óptico Olympus® para confirmação e controle da contagem diferencial de células sanguíneas.

3.3 Análise estatística

Os resultados obtidos estão expressos como média \pm desvio padrão (d.p.) e foram analisados estatisticamente empregando-se o teste “t” de Student para a toxicidade aguda e Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguido dos testes de Dunnett ou Tukey para resultados da atividade gastroprotetora e cicatrizante. O nível de significância mínimo considerado foi 0,05 ($p<0,05$). Todos os dados foram analisados com programa estatístico, GraphPad Prism versão 5.0, San Diego, CA, EUA.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE *Maytenus obtusifolia*

4.1.1 Toxicidade aguda via oral

Considerando os parâmetros citados por Almeida et al. (1999) os camundongos tratados com a dose única de 2000 mg/kg, v.o. do EEtOH apresentaram sinais de analgesia na segunda e terceira hora após a administração do extrato, no entanto, tal efeito foi reversível na quarta hora após o tratamento, quando comparado ao respectivo controle (salina 0,9 %).

Quando avaliado o peso corporal e o peso dos órgãos não foi observado nenhuma alteração estatisticamente significativa em comparação ao grupo controle (salina 0,9 %). Os dados estão apresentados na Tabela 1.

Ao ser avaliado o consumo de água, foi observado que o extrato não promoveu alteração significativa no consumo de água das fêmeas, enquanto que, ocorreu aumento significativo na ingestão de água dos machos tratados com o EEtOH, em comparação ao seu respectivo controle (salina 0,9 %) (Tabela 1).

Em relação ao consumo de ração foi observado que o EEtOH promoveu diminuição significativa no consumo de ração das fêmeas, enquanto que nenhuma alteração foi observada para os machos, quando comparado ao seu respectivo controle (salina 0,9 %) (Tabela 1).

O extrato não provocou nenhuma alteração macroscópica nos órgãos dos camundongos. Foi também observado que o EEtOH não causou mortes nos animais durante os 14 dias de observação após a administração, impossibilitando a determinação da DL₅₀.

A análise desses parâmetros sugere que, nas condições avaliadas, os camundongos baixa toxicidade, quando tratados com EEtOH (2000 mg/kg, v.o.).

Tabela 01 - Efeito da administração oral do EEtOH obtido de *M. obtusifolia* na evolução ponderal e peso dos órgãos, consumo de água e ração em camundongos machos e fêmeas

Parâmetros	Sexo	Tratamentos	
Evolução ponderal (g)		Controle (salina 0,9 %)	EEtOH (2000 mg/kg)
Fêmeas			
Inicial		34,08 ± 2,91	32,22 ± 4,14
Final		37,88 ± 3,92	35,32 ± 3,84
Aumento (%)		09,48 ± 5,21	08,91 ± 2,96
Machos			
Inicial		35,92 ± 1,66	33,98 ± 1,91
Final		40,90 ± 2,89	38,78 ± 2,58
Aumento (%)		11,99 ± 4,22	12,25 ± 4,28
Peso dos órgãos (g)			
Fêmeas			
Coração		0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,04
Fígado		1,81 ± 0,32	1,74 ± 0,36
Rins		0,51 ± 0,10	0,48 ± 0,06
Machos			
Coração		0,19 ± 0,01	0,18 ± 0,01
Fígado		2,31 ± 0,21	2,18 ± 0,28
Rins		0,53 ± 0,04	0,50 ± 0,05
Consumo de água (mL)			
Fêmeas		12,30 ± 1,84	12,24 ± 2,00
Machos		09,74 ± 0,86	10,62 ± 1,04*
Consumo de ração (g)			
Fêmeas		08,33 ± 0,91	07,09 ± 1,26**
Machos		06,61 ± 0,96	06,52 ± 0,82

Os dados estão expressos como média ± d.p. (n=6). Teste "t" de Student, **p<0,01, *p<0,05 comparados à salina 0,9 %.

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DE *Maytenus obtusifolia*

4.2.1 Indução aguda da úlcera gástrica por HCl/etanol

Inicialmente foi realizada uma triagem farmacológica preliminar para avaliar se o EEtOH apresenta efeito gastroprotetor, frente ao modelo de indução aguda de úlcera em camundongos, utilizando como agente lesivo o HCl/etanol. Os resultados obtidos neste modelo demonstram que o EEtOH (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg, v.o.) e lansoprazol (30 mg/kg, v.o. - controle positivo) reduziram significativamente o ILU para $65,6 \pm 8,7$ (20 %), $43,0 \pm 9,5$ (47 %), $15,5 \pm 7,6$ (81 %), $54,8 \pm 8,9$ (33 %) e $36,3 \pm 9,6$ (56 %), respectivamente, quando comparado ao controle negativo (salina 0,9 %) $82,3 \pm 12,5$ (Gráfico 1). De acordo com esses dados o extrato etanólico bruto de *M. obtusifolia* nas doses avaliadas apresenta atividade protetora da mucosa gástrica.

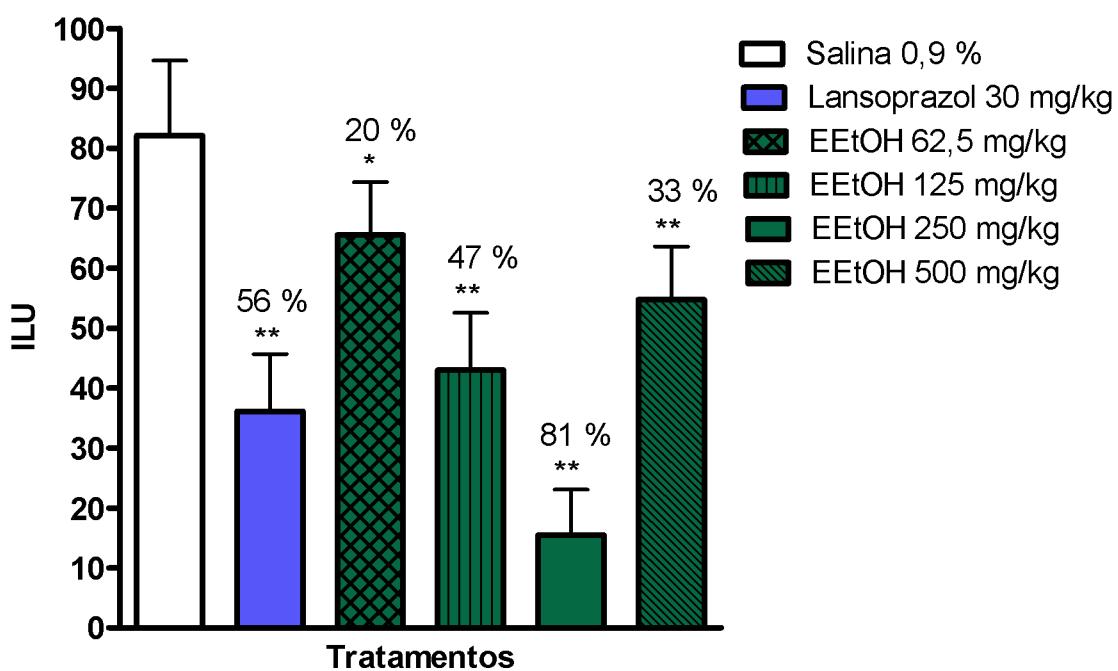


Gráfico 1 - Efeito gastroprotetor do EEtOH obtido de *Maytenus obtusifolia* no modelo de úlcera gástrica induzida por HCl/etanol em camundongos. Os dados estão expressos como média \pm d.p. ($n = 6-8$). ANOVA de uma via, seguido do teste de Dunnett, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ comparados à salina 0,9 %. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao grupo salina.

4.2.2 Indução aguda da úlcera gástrica por etanol absoluto

Os resultados obtidos demonstram que o EEtOH (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg, v.o.) e lansoprazol (30 mg/kg, v.o.) reduziram significativamente as lesões agudas induzidas por etanol absoluto na mucosa gástrica dos ratos (Figura 17) para $298,8 \pm 54,8$ (22 %), $195,2 \pm 41,2$ (49 %), $148,2 \pm 23,0$ (61 %), $81,7 \pm 19,9$ (79 %) e $207,7 \pm 29,7$ (46 %), respectivamente, quando comparados ao controle negativo (salina 0,9 %) $383,7 \pm 55,1$ (Gráfico 2). Resultado semelhante foi observado para FAcOEt (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg, v.o.), em que os danos na mucosa gástrica foram significantemente reduzidos (Figura 18) para $152,7 \pm 50,7$ (48 %), $91,3 \pm 17,4$ (69 %), $67,6 \pm 7,7$ (77 %), $47,4 \pm 13,6$ (84 %) e $162,0 \pm 15,32$ (45 %), respectivamente, em comparação à controle negativo $292,3 \pm 33,8$ (Gráfico 3). Esses resultados indicam que tanto o extrato etanólico, como a fase acetato de etila obtidos de *M. obtusifolia* apresentaram atividade gastroprotetora frente às lesões gástricas agudas induzidas por etanol absoluto.

De acordo com os resultados obtidos nesse modelo, foi realizada uma comparação entre as diferentes doses dos grupos tratados com o EEtOH e a FAcOEt, utilizando o teste de Tukey, que mostrou a dose de 250 mg/kg como a mais efetiva para ambas as amostras vegetais, visto que não apresentou diferença significativa com a dose de 500 mg/kg. Tal dose foi selecionada para os experimentos de avaliação dos parâmetros bioquímicos e determinação dos mecanismos de ação.

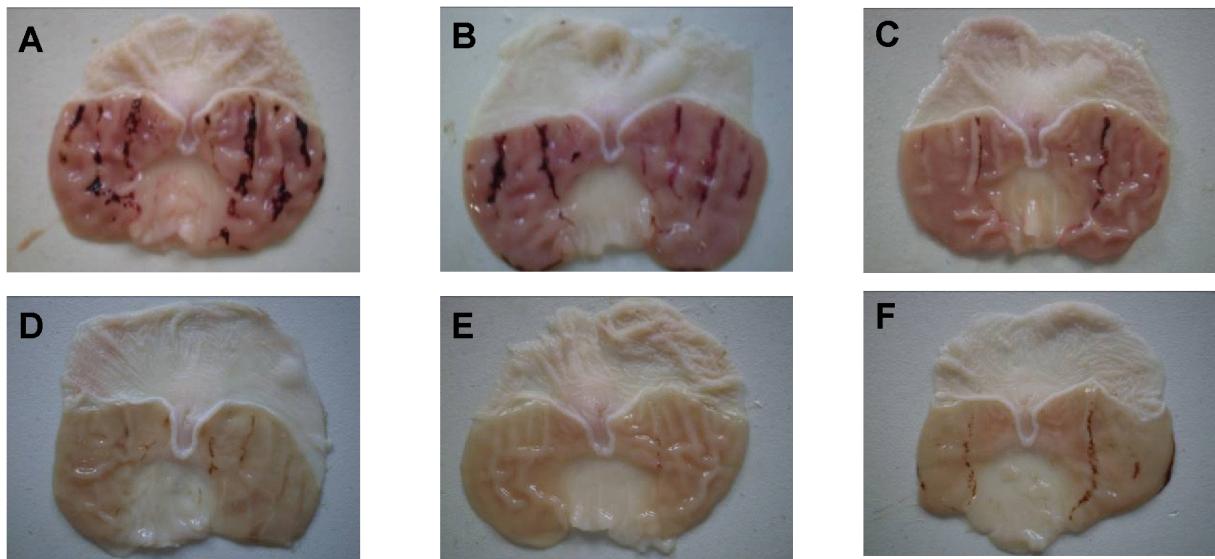


Figura 17. Estômagos de ratos ulcerados com etanol absoluto e tratados com (A) salina 0,9 %, (B) EEtOH 62,5 (C) EEtOH 125, (D) EEtOH 250, (E) EEtOH 500 mg/kg e (F) lansoprazol 30 mg/kg.

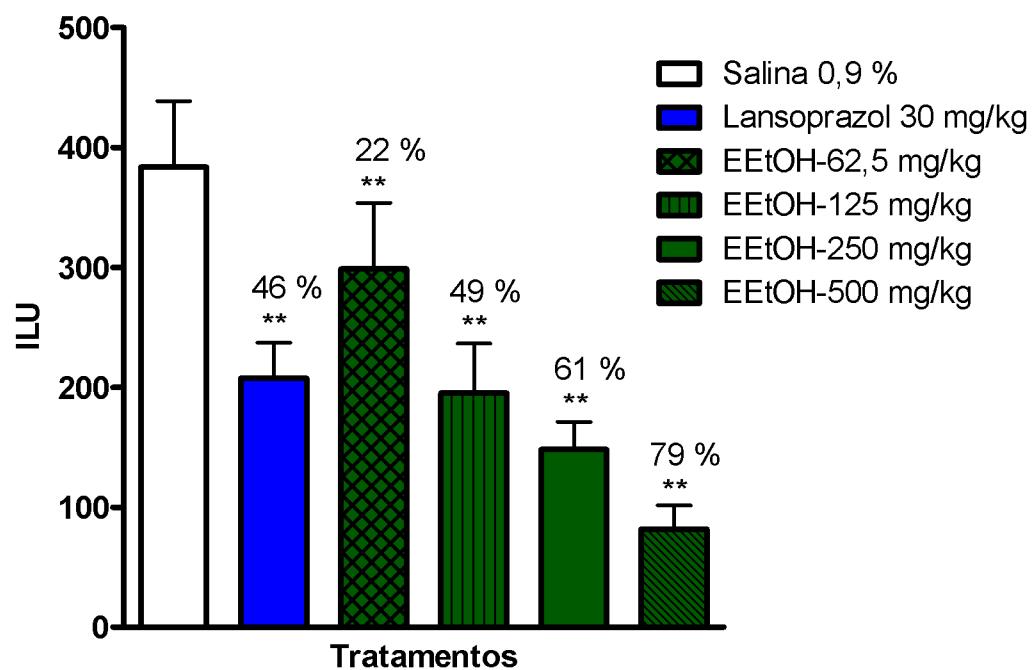


Gráfico 2 - Efeito gastroprotetor do EEtOH obtido de *Maytenus obtusifolia* no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos. Os dados estão expressos como média \pm d.p. ($n = 6-8$). ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey, ** $p < 0,01$, comparados à salina 0,9 %. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao grupo salina.

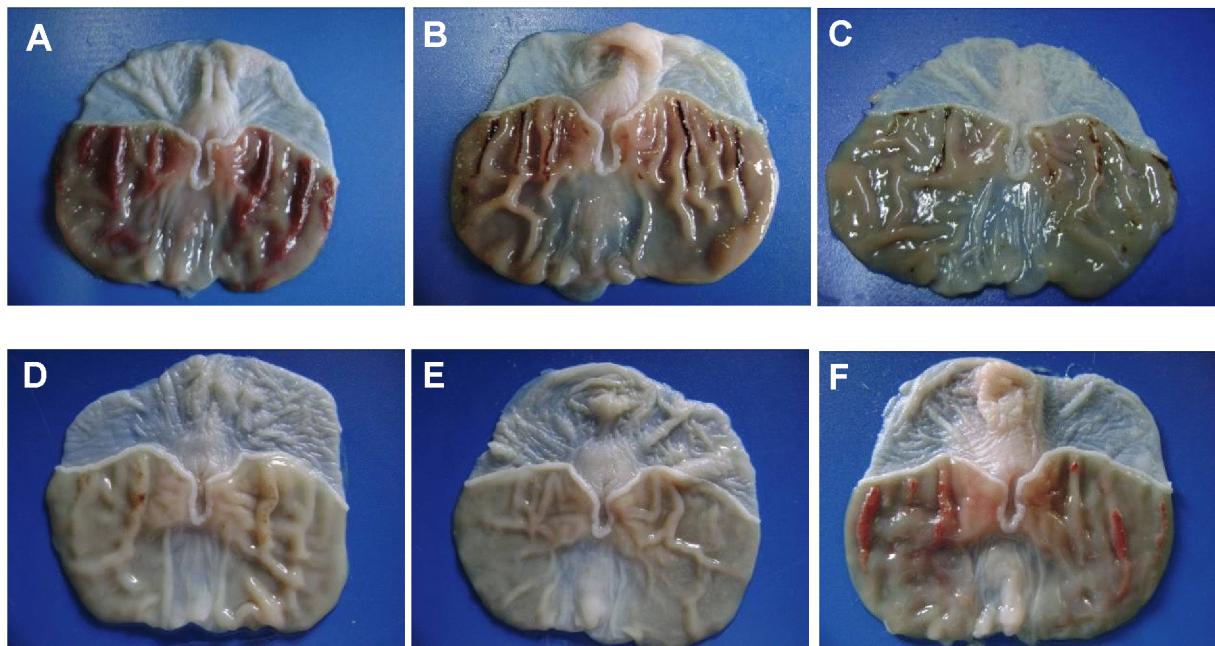


Figura 18. Estômagos de ratos ulcerados com etanol absoluto e tratados com (A) salina 0,9 %, (B) FAcOEt 62,5 (C) FAcOEt 125, (D) FAcOEt 250, (E) FAcOEt 500 mg/kg e (F) lansoprazol 30 mg/kg.

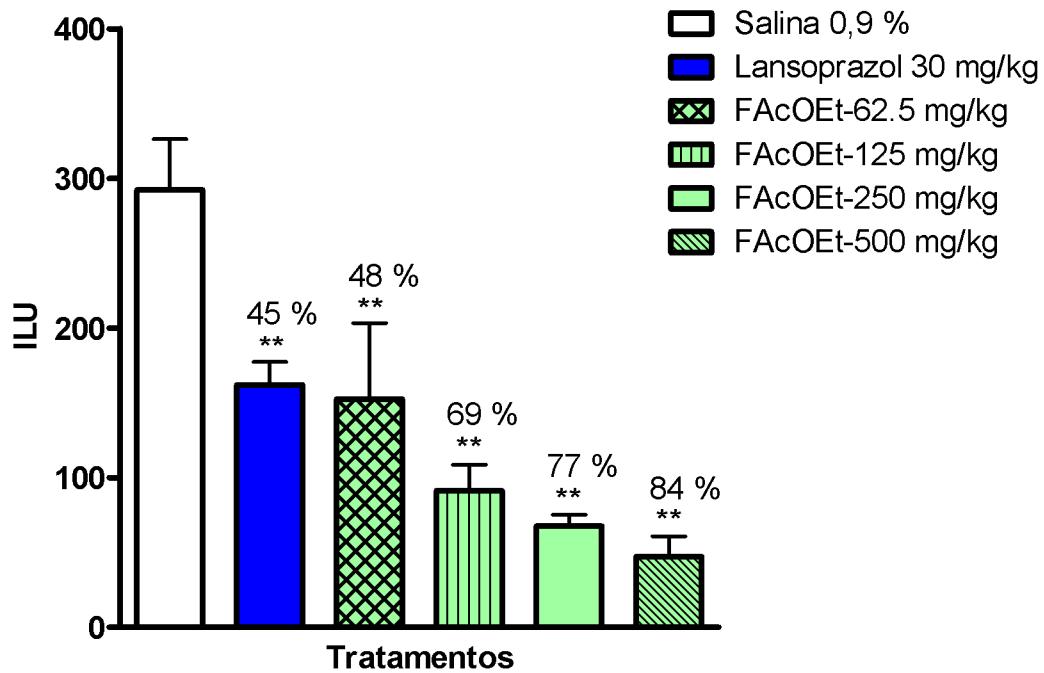


Gráfico 3 - Efeito gastroprotetor da FAcOEt obtida de *Maytenus obtusifolia* no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos. Os dados estão expressos como média \pm d.p. ($n = 5-9$). ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey, ** $p < 0,01$, comparados à salina 0,9 %. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao grupo salina.

4.2.3 Indução aguda de úlcera gástrica por estresse (imobilização e frio)

No modelo de indução aguda de úlcera gástrica pelo estresse induzido por imobilização e frio em camundongos, os resultados obtidos demonstram que o EEtOH e a FAcOEt (62,5, 125 e 250 mg/kg, v.o.) e cimetidina (100 mg/kg, v.o.), controle positivo, reduziram significativamente o índice de lesões ulcerativas para $102,7 \pm 23,7$ (41 %), $122,0 \pm 43,3$ (31 %), $70,5 \pm 19,0$ (60 %) (EEtOH), $81,3 \pm 21,5$ (54 %), $82,9 \pm 34,2$ (53 %), $88,0 \pm 13,2$ (50 %) (FAcOEt) e $98,2 \pm 25,0$ (44 %), respectivamente, quando comparados ao controle negativo $176,2 \pm 33,8$ (Gráfico 4). Os dados indicam que as amostras vegetais obtidas de *M. obtusifolia* protegeram a mucosa gástrica dos camundongos contra os danos causados pelo estresse.

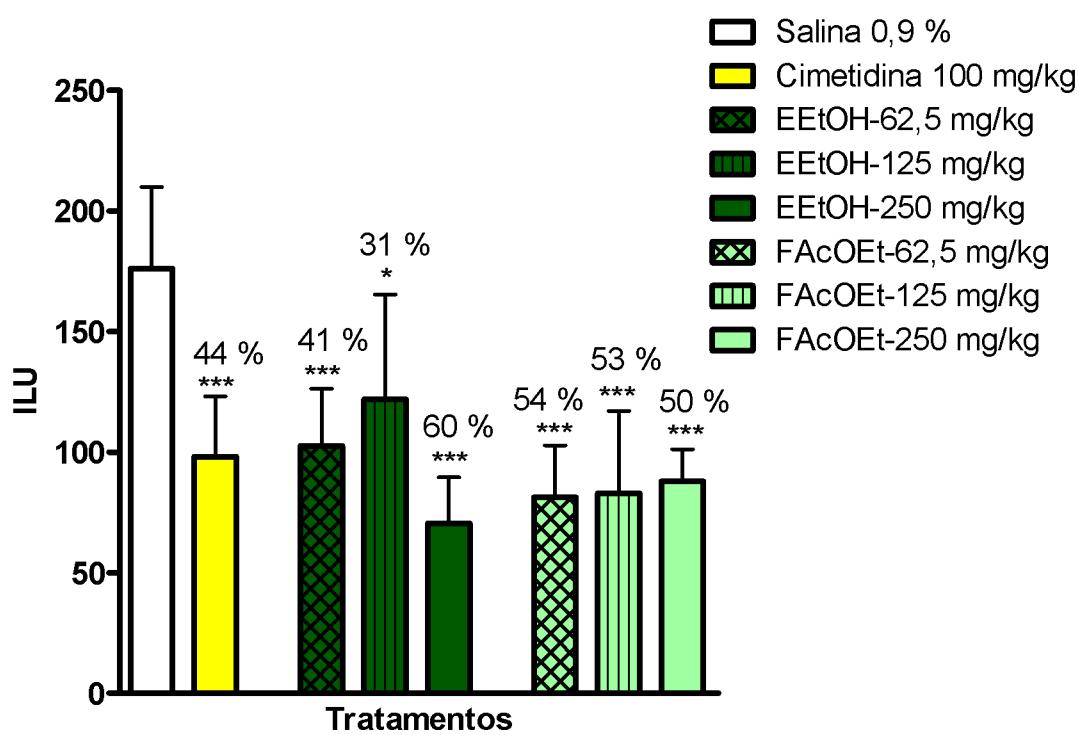


Gráfico 4 - Efeito gastroprotector do EEtOH e da FAcOEt obtidos de *Maytenus obtusifolia* no modelo de úlcera gástrica induzida por estresse (imobilização e frio) em camundongos. Os dados estão expressos como média \pm d.p. ($n = 6-7$). ANOVA de uma via, seguido do teste de Dunnett, *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$ comparados à salina 0,9 %. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao grupo salina.

4.2.4 Indução de úlcera gástrica por AINEs (piroxicam)

Através da realização deste modelo foi observado que o EEtOH e a FAcOEt (62,5, 125 e 250 mg/kg, v.o.) e cimetidina (100 mg/kg, v.o.) protegeram a mucosa gástrica dos camundongos das lesões induzidas por piroxicam, uma vez que reduziram significativamente o ILU para $74,0 \pm 9,2$ (63 %), $67,0 \pm 32,7$ (66 %), $74,3 \pm 28,2$ (63 %) (EEtOH), $128,2 \pm 33,6$ (36 %), $98,7 \pm 21,5$ (50 %), $47,0 \pm 17,9$ (76 %) (FAcOEt) e $106,3 \pm 11,3$ (47 %), respectivamente, em comparação ao controle negativo (salina 0,9 %) $199,0 \pm 45,6$ (Gráfico 5). Os dados sugerem que o extrato etanólico bruto e a fase acetato de etila apresentaram atividade gastroprotetora.

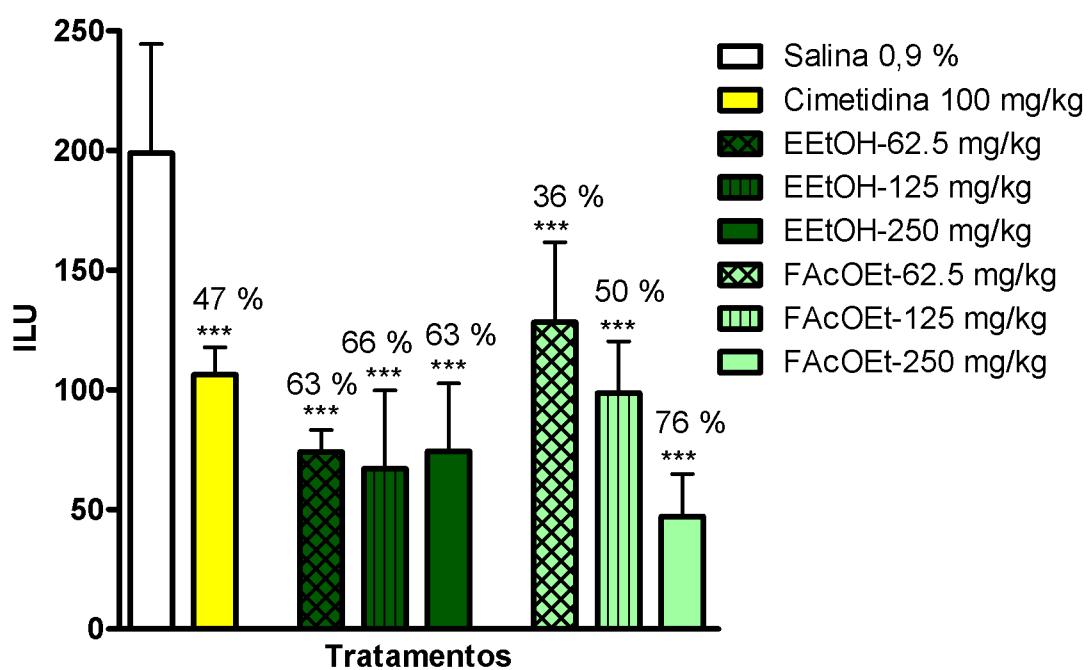


Gráfico 5 - Efeito gastroprotetor do EEtOH e da FAcOEt obtidos de *Maytenus obtusifolia* no modelo de úlcera gástrica induzida por piroxicam em camundongos. Os dados estão expressos como média ± d.p. ($n = 6-8$). ANOVA de uma via, seguido do teste de Dunnett, *** $p < 0,001$ comparados à salina 0,9 %. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao grupo salina.

4.2.5 Indução de úlcera gástrica por contensão do suco gástrico

Os resultados obtidos para amostras vegetais de *M. obtusifolia* frente à contensão do suco gástrico utilizando o modelo de ligadura de piloro em ratos demonstraram que o EEtOH e a FAcOEt (250 mg/kg, v.o.) e cimetidina (100 mg/kg, v.o.), reduziram significativamente o ILU para $154,7 \pm 33,5$ (26 %), $124,7 \pm 13,2$ (40 %) e $146,5 \pm 19,9$ (30 %), respectivamente, quando comparados com o grupo controle (salina 0,9 %) $209,7 \pm 49,44$ (Gráfico 6). Esses dados sugerem que as amostras vegetais de *M. obtusifolia* protegem a mucosa gástrica das lesões induzidas por contensão do suco gástrico.

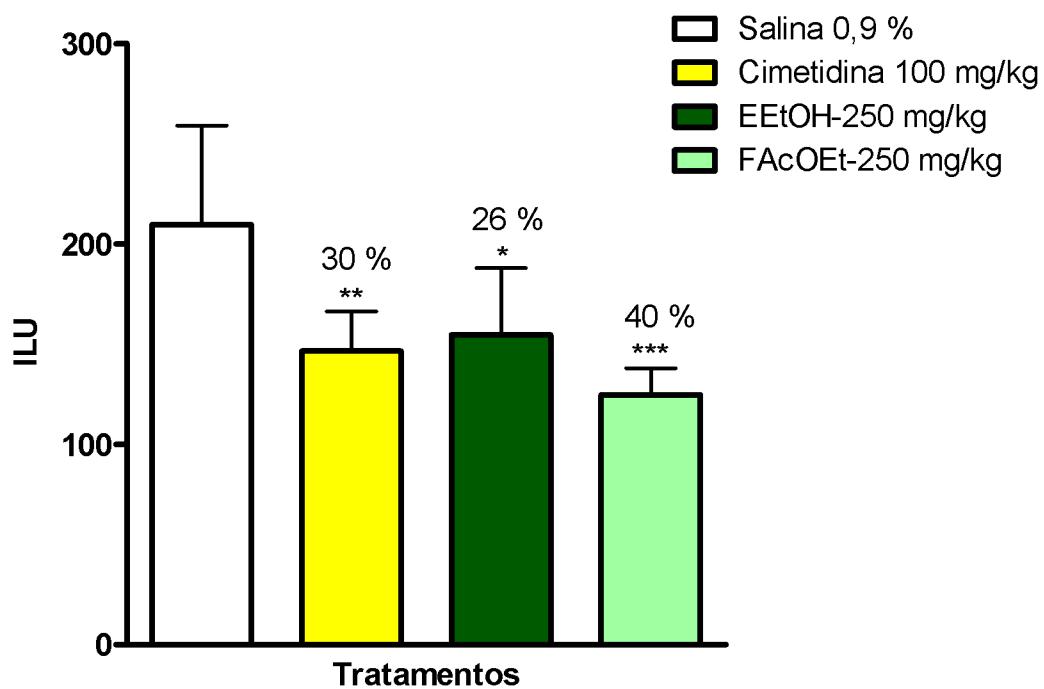


Gráfico 6 - Efeito gastroprotetor do EEtOH e da FAcOEt obtidos de *Maytenus obtusifolia* no modelo de ligadura de piloro em ratos. Os dados estão expressos como média \pm d.p. ($n = 6-7$). ANOVA de uma via, seguido do teste de Dunnett, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ comparados à salina 0,9 %. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao grupo salina.

4.2.6 Avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico no modelo de ligadura do piloro i.d.

No modelo de ligadura do piloro, foram avaliados parâmetros bioquímicos do conteúdo estomacal dos ratos, como volume do suco gástrico, pH e concentração de H⁺, após a administração i.d. da solução salina 0,9 %, cimetidina (100 mg/kg), EEtOH (250 mg/kg) ou FAcOEt (250 mg/kg) obtidos de *M. obtusifolia*. As amostras vegetais não alteraram o pH e a concentração de H⁺, entretanto, reduziram de forma significativa, o volume do suco gástrico quando comparado com o grupo controle negativo. No grupo dos animais que recebeu a cimetidina (controle positivo), houve alterações em todos os parâmetros bioquímicos avaliados (Tabela 2). Estes dados sugerem que as amostras vegetais possuem ação sistêmica.

Tabela 2 - Efeito gastroprotetor do EEtOH e da FAcOEt obtidos de *Maytenus obtusifolia* sobre os parâmetros bioquímicos do suco gástrico no modelo de ligadura de piloro (i.d.) em ratos

Tratamentos	n	Dose	Volume do suco gástrico (g)	pH (unid.)	[H ⁺] (mEq/mL/4h)
Salina	6	10 mL/kg	1,41 ± 0,21	3,05 ± 0,53	11,76 ± 1,40
Cimetidina	7	100 mg/kg	0,76 ± 0,20***	3,88 ± 0,37**	7,08 ± 1,08***
EEtOH	7	250 mg/kg	0,95 ± 0,06***	2,96 ± 0,21	13,84 ± 1,06
FAcOEt	6	250 mg/kg	0,76 ± 0,19***	3,49 ± 0,49	11,09 ± 2,02

Os dados estão expressos como média ± d.p.. ANOVA de uma via, seguido do teste de Dunnett, **p<0,01 e *** p<0,001 comparados à salina 0,9 %.

4.2.7 Avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico no modelo de ligadura do piloro v.o.

Na avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico, foi evidenciado que o EEtOH não promoveu alteração significativa em nenhum desses parâmetros avaliados, no entanto, a FAcOEt aumentou significativamente o volume do suco gástrico e pH, bem como reduziu a concentração de íons H⁺. No grupo dos animais que recebeu a cimetidina, como esperado foi observado aumento no pH e redução da concentração de íons H⁺, entretanto ocorreu redução do volume gástrico (Tabela 3). Estes dados sugerem que o efeito gastroprotetor da fase acetato de etila pode estar relacionado à redução da secreção ácida gástrica.

Tabela 3 - Efeito gastroprotetor do EEtOH e da FAcOEt obtidos de *Maytenus obtusifolia* sobre os parâmetros bioquímicos do suco gástrico no modelo de ligadura de piloro (v.o.) em ratos

Tratamentos	n	Dose	Volume do suco gástrico (g)	pH (unid.)	[H ⁺] (mEq/mL/4h)
Salina	6	10 mL/kg	1,70 ± 0,36	1,83 ± 0,11	8,35 ± 0,77
Cimetidina	7	100 mg/kg	0,72 ± 0,23***	5,87 ± 0,82***	5,51 ± 0,95***
EEtOH	7	250 mg/kg	1,79 ± 0,47	2,29 ± 0,47	8,19 ± 0,95
FAcOEt	6	250 mg/kg	3,08 ± 0,28***	3,63 ± 0,84***	2,36 ± 0,85***

Os dados estão expressos como média ± d.p.. ANOVA de uma via, seguido do teste de Dunnett, *** p<0,001 comparados à salina 0,9 %.

4.3 AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DE *Maytenus obtusifolia*

Na perspectiva de elucidação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora de *M. obtusifolia* foram avaliados a participação das prostaglandinas, óxido nítrico e grupamentos sulfidrilas nessa atividade.

4.3.1 Determinação dos níveis de PGE₂ na mucosa gástrica

Os resultados obtidos no modelo que proporciona a investigação da participação da PGE₂ na gastroproteção induzida pela FAcOEt mostram que esta fase nas doses 125 e 250 mg/kg, v.o. não promoveu alteração significativa nos níveis de PGE₂, em comparação ao controle negativo. No entanto, o grupo que foi pré-tratado com salina 0,9 % ou com a FAcOEt e em seguida tratado com indometacina (30 mg/kg), um inibidor não seletivo da COX, não manteve os níveis de PGE₂, uma vez que ocorreu uma redução significativa na produção de PGE₂, quando comparado ao grupo que não recebeu indometacina.

Os dados indicam a não participação de PGE₂ no efeito gastroprotetor de *M. obtusifolia*.

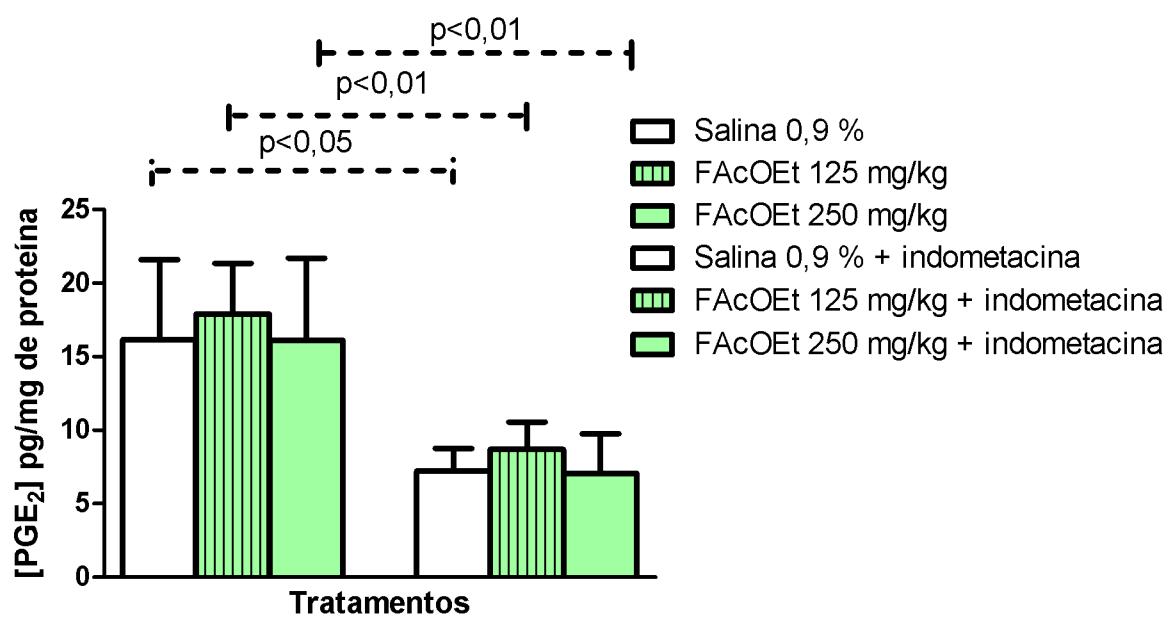


Gráfico 7 - Efeito gastroprotetor da FAcOEt obtida de *Maytenus obtusifolia* nos níveis de PGE₂ na mucosa gástrica de ratos. Os dados estão expressos como média ± d.p. (n = 5). ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey.

4.3.2 Avaliação da participação do NO

Os resultados obtidos no modelo que proporciona a investigação da participação NO na gastroproteção em ratos, mostram que nos grupos previamente tratados com solução salina 0,9 % (i.p.) e depois tratados com EEtOH ou FAcOEt (250 mg/kg, v.o.) ou carbenoxolona (100 mg/kg), ocorreu uma redução significativa do ILU para $155,4 \pm 19,3$ (40 %), $70,1 \pm 21,8$ (73 %) e $124,2 \pm 21,8$ (52 %) respectivamente, quando comparado ao seu controle negativo (salina 0,9 %, v.o.) $259,6 \pm 55,0$. Resultado semelhante foi observado nos grupos pré-tratados com o L-NAME i.p., inibidor da NOS, e que posteriormente receberam o mesmo tratamento do grupo anterior. Foi observado redução do ILU para $169,0 \pm 42,6$ (56 %), e $62,0 \pm 23,0$ (84 %) e $210,4 \pm 29,0$ (46 %), respectivamente, em comparação a ao seu controle negativo (salina 0,9 %, v.o.) $387,6 \pm 59,9$. Entretanto, não foi observada diferença significativa entre os grupos pré-tratados com solução salina 0,9 % i.p. com os grupos pré-tratados com L-NAME i.p. (Figura 19 e Gráfico 8). Os dados sugerem que o NO não participa do efeito gastroprotetor promovido pelas amostras vegetais em estudo.

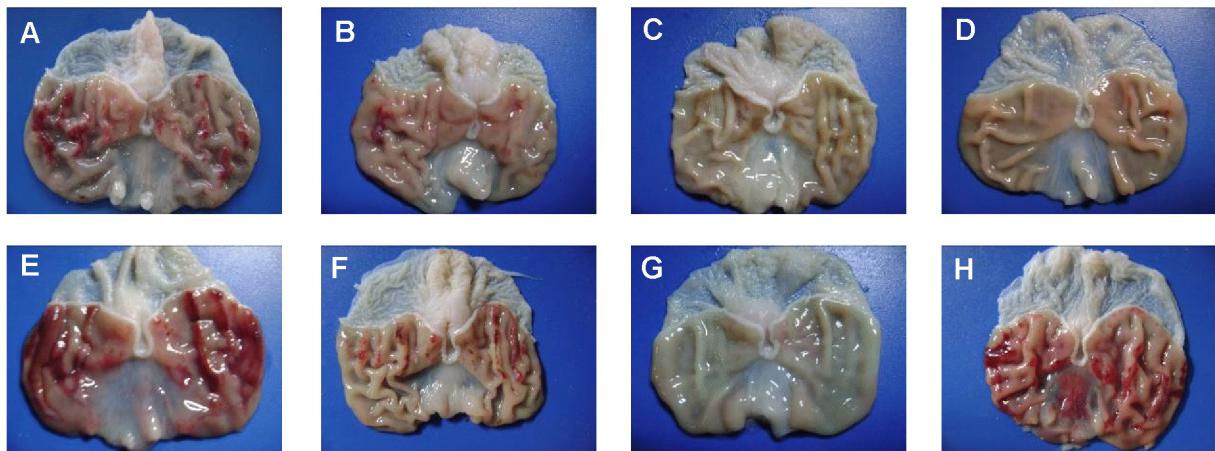


Figura 19. Estômagos de ratos ulcerados com etanol absoluto e tratados com salina/salina (A), salina/EEtOH (B), salina/FAcOEt (C), (D) salina/carbenoxolona, L-NAME/salina (E), L-NAME/EEtOH (F), L-NAME/FAcOEt (G) ou L-NAME/carbenoxolona (H).

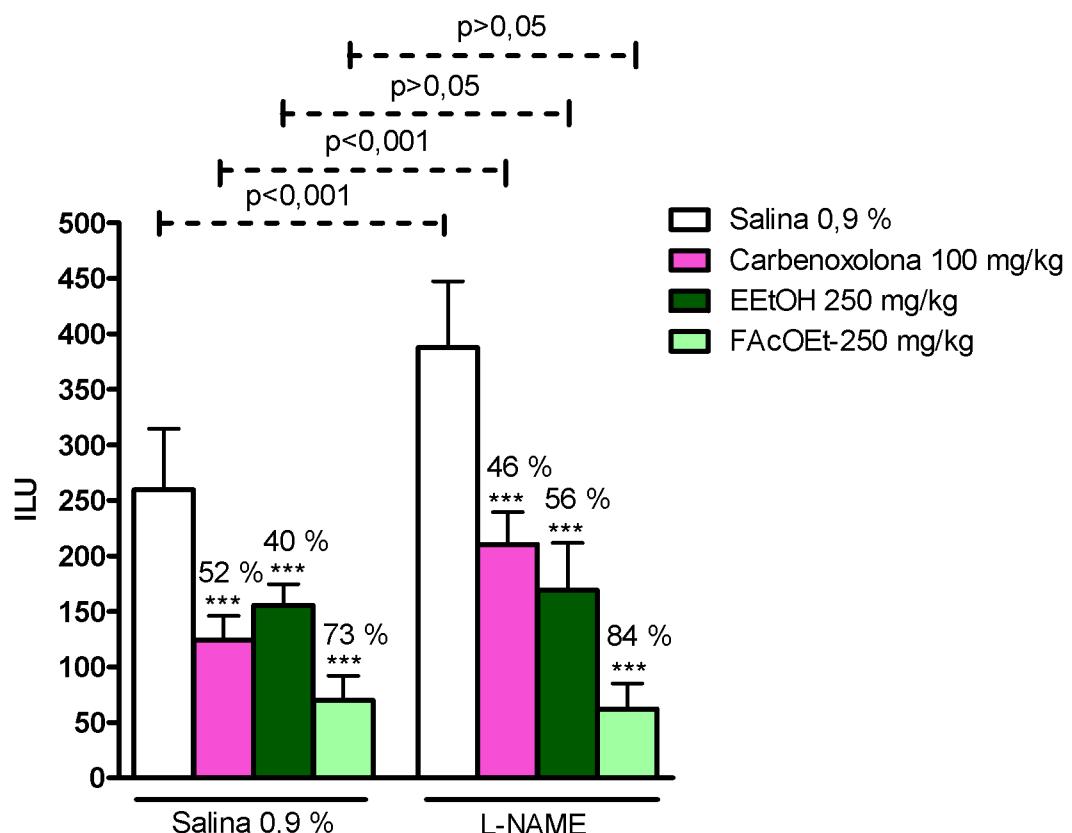


Gráfico 8 - Efeito gastroprotetor do EEtOH e da FAcOEt obtidos de *Maytenus obtusifolia* após pré-tratamento com L-NAME, um inibidor da enzima NO sintase, na úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos. Os dados estão expressos como média \pm d.p. ($n = 6-9$). ANOVA de um via, seguido do teste de Tukey, *** $p < 0,001$ comparados à salina 0,9 %. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao grupo salina.

4.3.3 - Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrilas

Os resultados obtidos no modelo que proporciona a investigação da participação dos compostos sulfidrilas na gastroproteção em ratos, mostram que nos grupos previamente tratados com solução salina 0,9 % (i.p.) e depois tratados com EEtOH ou FAcOEt (250 mg/kg, v.o.) ou carbenoxolona (100 mg/kg, v.o.), ocorreu uma redução significativa do ILU para $153,0 \pm 17,1$ (43 %), $53,8 \pm 18,9$ (89 %) e $85,8 \pm 31,2$ (68 %), respectivamente, quando comparado ao seu controle negativo (salina 0,9 %, v.o.) $269,8 \pm 42,5$. Resultado semelhante foi observado nos grupos pré-tratados com o NEM (bloqueador dos grupamentos SHs) e que posteriormente receberam o mesmo tratamento do grupo anterior, foi observada redução do ILU para $281,7 \pm 52,2$ (38 %), $224,8 \pm 46,3$ (50 %) e $314,5 \pm 89,5$ (30 %), respectivamente, quando comparado ao seu controle negativo (salina 0,9 %, v.o.) $452,3 \pm 42,9$ (Figura 20 e Gráfico 9). Entretanto, foi observada uma exacerbação do ILU para os grupos de animais pré-tratados com NEM (i.p.), quando comparados aos grupos pré-tratados com solução salina 0,9 % (i.p.). Os dados sugerem que os grupamentos SHs estão envolvidos no mecanismo de ação gastroprotetor de *M. obtusifolia*.

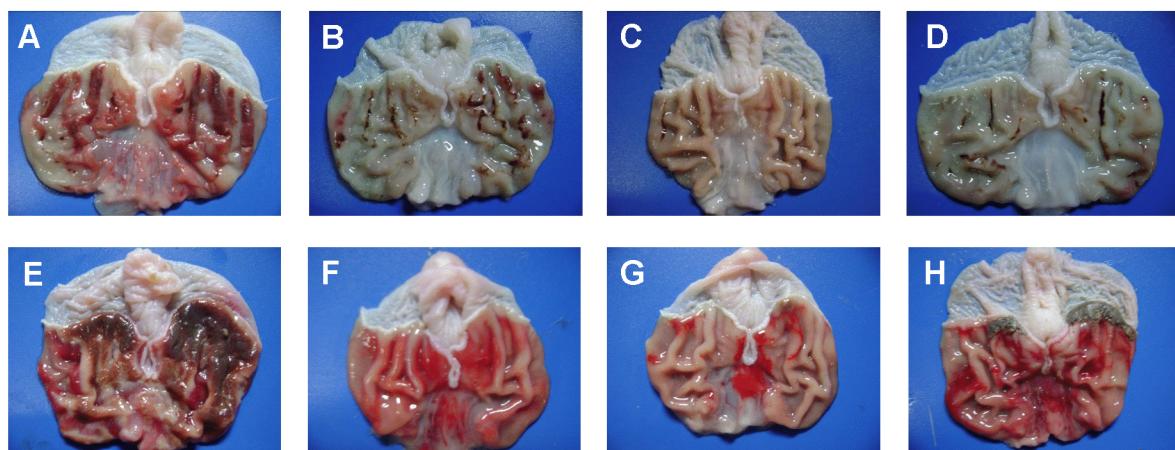


Figura 20. Estômagos de ratos ulcerados e tratados com salina/salina (A), salina/EEtOH (B), salina/FAcOEt (C), (D) salina/carbenoxolona, NEM/salina (E), NEM/EEtOH (F), NEM/FAcOEt (G) ou NEM/carbenoxolona (H).

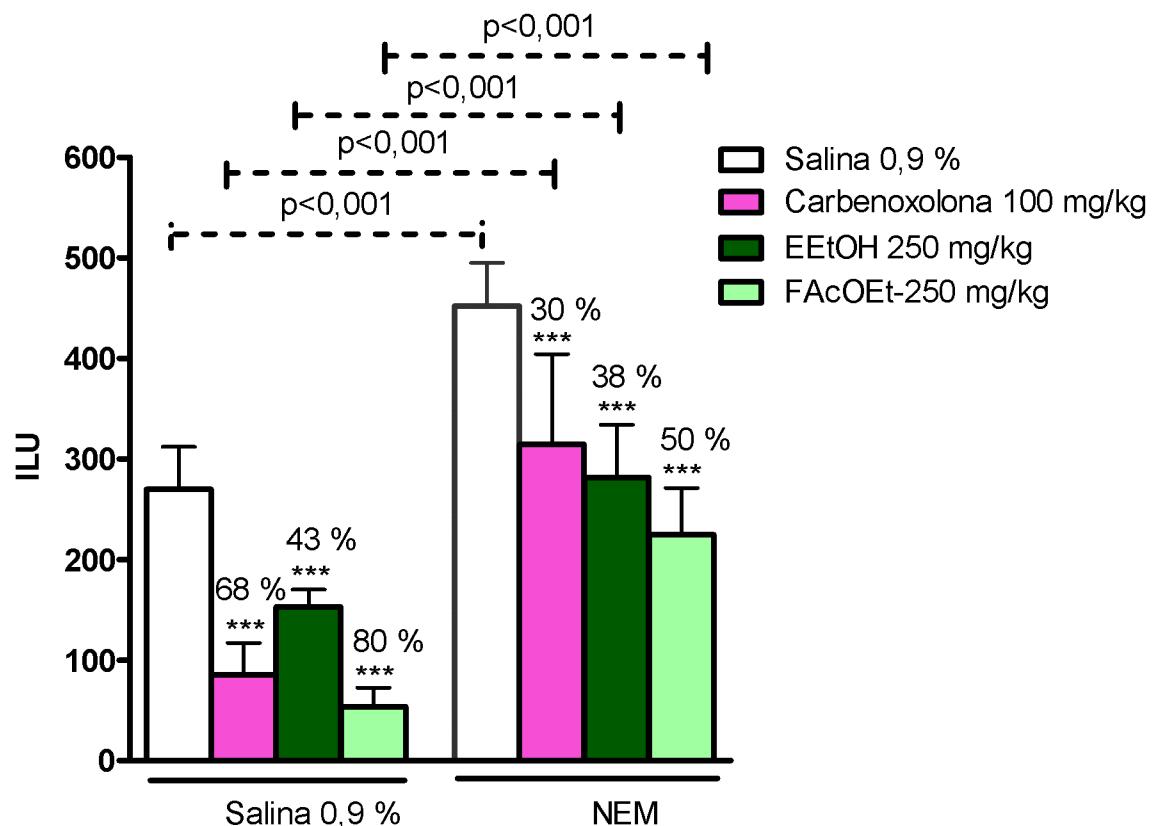


Gráfico 9 - Efeito gastroprotetor do EEtOH e da FAcOEt obtidos de *Maytenus obtusifolia* após pré-tratamento com NEM, um inibidor dos grupamentos sulfidrilas, na úlcera gástrica induzida por etanol em ratos. Os dados estão expressos como média \pm d.p. ($n = 6-8$). ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey, *** $p < 0,001$ comparados à salina 0,9 %. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao grupo salina.

4.4 INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DE *Maytenus obtusifolia*

Com o intuito de avaliar o processo de cicatrização produzido pelas amostras vegetais obtidas de *M. obtusifolia*, foi determinada a área de lesão ulcerativa, análise histológica da lesão e como parâmetro adicional foi avaliada a toxicidade do EEtOH e da FAcOEt por doses repetidas durante 14 dias no modelo de ácido acético 30 %.

4.4.1 Úlcera gástrica induzida por ácido acético 30 %

No modelo de indução de úlcera gástrica por ácido acético 30 %, foi observado que durante 14 dias de tratamento o EEtOH e a FAcOEt (250 mg/kg, v.o.) e cimetidina (100 mg/kg, v.o.) ocorreu redução na área da lesão ulcerativa de $44,3 \pm 12,0$ (salina 0,9 %) para $21,4 \pm 3,7$ (52 %), $19,0 \pm 4,5$ (57 %) e $24,4 \pm 5,4$ (45 %), respectivamente (Gráfico 10). O grupo Sham, constituído por animais em que não foi induzida a úlcera, não apresentou lesão, como esperado. De acordo com esses resultados tanto o extrato etanólico bruto quanto a fase acetato de etila apresentaram atividade cicatrizante da úlcera gástrica induzida por este agente lesivo.

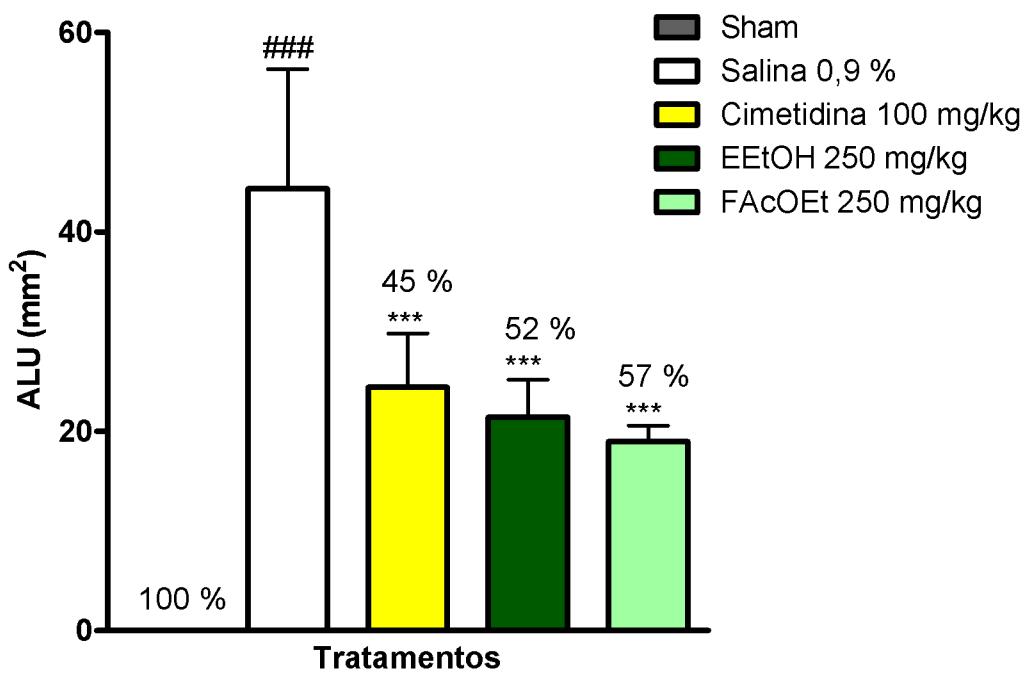


Gráfico 10 - Efeito cicatrizante do EEtOH e da FAcOEt obtidos de *Maytenus obtusifolia* no modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético em ratos. Os dados estão expressos como média \pm d.p. ($n = 6-8$). ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey, *** $p < 0,001$ Sham vs salina 0,9 % e *** $p < 0,001$ salina 0,9 % vs EEtOH e FAcOEt. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao grupo salina.

4.4.2 Análise histológica

As fotomicrografias de estômagos de ratos com úlceras gástricas induzidas por ácido acético 30 % e coradas com HE estão dispostas em lesão (aumento 5x), mucosa (aumento 10x) e submucosa (aumento 20x) (Figuras 21 e 22). Pode-se observar na camada mucosa a dilatação das glândulas tubulosas na borda da lesão, para os grupos tratados oralmente com 10 mL/kg de salina 0,9 % (D), 100 mg/kg de cimetidina (E) e 250 mg/kg do EEtOH ou da FAcOEt (F), entretanto, em F essa dilatação é menos acentuada, quando comparada com controle negativo (D). No grupo F tratado com FAcOEt destaca-se o grau de organização, com morfologia típica das glândulas estomacais, que são tubulosas retas com dilatação reduzida. Também foi observado na submucosa alguns vasos no grupo salina 0,9 % (G), cimetidina (H) e EEtOH ou FAcOEt (I).

As fotomicrografias de estômagos de ratos com úlceras promovidas por ácido acético e coradas com PAS estão dispostas lesão (aumento 5x) e mucosa (aumento 10x) (Figuras 23 e 24). Foi observado que houve uma maior homogeneidade de secreção pelas células dos animais tratados com EEtOH ou FAcOEt (F) (seta vermelha), quando comparado com salina 0,9 % (E), sendo este efeito mais pronunciado na fase.

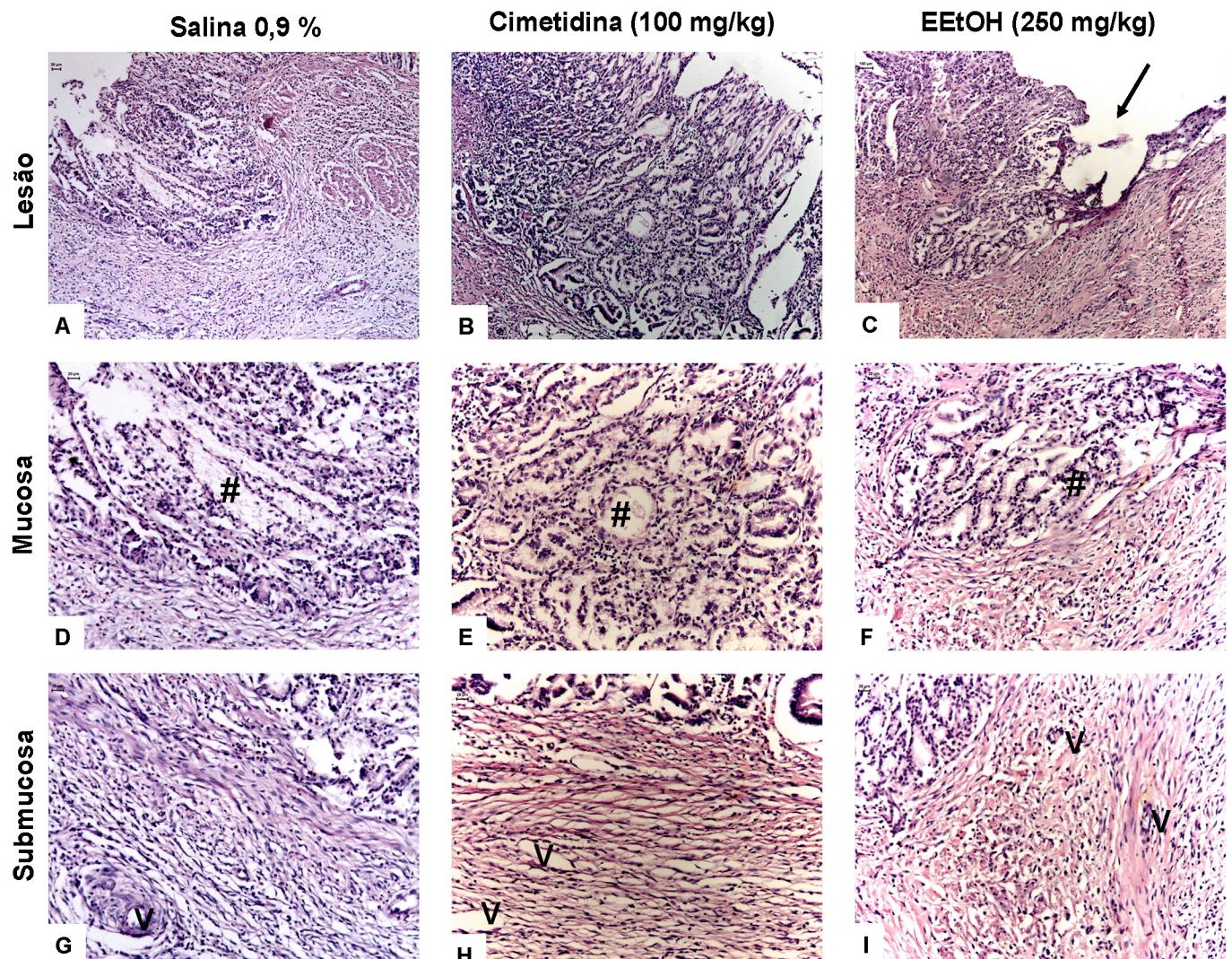


Figura 21. Fotomicrografias de estômagos de ratos com úlceras promovidas por ácido acético e tratados com o EEtOH obtido de *Maytenus obtusifolia*. Cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina. Onde A, D e G representam animais do grupo controle negativo (salina 0,9%); B, E e H representam animais do grupo controle positivo (cimetidina, 100 mg/kg); C, F e I representam animais do grupo tratado com EEtOH (250 mg/kg). (→) indica a região lesionada, (#) representa glândulas tubulosas dilatadas e (v) vasos.

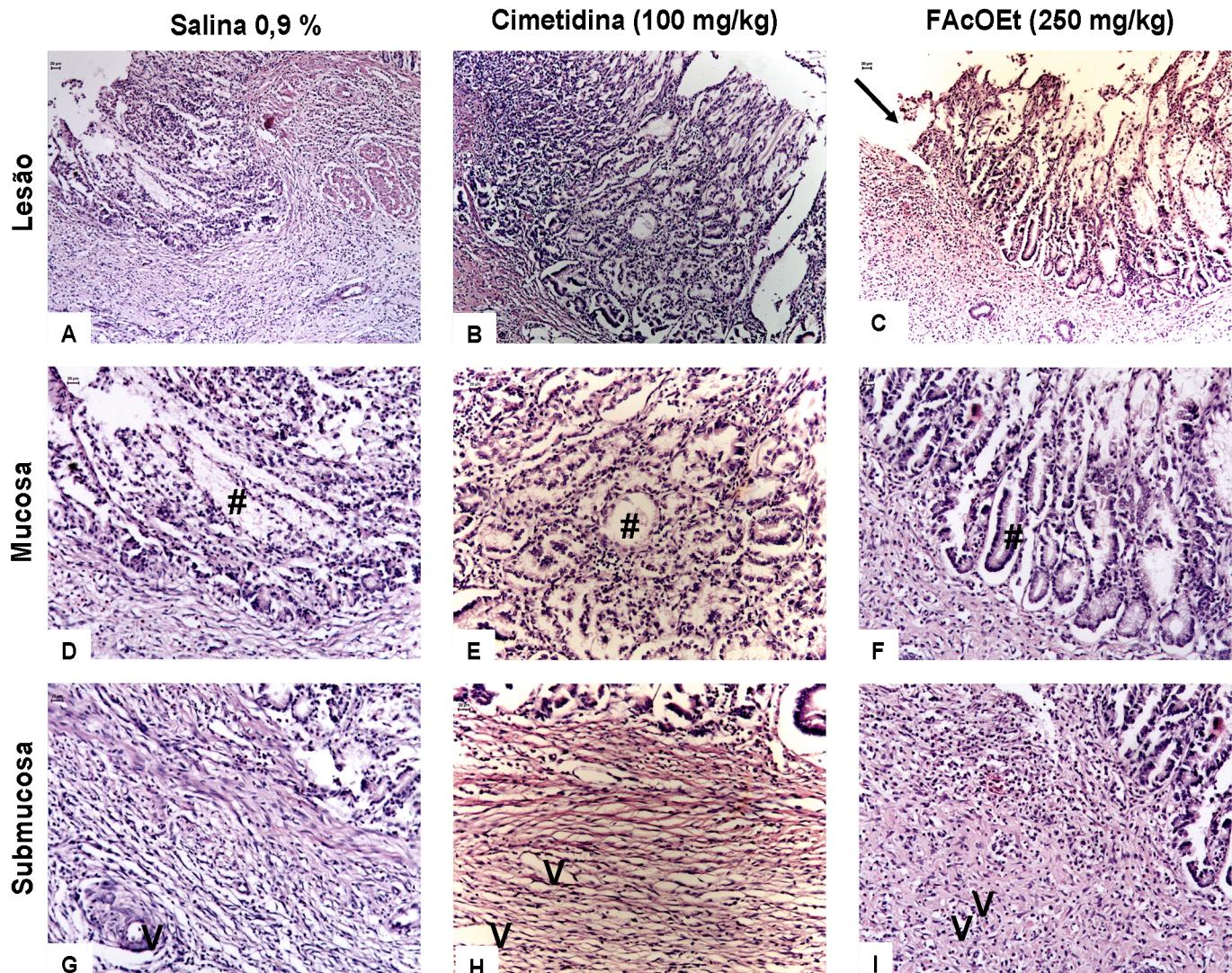


Figura 22. Fotomicrografias de estômagos de ratos com úlceras promovidas com ácido acético e tratados com a FAcOEt obtida de *Maytenus obtusifolia*. Cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina. Onde A, D e G representam animais do grupo controle negativo (salina 0,9 %); B, E e H representam animais do grupo controle positivo (cimetidina, 100 mg/kg); C, F e I representam animais do grupo tratado com FAcOEt (250 mg/kg). (→) indica a região lesionada, (#) representa glândulas tubulosas dilatadas e (v) vasos.

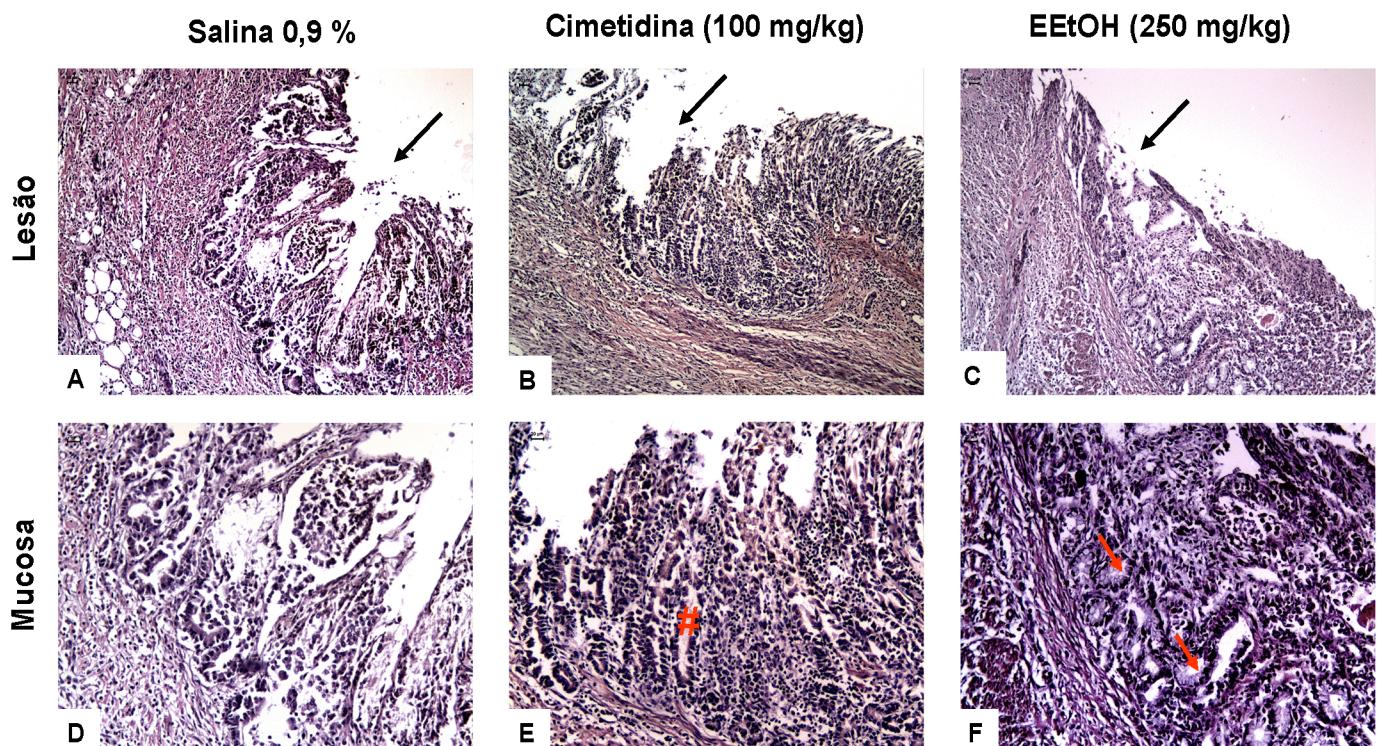


Figura 23. Fotomicrografias de estômagos de ratos com úlceras promovidas por ácido acético e tratados com o EEtOH obtido de *Maytenus obtusifolia*, corados com PAS (marcador de glicoproteínas), para visualização do muco gástrico. Em que A e D representam animais do grupo controle negativo (salina 0,9 %); B e E representam animais do grupo controle positivo (cimetidina, 100 mg/kg); C e F representam animais do grupo tratado com EEtOH (250 mg/kg). (→) indica a região lesionada, (#) representa glândulas tubulosas dilatadas e (→) indica a presença de muco.

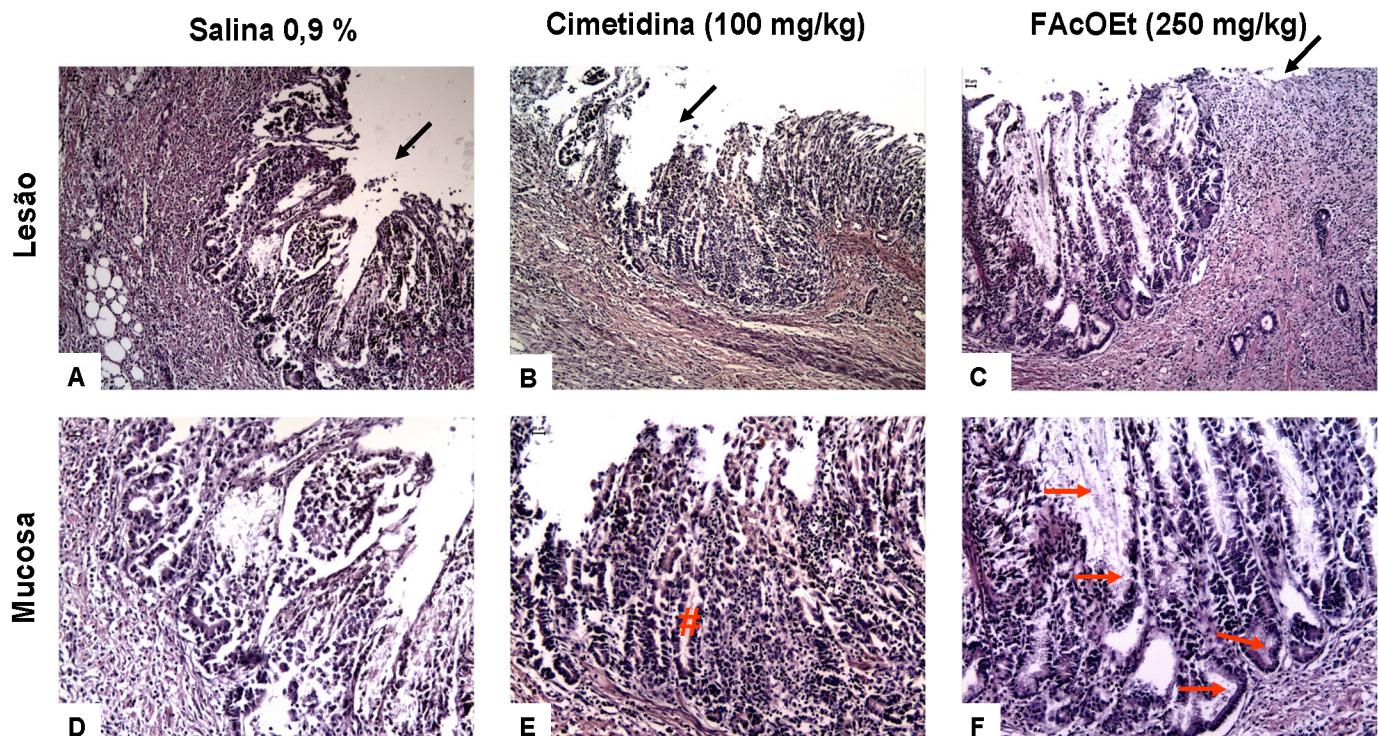


Figura 24. Fotomicrografias de estômagos de ratos com úlceras promovidas por ácido acético e tratados com a FAcOEt obtida de *Maytenus obtusifolia*, corados com PAS (marcador de glicoproteínas), para visualização do muco gástrico. Em que A e D representam animais do grupo controle negativo (salina 0,9 %); B e E representam animais do grupo controle positivo (cimetidina, 100 mg/kg); C e F representam animais do grupo tratado com FAcOEt (250 mg/kg). (→) indica a região lesionada, (#) representa glândulas tubulosas dilatadas e (→) indica a presença de muco.

4.4.3 Avaliação da toxicidade do EEtOH e da FAcOEt por doses repetidas durante 14 dias no modelo de ácido acético 30 %

4.4.3.1 Avaliação do peso corporal

Em adição a investigação da atividade cicatrizante de *M. obtusifolia*, foi avaliada a toxicidade produzida por doses repetidas do EEtOH e da FAcOEt (250 mg/kg, v.o.) durante 14 dias de tratamento. Com isso foi observado que as amostras vegetais não promoveram alterações significativas no peso corporal dos ratos, quando comparados ao controle negativo (salina 0,9 %) (Tabela 4).

Tabela 04 - Efeito da administração oral do EEtOH e da FAcOEt obtidos de *M. obtusifolia* durante 14 dias sobre o peso corporal dos ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético

Tratamento	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Aumento (%)
Sham	237,9 ± 5,47	297,9 ± 22,56	19,76 ± 6,05
Salina 0,9 %	236,3 ± 9,77	283,6 ± 25,07	16,27 ± 5,57
Cimetidina	214,0 ± 17,23	273,4 ± 17,85	21,67 ± 4,87
EEtOH	199,3 ± 15,22	243,4 ± 42,94	19,43 ± 7,22
FAcOEt	204,5 ± 15,10	257,6 ± 13,46	20,60 ± 4,52

Os valores estão expressos como média ± d.p. (n = 6-10). ANOVA de uma via, seguido do teste de Dunnett, p>0.05 comparados à salina 0,9 %.

4.4.3.2 Avaliação do consumo de água e ração

Adicionalmente aos parâmetros acima avaliados foi investigado diariamente o consumo de água e ração pelos ratos. Foi observada uma diminuição significativa na ingestão de água pelos ratos tratados com EEtOH (250 mg/kg, v.o.), alteração essa não observada para os grupos tratados com a fase. Já com relação ao consumo de ração não foi observada alteração para os grupos tratados com o extrato e a fase, quando comparados ao controle negativo (Tabela 5).

Tabela 05 - Efeito da administração oral do EEtOH e da FAcOEt obtidos de *M. obtusifolia* durante 14 dias sobre o consumo de água e ração dos ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético

Tratamento	Dose	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)
Sham	-	37,29 ± 2,22	23,92 ± 2,85
Salina 0,9 %	10 mL/kg	31,02 ± 1,48	21,30 ± 4,16
Cimetidina	100 mg/kg	32,53 ± 3,99	22,51 ± 4,67
EEtOH	250 mg/kg	27,71 ± 2,54**	19,39 ± 4,66
FAcOEt	250 mg/kg	30,12 ± 2,40	20,84 ± 3,86

Os valores estão expressos como média ± d.p. (n = 6-10). ANOVA de uma via, seguido do teste de Dunnett, **p<0,01 comparados à salina 0,9 %.

4.4.3.3 Avaliação do peso dos órgãos

O tratamento durante 14 dias com o EEtOH ou com a FAcOEt (250 mg/kg, v.o.) não promoveram alteração significativa no peso dos órgãos dos ratos ulcerados com ácido acético 30 %, em comparação ao grupo controle negativo (salina 0,9 %) (Tabela 6).

Tabela 6 - Efeito da administração oral do EEtOH e da FAcOEt obtidos de *M. obtusifolia* durante 14 dias sobre o peso dos órgãos dos ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético

Órgãos	Sham	Salina 0,9 %	Cimetidina (100 mg/kg)	EEtOH (250 mg/kg)	FAcOEt (250 mg/kg)
Coração	3,62 ± 0,13	3,68 ± 0,17	3,73 ± 0,15	3,79 ± 0,20	3,74 ± 0,13
Fígado	10,42 ± 0,51	10,32 ± 0,39	10,70 ± 0,22	10,46 ± 0,67	9,95 ± 0,37
Rins	5,09 ± 0,311	5,23 ± 0,23	5,19 ± 0,21	5,07 ± 0,11	5,12 ± 0,20
Baço	3,03 ± 0,21	3,03 ± 0,44	3,24 ± 0,36	3,12 ± 0,20	3,05 ± 0,17
Pulmão	4,14 ± 0,59	4,60 ± 0,46	4,72 ± 0,24	4,97 ± 0,53	4,84 ± 0,55

Dados da razão do peso dos órgãos dividido pelo peso corpóreo e transformado em arcoseno. Os dados estão expressos como média ± d.p. (n = 6-10). ANOVA de uma via, seguido do teste de Dunnett, p>0,05 comparados à salina 0,9 %.

4.4.3.4 Análise laboratorial dos parâmetros bioquímicos e hematológicos

4.4.3.4.1 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Em relação à análise dos parâmetros bioquímicos avaliados, foi observado que apenas o EEtOH (250 mg/kg, v.o.) promoveu alteração significativa frente aos níveis de uréia, quando comparados ao controle negativo (salina 0,9 %) (Tabela 7).

Tabela 7 - Efeito da administração oral do EEtOH e da FAcOEt obtidos de *M. obtusifolia* durante 14 dias sobre os parâmetros bioquímicos em ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético

Parâmetros Bioquímicos	Tratamentos				
	Sham	Salina 0,9 %	Cimetidina (100 mg/kg)	EEtOH (250 mg/kg)	FAcOEt (250 mg/kg)
Uréia (mg/dL)	31,57 ± 3,05	28,70 ± 3,27	28,25 ± 3,33	33,57 ± 2,15**	27,56 ± 2,96
Creatinina (mg/dL)	0,53 ± 0,17	0,42 ± 0,08	0,44 ± 3,99	0,40 ± 0,0	0,40 ± 0,05
AST (U/I)	175,3 ± 28,12	194,6 ± 2,60	161,8 ± 9,33	182,3 ± 21,79	180,1 ± 7,14
ALT (U/I)	59,14 ± 7,63	57,10 ± 0,12	55,63 ± 0,86	62,50 ± 15,37	61,78 ± 9,38

Os valores estão expressos como média ± d.p. (n = 6-10). ANOVA de uma via, seguido do teste de Dunnett, **p<0,01 comparados à salina 0,9 %.

4.4.3.4.2 Avaliação dos parâmetros hematológicos

Com relação aos parâmetros hematológicos, foi observado que durante 14 dias de tratamento, o EEtOH e a FAcOEt (250 mg/kg, v.o.) não alteraram de forma significativa os parâmetros hematológicos analisados (Tabela 8).

Tabela 8 - Efeito da administração oral do EEtOH e da FAcOEt obtidos de *M. obtusifolia* durante 14 dias sobre os parâmetros hematológicos em ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético

Parâmetros Hematológicos	Tratamentos				
	Sham	Salina 0,9 %	Cimetidina (100 mg/kg)	EEtOH (250 mg/kg)	FAcOEt (250 mg/kg)
Hemárias ($10^6/\text{mm}^3$)	7,34 ± 0,54	7,52 ± 1,07	7,58 ± 0,54	7,47 ± 0,13	7,73 ± 0,56
Hemoglobina (g/dL)	14,26 ± 0,89	14,52 ± 1,78	14,84 ± 0,96	14,70 ± 1,06	14,96 ± 1,38
Hematócrito (%)	34,83 ± 2,32	34,67 ± 0,60	36,07 ± 2,87	35,52 ± 2,96	36,12 ± 3,74
VCM (μ^3)	47,38 ± 1,06	46,70 ± 2,50	3,24 ± 1,72	46,50 ± 3,21	46,67 ± 2,40
HCM (μg)	19,57 ± 0,16	19,53 ± 0,98	19,59 ± 0,94	19,20 ± 1,49	19,33 ± 0,71
CHCM (%)	40,98 ± 1,05	41,94 ± 1,02	41,17 ± 1,15	41,45 ± 1,30	41,47 ± 0,81
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	6,71 ± 1,16	8,92 ± 2,51	6,68 ± 1,63	8,30 ± 2,74	9,17 ± 1,63
Neutrófilo (%)	32,38 ± 6,63	32,89 ± 4,14	30,17 ± 7,55	29,67 ± 9,05	33,22 ± 7,61
Eosinófilo (%)	0,13 ± 0,09	0,08 ± 0,04	0,10 ± 0,0	0,12 ± 0,07	0,12 ± 0,08
Linfócitos (%)	61,25 ± 7,32	58,30 ± 6,85	67,00 ± 7,37	65,33 ± 8,91	60,00 ± 7,55
Monócitos (%)	5,13 ± 1,96	5,38 ± 2,61	3,33 ± 1,96	3,20 ± 1,10	5,56 ± 2,66
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	889,7 ± 101,3	1096 ± 358	885,4 ± 223	969,7 ± 392	1015 ± 170

Os valores estão expressos como média ± d.p. (n = 6-10). ANOVA de uma via, seguido do teste de Dunnett, p>0,05 comparados à salina 0,9 %.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A prevenção ou cura da úlcera péptica é um dos principais problemas de saúde pública na atualidade. Mesmo considerando os avanços ocorridos no desenvolvimento de novos fármacos, a terapêutica antiulcerogênica ainda apresenta fatores limitantes em relação à eficácia, efeitos colaterais e alto custo dos medicamentos disponíveis (DEBASHIS et al., 2002). Por estas razões, existe uma necessidade preeminente de se buscar novas abordagens terapêuticas para o tratamento da úlcera péptica. Neste contexto a pesquisa com plantas vem se destacando, por serem fontes de moléculas potencialmente bioativas.

Dentre as plantas que tem despertado grande interesse na comunidade científica, destacam-se as espécies do gênero *Maytenus*, cujas folhas são amplamente usadas na medicina popular devido as suas indicações como analgésica, antiinflamatória, antiulcerogênica, entre outras (CÔRREA, 1984). A espécie mais estudada deste gênero é a *M. ilicifolia*, por suas propriedades antinociceptiva, antiinflamatória (JORGE et al., 2004), antioxidante (MELO et al., 2001; VELLOSA et al., 2006) e principalmente antiulcerogênica (SOUZA-FORMIGONI et al., 1991; JORGE et al., 2004; BAGGIO et al., 2007). Porém, a utilização de forma indiscriminada dessa espécie contribui para a sua provável extinção. Com isto é necessário o desenvolvimento de estudos que apontem uma nova alternativa terapêutica que venha substituir o uso de *M. ilicifolia*.

M. obtusifolia surge como esta alternativa. É uma espécie amplamente difundida na medicina popular e apresenta uma riqueza de compostos potencialmente ativos, o que se constitui um critério de escolha para o desenvolvimento deste trabalho (etnofarmacológico e quimiotaxonômico). Entretanto, são escassos os estudos sobre as atividades tóxicas e farmacológicas desta espécie, a exemplo dos mencionados por Freire (1998) e Sousa; Almeida (2005) que relatam atividade neuroléptica e analgésica para *M. obtusifolia*. Contudo, não existe nenhum relato na literatura sobre a comprovação da atividade antiulcerogênica da mesma.

Diante das considerações, o presente trabalho foi realizado com o intuito de investigar a toxicidade e validar o uso popular de *M. obtusifolia* frente à atividade antiulcerogênica, avaliando assim o efeito do EEtOH e da FAcOEt obtidos das folhas desta espécie, em modelos de indução aguda de lesões por HCl/etanol, etanol

absoluto, AINEs (piroxicam), estresse por imobilização e frio e contensão do suco gástrico, modelos estes que mimetizam as principais causas de úlcera no homem, modelos que permitem elucidar os mecanismos de ação envolvidos e avaliar o processo de cicatrização da úlcera induzida por ácido acético.

A toxicidade aguda é utilizada para avaliar as substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou sinais tóxicos como estabelecido pela RE 90 (2004), podendo também ser determinadas as espécies animais mais susceptíveis à ação da substância avaliada, identificar órgãos alvos e selecionar doses para estudos posteriores (CHAN; HAYES, 1994). Nesta perspectiva foi realizado o ensaio toxicológico pré-clínico agudo com EEtOH.

O estudo foi iniciado com a triagem farmacológica comportamental utilizando a metodologia padronizada por Almeida et al. (1999) com o objetivo de identificar alterações em nível do SNC e SNA produzidas pelo extrato etanólico bruto. Foi observado que de todos os parâmetros citados no protocolo, o EEtOH na dose única de 2000 mg/kg, v.o. (OECD, 2001) provocou apenas sinais de analgesia nos camundongos, na segunda e terceira hora após a administração, no entanto, tal efeito foi reversível na quarta hora após o tratamento. Os resultados sugerem uma possível ação do extrato no SNC, entretanto, não se pode inferir toxicidade apenas com a alteração deste parâmetro, uma vez que várias espécies de *Maytenus* são usadas na medicina popular por suas propriedades analgésicas (CÔRREA, 1984). Além disso, os estudos realizados por Freire (1998) mostraram que a fase hexânica obtida das raízes de *M. obtusifolia* apresentou atividade analgésica, também observada para outras espécies de *Maytenus*, em particular *M. aquifolium* (GONZALES et al., 2001).

Em adição a estes parâmetros, foi avaliado o peso corporal dos camundongos no primeiro e último dia de experimento. Variação no peso corporal é considerado um indicador de efeitos adversos, ou seja, os animais que sobrevivem não podem perder mais que 10 % do peso inicial (RAZA et al., 2002; TEO et al., 2002). O EEtOH na dose testada, não promoveu alteração significativa no peso (Tabela 1), ocorrendo variação apenas nos limites pré-estabelecidos.

Ainda na avaliação da toxicidade aguda, quando investigados o consumo de água e ração dos animais, não foi constatado alteração significante na ingestão de água das fêmeas e no consumo alimentar dos machos. Porém, foi observado um aumento no consumo de água dos machos e diminuição no consumo ração das

fêmeas (Tabela 1). Apesar de serem parâmetros importantes no estudo da segurança de um produto com finalidade terapêutica (IVERSEN; NICOLAYSEN, 2003), não se pode inferir toxicidade para o extrato.

De acordo com Dallegrave (2003) alterações na massa relativa dos órgãos possuem uma relação direta com sinais de toxicidade. Com o intuito de investigar esta hipótese, o peso dos órgãos foi avaliado no final do ensaio toxicológico agudo, sendo observado que o EEtOH não promoveu alteração significativa no peso do coração, fígado e rins dos camundongos (Tabela 1). Além disso, não foi evidenciada alteração macroscópica nestes órgãos. Durante todo o período de observação não ocorreram mortes, o que impossibilitou a determinação da DL₅₀.

Diante destes resultados, sugere-se que o EEtOH na dose única de 2000 mg/kg, v.o. e nas condições avaliadas, apresentou toxicidade para os camundongos de ambos os sexos. No entanto, são necessários estudos complementares e minuciosos, com a finalidade de comprovar ou refutar esta hipótese.

Levando em consideração a não ocorrência de mortes com a dose 2000 mg/kg, v.o. e, consequentemente, a impossibilidade de determinação da DL₅₀, foi possível escolher com segurança as doses do EEtOH para seguir com os estudos de avaliação das atividades gastroprotetoras e cicatrizantes de *M. obtusifolia* (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg). A escolha destas doses está de acordo com o preconizado por Souza-Brito (1994), em que extratos brutos vegetais e seus derivados devem ser testados até a dose de 1000 mg/kg em triagens farmacológicas.

A atividade do EEtOH foi inicialmente caracterizada na triagem farmacológica preliminar utilizando como agente lesivo o HCl/etanol. Neste modelo as lesões são causadas pela diminuição da camada de muco, aumento da secreção ácida (MIZUI; DOUTECHI, 1983), estresse oxidativo, peroxidação lipídica e fragmentação de DNA (GONZALES et al., 2001). Este modelo avalia a capacidade da droga de proteger a mucosa gástrica, sendo esta técnica adequada para investigação de produtos naturais com atividade antiulcerogênica. Os resultados obtidos mostram que o EEtOH (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg, v.o.) inibiu as lesões gástricas provocadas por este agente lesivo em camundongos (Gráfico 1), o que estimulou a continuidade do trabalho utilizando novos modelos de indução.

Em seguida foi avaliado se o EEtOH e a FAcOEt protegem a mucosa gástrica das lesões induzidas por etanol absoluto, modelo amplamente utilizado na investigação da atividade gastroprotetora de drogas, em que este agente lesivo têm efeito necrotizante, resultante de sua ação direta na mucosa, fragilizando a barreira de muco e bicarbonato (SZABO; TRIER; FRANKEL, 1981; AJAIKUMAR et al., 2005).

O etanol se difunde rapidamente na mucosa gástrica, causando esfoliações e erosões, as quais resultam na ativação dos mastócitos e macrófagos liberadores de mediadores vasoativos a exemplo do LTC₄ e histamina, que isoladamente ou em associação induzem venoconstricção e dilatação arteriolar, resultando em hiperemia, hemorragia e edema gástrico, seguido do recrutamento e infiltração de neutrófilos, bem como, formação de espécies reativas de oxigênio (SZABO, 1987; OATES; HAKKINEN, 1988; KAY; GRINDER; MAGNESS, 2000).

As EROs, tais como O₂⁻ e -OH, desempenham um importante papel no desenvolvimento das lesões gástricas induzidas por etanol. Os radicais -OH interagem com a membrana da célula, resultando na peroxidação lipídica e, subsequentemente, na formação de dienos conjugados e hidroperóxidos lipídicos, os quais são radicais extremamente reativos. Com isso ocorre um desequilíbrio entre os processos oxidante e antioxidante da célula, visto que o aumento dessas espécies reativas é acompanhado da diminuição dos componentes de defesa da mucosa como os sistemas antioxidantes enzimáticos (SOD, CAT, GSH-Px e GSH-Rd) e não enzimático (GSH) (HIROKAWA et al., 1998; REPETTO; LLESUY, 2002).

Além dos danos causados diretamente pelo etanol, o seu metabólito, acetaldeído, resultante da oxidação do etanol também promove injúrias, devido à formação de um complexo com a glutationa, diminuindo os níveis de antioxidante, favorecendo a peroxidação lipídica (SALASPURO, 2003).

No modelo de indução de úlcera por etanol absoluto, o EEtOH (Gráfico 2) e a FAcOEt (Gráfico 3) nas doses anteriormente estabelecidas, reduziram o ILU, sugerindo que as amostras vegetais apresentaram atividade gastroprotetora, que poderá estar relacionada a fatores anti-secretórios, citoprotetores e/ou antioxidantes.

O próximo passo deste trabalho foi investigar se as amostras vegetais também eram capazes de promover proteção gástrica frente às lesões induzidas por estresse (imobilização e frio) e AINEs, modelos que envolvem principalmente a via do nervo vago e inibição da síntese de PGs na mucosa gástrica, respectivamente.

O trato gastrintestinal, em particular o estômago, é sensível a vários estímulos de estresse (FILATEROVA, 2006), como choque, queimaduras, trauma severo, danos intracraniais, choque séptico, estados pós-cirúrgicos ou alterações psíquicas, resultando em lesões agudas na mucosa gástrica (GLAVIN; SZABO, 1992; HAMAGUCHI et al., 2001). Dessa forma a úlcera péptica tem sido muitas vezes descrita como uma doença de estresse.

O estímulo estressor, a exemplo da imobilização e frio, pode causar danos ao estômago de animais, devido à interação do sistema neuroimunoendócrino, que estimula o sistema nervoso autônomo (BANDYOPADHYAY et al., 2001), ativa o eixo hipotalâmico-pituitário-adrenocortical (PRUETT, 2003; FILARETOVA, 2006) e estimula o sistema termogênico no cérebro (TANAKA et al., 2007b), resultando na modulação do sistema imune e, consequentemente, na resposta inflamatória (HAMAGUCHI et al., 2001; PRUETT, 2003; ODASHIMA et al., 2005; TANAKA et al., 2007b; FILARETOVA et al., 2007).

Em resposta ao estresse ocorre primariamente uma estimulação simpática e parassimpática no estômago, que induz aumento da motilidade e contração do músculo gastrintestinal, levando a compressão vascular e isquemia mucosal. A estimulação simpática também promove diretamente constrição arteriolar, o que resulta num processo isquêmico, que gera EROs. Estas por sua vez induzem peroxidação lipídica e depleção do conteúdo de glutationa (BANDYOPADHYAY et al., 2001). Além disso, essas espécies reativas promovem inibição da síntese de PGs, com consequente perda da citoproteção (BANDYOPADHYAY et al., 2001). Adicionalmente, a diminuição nos níveis de PGs resulta no aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina 1 β (IL-1 β), que induz um aumento na expressão da molécula de adesão 1 (ICAM-1), principais responsáveis pela infiltração de neutrófilos na mucosa gástrica (HAMAGUCHI et al., 2001).

No estresse por imobilização e frio, a diminuição da temperatura, ativa o sistema termogênico no cérebro, resultando na secreção do hormônio liberador da tirotropina (TRH), que libera o hormônio estimulante da tireoide (TSH), via nervo vago, aumentando a secreção ácida (TANAKA et al., 2007b).

No modelo experimental de úlcera gástrica induzida por estresse (imobilização e frio), o EEtOH e a FAcOEt nas doses avaliadas preveniram o desenvolvimento das lesões gástricas (Gráfico 4), sugerindo portanto que a atividade

gastroprotetora de *M. obtusifolia* poderia ser atribuída a mecanismos anti-secretório, citoprotetor e/ou antioxidante.

Na etapa seguinte deste trabalho foi avaliado o efeito do EEtOH e da FAcOEt nas mesmas doses em úlceras induzidas por AINEs (piroxicam), uma vez que estas drogas podem causar gastropatias, principalmente úlceras gastrintestinais em humanos e animais a longo prazo (WALLACE, 2001; KATO et al., 2007).

A patogenia das lesões gastrintestinais induzidas por AINEs pode estar relacionada as ações local (tópica) e sistêmica, dependendo da via de administração (WALLACE, 2008).

Os danos tópicos provocados pelos AINEs devem-se as suas características físico-químicas por serem ácidos orgânicos fracos. No suco gástrico, os AINEs são relativamente não-ionizados e lipofílicos, o que lhes permitem atravessar a membrana. Como o pH intracelular é neutro, os AINEs são convertidos na forma ionizada permitindo o seu acúmulo no interior da célula provocando danos locais (LAINE, TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

Vários mecanismos estão envolvidos na ação citotóxica local, incluindo redução da secreção de muco e bicarbonato (PHILLIPSON et al., 2002; BAUMGARTNER et al., 2004) e destruição da camada de fosfolipídeos na superfície da mucosa (LICHTENBERGER et al., 2006) o que permite a retrodifusão dos íons H⁺ em direção às células da mucosa e, consequentemente, a ocorrência de danos pelo ácido (WALLACE, 2008). Adicionalmente, os AINEs podem diminuir a capacidade do EGF em promover reparação epitelial, por impedir a ativação de seus receptores (PAI et al., 2001).

O mais importante efeito sistêmico dos AINEs na indução de úlcera gastrintestinal é sua capacidade de suprimir a síntese de PGs, via inibição não seletiva das COXs 1 e 2 (WALLACE, 2008). A inibição de COX-1 diminui a produção de PGs, resultando na hipermotilidade gástrica, distúrbios microvasculares, promovendo assim a ativação e infiltração de neutrófilos, com subsequente produção de EROs e peroxidação lípidica, o que ocasiona dano gástrico (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008). Além disso, a inibição dessa enzima promove a redução da secreção de muco e bicarbonato (RAINSFORD, 2001) e o aumento da acidez gástrica (WALLACE, 2001). A inibição de COX-1 também pode aumentar a expressão de COX-2, resultando na maior produção de PGs via essa enzima (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

Os AINEs podem induzir lesões teciduais por mecanismos independentes de PGs, que estão relacionados com a inibição da fosforilação oxidativa na mitocôndria, inibição de cinases (fosforilação das enzimas) e/ou ativação de apoptose (HUSAIN et al., 2001), produção de leucotrienos e, consequentemente, ativação/infiltração de neutrófilos (BIAS et al., 2005).

No modelo de indução de úlcera por AINEs foi observado que o EEtOH e a FAcOEt nas doses avaliadas previniram de forma significativa as lesões gástricas induzidas por piroxicam (Gráfico 5), sugerindo que *M. obtusifolia* apresenta atividade gastroprotetora, possivelmente via mecanismos citoprotetores, visto que as lesões promovidas por AINEs envolvem principalmente a inibição das PGs, principais mediadoras da citoproteção na mucosa gástrica.

Com base nos resultados obtidos nestes modelos clássicos de indução aguda de úlcera gástrica, pode-se concluir que tanto o EEtOH quanto FAcOEt inibiram as lesões gástricas produzidas por esses agentes lesivos, apresentando propriedade gastroprotetora, que poderá estar relacionada a inibição da secreção ácida gástrica, aumento dos mecanismos de proteção da mucosa (citoproteção) e a ação antioxidante.

Estes resultados são semelhantes aos obtidos com *M. rigida* por nosso grupo de pesquisa, em que o extrato etanólico e a fase acetato de etila apresentaram atividade gastroprotetora (SANTOS et al., 2007; SANTOS, 2008), assim como a de outras espécies de *Maytenus*, a exemplo de *M. ilicifolia* (SOUZA-FORMIGONI et al., 1991; JORGE et al., 2004; BAGGIO et al., 2007), *M. truncata* (SILVA et al., 2005), *M. aquifolium* (SOUZA-FORMIGONI et al., 1991; BERSANI-AMADO et al., 2000; GONZALEZ et al., 2001) e *M. robusta* (ANDRADE et al., 2007).

O modelo padrão escolhido para seleção das melhores doses do EEtOH e FAcOEt foi o etanol absoluto, considerando a sua etiologia ampla e complexa, além de ser um modelo simples e com reprodutibilidade. A dose mais efetiva tanto para o extrato quanto para a fase foi 250 mg/kg.

Levando em consideração esta promissora atividade de *M. obtusifolia*, a próxima etapa do estudo foi investigar o envolvimento da secreção ácida gástrica, através da avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico (volume do suco gástrico, pH e concentração de H⁺) e índice de lesão ulcerativa no modelo de ligadura de piloro.

A ligadura de piloro é um modelo utilizado para avaliar possíveis alterações nos parâmetros bioquímicos do conteúdo gástrico (TOMA et al., 2004), para inferir provável atividade anti-secretória e indicar efeito local e/ou sistêmico de algumas drogas (HIRUMA-LIMA et al., 2006). Este modelo promove aumento na secreção gástrica, mediada por reflexos vago-vagais independentes das células G e ECL provavelmente por estímulação dos mecanorreceptores presentes na mucosa antral (BAGGIO et al., 2003).

Neste modelo a úlcera gástrica é decorrente da autodigestão da mucosa e rompimento da barreira de muco (SAIRAM et al., 2002), o que promove o aumento de pepsina; da atividade da mieloperoxidase, indicando a participação de neutrófilos, com consequente aumento de radicais livres induzindo a peroxidação lipídica e subsequente danos gástricos (RASTOGI; PATNAIK; DIKHIT, 1998).

Neste modelo o EEtOH e a FAcOEt (250 mg/kg, v.o.) reduziram de forma significativa o índice de lesão ulcerativa produzido pela contensão do suco gástrico (Gráfico 6), resultando em atividade gastroprotetora provavelmente relacionada a mecanismos anti-secretórios.

Na perspectiva de confirmar ou rejeitar esta hipótese, foram avaliados também no modelo de ligadura de piloro os parâmetros bioquímicos do suco gástrico, sendo observado que o EEtOH e a FAcOEt quando administrados intraduodenalmente não alteraram o pH e a concentração de H⁺, entretanto, reduziram significativamente o volume do suco gástrico (Tabela 2). Estes dados indicam ação sistêmica.

Quando as amostras vegetais foram administradas v.o., foi observado que o extrato etanólico não alterou os parâmetros bioquímicos do suco gástrico, entretanto, a fase acetato de etila aumentou significativamente o volume do suco gástrico e o pH, além de reduzir a concentração de H⁺, sugerindo que o efeito gastroprotetor promovido pelo extrato etanólico, provavelmente, não envolve atividade anti-secretória, enquanto que esta atividade pode ser produzida pela fase acetato de etila devido principalmente a sua ação local.

A diferença dos resultados entre o EEtOH e a FAcOEt, provavelmente deve-se a presença de compostos polifenólicos nesta fase, a exemplo de 4'-O-metil(-)-epigalocatequina, ouratea proantocianidina A, catequina e epicatequina. Os flavonóides têm conhecida atividade anti-secretória a exemplo hipolaetina-8-glicosídio que diminui a acidez no modelo de ligadura de piloro

(ALCARAZ; TORDERA, 1988) e quercetina que inibiu a H⁺,K⁺-ATPase (BEIL; BIRKHOIZ; SEWING, 1995). Esta atividade também foi reportada para os isômeros catequina e epicatequina (MURAKAMI; MURAMATSU; OTOMO, 1992) presentes na FAcOEt.

Os resultados obtidos com a FAcOEt de *M. obtusifolia* corroboram com os resultados observados em outras espécies de *Maytenus*, como *M. robusta* (ANDRADE et al., 2007) e, em particular, a *M. ilicifolia*, cuja fração rica em flavonóides (galactitol, catequina e epicatequina) diminuiu o volume gástrico e acidez no modelo de ligadura de piloro, bem como inibiu a atividade da H⁺,K⁺-ATPase (BAGGIO et al., 2007). A proteção gástrica promovida pela FAcOEt pode ser mediada por mecanismos anti-secretórios, entretanto, para confirmar essa hipótese serão necessários estudos complementares, a exemplo da dosagem dos níveis séricos de gastrina e somatostatina, hormônios que controlam a secreção ácida, além da avaliação *in vitro* da atividade da H⁺,K⁺-ATPase.

Com o intuito de compreender os mecanismos de ação envolvidos na gastroproteção do EEtOH e da FAcOEt obtidos das folhas de *M. obtusifolia* foi investigada a participação de PGs, NO e grupos sulfidrilas (SHs) nos mecanismos citoprotetores. Estes mediadores endógenos protegem a mucosa gastrintestinal (citoproteção) de lesões induzidas por uma variedade de agentes ulcerogênicos e necrotizantes (aspirina, indometacina, ácidos biliares, água fervente, álcool absoluto, 0,6 mol/L HCl, 0,2 mol/L NaOH) (HALTER et al., 2001; BRZOZOWSKI et al., 2005).

As PGs, em particular a PGE₂, promovem citoproteção gástrica ativando diferentes tipos de receptores EP e vias de transdução de sinal (SUGIMOTO; NARUMIYA; ICHIKAWA, 2000). A PGE₂ ao ativar o receptor EP₁ promove a formação de segundos mensageiros, como o IP₃ e DAG, que leva ao aumento [Ca²⁺]_i. Esse prostanoíde ao ativar EP₂ e EP₄, estimula a via ciclase de adenilil-AMPc, entretanto, quando se liga a EP₃ inibe esta via (PAWLICK et al., 2002).

A ação protetora da PGE₂ mediada por receptores EP₁, favorece o aumento da secreção de muco e bicarbonato, mantém o fluxo sanguíneo da mucosa e diminui a motilidade gástrica (ARAKI et al., 2000; TAKEUCHI et al., 1999; TAKEUCHI et al., 2002). Quando a PGE₂ atua nos receptores EP₃ e EP₄, ocorre diminuição da secreção ácida e aumento de muco, respectivamente (TAKAHASHI; TAKEUCHI; OKABE, 1999). O fluxo sanguíneo também pode ser

aumentado por PGE₂ e PGI₂, ativando os receptores EP₂ e IP, respectivamente (KOTANI et al., 2006).

Adicionalmente, as PGs podem reduzir a permeabilidade do epitélio ao ácido (retrodifusão), inibir a liberação de uma série de outros mediadores inflamatórios (histamina, TNF- α , fator ativador de plaquetas, IL-1, IL-8 e LTB-4) envolvidos na lesão da mucosa e inibir a aderência leucocitária ao endotélio vascular (TAKEZONO et al., 2004; WALLACE, 2008).

Considerando a grande importância das PGs na citoproteção, foi avaliado o efeito da fase acetato de etila obtida de *M. obtusifolia* sobre os níveis de PGE₂ na mucosa gástrica. A FAcOEt (125 e 250 mg/kg, v.o.) não aumentou de forma significativa a produção de PGE₂ na mucosa gástrica em ambos os grupos tratados com salina 0,9 % e FAcOEt, e indometacina (Gráfico 7). Com isso foi possível sugerir que o efeito gastroprotetor promovido pela FAcOEt provavelmente não envolve o aumento nos níveis mucosal de PGE₂.

Na perspectiva de avaliar os mediadores endógenos envolvidos no possível mecanismo citoprotetor de *M. obtusifolia*, passou-se a investigar o envolvimento do NO na gastroproteção do extrato e da fase, visto que o NO pode desempenhar um papel fundamental na defesa da mucosa frente a diferentes agentes lesivos.

O NO é um mediador chave da integridade da mucosa gastrintestinal (FIORUCCI et al., 2001), além de exercer amplo espectro de atividades biológicas *in vivo* através da ativação da enzima ciclase de guanilil solúvel, que resulta no aumento do segundo mensageiro, GMPc (MONCADA; HIGGS, 2006). O aumento de GMPc promove relaxamento nas células musculares lisas, resultando no aumento do fluxo sanguíneo e favorecendo a proteção da mucosa.

Muitos dos efeitos protetores do óxido nítrico no TGI são semelhantes aos das PGs, citados anteriormente. Além dos eventos gastroprotetores o NO acelera a cicatrização da úlcera via liberação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), promovendo a angiogênese e cicatrização da úlcera (MILLER; WALLACE, 2000; WALLACE, 2008).

Embora o NO produzido pela cNOS tenha uma papel importante na manutenção da integridade da mucosa, muitos estudos tem demonstrado que o NO desempenha uma papel bifásico na resposta ulcerogênica da mucosa gastrintestinal, ou seja, dependendo da isoenzima NOS, o NO pode promover efeito protetor via cNOS ou efeito pró-ulcerogênico via iNOS (KOBATA et al., 2007).

O NO protege a mucosa gástrica de lesões induzidas por etanol e endotelina. A inibição da enzima NOS por L-NAME, resulta na redução desse mediador endógeno e, consequentemente, aumento da lesão na mucosa estomacal (MATSDA; LI; YOSHIKAWA, 1999).

Para avaliar a hipótese de participação do NO na proteção gástrica, foi realizado o modelo agudo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos, na ausência e na presença de L-NAME, um inibidor da enzima NOS. Com isso foi observado que o EEtOH e a FAcOEt (250 mg/kg, v.o.) reduziram de forma significativa as lesões ulcerativas induzidas por etanol absoluto, tanto na ausência quanto na presença de L-NAME, não havendo diferença significativa entre esses dois (Gráfico 8), o que leva a sugerir que o NO provavelmente não está envolvido na gastroproteção promovida por *M. obtusifolia*.

Outro importante aspecto investigado no mecanismo de ação citoprotetor desta espécie foi o envolvimento dos grupamentos SHs, que aumentam a produção de muco (SALIM, 1993) e mantém estabilidade do muco por formar pontes de dissulfeto com suas subunidades (CHANDRANATH, BASTAK; SINGH, 2002).

A GSH promove a proteção da mucosa gástrica, principalmente devido a sua atividade antioxidante, que remove as EROs frente ao estresse oxidativo. Este processo envolve o ciclo redox da GSH, que se inicia com GSH atuando como um co-fator da GPx, resultando na formação de glutationa oxidada (GSSG). O aumento de GSSG durante o estresse oxidativo geralmente é transitório, visto que a GSH-Rd restaura os níveis de GSH (CNUBBEN et al., 2001). Dessa forma a GSH exerce um papel chave na proteção das células epiteliais gástricas sobre as lesões induzidas por etanol (REPETTO; LLESUY, 2002).

Uma forma de investigar a participação dos grupamentos SHs é através do N-etilmaleimida, um agente bloqueador desses grupamentos, que potencializa as lesões ulcerativas induzidas pelo etanol (RASTOGI; PATNAIK; DIKSHIT, 1998; MATSUDA; LI; YOSHIKAWA, 1999).

Diante dessas considerações o envolvimento dos grupamentos SHs na proteção da mucosa gástrica de *M. obtusifolia*, foi verificado através do modelo de indução aguda de úlcera com etanol absoluto, na ausência e na presença de NEM. Neste experimento o EEtOH e a FAcOEt (250 mg/kg, v.o.) reduziram de forma significativa as lesões ulcerativas induzidas por etanol absoluto, tanto na ausência quanto na presença de NEM, havendo diferença significativa entre os grupos

pré-tratados com salina 0,9 % e com NEM (Gráfico 09), sugerindo que o efeito gastroprotetor promovido pelo EEtOH e FAcOEt depende da produção e/ou presença dos compostos SHs. Os dados obtidos neste trabalho estão de acordo com os resultados obtidos com *M. rigida*, que demonstraram que o extrato etanólico e a fase acetato de etila promovem proteção gástrica por participação dos grupamentos SHs (SANTOS, 2008).

Mediante a relevante atividade gastroprotetora do EEtOH e da FAcOEt obtidos de *M. obtusifolia*, passou-se a investigar a propriedade cicatrizante dessas amostras em modelo crônico de úlcera gástrica.

A cicatrização da úlcera é um processo de reparação geneticamente programado, envolvendo inflamação, proliferação celular (particularmente na margem da úlcera), re-epitelização, formação de tecido de granulação na base da úlcera, angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos) e deposição da matrix. Todos esses eventos são regulados por citocinas, fatores de crescimento e de transcrição (TARNAWSKI, 2005; WALLACE, 2008).

Em resposta a ulceração, novos tipos de células aparecem na margem da úlcera e secretam grande quantidade de fatores de crescimento, tais como EGF, VEGF, fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento do hepatócito (HGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento transformador β (TGF- β). Estes fatores são produzidos localmente e vão atuar via ação autócrina e/ou parácrina promovendo a divisão, migração celular, proliferação e re-epitelização (TARNAWSKI, 2005).

A estrutura da glândula é gradualmente restabelecida juntamente com a circulação da mucosa (WALLACE et al., 2006), sendo acompanhado pelo aumento nos níveis de gastrina plasmática e de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β), que são regulados pelos fatores de crescimento, em especial o VEGF. A angiogênese no tecido de granulação na base da úlcera e a replicação das células epiteliais na margem da úlcera restabelecem a arquitetura glandular (BRZOZOWSKI, 2003; WALLACE et al., 2006).

O modelo de ácido acético tem sido amplamente utilizado para avaliar o processo de cicatrização da úlcera, sendo considerado o modelo experimental que mais se assemelha à úlcera crônica no homem em termos de características patológicas e mecanismo de cicatrização (OKABE, AGAMASE, 2005).

Para avaliar se *M. obtusifolia* estaria acelerando o processo de cicatrização da úlcera, o EEtOH e a FAcOEt (250 mg/kg, v.o.) foram administrados durante 14 dias após a indução de úlcera por ácido acético 30 %. Neste experimento o extrato etanólico bruto e a fase acetato de etila aumentaram o processo de cicatrização da úlcera, visto que reduziram significativamente a ALU (Gráfico 10), sugerindo que *M. obtusifolia* apresenta atividade cicatrizante.

Resultados semelhantes foram encontrados para a fração rica em flavonóides de *M. ilicifolia* (BAGGIO et al., 2007), e para a fase acetato de etila obtida de *M. rigida* (SANTOS, 2008).

Histologicamente, a úlcera gástrica consiste em duas estruturas, a margem e a base da úlcera. A margem é formada pela borda adjacente não necrosada, onde as glândulas tornam-se dilatadas e suas células sofrem diferenciação, expressam receptores para o EGF e proliferam ativamente formando uma característica zona de cicatrização. A base da úlcera é formada por tecido de granulação, que é composto de macrófagos, fibroblastos e células endoteliais, o qual se desenvolve 48-72 horas após a ulceração (TARNAWSKI, 2005).

Dentro deste contexto foram realizados cortes da área ulcerativa, os quais foram corados com HE, em que se observou que nos grupos tratados com o EEtOH e a FAcOEt a dilatação da glândula tubulosa é menos acentuada, quando comparada com salina 0,9 %. No grupo tratado com FAcOEt destacou-se o grande grau de organização, apresentando morfologia típica das glândulas estomacais, que são tubulosas reta com dilatação reduzida (Figuras 21 e 22). Assim, o maior grau de organização da região de regeneração pode facilitar a passagem do muco e de outras substâncias em direção à superfície da mucosa gástrica.

Na análise dos cortes histológicos corados com PAS, foi evidenciado uma maior homogeneidade de secreção pelas células dos animais tratados com EEtOH ou FAcOEt (Figuras 23 e 24), sugerindo uma melhor qualidade de secreção do muco, componente importante no processo de cicatrização da úlcera, visto que a camada formada por muco e bicarbonato protege as células recém formadas da ação do ácido gástrico (TARNAWSKI et al., 2001; LIMA et al., 2006). O aumento da quantidade de muco presente nos cortes histológicos dos grupos de animais tratados com as amostras vegetais provavelmente pode estar relacionada com a participação dos grupamentos SHs, uma vez que a gastroproteção promovida pelo EEtOH e FAcOEt é mediada por estes grupamentos.

Adicionalmente no modelo de úlcera induzida por ácido acético foram avaliados os parâmetros de peso corporal, consumo de água e ração, bem como, peso dos órgãos, além dos parâmetros bioquímicos e hematológicos. Embora este modelo não avalie apenas os parâmetros de toxicidade, serve como um indicador da possível presença de toxicidade após 14 dias de tratamento (VASCONCELOS et al., 2008). Com isso foi possível observar que o EEtOH e a FAcOEt (250 mg/kg, v.o.) não induziram alterações significativas no peso corporal dos animais, no consumo de ração e no peso dos órgãos. No entanto, foi observado que o extrato etanólico bruto promoveu diminuição significativa na ingestão de água dos ratos (Tabelas 4, 5 e 6).

Na perspectiva de corroborar aos dados obtidos, foram avaliados como parâmetros bioquímicos: AST (indicador de lesão hepática aguda), ALT (indicador de lesão hepática crônica), creatinina e uréia (marcadores da função renal). As amostras vegetais não promoveram alterações significativas nos níveis de AST, ALT e creatinina, entretanto, o EEtOH promoveu aumento significativo nos níveis séricos de uréia (Tabela 7). Este resultado pode estar associado com a diminuição da ingestão de água dos ratos, uma vez que esta promove diminuição do fluxo sanguíneo renal. Como a reabsorção tubular de água permanece intacta, a uréia aumenta em grau muito maior do que a creatinina, devido ao aumento da reabsorção de uréia e sua menor eliminação, sem diminuir proporcionalmente a secreção de creatinina, provocando a elevação do nitrogênio uréico no sangue e, consequentemente, a azotemia pré-renal, que é o acúmulo dos produtos de nitrogênio (HENRY, 2008). Outro fator que pode estar relacionado a elevação nos níveis séricos de uréia é uma possível hemorragia gastrintestinal (HENRY, 2008), provavelmente devido às lesões ulcerativas induzidas por ácido acético 30 %.

Não se pode desconsiderar tal achado, entretanto, não é possível inferir alterações renais, uma vez que não ocorreram alterações significativas no peso dos rins, bem como nos níveis séricos de creatinina, que é o principal marcador da função renal, sendo considerada um marcador mais eficiente que a uréia, visto que diferentes fatores não renais podem afetar a concentração de uréia (RAVEL, 1997). De acordo com os parâmetros avaliados pode-se sugerir que durante os 14 dias de tratamento a FAcOEt não apresentou sinais de toxicidade, entretanto, o EEtOH nas condições avaliadas apresentou alteração em alguns parâmetros. Estes resultados

sugerem que o extrato etanólico nas condições avaliadas apresenta baixa toxicidade para os ratos.

Com base nos dados apresentados, pode-se sugerir que *M. obtusifolia* apresenta promissora atividade gastroprotetora e cicatrizante, sendo que tais atividades podem estar relacionadas à participação dos grupamentos sulfidrila, compostos estes que desempenham importante papel na citoproteção gástrica, por estabilizar e aumentar a produção de muco, além de atuarem principalmente como antioxidantes.

O gênero *Maytenus* é rico em compostos polifenólicos dos quais destacam-se os flavonóides, a exemplo da queracetina, catequina, epicatequina, entre outros (TIBERTI et al., 2007; BAGGIO et al., 2007), que protegem a mucosa gástrica contra as lesões induzidas por diferentes agentes lesivos. Estes efeitos podem estar relacionados às suas propriedades anti-secretória (BEIL; BIRKHOIZ; SEWING, 1995), citoprotetora (SAZIKI et al., 1984) e principalmente, antioxidante (KAHRAMAN et al., 2003).

Além disso, muitos extratos, fases e frações ricas em flavonóides apresentam atividade gastroprotetora possivelmente devido à presença destes compostos, podendo destacar a fração rica em flavonóides de *Syngonanthus arthrorhynchus* (BATISTA et al., 2004), fase acetato de etila de *M. rigida* (SANTOS, 2008), bem como a fração rica em flavonóides obtida das folhas de *M. ilicifolia* (BAGGIO et al., 2007).

Levando em consideração a importância destes compostos polifenólicos na citoproteção gástrica, bem como a presença destes em *M. obtusifolia*, podemos sugerir que a atividade antiulcerogênica promovida por esta planta medicinal se dá pelo menos em parte, devido aos flavonóides, especialmente os presentes na FAcOEt. Os resultados obtidos neste trabalho corroboram a difundida utilização desta planta na medicina tradicional, dando suporte farmacológico para a validação do seu uso popular, além de apresentar potencial terapêutico gastroprotetor e cicatrizante.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Diante dos dados analisados para a espécie vegetal *Maytenus obtusifolia* Mart. (Celastraceae) é possível concluir que:

- O EEtOH nas condições e parâmetros avaliados apresentou baixa toxicidade;
- O EEtOH nas doses avaliadas apresentou atividade gastroprotetora quando submetido à triagem farmacológica;
- O EEtOH e a FAcOEt nas doses utilizadas apresentaram atividade gastroprotetora;
- O efeito gastroprotetor do EEtOH e da FAcOEt pode ser atribuído a ação sistêmica e local, contudo este efeito para a fase acetato de etila, poderá estar relacionado a atividade anti-secretória;
- O mecanismo pelo qual o EEtOH e a FAcOEt promovem atividade gastroprotetora, envolve provavelmente devido a participação dos grupamentos sulfidrilas;
- O EEtOH e a FAcOEt apresentam atividade cicatrizante por estimular o processo de cicatrização da úlcera gástrica.

PERSPECTIVAS

7 PERSPECTIVAS

Na perspectiva de complementar o estudo da atividade antiulcerogênica do EEtOH e da FAcOEt obtidos das folhas de *M. obtusifolia* Mart. (Celastraceae), nos propomos a investigar:

- O mecanismo de ação anti-secretório, avaliando para tanto:
 - ✓ Os níveis séricos de somatostatina e gastrina;
 - ✓ O envolvimento da bomba H⁺, K⁺-ATPase.
- Avaliar o mecanismo de ação antioxidante, investigando assim:
 - ✓ A peroxidação lipídica;
 - ✓ O antioxidante não enzimático: GSH;
 - ✓ Os antioxidantes enzimáticos: GSH-Px, GSH-Rd, SOD, catalase.
- Avaliar, através de estudos imunohistoquímicos, os fatores envolvidos no processo de cicatrização de lesões, investigando:
 - ✓ A proliferação celular;
 - ✓ A angiogênese;
 - ✓ O envolvimento da cicloxigenase 2.

REFERENCIAS

REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 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. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 98, p. 109-27, 2003.
- AIHARA, T.; NAKAMURA, Y.; TAKETO, M. M.; MATSUI, M.; OKABE, S. Cholinergically stimulated gastric acid secretion is mediated by M_3 and M_5 but not M_1 muscarinic acetylcholine receptors in mice. **American Journal Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 288, p. 1199-1207, 2005.
- AJAIKUMAR, K. B.; ASHEEF, M.; BABU, B. H.; PADIKKALA, J. The inhibition of gastric mucosal injury by *Punicagranatum* L. (pomegranate) methanolic extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 171-176, 2005.
- ALCARAZ, M. J.; TORDERA, M. Studies on the gastric anti-ulcer activity of hypolaetin-8-glucoside. **Phytotherapy Research**, v. 2, p. 85-88, 1988.
- ALLEN, A.; FLEMSTRÖM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **American Journal Physiology - Cell Physiology**, v. 288, p. 1-19, 2005.
- ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; POLARI, R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. 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. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p. 72-76, 1999.
- ALMEIDA, C. F. C. B. R.; LIMA E SILVA, T. C.; AMORIM, E. L. C.; MAIA, M. B. S.; ALBUQUERQUE, U. P. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 127-142, 2005.
- ANDERSON, K.; CARLSSON, E. Potassium-competitive acid blockade: a new therapeutic strategy in acid-related diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 108, p. 294-307, 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. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 252-257, 2007.

ARAKI, H.; UKAWA, H.; YAGI, K.; SUZUKI, K.; TAKEUCHI, K. Roles of prostaglandin E receptor subtypes in cytoprotective action of prostaglandin E₂ in rat stomachs. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 14, n. 1, p. 18–25, 2000.

ATHMANN, C.; ZENG, N.; SCOTT, D. R.; SACHS, G. Regulation of parietal cell calcium signaling in gastric glands. **American Journal Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 279, p. G1048–G1058, 2000.

ATUMA, C.; STRUGALA, V.; ALLEN, A.; HOLM, L. The adherent gastric mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. **American Journal Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 280, p. G922–G929, 2001.

BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; RIECK, L.; MARQUES, M. C. A. Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC in rats. **Pharmacological Research**, v. 47, p. 93-98, 2003.

BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; OTOFUJI, G. M.; CIPRIANI, T. R.; SOUZA, L. M.; SASSAKI, G. L.; IACOMONI, M.; MARQUES, M. C. A.; MESIA-VELA, 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. **Journal of Ethnopharmacology**, 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 oxygenderived reactive species: protection by melatonin. **Current Molecular Medicine**, v. 1, p. 501-513, 2001.

BAROCELLI, E.; BALLABENI, V. Histamine in the control of gastric acid secretion: a topic review. **Pharmacological Research**, v. 47, p. 299-304, 2003.

BARRACHINA, M. D.; PANES, J.; ESPLUGUES, J. V. Role of nitric oxide in gastrointestinal inflammatory and ulcers diseases: perspective for drugs development. **Current Pharmaceutical Design**, v. 7, p. 31-48, 2001.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

BARRETO, R. L.; CORREIA, C. R. D.; MUSCARÁ, M. N. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1046-1054, 2005.

BATISTA, L. M.; ALMEIDA, A. B. A.; MAGRI, L. P.; TOMA, W.; CALVO, T. R.; VILEGAS, W.; SOUZA-BRITO, A. R. M. Gastric antiulcer activity of *Syngonanthus arthrotrichus* Silveira. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 3, 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.

BEALL, D. P; HENSLEE, H. B.; WEBB, H. R.; SCOFIELD, R. H. Milk-alkali syndrome: a historical review and description of the modern version of the syndrome. **American Journal of the Medical Sciences**, 331:233–242, 2006.

BEECHER, G. R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. **Journal of Nutriton**, v. 133, p. 3248S-3254S, 2003.

BEIL, W.; BIRKHOIZ, C.; SEWING, K. F. Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and *Helicobacter pylori* growth. **Arzneimittel-Forschung**, v. 45, p. 697-700, 1995.

BERESWILL, S.; KIST, M. Molecular microbiology and pathogenesis of *Helicobacter* and *Campylobacter* updated: a meeting report of the 11 th conference on *Campylobacter*, *Helicobacter* and related organisms. **Molecular Microbiology**, v. 45, p. 255-262, 2002.

BERSANI-AMADO, C. A.; MASSAO, L. B.; BAGGIO, S. R.; JOHANSON, L.; ALBIERO, A. L.; KIMURA, E. Antiulcer effectiveness of *Maytenus aquifolium* spray dried extract. **Phytotherapy Research**, v.14, p.543-5, 2000.

BI, L. C.; KAUNITZ, J. D. Gastroduodenal mucosal defense: na integrated protective response. **Current Opinion Gastroenterology**, v. 19, p. 526-532, 2003.

BIAS, P.; BUCHNER, A.; KLESSER, B.; STEFAN, L. The gastrointestinal tolerability of the LOX/COX inhibitor, licoferone, is similar to placebo and superior to naproxen therapy in healthy volunteers: results from a randomized, controlled trial. **American Journal of Gastroenterology**, v. 99, p. 611–618, 2005.

BORRELI, F.; IZZO, A. A. The plant kingdom as a Source of Anti-ulcer Remedies. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 581-591, 2000.

BOTTING, R. M. Cyclooxygenase: past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927-2004). **Journal of Thermal Biology**, v. 31, p. 208-216, 2006.

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

BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P. C.; KONTUREK, S. J.; BRZOZOWSKA, I.; PAWLIK, T. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56, n. 5, p. 33–55, 2005.

BRUNI, R.; ROSSI, D.; MUZZOLI, M.; ROMAGNOLI, C.; PAGANETTO, G.; BESCO, E.; CHOQUECILLO, F.; PERALTA, K.; LORA, W. S.; SACCHETTI, G. Antimutagenic, antioxidant and antimicrobial properties of *Maytenus krukovi* bark. **Fitoterapia**, v. 77, p. 538-545, 2006.

CALAM, J.; BARON, J. H. Pathophysiology of duodenal and gastric ulcer and gastric cancer. **British Medical Journal**, v. 323, p. 980-983, 2001.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, p. 37-38, 2003.

CAROTENUTO, A.; FATTORUSSO, E.; LANZOTTI, V.; MAGNO, S.; DE FEO, V.; CICALA, C. The flavonoids of *Allium neapolitanum*. **Phytochemistry**, v. 44, p. 949-957, 1997.

CHAN, P. K.; HAYES, A. W. Acuity toxicity and eye irritancy. In: HAYES, A.W. (ed.). Principles and methods of toxicology. 3. ed. New York: Raven Press, p. 579-647, 1994.

CHANDRANATH, S. I.; BASTAKI, S. M. A.; SINGH, J. A comparative study on the activity of lansoprazole, omeprazole and PD-136450 on acidified ethanolinduced

gastric ulcers. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.29, p. 173-180, 2002.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other drugs: cloning, structure, and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 13926-13931, 2002.

CHEN, D.; AIHARA, T.; ZHAO, C.; HÅKANSON, 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. **American Journal Physiology Gastrointestinal Liver Physiology**, v. 291, p. G539-G544, 2006.

CHENTER, L.; RODRIGUES-JÚNIOR, L. Úlcera Péptica. Em: MISZPUTEN, S. J. **Gastroenterologia**, 1^a ed. Editora Manole, Barueri, SP, p. 49-64, 2002.

CHEONG, H.; RYU, S. Y.; OAK, M. H.; CHEON, S. H.; YOO, G. S.; KIM, K. M. Studies of structure activity relationship for the anti-allergic actions. **Archives of Pharmacal Research**, v. 21, p. 478-480, 1998.

CNUBBEN, N. H. P.; RIETJENS, I. M. C. M.; NORTELBOER, H.; ZANDER, J.; BLADERSEN, P. J. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, p. 141-52, 2001.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. IBDF-Ministério da Agricultura, v. 6, p. 149, Rio de Janeiro, 1984.

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.

CRITCHFIELD, J. W.; BUTERA, S. T.; FOLKS, T. M. Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 12, p. 39-46, 1996.

CURTIS, G. H.; MACNAUGHTON, W. K.; GALL, D.G.; WALLACE, J. L. Intraluminal pH modulates gastric prostaglandin synthesis. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 73, p. 130-134, 1995.

DALLEGRAVE, E. Toxicidade reprodutiva do herbicida glifosato - Roundupâ em ratos Wistar. 225 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2003.

DEBASHIS, B.; KAUSHIK, B.; MRINNALINI, B.; RUSSEL, J.; REITER, R. K. B. Involvement of reactive oxygen species in gastric ulceration., protection by melatonin. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 40, p. 693-705, 2002.

DELLE, M. F.; MARINI, B. G. B.; BERNAYS E. A. Isolation of insect antifeedant alkaloids from *Maytenus rigida* (Celastraceae). **Zeitschrift Angewandte Entomologie**, v. 97, p. 406-414, 1984.

DHAR, S. K; SONI, R. K.; DAS, B. K.; MUKHOPADHYAY, G. Molecular mechanism of action of major *Helicobacter pylori* virulence factors. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 253, p. 207–15, 2003.

DI CARLO, G.; AUTORE, G.; IZZO, A. A.; MAIOLINO, P.; MASCOLO, N.; VIOLA, P.; DIURNO, M. V.; CAPASSO, F. Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure-activity relationships. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 45, p. 1054-1059, 1993.

DOAN, T.; MASSAROTTI, E. Rheumatoid arthritis: An overview of new and emerging therapies. **Journal of Clinical Pharmacolog**, v. 45, p. 751-762, 2005.

DUSSE, L. M. S. A.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicinal Laboratorial**, v. 99, p. 343-350, 2003.

EL TAHIR A.; SATTI, G. M. H.; KHALID, S. A. Antiplasmodial activity of selected Sudanese medicinal plants with emphasis on *Maytenus senegalensis* (Lam.) Exell. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 227-233, 1999.

FALCÃO, H. S. Avaliação da atividade antiulcerogênica do extrato etanólico bruto e fase clorofórmica obtidos das partes aéreas de *Praxelis clematidea* (Griseb.) R. M. King & H. Robinson em modelos animais. 2007, João Pessoa, 113 p. **Dissertação** (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba.

FAURE, P.; LAFOND, J. L. Measurement of plasma sulphhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: FAVIER A. E., **Analysis of free radicals in biological systems**. Boston: Verlag, p. 237-248, 1995.

FENG, X.; GAO, Z.; LI, S.; JONES, S. H.; HECHT, S.M. DNA polymerase, lyase inhibitors from *Maytenus putterlickoides*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1744-1747, 2004.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.

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

FILARETOVA, L.; PODVIGINA, T.; BAGAEVA, T.; BOBRYSHOV, P.; TAKEUCHI, K. Gastroprotective Role of Glucocorticoid Hormones. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 104, p. 195- 201, 2007.

FILHO, R. F.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.

FIORUCCI, S.; ANTONELLI, E.; BURGAUD, J. L.; MORELLI, A. Nitric oxide-releasing NSAIDs: a review of their current status. **Drug Safety**, v. 24, p. 801-811, 2001.

FLEMSTRÖM, G.; ISENBERG, J. I. Gastroduodenal mucosal alkaline secretion and mucosal protection. **News Physiological Science**, v. 16, p.23-28, 2001.

FREIRE, M. O. Estudo fitoquímico e psicofarmacológico das raízes de *Maytenus obtusifolia* MART. (CELASTRACEAE). 1998, João Pessoa, **Dissertação** (mestrado) Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba.

GATÉ, L.; PAUL, J.; BA, G. N.; TEW, K. D. TAPIERO, H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 53, p.169-180, 1999.

GESSLER, M.C.; TANNER, M.; CHOLLE, J.; NKUNYA, M.H.H.; HEINRICH, M. Tanzanian medicinal-plants used traditionally for the treatment of malaria – *in vivo* antimalarial and *in vitro* cytotoxic activities. **Phytotherapy Research**, v. 9, p. 504-508, 1995.

- GLAVIN, G.; SZABO, S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanism of pathogenesis and new therapeutic strategies. **FASEB J.**, v. 6, p.825-831, 1992.
- GONZALES, F. G.; PORTELA, T. Y.; STIPP, E. J; DI STASI, L. C. Antiulcerogenic and analgesic effects of Maytenus aquifolian, Sorocea bamplandii and Zolernia ilicifolia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 41-47, 2001.
- GOWER, 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. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 284, p.G638–G645, 2003a.
- GOWER, W. R.; DIETZ, J. R.; MCCUEN, R. W.; FABRI, P. J.; LERNER, E. A.; Regulation of atrial natriuretic peptide secretion by cholinergic and PACAP neurons of the gastric antrum. **American Journal of Physiology- Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 284, p.G68–G74, 2003b.
- GRAHAM, D. Y. *Helicobacter pylori* infection in the pathogenesis of duodenal ulcer and gastric cancer: a model. **Gastroenterology**, v. 113, p. 1983–1991, 1997.
- GURBUZ, I.; USTUN, O.; YESILADA, E.; SEZIK, E.; AKYUREK, N. *In vivo* gastroprotective effects of five Turkish folk remedies against ethanol-induced lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, n. 3, p. 241-244, 2002.
- GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.
- GUTH, P. H. Current concepts in gastric microcirculatory pathophysiology. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 65, p. 677–688, 1992.
- HAGNER, S.; STAHL, U.; KNOBLAUCH, B. Calcitonin receptor-like receptor: identification and distribution in human peripheral tissues. **Cell and Tissue Research**, v. 310, p.41–50, 2004.
- HALTER, F.; TARNAWASKI, A. S.; SCHAMASSMANN, A.; PESKAR, B. M. Cyclooxygenase-2 expression on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issue and perspectives. **Gut**, v. 49, p. 443-453, 2001.

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. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 46, n. 12, p. 2708-2715, 2001.

HARBORNE, J. B.; BAXTER, H. *Handbook of Natural Flavonoids*, Wiley, Chichester, v. 2, 1999.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

HASSIG, A.; LIANG, W. X.; SCHWABL, H.; STAMPFLI, K. Flavonoids and tannins plant-based antioxidants with vitamin character. **Medical Hypotheses**, v. 52, p. 479-481, 1999.

HAVSTEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. Editora Manole Ltda., Barueri-SP, 20ª edição, p. 195, 2008.

HIROKAWA, M.; MIURA, S.; YOSHIDA, H.; KUROSE, I.; SHIGEMATSU, T.; HOKARI, R.; HIGUCHI, H.; WATANABE, N.; YOKOYAMA, Y.; KIMURA, H.; KATO, S.; ISHII, H. Oxidative stress and mitochondrial damage precedes gastric mucosal cell death induced by ethanol administration. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 22, n. 3, p. 111-114, 1998.

HIRUMA-LIMA, C. A.; CALVO, T. R.; RODRIGUES, C. M.; ANDRADE, F. D. P.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. M. S. Antiulcerogenic activity of Alchornea castaneaefolia: Effects on somatostatin, gastrin and prostaglandin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 215-224, 2006.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOLZER, P. Role of visceral afferent neurons in mucosal inflammation and defense. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 7, p. 563-569, 2007.

- HOU, W.; SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 22, p. 593-598, 2006.
- HUSAIN, S.S.; SZABO, I.L.; PAI, R. SOREGHAN, B.; JONES, M. K.; TARNAWSKI, A. S. MAP (ERK-2) kinase - a key target for NSAIDs-induced inhibition of gastric cancer cell proliferation and growth. **Life Sciences**, v. 69, p. 3045–3054, 2001.
- IVERSEN, P. O.; NICOLAYSEN, G. Water-for life. **Tidsskrift for den Norske Laegeforening**, v. 123, p. 3402–3405, 2003.
- JOFFILY, A., VIEIRA, R. C. Anatomia foliar de *Maytenus Mol.* Emend *Mol.* (Celastraceae), ocorrente no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, p. 549-561, 2005.
- JAIN, K. S.; SHAH, A. K.; BARIWAL, J.; SHELKE, S. M.; KALE, A. P.; JAGTAPC, J. R.; BHOSALE, A. V. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 1181-1205, 2007.
- JORDÃO-JÚNIOR, A. A.; CHIARELLO, P. G.; BERNARDES, M. M.; VANNUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutationa reduzida e da vitamina E. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 31, p. 434-449, 1998.
- JORGE, R. M.; LEITE, J. P.; OLIVEIRA, A. B.; TAGLIATI, C. A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 93-100, 2004.
- KAHRAMAN, A.; ERKASAP, N.; KOKEN, T.; SERTESER, M.; AKTEPE, F.; ERKASAP, S. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. **Toxicology**, v.183, p. 133-42, 2003.
- KANEKO, T.; BABA, N.; MATSUO, M. Protection of coumarins against linoleic acid hydroperoxide-induced cytotoxicity. **Chemico-biological Interactions**, v.142, p. 239-254, 2003.
- KATO, S.; OGAWA, Y.; KANATSU, K.; TAKEUCHI, K. Ulcerogenic influence of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in the rat stomach with adjuvant-induced arthritis. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 303, p. 503-509, 2002.

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. **American Journal of Physiology- Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.289, p.64-69, 2005.

KATO, S.; ITO, Y.; NISHIO, H.; AOI, Y.; AMAGASE, K.; TAKEUCHI, K. Increased susceptibility of small intestine to NSAID-provoked ulceration in rats with adjuvant-induced arthritis: Involvement of enhanced expression of TLR4. **Life Sciences**, v. 81, p. 1309-1316, 2007.

KAWANO, S.; TSUJI, S. Gastric mucosal protection and cell proliferation. Role of mucosal blood flow: a conceptional review in gastric mucosal injury and protection. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 15, p. D1-D6, 2000.

KAWASHIMA, K.; ISHIHARA, S.; RUMI, M. A. K. Localization of calcitonin generelated peptide receptors in rat gastric mucosa. **Peptides**, v. 23, p. 955–66, 2002.

KAY, H.; GRINDLE, K. M.; MAGNESS, R. R. Ethanol exposure induces oxidative stress and impairs nitric oxidative availability in the human placental villi: A possible mechanism of toxicity. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 182, p. 682-688, 2000.

KIMURA, M.; GOTO S.; IHARA, Y.; WADA, A.; YAHIRO, K.; NIIDOME, T. AOYAGI, H.; HIRAYAMA, T.; KONDO, T. Impairment of glutathione metabolism in human gastric epithelial cells treated with vacuolating cytotoxin from *Helicobacter pylori*. **Microbial pathogenesis**, v. 31, p. 29-36, 2001.

KINGHORN, A. D. The role of pharmacognosy in modern medicine. **Expert Opinion Pharmacotherapy**, v. 3, n. 2, p. 77-79, 2002.

KIRKPATRICK, P. Antibacterial drugs - Stitching together naturally. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 10, p. 748-748, 2002.

KLOUCEK, P.; SVOBODOVA, B.; POLESNY, Z.; LANGROVA, I.; SMRCEK, S.; KOKOSKA, L. Antimicrobial activity of some medicinal barks used in Peruvian Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 427-429, 2007.

KO, J. K.; CHO, C. H.; LAM, S. K. Adaptative cytoprotection through modulation of nitric oxide in ethanol-evoked gastritis. **World Journal Gastroenterology**, v. 1, p. 2503-2508, 2004.

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, S. J.; BRZOZOWSKI, T.; PIASTUCKI, I.; RADECKI, T.; DUPUY, D.; SZABO, S. Gastric mucosal protection by agents altering gastric mucosal sulfhydryls. **Digestion**, v. 37, p. 65-71, 1987.

KONTUREK, P. C.; KONTUREK, S. J.; CZESNIKIEWICZ, M.; PLONKA, M.; BIELANSKI, W. Interaction of *Helicobacter pylori* (Hp) and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) on gastric mucosa and risk of ulcerations. **Medicine Science Monitor**, v. 9, p. 197-209, 2002.

KONTUREK, P. C.; KONTUREK, J. S.; OCHMANSKI, W. Neuroendocrinology of gastric H⁺ and duodenal HCO₃⁻ secretion: the role of brain-gut axis. **European Journal of Pharmacology**, v. 499, p. 15-27, 2004.

KONTUREK, J. S.; KONTUREK, P. C.; PAWLIK, T.; SLIWOWSKI, Z.; OCHMANSKI, W.; HAHN, E. G. Duodenal mucosal protection by bicarbonate secretion and its mechanisms. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 55, p. 5-17, 2004.

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. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 316, p. 547-555, 2006.

KRÖNCKE, K. D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide: Cytotoxicity versus cytoprotection – How, Why, When, and Where? **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 1, p. 107-120, 1997.

KULAKSIZ, H.; ARNOLD, R.; GÖKE, B.; MARONDE, E.; MEYER, M.; FAHRENHOLZ, F.; FORSSMANN, W. G.; EISSELE, R. Expression and cell-specific localization of the cholecystokinin B/gastrin receptor in the human stomach. **Cell & Tissue Research**, v. 299, p. 289–298, 2000.

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. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 45-53, 2000.

LADEIRA, M. S. P.; SALVADOR, D. M. F.; RODRIGUES, M. A. M. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, p. 335-342, 2003.

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

LEE, S. Y.; SHIN, Y. W.; BAHAM, K. B. Phytoceuticals: Mighty but ignored weapons against *Helicobacter pylori* infection. **Journal of Digestive Diseases**, v. 9, p. 129 139, 2008.

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.

LEWIS, D. A.; SHAW, G. P. A natural flavonoid and synthetic analogues protect the gastric mucosa from aspirin-induced erosions. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, p. 95–100, 2001.

LI, P.; CHANG, T. M.; COY, D.; CHEY , W. Y. Inhibition of gastric acid secretion in rat stomach by PACAP is mediated by secretin, somatostatin, and PGE₂. **American Journal of Physiology- Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 278, p. G121-G127, 2000.

LICHTENBERGER, L. M. Gastroduodenal mucosal defense. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 15, p.463–472, 1999.

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. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, p. 1421–1428, 2006.

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. 2008, João Pessoa, 114 p. **Dissertação** (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba.

LIMA, J. T.; ALMEIDA, J.R.G.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; ASSIS, T.S.; SILVA, M.S.; DACUNHA, E.V.L.; BRAZ-FILHO, R.; SILVA, B.A. Spasmolytic action of diplotropin, a furanoflavan from *Diplotropis ferruginea* Benth., involves calcium blockade in ginea-pig ileum. **Zeitschrift fur Naturforschung B**, v. 60, p.1-8, 2005.

LIMA, Z. P.; SEVERI, J. A.; PELLIZON, C. H.; BRITO, A. R. M. S.; SOLIS, P. N.; CÁCERES, A.; GIRÓN, L. M.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. Can the aqueous decoction of mango flowers be used as an antiulcer agent? **Journal of Ethnopharmacology**, v.106, p.29-37, 2006.

LIO, E. S.; WONG, B. C.; CHO, C. H. Gastritis, gastric ulcer, gastric metaplasia: clinical and experimental studies. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 16, p. 740-746, 2001.

LUCA, C.; MONACHE, F. D.; MARINI-BETTOLO, G. B. Triterpenoid quinones of *Maytenus obtusifolia* and *Maytenus boaria*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 9, p 208-209, 1978.

LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT'ANA, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 199-206, 2005.

MAITY, P.; BISWAS, K.; ROY, S.; BANERJEE, R. K.; BANDYOPADHYAY, U. Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer-recent mechanistic update. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.253, p.329-338, 2003.

MAJUMDAR, D.; BEBB, J.; ATHERTON, J. *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcers. **Medicine**, v. 35, p. 204-209, 2007.

MALINOWSKA, D. H.; SHERRY, A. M.; TEWARI, K. P.; CUPPOLETTI, J. Gastric parietal cell secretory membrane contains PKA- and acid-activated Kir2.1 K⁺ channels. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v. 286, p. C495-C506, 2004.

MARTIN, M. J.; JIMENEZ, M. D.; MOTILVA, V. New issues about nitric oxide and its effects on the gastrointestinal tract. **Current Pharmaceutical Design**, v. 7, p. 881-908, 2001.

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 ethanolinduced gastric mucosal lesion in rats. **Life Sciences**, v. 65, p. 27-32, 1999.

MEDEIROS, V. M. Isolamento e Caracterização Estrutural dos Constituintes Químicos de *Maytenus obtusifolia* Mart.(Celastraceae). 2007, João Pessoa, 190 p.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba.

MELO, S. F.; SOARES, S. F.; DA COSTA, R. F.; DA SILVA, C. R.; DE OLIVEIRA, M. B.; BEZERRA, R. J.; CALDEIRA-DE-ARAUJO, A.; BERNARDO-FILHO, M. Effect of the *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. **Mutation Research**, v. 496, p. 33-38, 2001.

MILLER, M. J. S.; WALLACE, J. L. Nitric oxide and mucosal defense: a little goes a long way. **Gastroenterology**, v. 119, p. 512–520, 2000.

MINCIS, M. **Gastroenterologia & Hepatologia: diagnóstico e tratamento**. 3^a edição revista e ampliada. São Paulo. Ed. Lemos. p. 960, 2002.

MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanolinduced gastric lesions in rats. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 33, p. 939–945, 1983.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. S193–S201, 2006.

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.; RODRIGUES, C.; KUSHIMA, H.; BAUAB, T.; VILLEGRAS, W.; PELLIZZON, C.; BRITO, A.; HIRUMALIMA, C. *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 161-168, 2008.

MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; SUKAMOTO, T. Effects of the new antiulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal dafensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. **JPN Journal of Pharmacology**, v. 57, p. 495-505, 1991.

MÖSSNER, J.; CACA, K. Developments in the inhibition of gastric acid secretion. **European Journal of Clinical Investigation**, v.35, p.469-475, 2005.

MURAKAMI, S.; MURAMATSU, M.; OTOMO, S. Gastric H⁺,K⁺-ATPase inhibition by catechins. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 44, 926–928 1992.

NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Molecular and cellular mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation and oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, p. 323-336, 2002.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

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

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 A_{2A} receptor agonist, ATL-146e, attenuates stress-induced gastric lesions in rats. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 20, p. 275-280, 2005.

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

OKABE, S.; AMAGASE, K. An Overview of Acetic Acid Ulcer Models - The History and State of the Art of Peptic Ulcer Research. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 8, p. 1321-341,2005.

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

OLIVEIRA, A. F. M.; NEGRI, G.; KATO, M. J.; SALATINO, A. Friedelan-3b-ol, na Abundant Foliar Triterpene of *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). **Bollettino Chimico Farmaceutico**, v.138, p.186-189, 1999.

OLIVEIRA, A. F. M., SALATINO, A. Major constituents of the epicuticular waxes of species from the caatinga and Cerrado. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 55, p. 688-692, 2000.

OMENA, M. L. R. A. Ensaio etnofarmacológico de spécies vegetais com ação no sistema nervoso central, originárias do bioma caatinga. **Saúde Ambiente Revista**, v. 2, p. 92-107, 2007.

OTAKÉ, T.; MORI, H.; MORIMOTO, M.; NAMBA, T.; OTAK, T.; SUTARDJO, S.; UEBA, N. Screening of Indonesian plant extracts for anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) activity. **Phytotherapy Research**, v. 9, p. 6-10, 1995.

PAI, R.; SZABO, I. L.; GIAP, A. Q.; KAWANAKA, H.; TARNAWSKI, A. S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit re-epithelialization of wounded gastric monolayers by interfering with actin, Src, FAK, tensin signaling. **Life Sciences**, v. 69, p. 3055–3071, 2001.

PATEL, Y. C.; GREENWOOD, M.; PANETTA, R.; HUKOVIC, N.; GRIGORAKIS, S.; ROBERTSON, L. A.; SRIKANT, C. B. Molecular biology of Somatostatin receptor subtypes. **Metabolism**, v. 45, p. 31–38, 1996.

PAWLIK, T.; KONTUREK, P.C.; KONTUREK, J. W.; KONTUREK, S.J.; BRZOZOWSKI, T.; CZESNIKIEWICZ, M.; PLONKA, M.; BIELANSKI, W.; ARENY, H. Impact of *Helicobacter pylori* and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on gastric ulcerogenesis in experimental animals and in humans. **European Journal of Pharmacology**, v. 449, p. 1-15, 2002.

PEREZ-VICTORIA, J. M.; TINCUSI, B. M.; JIMENEZ, I. A.; BAZZOCCHI, I. L.; GUPTA, M. P.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F.; RAVELO, A. G. New natural sesquiterpenes as modulators of daunomycin resistance in a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 4388-4393, 1999.

PESKAR, B. M.; GUNTER, B.; PESKAR, B. A. Prostaglandins and prostaglandin metabolites in human gastric juice. **Prostaglandins**, v. 20, p. 419–427, 1980.

PHILLIPSON, M.; ATUMA, C.; HENRIKSNA, S. J.; HOLM, L. The importance of mucus layers and bicarbonate transport in preservation of gastric juxtamucosal pH. **American Journal of Physiology- Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 282, p. G211–G219, 2002.

POHLE, T.; BRZOZOWSKI, T.; BECKER, J. C.; VAN DER VOORT, I. R.; MARKMANN, A.; KONTUREK, S. J.; MONCZEWSKI, A.; DOMSCHKE, W.; KONTUREK, J. W. Role of reactive oxygen metabolites in aspirin-induced gastric damage in humans: gastroprotection by vitamin C. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 15, p. 677-687, 2001.

PRADOS, C. M. A.; MIQUEL, D. B. Úlcera péptica. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, v. 96, p.81-92, 2004.

- PRUETT, S. B. Stress and the immune system. **Pathophysiology**, v. 9, p.133-153, 2003.
- PUSCAS, I.; PUSCAS, C.; COLTAU, M.; PASCA, 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 piroxicaminduced 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-3b-ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 465-468, 2000.
- RADOSZ-KOMONIEWSKA, H.; BEK, T.; JÓZWIAK, J.; MARTIROSIAN, G. Pathogenicity of *Helicobacter pylori* infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, p. 602-610, 2005.
- RAFFA, R.B., RAWLS, S.M., BEYZAROV, E.P. **Atlas de Farmacologia de Netter**. Artmed. Porto Alegre, Brasil, p. 169-190, 2006.
- RAINSFORD, K. D. The ever-emerging anti-inflammatories. Have there been any real advances? **Journal of Physiology – Paris**, v. 95, p.11-19, 2001.
- RAMAKRISHNAN, K.; SALINAS, R. C. Peptic Ulcer Disease. **American Family Physician**, v. 76, p. 1005-1012, 2007.
- RASTOGI, L.; PATNAIK, G. K.; DIKHIT, M. Free radicals and antioxidant status following pylorus ligation inducedgastric mucosal injury in rats. **Pharmacological Research**, v. 38, n. 2, p.125-132, 1998.
- RATES, S. M. K. Plants as source drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.
- RAVEL, R. **Laboratório clínico: aplicações clínicas dos dados laboratoriais**. Rio de Janeiro: editora Guanabara Koogan, 6^a Edição, 1997.
- 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. **Scientia Pharmaceutica**, v. 70, p. 135–145, 2002.

REPETTO, M. G.; LLESUY, S. L. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 5, p. 523-534, 2002.

ROEPKE, T. K.; ANANTHARAM, A.; KIRCHHOFF, P.; BUSQUE, S. M.; YOUNG, J. B.; GEIBEL, J. P.; LERNER, D. J.; ABBOTT, G. W. The KCNE₂ potassium channel ancillary subunit is essential for gastric acid secretion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 23740–23747, 2006.

ROSTOM, A; MUIR, K. DUBE, C.; JOLICOEUR, E.; BOUCHER, M.; JOYCE, J.; TUGWELL, P.; WELLS, G. Gastrointestinal safety of cyclooxygenase-2 inhibitors: a Cochrane Collaboration Systematic Review. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 5, p. 818–828, 2007.

ROVER, L.; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. Antioxidant system involving the glutathione metabolic cycle associated to electroanalytical methods in the oxidative stress evaluation. **Química Nova**, v. 24, p. 112-119, 2001.

RUSSO, A.; ACQUAVIVA, R.; CAMPISI, A.; SORRENTI, V.; DI GIACOMO, C.; VIRGATA, G.; BARCELLONA, M. L.; VANELLA, A. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. **Cell Biology and Toxicology**, v. 16, p. 91-98, 2000.

SACHS, G.; ZENG, N. X.; PRINZ, C. Physiology of isolated gastric endocrine cells. **Annual Review of Physiology**, v. 59, p. 243–256, 1997.

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

SALASPURO, M. P. Alcohol consumption and cancer of the gastrointestinal tract. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v.17, p.679-694, 2003.

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

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. 2008, João Pessoa, 121 p. **Tese** (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba.

SANTOS, V. L.; COSTA, V. B. M.; AGRA, M. F.; SILVA, B. A.; BATISTA, L. M. Pharmacological studies of ethanolic extracts of *Maytenus rigida* Mart (Celastraceae) in animal models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 336-342, 2007.

SAZIKI, R.; KYOGOKU, K.; HATAYAMA, K.; SUWA, T.; SAWADA, J. Anti-ulcer activities of su-88, a compound related to sophoradin isolated from guang-dou-gen. **Journal of Pharmacobio-dynamics**, v. 6, p. S-59, 1983.

SAZIKI, R.; ARAI, I.; ISOBE, Y.; HIROSE, H.; AIHARA, H. Effects of sofalcone on necrotizing agents-induced gastric lesions and on endogenous prostaglandins in rat stomachs. **Journal of Pharmacobio-dynamics**, v. 7, p. 791-797, 1984.

SCARPIGNATO, C.; PELOSINI, I.; DI MARIO, F. Acid Suppression Therapy: Where Do We Go from Here? **Digestive Disease**, v. 24, p. 11-46, 2006.

SCHMASSMANN, A. Mechanisms of ulcer healing and effects of nosteroidal anti-inflammatory drugs. **The American Journal of Medicine**, v. 104, p. 43S-51S, 1998.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; YESILADA, E. Tradicional medicine and gastroprotective crude drugs. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 61-66, 2005.

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

SCHUBERT, M. L. Stomach and duodenum. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 22, p. 591-592, 2006.

SCHUBERT, M. L.; PEURA, D. A. Reviews in basic and clinical gastroenterology. **Gastroenterology**, v. 134, p. 1842-1860, 2008.

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. **Gastroenterology**, v. 5, p. 43-61, 1945.

SHIN, V. Y.; LIU, E. S. L.; KOO, M. W. L.; WANG, J. Y.; MATSUI, H.; CHO, C. H. Cigarette smoke extracts delay wound healing in the stomach: involvement of polyamine synthesis. **Experimental Biology and Medicine**, v. 227, p. 114-124, 2002.

SIKIRIC, P.; SEIWERTH, S.; GRABAREVIC, Z.; RUCMAN, R.; PETEK, M.; JAGIĆ, V.; TURKOVIĆ, B.; ROTKVIĆ, I.; MISE, S.; ZORICIĆ, I.; KONJEVODA, P.; PEROVIĆ, D.; JURINA, L.; SEPAROVIĆ, J.; HANZEVACKI, M.; ARTUKOVIĆ, B.; BRATULIĆ, M.; TISLJAR, M.; GJURASIN, M.; MIKLIĆ, P.; STANIĆ-ROKOTOV, D.; SLOBODNJAK, Z.; JELOVAC, N.; MAROVIĆ, A. 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. **European Journal Pharmacology**, v. 332, p. 23-33, 1997.

SILVA, J. L.; SILVA, R. P.; JORGE, R. M.; SILVA, F. G. D.; VIEIRA FILHO, S. A.; FONSECA, A. P. N. D.; TAGLIATI, C. A. Avaliação da atividade antiulcerogênica da *Maytenus truncata* Reiss (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 30-35, 2005.

SILVA, M. S.; DE SOUSA, D. P.; MEDEIROS, V. M.; FOLLY, M. A. B.; TAVARES, J. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Alkaloid, flavonoids, and pentacyclic triterpenoids of *Maytenus obtusifolia* Mart. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 500-503, 2008.

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.

SOUSA, D. P.; ALMEIDA, R. N. Neuroleptic-like properties of the chloroform extract of *Maytenus obtusifolia* Mart. roots. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, p 224-225, 2005.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, Go, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, p. 135-142, 2006.

SOUZA-BRITO, A. R. **Manual De Ensaios Toxicológicos "In Vivo"**. Campinas - SP: Editora UNICAMP, 1994. p. 122.

SOUZA-BRITO, A. R. M. How to study the pharmacology of medicinal plants in underdeveloped countries. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 54, p. 131-138, 1996.

SOUZA-FORMIGONI, M. L. O.; OLIVEIRA, M. G. M.; MONTEIRO, M. G.; SILVEIRA FILHO, N. G.; BRAZ, S.; CARLINI, E. L. A. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* Species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, p. 21-28, 1991.

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

SRIKANTA, B. M.; SIDDARAJU, M. N.; DHARMESH, S. M. A novel phenol-bound pectic polysaccharide from *Decalepis hamiltonii* with multi-step ulcer preventive activity. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n.13 (39), p. 5196-5207, 2007.

STEVENS, P. F., 2001. **Angiosperm Phylogeny Website. Version 7**. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Acesso em Janeiro de 2009.

STOICOV, C.; SAFFARI, R.; CAI X.; HASYAGAR, C.; HOUGHTON, J. Molecular biology of gastric cancer: Helicobacter infection and gastric adenocarcinoma: bacterial and host factors responsible for altered growth signaling. **Gene**, v. 341, p. 1-17, 2004.

SUGIMOTO, Y.; NARUMIYA, S.; ICHIKAWA, A. Distribution and function of prostanoid receptors: studies from knockout mice. **Progress in Lipid Research**, v. 39, n. 4, p. 289-314, 2000.

SZABO, S.; TRIER, J. S., FRANKEL, P. W. Sulphydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. **Science**, v. 214, p. 200-202, 1981.

SZABO, S. Mechanism of mucosal injury in the stomach and duodenum: time-sequence analysis of morphologic, functional biochemical and histochemical studies. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 127, p. 21-28, 1987.

SZABO, S.; VINCZE, A. Growth factors in ulcer healing: Lessons from recent studies. **Journal of Physiology - Paris**, v. 94, p. 77-81, 2000.

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

TAKAGI, K.; OKABE, S.; SAZIKI, R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. **JPN Journal of Pharmacology**, v. 19, p.418-426, 1969.

TAKAHASHI, S.; TAKEUCHI, K.; OKABE, S. EP₄ receptor mediation of prostaglandin E₂-stimulated mucus secretion by rabbit gastric epithelial cells. **Biochem Pharmacol**, v. 58, p. 1997–2002, 1999.

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. **Journal of Physiology - Paris**, v. 93, p. 423-431, 1999.

TAKEUCHI, K.; KOMOIKE, Y.; TAKEEDA, M.; UKAWA, H. Gastric mucosal ulcerogenic responses following barrier disruption in knockout mice lacking prostaglandin EP₁ receptors. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 16, p. 74-82, 2002.

TAKEZONO, Y.; JOH, T.; OSHIMA, T.; SUZUKI, H.; SENO, K.; YOKOYAMA, Y.; ALEXANDER, J. S.; ITOH, M. Role of prostaglandins in maintaining gastric mucus-cell permeability against acid exposure. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 143, p. 52-58, 2004.

TANAKA, K.; TSUTSUMI, S.; ARAI, Y.; HOSHINO, T.; SUZUKI, K.; TAKAKI, E.; ITO, T.; TAKEUCHI, K. NAKAI, A.; MIZUSHIMA, T. Genetic evidence for a protective role of heat shock factor 1 against irritant-induced gastric lesions. **Molecular Pharmacology**, v. 71, p. 985-993, 2007a.

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. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 52, p. 478-487, 2007b.

TARNAWSKI, A.; SZABO, I. L.; HUSAIN, S. S.; SOREGHAN, B. Regeneration of gastric mucosa during ulcer healing is triggered by growth factors and signal transduction pathways. **Journal of Physiology - Paris**, v. 95, n. 1-6, p. 337-344, 2001.

TARNAWSKI, A. S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, p. 24-33, 2005.

TAYLOR, J. L. S.; RABE, T.; McGAW, L. J.; JÄGER, A. K.; VAN STADEN, J. Towards the scientific validation of traditional medicinal plants. **Plant Frown Regulation**, v. 34, p. 23-37, 2001.

TEO, S.; STIRLING, D.; THOMAS, S.; HOBERMAN, A.; KIORPES, 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.

The Organization of Economic Co-operation Development (OECD), 2001. The OECD Guideline for Testing of Chemical: 425 Acute Oral Toxicity. **OECD**, Paris, pp. 1–26.

TIBERTI, L. A.; JANETE H. YARIWAKE, J. H.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. **Journal of chromatography B.**, v. 846, p 378-384, 2007.

TOMA, W.; TRIGO, J. R.; PAULA, A. C. B.; SOUZA-BRITO, A. R. M. Modulation of gastrin and epidermal growth factor by pyrrolizidine alkaloids obtained from *Senecio brasiliensis* in acute and chronic induced gastric ulcers. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 82, p. 319-325, 2004.

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

VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VELLOSA, J. C. R.; KHALIL, N. M.; FORMENTON, V. A. F.; XIMENES, V. F.; FONSECA L. M.; FURLAN, M.; BRUNETTI, I. L.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Antioxidante activity of *Maytenus ilicifolia* root bark. **Fitoterapia**, v. 77, p 243-244, 2006.

WALLACE, J. L. Pathogenesis of NSAID-induced gastroduodenal mucosal injury. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v.15, p.691-703, 2001.

WALLACE, J. L.; DICAY, M.; MCKNIGHT, W.; DUDAR, G. K. Platelets accelerate gastric ulcer healing through presentation of vascular endothelial growth factor. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, p. 274–278, 2006.

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

WILLIAMS, C. A.; GRAYER, R. J. Anthocyanins and other flavonoids. **Natural Product Reports**, v. 21, p. 539–573, 2004.

- WOLFE, M. M.; SACHS, G. Acid suppression: Optimizing therapy for gastrroduodenal ulcer healing, gastroesophageal reflux disease, and stress-related erosive syndrome. **Gastroenterology**, v. 118, p. s9-s31, 2000.
- 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. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 318, p. 547–554, 2006.
- YAO, X.; FORTE, J. G. Cell biology of acid secretion by the parietal cell. **Annual Review of Physiology**, v. 65, p. 103-131, 2003.
- YU, H.; SATO, E. F.; MINAMIYAMA, Y.; ARAKAWA, T.; KOBAYASHI, K.; INOUE, M. Effect of nitric oxide stress-induced gastric mucosal injury in the rat. **Digestion**, v. 58, p. 311-318, 1997.
- YUAN, Y.; PADOL, I. T.; HUNT, R. H. Peptic ulcer disease today. **Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology**, v. 3, n. 2, p. 80-89, 2006.
- ZANNER, R.; HAPFELMEIER, G.; GRATZL, M.; PRINZ, C. Intracellular signal transduction during gastrin-induced histamine secretion in rat gastric ECL cells. **American Journal of Physiology- Cell Physiology**, v. 282, p.C374–C382, 2002.
- ZENG, N.; ATHMANN, C.; KANG, T.; LYU, R. M.; WALSH, J. H.; OHNING, G. V.; SACHS, G.; PISEGNA, J. R. PACAP type 1 receptor activation regulates ECL cells and gastric acid secretion. **Journal of Clinical Investigation**, v. 104, p. 1383–1391, 1999.
- ZHAO, C. M.; MARTINEZ, V.; PIQUERAS, L.; WANG, L.; TACHE, Y.; CHEN, D. Control of Gastric Acid Secretion in Somatostatin Receptor 2 Deficient Mice: Shift from Endocrine/Paracrine to Neurocrine Pathways. **Endocrinology**, v. 149, n. 2, p. 498-505, 2008.
- ZIMMERMAN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, p. 109-110, 1983.

ANEXOS

Protocolo utilizado na Triagem Farmacológica (AMEIDA et al., 1999)

Atividade farmacológica	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	até 30`	1 h	2 h	3 h	4 h
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras _____					
b – Depressora					
Hipnose					
Ptose					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
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 - SNA					
Diarréia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tono muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					

Observações complementares.: _____

Responsável Técnico

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)

[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)

[Baixar livros de Literatura Infantil](#)

[Baixar livros de Matemática](#)

[Baixar livros de Medicina](#)

[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)

[Baixar livros de Meio Ambiente](#)

[Baixar livros de Meteorologia](#)

[Baixar Monografias e TCC](#)

[Baixar livros Multidisciplinar](#)

[Baixar livros de Música](#)

[Baixar livros de Psicologia](#)

[Baixar livros de Química](#)

[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)

[Baixar livros de Serviço Social](#)

[Baixar livros de Sociologia](#)

[Baixar livros de Teologia](#)

[Baixar livros de Trabalho](#)

[Baixar livros de Turismo](#)