

CÉLIO DAMACENA DE ANGELIS



**AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO GÁSTRICA E DUODENAL DO
MONOTERPENO NEROL EM ROEDORES**

Botucatu - SP
2012

CÉLIO DAMACENA DE ANGELIS

**AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO GÁSTRICA E DUODENAL DO
MONOTERPENO NEROL EM ROEDORES**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Farmacologia.

ORIENTADORA: PROF^a. ADJ. CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA
CO-ORIENTADORA: PROF^a. DR^a LÚCIA REGINA MACHADO DA ROCHA

Botucatu - SP
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Angelis, Célio Damacena de.

Avaliação da proteção gástrica e duodenal do monoterpene nerol em roedores / Célio Damacena de Angelis. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Clélia Akiko Hiruma-Lima

Capes: 21000000

1. Farmacologia. 2. Estômago – Úlceras. 3. Glutathione.

Palavras-chave: Compostos sulfidrilicos; Droga anti-inflamatória não-esteróide; Gastroproteção; Glutathione; Mieloperoxidase; Nerol; Úlcera gástrica.

BANCA EXAMINADORA - DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MEMBROS TITULARES:

Prof. Dr. Clélia Akiko Hiruma-Lima (orientadora)

Prof. Dr. Elfriede Marianne Bacchi

Prof. Dr. Cláudia Helena Pellizzon

DATA: 03 / 05 / 2012

AUXILIO FINANCEIRO

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Processo: 2009/54603-2

DEDICATÓRIA

Esse trabalho é dedicado a Deus. Ele me trouxe até Botucatu e me sustentou, foi o meu refúgio e a minha esperança.

Gostaria de manifestar minha gratidão:

Aos meus pais por serem tão presentes na minha vida e terem vindo de São Vicente para que nossa família estivesse junta

Ao meu irmão, que escolheu trabalhar em Botucatu para que ficássemos juntos e foi meu amigo, companheiro, confidente, conselheiro...

À professora Clélia pela dedicação na orientação e pelo empenho e apoio no desenvolvimento da minha dissertação.

Ao professor Walber que me indicou para a professora Clélia e incentivou para que eu viesse fazer mestrado.

Aos parentes e amigos que fizeram parte da minha vida neste período. Paulo e sua família que cuidaram em de mim em Bauru quando estive doente, amigos da Aliança Bíblica Universitária, da Igreja Presbiteriana Independente, do grupo Timóteo de estudo bíblico, do Laboratório de Ensaio Biológicos com Produtos Naturais e da pós-graduação, da cidade de Bauru e da igreja Cristo é a resposta em Santos.

AGRADECIMENTOS

À Professora Adjunto Clélia Akiko Hiruma-Lima pela orientação.

À Professora Profa. Dra. Lúcia Regina Machado da Rocha por auxiliar na orientação.

À doutorando em Ciências Biológica/Farmacologia, Raquel de Cássia dos Santos pelo acompanhamento e orientação nos experimentos.

Aos alunos do Laboratório de Ensaio Biológicos com Produtos Naturais e ao técnico Hélio Kushima pelo auxílio nos experimentos e discussão de resultados.

Aos servidores do Departamento de Fisiologia Junior Vidotti e Lilian Morceli pelo manutenção do biotério e cuidado dos animais.

Ao Professor Doutor Luiz Claudio Di Stasi e aos seus alunos pela disponibilidade de materiais e de equipamentos do laboratório de fitomedicamentos e auxílio nos experimentos.

Ao Professor Doutor André Sampaio Pupo e ao seu aluno de doutorado Luiz Ricardo de Almeida Kiguti por disponibilizar o laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular do Departamento de Farmacologia e realizar o experimento de bloqueio de canais de cálcio.

Ao mestrando em Ciências Biológica/Farmacologia Alexandre Tanimoto pela tradução português-inglês do resumo

Às agências de fomento Fapesp, e Capes pelo auxílio financeiro

Ao Instituto de Biociências e ao Departamento de Fisiologia pelo espaço cedido

PRÓLOGO

A finalização da presente dissertação simboliza o aprendizado adquirido durante o curso de pós-graduação em Ciências Biológicas na sub-área de Farmacologia, que vão além dos resultados aqui apresentados. As atividades realizadas neste período permitiram que fossem acrescentadas à formação conhecimentos mais aprofundados principalmente de farmacologia e metodologia científica, mas não ficando limitados a estes, visto o caráter multidisciplinar do programa de pós-graduação e dos estudos em farmacologia. A seguir estão apresentadas as atividades realizadas durante o curso:

Trabalhos apresentados em congressos nacionais e internacionais

- Angelis, C.D.; Rocha, L.R.M.; Sousa, D.; Hiruma-Lima, C.A. Gastroprotective effect of monoterpene Nerol in Rats. 8º Congresso Internacional de Ciências Farmacêuticas – CIFARP realizado em Ribeirão Preto de 21 a 24 de agosto de 2011.

- Angelis, C.D., Rocha, L.R.M., Sousa, D.P., Hiruma-Lima, C.A. Avaliação dos mecanismos gastroprotetores e da atividade cicatrizante do monoterpene nerol em ratos Wistar. no I Simpósio de Farmacologia da Unesp (SIMFAR) realizados em Botucatu-SP nos dias 3 e 4 de junho de 2011

- Silva, L.P.; Angelis, C.D., Rinaldo, D.; Vilegas, W.; Hiruma-Lima, C.A.; Toma, W. Phytochemical analysis of ethanolic extract from *Terminalia catappa* L. leaves and its correlation with gastroprotection. 42º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental realizado em Ribeirão Preto-SP de 18 a 21 de outubro de 2010.

- Silva, L.P.; Angelis, C.D.; Carvalho, K.I.M.; Bonamin, F.; Rocha, L.M.R.; Toma, W.; Hiruma-Lima, C.A. Gastroprotective action of fractions obtained from *Terminalia catappa* L. (Combretaceae) leaves ethanolic extract. 8º Congresso Internacional de Ciências Farmacêuticas – CIFARP realizado em Ribeirão Preto de 21 a 24 de agosto de 2011.

Disciplinas cursadas:

- Abordagem Estatística em Farmacologia I – Fundamentos – (1 crédito, 15 horas-aula)
- Abordagem Estatística em Farmacologia II – Aplicabilidade – (2 créditos, 30 horas-aula)
- Farmacocinética – (3 créditos - 45 horas – aula)
- Farmacologia do Sistema Nervoso Autônomo Simpático – (3 créditos, 45 horas-aula)
- Métodos Biofísicos de Avaliação da Motilidade Gastrointestinal – (4 créditos, 60 horas-aula)
- Tópicos de Atualização em Ciências – (2 créditos, 30 horas-aula)
- Farmacologia de plantas medicinais com atividade antinociceptiva (analgésica) e/ou anti-inflamatória – (2 créditos, 30 horas-aula)
- Farmacologia Celular e Molecular da Junção Neuromuscular – (3 créditos, 45 horas-aula)

Participações em eventos científicos

- 8º Congresso Internacional de Ciências Farmacêuticas – CIFARP realizado em Ribeirão Preto-SP de 21 a 24 de agosto de 2011.
- Workshop Colóquio Brasileiro em Química Medicinal realizado em Ribeirão Preto-SP de 20 a 21 de agosto de 2011 .
- 4º Simpósio de Imunologia – Imunobiologia de Tumores realizado em Botucatu-SP de 20 a 22 de maio de 2011
- QIAday sobre Análise de expressão gênica e mutação pontual por PCR em tempo real; pirosequenciamento; webportal de busca e informação de genes e vias metabólicas, extração automatizada de DNA de DNA, RNA e proteínas realizado em Botucatu dia 23 de agosto de 2010
- 7º Simpósio Biota, 7º Reunião de Avaliação do Programa Biota e 4º Reunião de Avaliação do Programa Bioprosecta realizado em São Carlos - SP de 3 a 10 de julho de 2011
- I Simpósio de Farmacologia da Unesp (SIMFAR) realizado em Botucatu-SP nos dias 3 e 4 de junho de 2011

Participações em cursos e mini-cursos:

- Curso de extensão universitária: toxicologia aplicada oferecido pelo Centro de Assistência toxicológica – Ceatox em Botucatu-SP de 21 a 26 de fevereiro de 2011
- Mini-curso Antioxidantes Naturais e Quimioprevenção oferecido durante o 7º Simpósio Biota, 7º Reunião de Avaliação do Programa Biota e 4º Reunião de Avaliação do Programa Bioprosecta em São Carlos – SP nos dias 4 e 5 de julho de 2011

Organização de Eventos

- Comissão de Apoio do IX Workshop da pós-graduação e X Workshop de genética do instituto de biociências de Botucatu realizado em Botucatu-SP de 13 a 15 de maio de 2010
- Comissão Organizadora do X Workshop da pós-graduação do Instituto de Biociências de Botucatu realizado em Botucatu-SP de 12 a 14 de maio de 2011

Extensão universitária

- Monitor do curso “Reprodução de A a Z” do programa de extensão universitária “Difundindo e Popularizando a Ciência na Unesp: Interação entre Pós-Graduação e Ensino Básico” realizado em Botucatu-SP de 24 a 29 de janeiro de 2011

Estágio

- Estágio de docência junto à disciplina de Farmacologia Geral ministrada ao Curso de Graduação em Medicina da Faculdade de Medicina de Botucatu no período de 26 de julho a 03 de dezembro de 2010

RESUMO

Este projeto se propôs a avaliar a ação farmacológica do nerol na prevenção de úlcera péptica. Nerol na dose de 60 mg/Kg por via oral exerceu proteção contra lesão gástrica induzida por etanol e por droga anti-inflamatória não esteróide (DAINE) em ratos, mas não protegeu contra úlcera duodenal induzida por cisteamina. Experimentos foram realizados para a elucidação dos mecanismos ação e verificou-se que a proteção exercida pelo Nerol não é por bloqueio dos radicais livres, por redução da secreção gástrica ou por aumento de muco, sua ação também não ocorre por formação de barreira mecânica. Verificou-se, contudo, que houve redução da motilidade gastrointestinal, o que pode ser um indicativo de redução do esvaziamento gástrico, o que contribui para o efeito gastroprotetor. A redução da motilidade gastrointestinal assim como a redução do acúmulo intestinal exercido pelo nerol foi revertida pela administração de naloxona (antagonista de receptores opióides), indicando, portanto, o envolvimento destes receptores. Através do bloqueio de fatores protetores da mucosa gástrica, verificou-se que a gastroproteção exercida pelo nerol é independente da via do óxido nítrico, de prostaglandinas e dos receptores mu opióides, porém, é dependente de compostos sulfidrílicos. Mostrou-se através da quantificação dos níveis de glutathiona (GSH) e da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) que o tratamento com nerol mantém os níveis de compostos sulfidrílicos não-protéicos e reduz a infiltração de neutrófilos na mucosa gástrica em animais com lesão gástrica induzida por etanol. A administração aguda de nerol (doses de 60, 300, 600, 1250, 2500 ou 5000 mg/Kg) não provocou mortes nem alterações significantes nos parâmetros comportamentais até a dose de 600 mg/Kg. Neste trabalho portanto, ficou evidenciado o efeito gastroprotetor do nerol frente a úlcera gástrica induzida por etanol e por DAINE, e a dependência de compostos sulfidrílicos. O envolvimento de receptores opióides e a redução da motilidade gastrointestinal na gastroproteção necessitam ser investigados de maneira mais específicas uma vez que o antagonista opióide utilizado é mais seletivo para receptores mu (μ) e não foi possível afirmar com os métodos utilizados em qual região do trato gastrointestinal houve redução da motilidade.

Palavras chave: nerol; gastroproteção; úlcera gástrica; droga anti-inflamatória não-esteróide; compostos sulfidrílicos; mieloperoxidase; glutathiona.

ABSTRACT

The present project proposed to evaluate the pharmacologic action of nerol in the prevention of peptic ulcer. It was seen that 60 mg/kg (p.o.) of nerol prevented gastric lesions induced by ethanol and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) in rats, however nerol did not protect duodenal mucosa against cysteamine. Assays were performed to elucidate the mechanisms of action and it was found that protection exerted by Nerol does not block free radicals, nor decrease gastric acid secretion nor increase mucus, its action is not by creating a mechanical barrier. However, it was found that nerol reduced gastrointestinal motility, this might be an indication of slower gastric emptying that contributes to the gastric protective effect. Reduction of gastrointestinal motility, as well as the reduction of intestinal accumulation exerted by nerol, was reversed by naloxone administration (antagonist of opioid receptors), therefore indicating involvement of the cited receptors. By blocking protective factors of gastric mucosa, it was verified that nerol's gastroprotective effect does not involve nitric oxide, prostaglandin nor mu opioid receptors, but is dependent of sulfhydryl compounds. It was shown by quantifying glutathione levels (GSH) and myeloperoxidase (MPO) action that treatment with nerol keeps the levels of non-proteinic sulfhydryl compounds and decreases the neutrophil infiltration into the gastric mucosa in animals with ethanol-induced gastric damage. Acute administration of nerol (60, 300, 600, 1250, 2500 and 5000 mg/Kg) presented no deaths, neither significant behavior changes to doses of 60, 300 and 600 mg/kg. In this work, nerol showed a gastroprotective effect against ethanol- and indomethacin-induced lesions, and the dependence of sulfhydryl compounds. The involvement of opioid receptors and the gastrointestinal motility reduction need to be investigated more specifically because the opioid antagonists used are more selective to mu (μ) receptors and it can not tell by methods used the region of the gastrointestinal tract that there was motility reduction.

Key words: nerol, gastroprotection, gastric ulcer, non-steroidal anti-inflammatory drugs, sulfhydryl compounds, myeloperoxidase, glutathione.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

I - INTRODUÇÃO	15
II - OBJETIVO	19
II.1 - GERAL	19
II.2 - ESPECÍFICOS	19
III - MATERIAIS E MÉTODOS	20
III.1 - ANIMAIS	20
III.2 - DROGAS UTILIZADAS	20
III.3 - AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA	20
III.3.1 - ATIVIDADE GASTROPROTETORA	20
III.3.1.A - LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL	21
III.3.1.B - LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR DROGA ANTI-INFLAMATÓRIA NÃO-ESTEROIDE (DAINE)	21
III.3.1.C - TESTE DE FORMALINA	21
III.3.1.D - LESÃO DUODENAL INDUZIDA POR CISTEAMINA	22
III.3.1.E - LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO ...	22
III.3.2 - CARACTERIZAÇÃO DO MECANISMO GASTROPROTETOR	22
III.3.2.A - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SISTÊMICA	22
III.3.2.B - AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS GÁSTRICO APÓS LIGADURA DO PILORO	22
III.3.2.C - DETERMINAÇÃO DE MUCO ADERIDO	23
III.3.2.D - ENVOLVIMENTO DE PROSTAGLANDINA	23
III.3.2.E - ENVOLVIMENTO DA SINTESE DE ÓXIDO NÍTRICO	23
III.3.2.F - ENVOLVIMENTO DE COMPOSTOS SULFIDRILICOS	24
III.3.2.F.1 - DOSAGEM DE GLUTATIONA	24
III.3.2.F.2 - ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE	24
III.3.2.G - MOTILIDADE GASTROINTESTINAL	25
III.3.2.G.1 - DIARRÉIA INDUZIDA POR ÓLEO DE RÍCINO	25
III.3.2.G.2 - BLOQUEIO DE CANAIS DE CÁLCIO VOLTAGEM DEPENDENTES	25
III.3.2.G.3 - ACÚMULO DE FLUÍDO INTESTINAL	26

III.3.2.G.4 – ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES OPIÓIDES NA REDUÇÃO DA MOTILIDADE GASTROINTESTINAL	26
III.3.2.H - ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES OPIÓIDES NA GASTROPROTEÇÃO	26
III.3.2.I - ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES OPIÓIDES NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO	27
III.4 - TOXICIDADE AGUDA E SCREENING HIPOCRÁTICO	27
III.5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
IV - RESULTADOS.....	29
IV.1 - ATIVIDADE GASTROPROTETORA.....	29
IV.1.A - LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL	29
IV.1.B - LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR DAINE	30
IV.1.C - TESTE DE FORMALINA.....	32
IV.1.D - LESÃO DUODENAL INDUZIDA POR CISTEAMINA.....	33
IV.1.E - LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO	34
IV.2 - CARACTERIZAÇÃO DE MECANISMO GASTROPROTETOR	35
IV.2.A - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SISTÊMICA	35
IV.2.B - LIGADURA DO PILORO	36
IV.2.C - MUCO ADERIDO À MUCOSA GÁSTRICA.....	37
IV.2.D - ENVOLVIMENTO DE PROSTAGLANDINA.....	38
IV.2.E - ENVOLVIMENTO DA VIA DO ÓXIDO NÍTRICO.....	39
IV.2.F - ENVOLVIMENTO DE COMPOSTOS SULFIDRÍLICOS	40
IV.2.F.1 – DOSAGEM DE GLUTATIONA	41
IV.2.F.2 – ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE	42
IV.2.G - MOTILIDADE GASTROINTESTINAL	43
IV.2.G.1 - DIARRÉIA INDUZIDA POR ÓLEO DE RÍCINO	43
IV.2.G.2 - BLOQUEIO DE CANAIS DE CÁLCIO	44
IV.2.G.3 - ACÚMULO FLUÍDO INTESTINAL.....	45
IV.2.G.4 - ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES OPIÓIDES NA MOTILIDADE GASTROINTESTINAL	46
IV.2.H - ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES OPIÓIDES NA GASTROPROTEÇÃO	47
IV.2.I. ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES OPIÓIDES NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO	48

IV.3 - TOXICIDADE AGUDA E SCREENING HIPOCRÁTICO.....	49
V - DISCUSSÃO	54
VI - CONCLUSÃO	65
VII - REFERÊNCIAS	66
VIII - ANEXO.....	72

I - INTRODUÇÃO

O estômago é continuamente exposto a substâncias de diferentes temperaturas, pH e osmolaridade, além de substâncias com ações detergentes ou citotóxicas, como exemplo componentes bacterianos capazes de causar reação inflamatória local e sistêmica (Wallace, 2008). Contudo, a mucosa gástrica possui diversos níveis de defesa que vão desde o lúmen até as camadas mais profundas do tecido, que impedem que estes fatores danifiquem a mucosa ao ponto de causar uma alteração de importância clínica (Wallace, 2008). Por outro lado, quando os fatores nocivos sobrepõem as defesas da mucosa ou quando os mecanismos de defesa da mucosa estão reduzidos, as lesões se instalam no local (Laine et al., 2008) e quando a defesa da mucosa é insuficiente para limitar estas lesões pode ocorrer uma rápida evolução para formação de úlceras (Wallace, 2008), que são lesões profundas que atingem a camada muscular da mucosa (Szabo e Szelenyi, 1987).

Fatores ligados ao ambiente ou ao hospedeiro contribuem para o aumento da secreção de ácido gástrico, pepsina ou enfraquecimento da barreira mucosa, sendo a formação de úlcera péptica (gástricas ou duodenais) associada a hipersecreção gástrica, estresse psicológico, fumo, consumo de álcool, uso de droga anti-inflamatória não-esteróide (DAINE), bifosfonatos orais, cloridrato de potássio, medicamentos imunossupressores, idade e infecção pela bactéria *H.pylori* (Yuan et al., 2006, Malfertheiner et al., 2009).

As úlceras pépticas têm sido uma grande ameaça para a população mundial nos últimos dois séculos causando morbidade e alta taxa mortalidade (Malfertheiner et al., 2009). Podem apresentar complicações severas como hemorragias, perfuração e raramente causar penetração nos órgãos retroperitoneais causando dores severas. (Malfertheiner et al., 2009).

Dados epidemiológicos mostram que existe uma grande variabilidade da prevalência desta doença de acordo com a região geográfica (Malfertheiner et al., 2009). Um estudo realizado na China entre os anos de 2000 e 2005 mostra que entre os pacientes dispépticos avaliados, 7,47% apresentaram úlcera duodenal e 7,07% úlcera gástrica (Wu et al., 2008). Nos países ocidentais, a úlcera gástrica é mais comumente associada com a ingestão de DAINÉ, embora infecção por *H.pylori* possa também estar presente (Yuan et al., 2006). Aproximadamente 1 em 10

americanos são afetados com úlcera péptica (Yuan et al., 2006). Estima-se que o financiamento anual com úlcera péptica nos Estados Unidos, incluindo custos diretos e indiretos, é de 3,4 bilhões de dólares (Yuan et al., 2006). Em estudo realizado no Hospital das Clínicas na cidade de São Paulo em 2005, foi diagnosticada a presença de úlcera péptica em 33,4% dos pacientes com dispepsia submetidos à endoscopia, sendo 26,5% com úlceras duodenais e 7% com úlceras gástricas (Marques et al., 2011). Considerando que as úlceras pépticas são comuns, principalmente entre os idosos, uma vez que as defesas gástricas estão reduzidas no envelhecimento (Laine et al., 2008), especula-se que seu impacto na saúde e na economia continuará sendo um fator importante no futuro (Yuan et al., 2006).

Segundo Chan e Leung (2002), embora admissões hospitalares por úlcera péptica não-complicada começaram a decair a partir de 1950 nos países em desenvolvimento, há um significativo aumento nas admissões por úlcera hemorrágicas e perfurantes entre os idosos e este aumento é atribuído ao aumento do uso de DAINE e a indicação terapêutica do uso de baixas doses de aspirina para prevenção de infarto do miocárdio. Nos Estados Unidos, em torno de 25% das reações adversas aos medicamentos são devidos a prescrição de DAINE (Chan e Leung, 2002). Estima-se que 16500 pacientes que possuem artrite morrem todo ano por toxicidade gastrointestinal causada dos DAINE (Chan e Leung, 2002).

Entre os fármacos que possuem atividade antiúlcera estão aqueles que inibem a secreção gástrica como os antagonistas de receptores H_2 e os bloqueadores da enzima $H^+/K^+/ATPase$ e os que reforçam a barreira mucosa, como o misoprostol, sucralfato e sais de bismuto (Malfertheiner et al., 2009). A terapia atual para pacientes com *Helicobacter pylori* consiste na erradicação da bactéria com antibioticoterapia e a introdução de inibidores da $H^+/K^+/ATPase$ para pacientes com úlceras pépticas (Malfertheiner et al., 2009). Os inibidores da $H^+/K^+/ATPase$ estão entre os fármacos mais vendidos no mundo, porém seu uso contínuo pode gerar efeitos adversos relacionados a inibição da secreção de ácido gástrico (Katzung, 2010).

O conhecimento dos mecanismos de defesa gástrica tem levado ao desenvolvimento de medicamentos com atividade antiinflamatória, porém que também reduzam os efeitos lesivos causados pelos DAINE, como por exemplo, o óxido nítrico ou sulfeto de hidrogênio complexados ao DAINE, NO-DAINE e H_2S -DAINE respectivamente (Laine et al., 2008). Edris (2007) destaca o potencial

terapêutico dos óleos essenciais e seus componentes na prevenção ou tratamento de doenças. Os óleos essenciais possuem diversas atividades farmacológicas, entre elas destaca-se a atividade antibacteriana (Edris, 2007), antiúlcera (Hiruma-Lima et al., 2000a) e anti-inflamatória (Bighetti et al., 1999, Esteves et al., 2005).

Os óleos essenciais são metabólitos secundários produzidos por plantas aromáticas, compostos principalmente por terpenos e terpenóides e sua atividade pode ser atribuída a ação individual de cada componente, embora possa haver sinergismo entre os elementos que os compõem. Os terpenos são formados pela união moléculas de isopreno e dependendo do número de moléculas combinadas são classificados como monoterpeno, sesquiterpeno, diterpeno, triterpeno ou tetraterpeno que adquirem diferentes propriedades funcionais (Bakkali et al., 2008).

Os monoterpenos são as moléculas mais representativas dentro da classe constituindo 90% dos óleos essenciais (Bakkali et al., 2008) e a atividade gastroprotetora de óleos essenciais contra úlcera induzida por etanol e por DAINE tem sido muitas vezes atribuída a diferentes representantes desta classe que são encontradas em maior concentração na sua composição (Takayama et al., 2011; Moraes et al., 2009; Rozza et al., 2011). Estudo desenvolvido em parceria com nosso laboratório evidenciou efeito gastroprotetor contra úlcera gástrica induzida por etanol e por DAINE para um dos monoterpenos mais abundantes na composição do óleo essencial das cascas do fruto de *Citrus lemon* (Rozza et al., 2011). Contudo, em estudos prévios em nosso laboratório foi verificado que o monoterpeno que esta presente em menor quantidade no óleo essencial do *C. lemon*, o β -mirceno, também possui atividade gastroprotetora. A partir destes resultados, temos estudado os efeitos de outros monoterpenos de estrutura similar ao β -mirceno, como o Nerol (cis-2,6-dimetil-2,6-octadien-8-ol), um álcool primário acíclico cuja estrutura química esta representada na figura 1, que é utilizado como compostos de fragrância em perfumaria (Lapczynski et al., 2008). Nerol já foi evidenciado na composição do óleo essencial de *Pelargonium graveolens*, utilizado pela comunidade francesa para tratamento de úlcera gástrica (Peterson et al., 2006) e no óleo essencial de *Mangifera indica*, espécie que possui atividade anti-inflamatória e gastroprotetora nos modelos de úlcera induzida por etanol e por DAINE (Shah et al., 2010; Lima et al., 2006). Outros estudos também já demonstraram atividade gastroprotetora para outros monoterpenos alcoólicos como o terpinen-4-ol (Matsunaga et al., 2000), isopulegol (Silva et al., 2009) e o α -terpineol (Souza et al., 2011).

Bergonzelli et al. (2003) mostram em seus resultados que, após avaliar a ação inibitória de diversos óleos essenciais, de sete óleos essenciais que reduziram a viabilidade de uma cepa de *Helicobacter pylori*, o mais efetivo foi o óleo essencial de semente de cenoura, o único que foi encontrado nerol em sua composição e apesar de estar presente em pequena quantidade, quando avaliado isoladamente o nerol apresentou atividade potente contra a mesma cepa. Estudo prévio em nosso laboratório verificou que nerol possui atividade antinociceptiva na fase inflamatória da dor, sugerindo para o mesmo uma possível atividade antiinflamatória (Catarine M. Nishijima, comunicação pessoal).

Visto a natureza multifatorial da formação de úlcera péptica, das quais as principais causadoras da doença são o uso de DAINE e a infecção por *Helicobacter pylori*, substâncias que atuem sobre as diversas causas desta doença auxiliariam na prevenção da doença. A literatura descreve diversas vias pelas quais substâncias poderiam atuar como gastroprotetora, por exemplo: através da via do óxido nítrico (Matsuda et al., 1999), da prostaglandina (Matsuda et al., 1999), dos receptores opióides (Gyires, 1990), dentre outros. Tendo em vista que o nerol é classificado como monoterpeno, classe de substâncias para as quais tem sido evidenciado efeito gastroprotetor e que este monoterpeno está presente em algumas espécies vegetais com ação gastroprotetora, o trabalho desenvolvido se propôs a avaliar o potencial efeito farmacológico do nerol como gastroprotetor e estudar por quais mecanismos antiúlcera o mesmo atua.

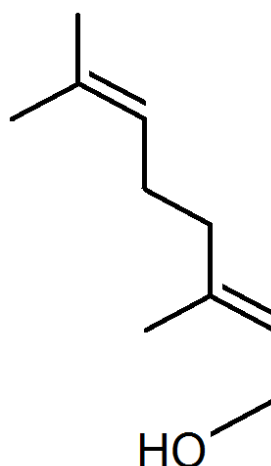


Fig.1 : Estrutura química do Nerol (Lapczynski et al., 2008)

II - OBJETIVO

II.1 - GERAL

Encontrar uma substância farmacologicamente ativa e segura com potencial terapêutico para a prevenção de úlceras pépticas e oferecer uma opção de monoterapia que atue sobre os principais causadores desta doença na população mundial simplificando desta forma o tratamento atual.

II.2 - ESPECÍFICOS

1) Avaliar a atividade gastroprotetora do monoterpene nerol em modelos experimentais agudos de úlcera gástrica e duodenal induzida por diferentes agentes em roedores;

2) Estudar os mecanismos envolvidos na ação gastroprotetora do nerol através da avaliação da participação de: formação de barreira local, atividade antsecretória, muco aderido, prostaglandinas, óxido nítrico, compostos sulfidrílicos, glutathione, mieloperoxidase, motilidade gastrointestinal e receptores opióides;

3) Avaliar a relação entre a dose de nerol que possui atividade antinociceptiva e a dose de nerol gastroprotetora.

4) Avaliar alterações de parâmetros de toxicológicos provocados por doses elevadas de nerol.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 - ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss albinos machos e ratos Wistar albinos machos provenientes do Biotério Central da UNESP/Botucatu para os ensaios de gastroproteção e para toxicidade foram utilizados machos e fêmeas de camundongos Swiss. Para o teste de formalina, que avalia analgesia, foram utilizados camundongos Swiss albinos machos provenientes da empresa Anilab Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda (Paulínea, SP). Os animais foram aclimatados às condições do biotério setorial por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, sob temperatura (23 ± 2 °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas controlado e alimentados com ração (Nuvital®) e água *ad libitum*. Em anexo segue o certificado de aprovação pela Comissão de ética do Instituto de Biociencias da UNESP – Botucatu sob número 354-CEUA.

III.2 – DROGAS UTILIZADAS

O monoterpeno nerol utilizado neste trabalho foi o comercializado pela empresa Sigma-Aldrich (ref.268909, USA) com grau de pureza de 97%. De acordo com o protocolo experimental, as drogas utilizadas como controle positivo foram carbenoxolona (Sigma, USA), cimetidina (Sigma, USA), lanzoprasol (comercializado pela Farmácia Cruz Vermelha Manipulações, Brasil), sulfato de morfina (Cristália, Brasil) ou cloridrato de loperamida (Sandoz, Brasil) e para avaliar as vias envolvidas foram Indometacina (Sigma, USA), L-NAME (Sigma, USA), NEM (Sigma, USA) ou naloxona (Aldrich, USA). O veículo utilizado para a diluição do nerol foi uma solução na proporção de 8g Tween® 80 para 100 ml de água deionizada e a mesma solução foi utilizada como controle negativo. No teste de formalina, o veículo utilizado foi solução de Tween® 80 a 0,01%.

III.3 - AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA

III.3.1 - ATIVIDADE GASTROPROTETORA

Os animais foram divididos em grupos que foram tratados com veículo (controle negativo), droga com atividade protetora (controle positivo) ou com Nerol. Nos experimentos de indução de lesão gástrica ou duodenal, após a morte dos

animais, estômago ou duodeno foram abertos, prensados entre placas de vidro e a imagem captada por um scanner e, através do software AVSoft Bioview® foi realizada a medida da área de lesão.

III.3.1.A - LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL

Ratos Wistar machos (n=5), após aproximadamente 18 horas de jejum foram tratados por via oral com veículo, carbenoxolona (100 mg/Kg) ou Nerol nas doses de 15, 30 ou 60 mg/Kg. Uma hora após os pré-tratamentos, foi administrado em todos os grupos 1 ml de etanol absoluto por via oral. Uma hora após receberem o etanol, os animais foram mortos em câmara de CO₂ e os estômagos abertos para mensuração da área de lesão (Robert et al., 1979 com modificações).

III.3.1.B - LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR DROGA ANTI-INFLAMATÓRIA NÃO-ESTEROIDE (DAINE)

Ratos Wistar machos (n=5-6), após aproximadamente 18 horas de jejum foram tratados por via oral com veículo, cimetidina (100 mg/Kg) ou Nerol nas doses de 15, 30, 60 ou 200 mg/Kg. Transcorridos 30 minutos após os tratamentos orais foi administrado Indometacina (DAINE) 50mg/Kg por via oral. Após 6 horas da administração de Indometacina os animais foram mortos e os estômagos abertos para mensuração da área da lesão (Rainsford, 1987).

III.3.1.C - TESTE DE FORMALINA

Camundondos Swiss machos (n=6), após 2 horas de jejum foram tratados oralmente com veículo ou nerol na dose de 60 mg/Kg. Após uma hora foi administrado nos dois grupos 20 µl de solução de formalina 2,5% em tampão fosfato (PBS), via intraplantar. Logo após a injeção de formalina, os animais foram observados individualmente durante 30 minutos em duas etapas: 1) Fase inicial: inicia-se logo após a administração da formalina e desaparece após aproximadamente 5 minutos. 2) Fase tardia: 15-30min após administração de formalina. O tempo, em segundos, que o animal lambeu a pata foi registrado e considerado como indicativo de dor (Hunskaar e Hole, 1987 com modificações)

III.3.1.D - LESÃO DUODENAL INDUZIDA POR CISTEAMINA

Ratos Wistar machos (n=5), após 2 horas de horas de jejum foram tratados por via oral com veículo, lansoprazol (30 mg/Kg) ou Nerol (60 mg/Kg). Após 30 minutos foi iniciada a indução de úlcera duodenal por administração oral de cisteamina em duas doses de 300 mg/Kg com intervalo de 4 horas entre elas. Transcorridas 22 horas após o tratamento com nerol e com os controles, os animais foram mortos e o duodeno retirado para mensuração das lesões (Szabo, 1978).

III.3.1.E - LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO

Ratos Wistar machos (n=6-8), após aproximadamente 18 horas de jejum foram tratados por via oral com veículo, lansoprazol (30 mg/Kg) ou (Nerol 60 mg/Kg). Para o acesso a artéria celíaca foi realizada uma incisão abdominal sob anestesia com xilazina (8 mg/Kg, im) e ketamina (8 mg/Kg, im) que foi mantida durante todo o procedimento. Após 30 minutos dos tratamentos, foi realizada a oclusão da artéria celiaca por meio de um clamp. O clamp foi retirado após 30 minutos e transcorridos 1 hora de reperfusão sanguínea os animais foram mortos e os estômagos abertos para mensuração da lesão. (Ueda et al., 1989).

III.3.2 - CARACTERIZAÇÃO DO MECANISMO GASTROPROTETOR

III.3.2.A - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SISTÊMICA

Camundongos Swiss machos (n=4), após aproximadamente 18 horas de jejum, foram tratados por via intraperitoneal com veículo, carbenoxolona (100 mg/Kg) ou Nerol (60 mg/Kg). Após 30 minutos do pré-tratamento foi administrado oralmente 0,2ml de uma solução de HCl 0,3M e etanol (40 e 60% respectivamente) e transcorrido um período de 1 hora da administração de HCl/etanol os animais foram mortos e os estômagos retirados para mensuração das lesões (Mizui & Doteuchi, 1983 com modificações).

III.3.2.B - AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS GÁSTRICOS APÓS LIGADURA DO PILORO

Ratos Wistar machos (n=5-7), após aproximadamente 18 horas de jejum foram anestesiados e submetidos a uma incisão abdominal para ser realizada a ligadura do piloro. Os tratamentos com veículo, cimetidina (100 mg/Kg) ou Nerol (60

mg/Kg) foram administrados 30 minutos antes (via oral) ou imediatamente após a ligadura do piloro (via intraduodenal). Após 4 horas da ligadura, os animais foram mortos e o conteúdo gástrico coletado. Foi então determinado: o conteúdo gástrico em balança analítica; o pH por meio de fita indicadora e a concentração de íons H^+ através de titulação com NaOH 0,01N utilizando fenolftaleína como indicador (Shay et al., 1945).

III.3.2.C - DETERMINAÇÃO DE MUCO ADERIDO

Ratos Wistar machos (n=5-6), após aproximadamente 18 horas de jejum, foram tratados com veículo, carbenoxolona (200 mg/kg) ou (Nerol 60 mg/Kg). Após 1 hora do tratamento fez-se uma incisão abdominal e foi realizada a ligadura do piloro. Transcorridas 4hs da ligadura do piloro os animais foram mortos e a região glandular dos estômagos foi colocada em solução de Alcian Blue (Alcian blue w/v 0,1%, sacarose 0,16 mol/l, acetato de sódio 0,05 mol/l, pH 5,8) por duas horas. Os estômagos foram lavados em solução de sacarose 0,25M e mantidos em solução de Cloreto de Magnésio 0,5M por 2 horas agitando-os periodicamente. Os estômagos foram retirados e pesados e sobre a solução foi adicionado éter dietílico na proporção 1:1, após agitação e centrifugação o sobrenadante foi descartado e a concentração de Alcian Blue mensurada em espectrofotômetro por absorvância em $\lambda=598$ nm. A produção de muco foi expressa pela relação entre a quantidade de alcian blue e a massa da região glandular do estômago (Rafatullah et al., 1990).

III.3.2.D - ENVOLVIMENTO DE PROSTAGLANDINA

Ratos Wistar machos (n=5-7), após aproximadamente 18 horas de jejum foram pré-tratados com salina 0,9% ou com inibidor da síntese de prostaglandina (indometacina 30 mg/Kg) por via sub-cutânea, após 30 minutos os animais foram tratados por via oral com veículo, carbenoxolona (100 mg/Kg) ou Nerol (60 mg/Kg). Após 1 hora dos tratamentos foi induzida lesão gástrica com 1 ml de etanol absoluto por via oral e após 1 hora do etanol os animais foram mortos e retirados os estômagos para mensuração das lesões (Matsuda et al., 1999).

III.3.2.E - ENVOLVIMENTO DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO

Ratos Wistar machos (n=5-6), após aproximadamente 18 horas de jejum foram pré- tratados com salina 0,9% ou com um inibidor da síntese de óxido nítrico

[L-NAME (ω -Nitro-L-arginine methyl éster) 70 mg/Kg] por via intraperitoneal. Após 30 minutos os animais foram tratados por via oral com veículo, carbenoxolona 100 mg/Kg) ou nerol (60 mg/Kg). Após 1 hora dos tratamentos, foi induzida lesão gástrica com 1 ml de etanol absoluto por via oral e após 1 hora os animais foram mortos e retirados os estômagos para mensuração das lesões (Matsuda et al., 1999).

III.3.2.F - ENVOLVIMENTO DE COMPOSTOS SULFIDRILICOS

Ratos Wistar machos (n= 5), após aproximadamente 18 horas de jejum foram pré-tratados com veículo ou com um bloqueador de compostos sulfidrilicos [NEM (N-metilmaleinida) 10 mg/Kg] por via intraperitoneal. Após 30 minutos os animais foram tratados por via oral com veículo, carbenoxolona (100 mg/Kg) ou Nerol (60 mg/Kg). Após 1 hora dos tratamentos foi induzida lesão gástrica nos ratos com 1 ml de etanol absoluto por via oral e após 1 hora de terem recebido etanol os animais foram mortos e retirados os estômagos para mensuração das lesões (Matsuda et al. 1999).

III.3.2.F.1 - DOSAGEM DE GLUTATIONA

Amostras de tecido gástrico retiradas do experimento que avaliou o envolvimento dos compostos sulfidrílicos na gastroproteção foram homogeneizadas em ácido tricloroacético (TCA) 5% e centrifugadas. O sobrenadante foi incubado a 30 °C com NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) e 5,5'ditio-bis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) preparados em tampão fosfato, após 5 minutos foi adicionado a enzima glutationa redutase e determinada em espectrofotômetro a concentração por absorbância em $\lambda=412$ nm (Anderson, 1985).

III.3.2.F.2 - ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE

Amostras de tecido gástrico retiradas do experimento que avaliou o envolvimento dos compostos sulfidrílicos na gastroproteção foram homogeneizadas em tampão HTAB (Brometo de hexadeciltrimetilamônio) preparado em tampão fosfato sódico 50mM pH 6 e submetidas a um triplo congelamento e descongelamento (primeiro congelamento ocorreu no dia de processamento das amostras e descongelado no dia da dosagem das amostras para os dois seguintes congelamentos que ocorrem apenas pelo tempo suficiente para que ocorresse o

congelamento). Após o último descongelamento, as amostras foram centrifugadas e sobre 50 µl do sobrenadante foi adicionado tampão de reação composto por peróxido de hidrogênio e o-dianisidina preparados em tampão fosfato. A atividade da enzima mieloperoxidase foi determinada em espectrofotômetro por absorbância em $\lambda=450$ nm (Krawisz et al., 1984).

III.3.2.G - MOTILIDADE GASTROINTESTINAL

Camundongos Swiss machos (n=5-6), após aproximadamente 6 horas de jejum, foram tratados com veículo, morfina 2,5 mg/Kg por via subcutânea ou Nerol (60 mg/Kg) via oral, após 1 hora foi administrado por via oral o carvão ativado (1 g/Kg) e após 30 minutos os animais foram mortos e feita a relação entre a distância percorrida pelo carvão ativado e o tamanho total do intestino delgado (Stickney e Northup, 1959 com modificações).

III.3.2.G.1 - DIARRÉIA INDUZIDA POR ÓLEO DE RÍCINO

Camundongos Swiss machos (N=7-8), após aproximadamente 18 horas de jejum, foram tratados por via oral com veículo, nerol (60 mg/Kg) ou loperamida (5 mg/Kg). Após 1 hora foi administrado por via oral 0,2 ml de óleo de rícino (agente indutor de diarréia) e cada animal foi colocado em caixas individuais forradas com papel filtro e observados durante 4 horas. Foram avaliados o tempo inicial de evacuação aquosas e a consistência das fezes (Awounters et al., 1978 modificado por Mukherjee et al., 1998).

III.3.2.G.2 - BLOQUEIO DE CANAIS DE CÁLCIO VOLTAGEM DEPENDENTES

Ratos Wistar machos (n=3) foram mortos, coletada a porção epididimal do ducto deferente e colocada sob tensão em cuba com solução nutritiva isenta de íons cálcio composta de NaCl 138 mM, KCl 5,7 mM, NaH₂PO₄ 0,36 mM, NaHCO₃ 15 mM e dextrose 5,5 mM mantida a 30°C, pH 7,4 e continuamente borbulhada com 95%O₂/5%CO₂. Foram adicionados à cuba o veículo onde foi solubilizado o nerol (solução de Tween®) ou nerol de forma que as concentrações na cuba foram de 1, 3, 10 ou 30µM. Após 30 minutos foi adicionado KCl 74,3 mM para despolarização celular e após 1 minuto foi obtida a curva concentração-resposta pela adição de CaCl₂. As alterações na tensão do ducto deferente foram registradas usando

transdutor de força isométrico conectado a um amplificador e analisados através do software AcqKnowledge 3.5.7 (Biopac Systems Inc., U.S.A.) (Nojimoto et al., 2009).

III.3.2.G.3 - ACÚMULO DE FLUÍDO INTESTINAL

Camundongos Swiss machos (n=6-7), após aproximadamente 6 horas de jejum, foram pré-tratados com salina ou com naloxona (30 mg/Kg). Após 15 minutos, os animais foram tratados com veículo por via oral, morfina (10 mg/Kg) por via subcutânea ou com nerol (60 mg/Kg) por via oral. Após 1 hora cada animal recebeu 0,2 ml de óleo de rícino e 30 minutos depois foram mortos. O intestino delgado foi retirado e coletado o conteúdo intestinal para pesagem (Robert et al., 1976).

III.3.2.G.4 – ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES OPIÓIDES NA REDUÇÃO DA MOTILIDADE GASTROINTESTINAL

Camundongos Swiss machos (n=4-5), após aproximadamente 6 horas de jejum, foram pré-tratados com solução salina 0,9% ou com um antagonista de receptores opióides (naloxona 15 mg/Kg) por via intraperitoneal, após 15 minutos foram tratados com veículo, morfina 2,5 mg/Kg por via sub-cutânea ou Nerol 60 mg/Kg via oral. Decorridos 1 hora do pré-tratamento foi administrado por via oral 1 g/Kg de carvão ativado e após 30 minutos os animais foram mortos e feita a relação entre a distância percorrida pelo carvão ativado e o tamanho total do intestino delgado (Baggio et al., 2003, modificado).

III.3.2.H - ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES OPIÓIDES NA GASTROPROTEÇÃO

Ratos Wistar machos (n=7-8), após aproximadamente 18 horas de jejum, foram pré-tratados com salina 0,9% ou naloxona 1,5 mg/Kg por via intraperitoneal, após 30 minutos os animais foram tratados com veículo por via oral, morfina 0,4 mg/Kg por via intra-peritoneal ou nerol (60 mg/Kg) por via oral. Decorridos 30 minutos do tratamento com morfina e 1 hora do tratamento com veículo ou nerol, todos os animais receberam 1 ml de etanol absoluto e após 1 hora da administração do etanol os animais foram mortos e mensurada a área de lesão (Bhounsule et al. 1994).

III.3.2.I - ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES OPIÓIDES NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO

Ratos Wistar machos (n=5), após aproximadamente 18 horas de jejum, foram tratados por via oral apenas com o veículo propilenoglicol 10%(v/v) ou com sulfato de morfina (2 mg/Kg) diluído em propilenoglicol 10% (v/v). Para o acesso a artéria celíaca foi realizada uma incisão abdominal sob anestesia com xilazina (6 mg/Kg, im) e ketamina (6 mg/Kg, im) que foi mantida durante todo o procedimento. Após 30 minutos dos tratamentos, foi realizada a oclusão da artéria celiaca por meio de um clamp. O clamp foi retirado após 30 minutos e transcorridos 1 hora de reperfusão sanguínea os animais foram mortos e os estômagos abertos para mensuração da lesão. (Ueda et al., 1989).

III.4 - TOXICIDADE AGUDA E SCREENING HIPOCRÁTICO

Camundongos Swiss machos e fêmeas (n=8-11) em torno de 60 dias, após aproximadamente 3 horas de jejum, foram tratados por via oral com veículo ou com nerol nas doses de 60, 300, 600, 1250, 2500 ou 5000 mg/Kg e avaliados os parâmetros comportamentais durante o período de 6 horas. Em cada momentos de avaliação eram analisados 2 animais de cada grupo. A partir do dia seguinte ao tratamento, os animais foram pesados diariamente durante 14 dias. No 14º dia, após a pesagem, os animais foram mortos e fígado, rins, coração, baço e pulmão foram pesados e realizados a relação entre o peso dos órgãos e o peso dos animais (Malone e Robichaud,1962 e Souza Brito, 1994).

Os parâmetros comportamentais avaliados foram:

- Aparência geral: Observação do comportamento geral dos animais, como nível de agitação, brigas e movimentação
- Frênto vocal: Emissão freqüente de ruídos, vocalização
- Irritabilidade: Reação ao indivíduo que está ao lado ou ao manuseá-lo
- Resposta ao toque: Capacidade do animal desviar de um objeto (pinça) direcionado ao seu focinho
- Aperto da cauda: Reação do animal ao pressionar a ponta da cauda com uma pinça
- Contorção: Observação de movimentos sinuosos
- Trem posterior: Observação do grau de relaxamento das patas posteriores dos animais
- Endireitamento: Capacidade do animal de reconhecer a alteração espacial causada por movimentos que projetam o animal em diferentes posicionamentos do corpo

- Tônus muscular: Capacidade da pele do animal retornar à condição normal após ser puxada
- Força de agarrar: Avaliação da força com que o animal resiste ao ser puxado contra uma grade
- Ataxia: Capacidade do animal em caminhar em linha reta sobre uma superfície estreita
- Reflexo auricular: Reação do animal ao estimular sua orelha com uma pinça
- Reflexo corneal: Avaliar a rapidez do fechamento dos olhos ao levar uma pinça em direção ao olho do animal
- Tremores: Observação da presença de tremores
- Straub: Observação da elevação da cauda
- Hipnose: Observação se os animais dormem agrupados
- Anestesia: Rapidez de rejeição do animal ao pressionar sua pata com uma pinça
- Lacrimação: Observação da presença de lacrimação
- Ptose: olhos cerrados
- Piloereção: Observação da elevação dos pelos
- Defecação: Observação da quantidade e consistência das fezes
- Hipotermia: Observação de alteração na temperatura dos animais ao tocar em suas patas
- Respiração: Observação da função respiratória
- Cianose: Observação se as patas e cauda dos animais estariam azuladas

III.5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significância estatística foi determinada por teste t-student quando havia apenas 2 grupos experimentais. Quando o número de grupos experimentais era maior que 2 foi utilizado análise de variância (ANOVA) com teste posterior de Dunnett ou Tukey para análise paramétrica, ou Kruskal Wallis com teste posterior de Dunn para análises não paramétricas. As análises foram realizadas através do software Graphpad Prism 5, sendo a significância mínima considerada $p < 0,05$.

IV - RESULTADOS

IV.1 - ATIVIDADE GASTROPROTETORA

IV.1.A - LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL

Todos os grupos de animais tratados com diferentes doses de Nerol tiveram redução na área de lesão quando comparados com o grupo que recebeu apenas veículo não apresentando diferença significativa entre os grupos. Destaca-se a média da área de lesão do grupo tratado com nerol a 60mg/Kg onde a média da área de lesão foi menor que a média do grupo tratado com o controle positivo carbenoxolona na dose de 100 mg/Kg, porém não há diferença estatística entre estes dois grupos (fig.2).

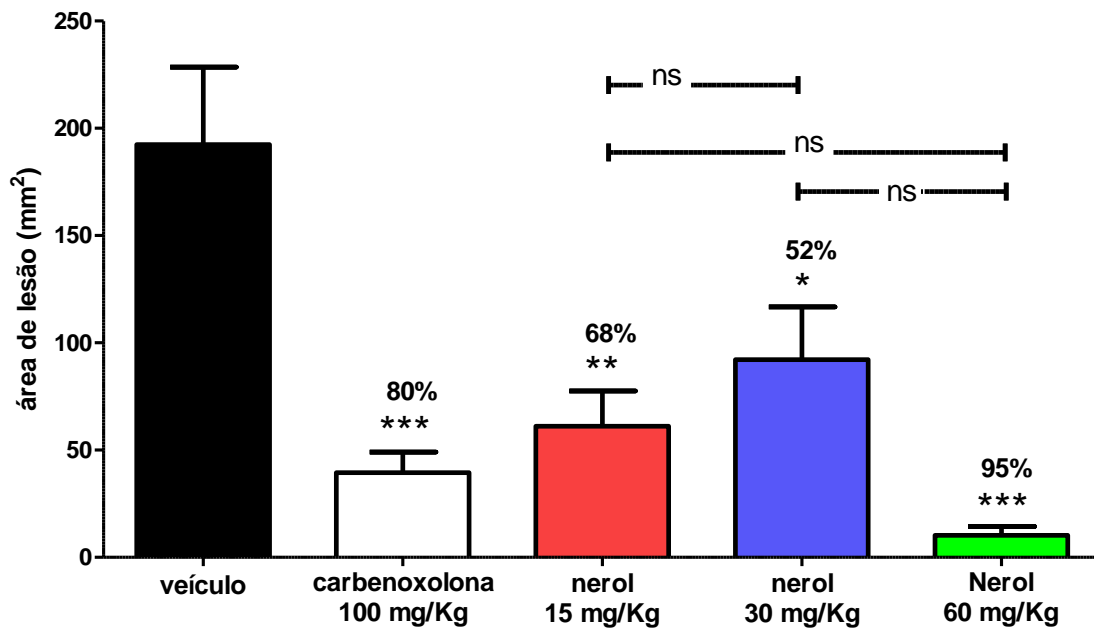


Fig.2: Úlcera gástrica induzida por etanol em ratos. Valores expressos em média \pm erro padrão da média (n=5). Os números em porcentagem indicam proteção em relação ao veículo. Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparação com o veículo, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e Tukey para comparação entre os grupos. (ns= diferença não significativa)

IV.1.B - LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR DAINE

Dos grupos tratados com Nerol em três diferentes doses, apenas aquele tratado com a dose de 60 mg/Kg teve redução na área de lesão comparado com o grupo tratado com veículo (fig. 3).

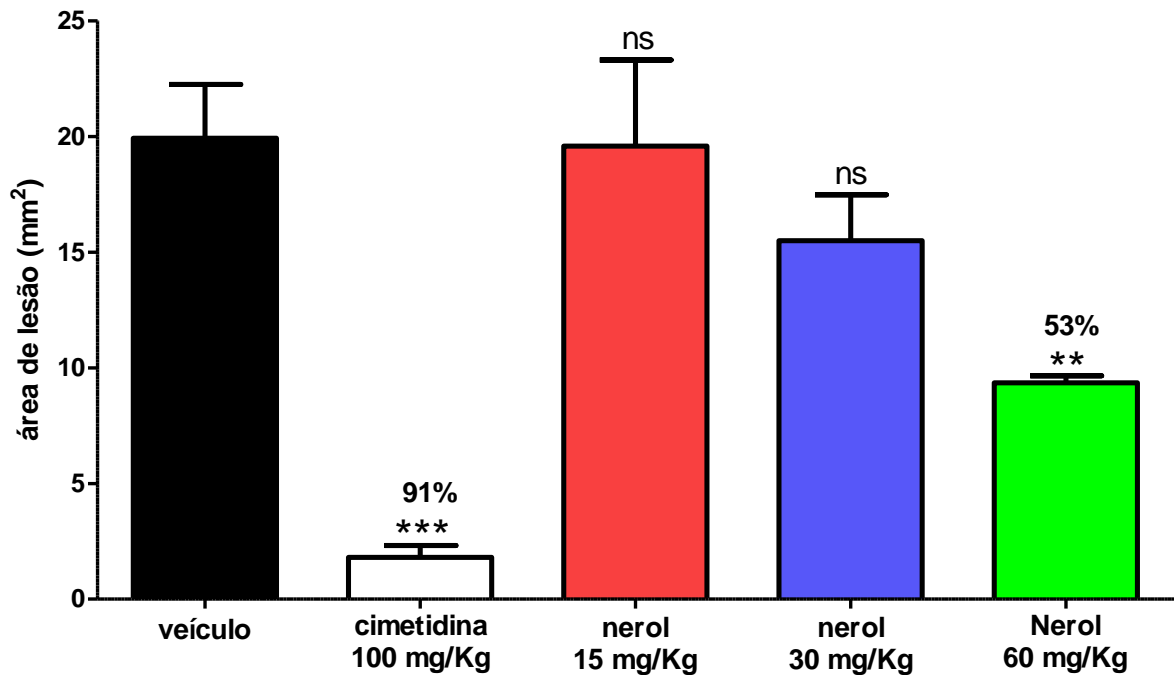


Fig.3: Úlcera gástrica induzida por DAINE. Valores expressos em média \pm erro padrão da média (n=5-6). Os números em porcentagem indicam proteção em relação ao veículo. Análise estatística: ANOVA seguido de Dunnett. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (ns= diferença não significativa)

Estudos do grupo têm apontado a dose de 200 mg/Kg de nerol como detentora de atividade antinociceptiva na fase II do teste de formalina (47% de redução), para tanto avaliou-se também esta mesma dose do nerol na ação gastroprotetora e se observou que a mesma apresentou atividade gastroprotetora contra as lesões provocadas por DAINE (fig.4).

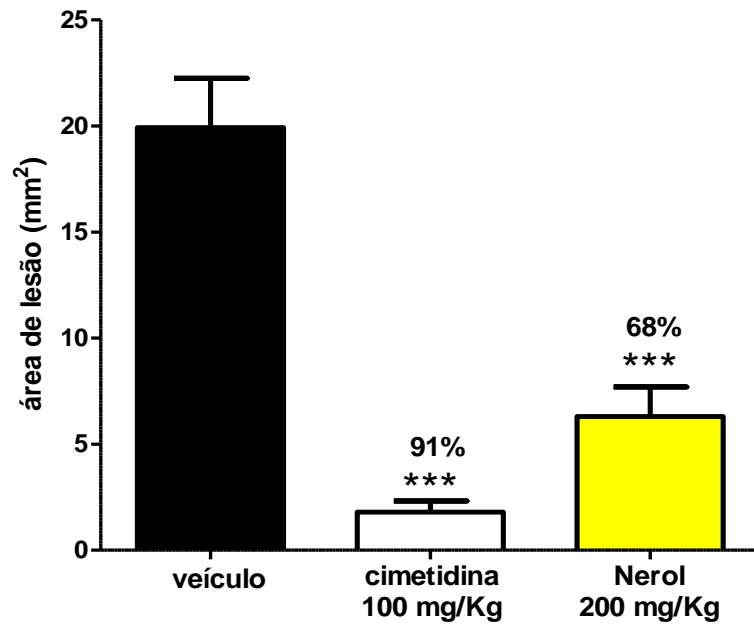


Fig.4: Úlcera gástrica induzida por DAINE. Valores expressos em média \pm erro padrão da média (n=5-6). Números em porcentagem indicam proteção em relação ao veículo. Análise estatística: ANOVA seguido de Dunnett. *** $p<0,001$

IV.1.C - TESTE DE FORMALINA

Porém, diferente da dose de 200 mg/Kg do nerol que possui ação gastroprotetora e também antinociceptiva, na dose de 60 mg/Kg o nerol não reduziu o tempo de lambida nas fases I e II do teste de formalina indicando a ausência de ação antinociceptiva e anti-inflamatória (fig.5).

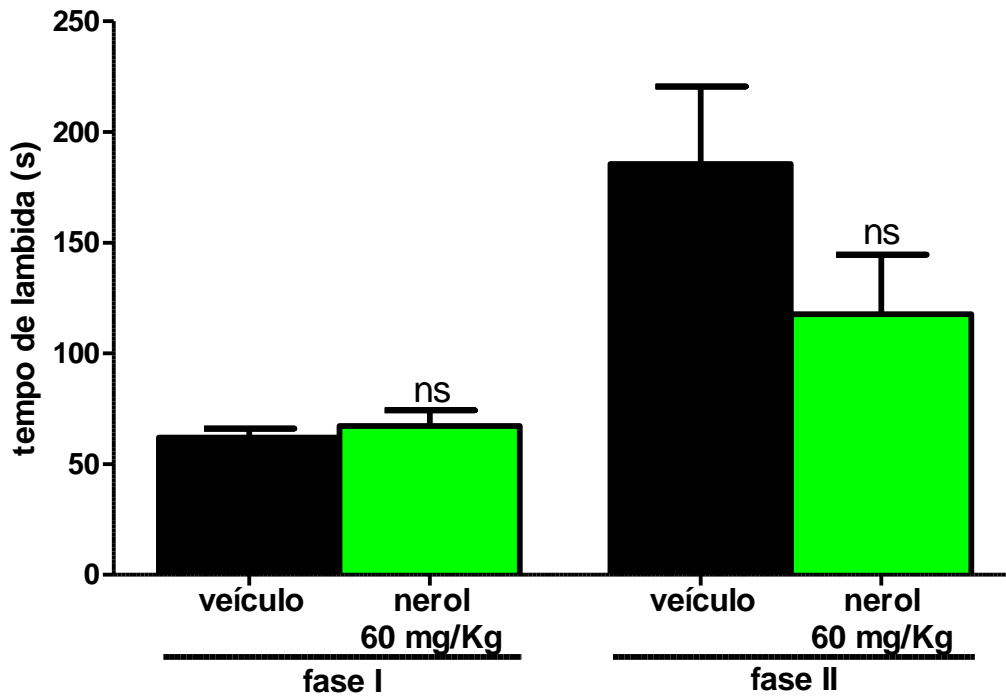


Fig.5: Teste de formalina em camundongos. Valores expressos em média \pm erro padrão da média (n= 6). Os números em porcentagem indicam o aumento ou a redução do tempo de lambida em relação ao grupo tratado com veículo. Análise estatística: teste t-student. (ns= diferença não significativa)

IV.1.D - LESÃO DUODENAL INDUZIDA POR CISTEAMINA

O grupo tratado com nerol 60 mg/Kg (dose selecionada a partir dos resultados obtidos no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol e por DAINE), não reduziu de forma significativa a área de lesão provocada pela administração oral de cisteamina quando comparado com o grupo tratado com veículo (fig.6).

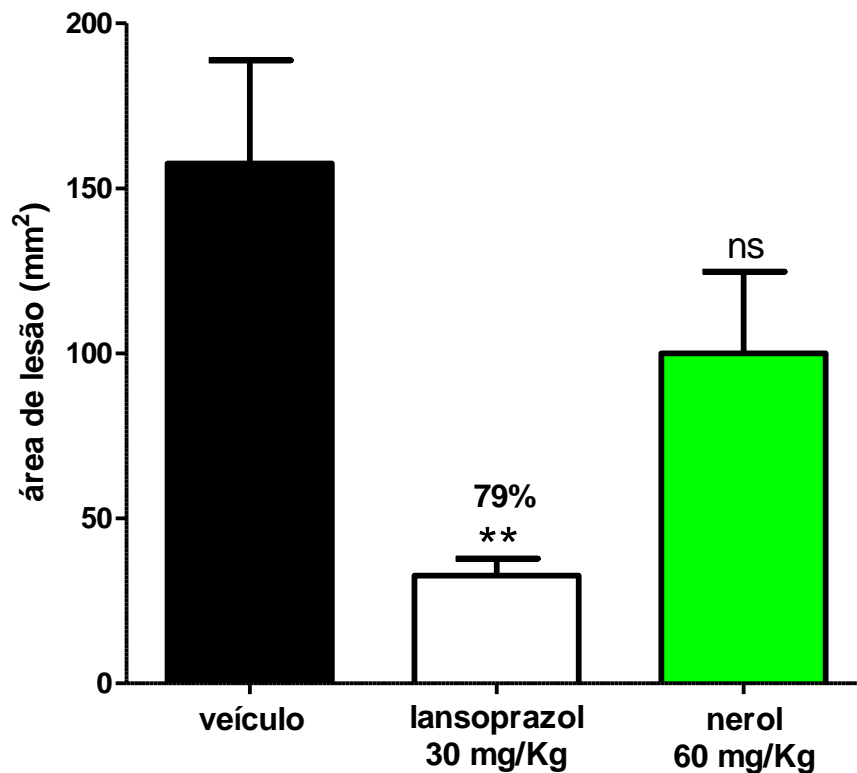


Fig.6: Úlcera duodenal induzida por cisteamina. Valores expressos em média \pm erro padrão da média (n=5). Números em porcentagem indicam a proteção em relação ao veículo. Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett. ** $p < 0,01$. (ns=diferença não significativa)

IV.1.E - LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO

O grupo tratado com nerol na dose de 60 mg/Kg não reduziu a área de lesão provocada pela isquemia e reperfusão da artéria celíaca quando comparado com o grupo tratado com veículo, mas pelo contrário, aumentou a área de lesão de maneira significativa (fig.7).

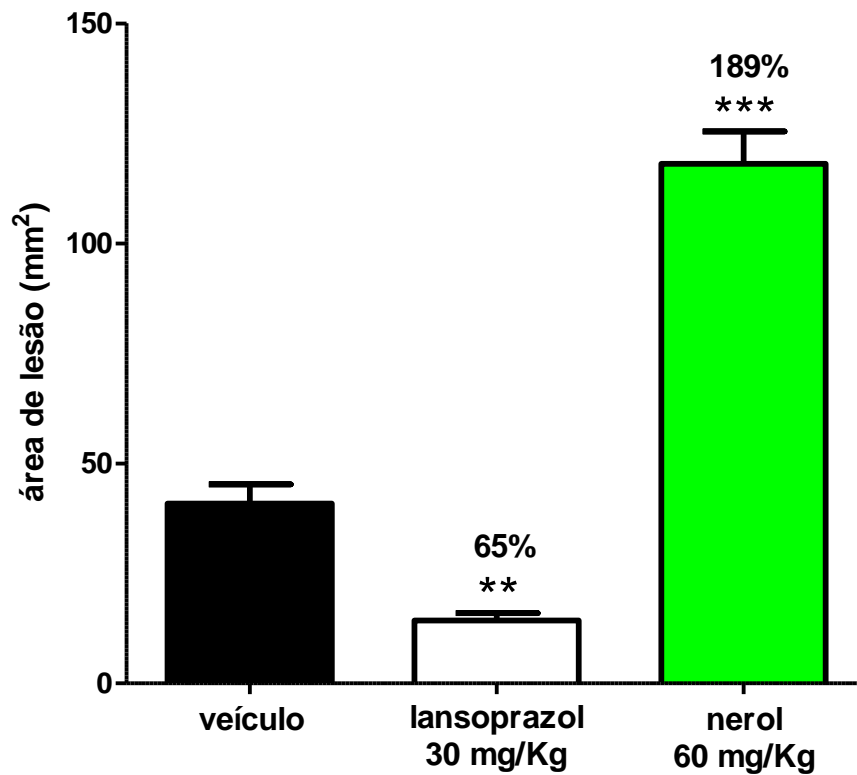


Fig.7: Úlcera gástrica induzida por Isquemia e reperfusão. Números em porcentagem indicam redução ou aumento da lesão em relação ao veículo. Valores expressos em média \pm erro padrão da média (e.p.m) (n=6-8). Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

IV.2 - CARACTERIZAÇÃO DE MECANISMO GASTROPROTETOR

IV.2.A - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SISTÊMICA

Para avaliar se o efeito do nerol é por uma ação local como, por exemplo, formando um revestimento na superfície da mucosa ou por atuação sistêmica, foi administrado nerol pela via intraperitoneal e se observou que camundongos tratados com nerol por esta via apresentaram 67% de proteção em relação ao grupo tratado com veículo (fig. 8).

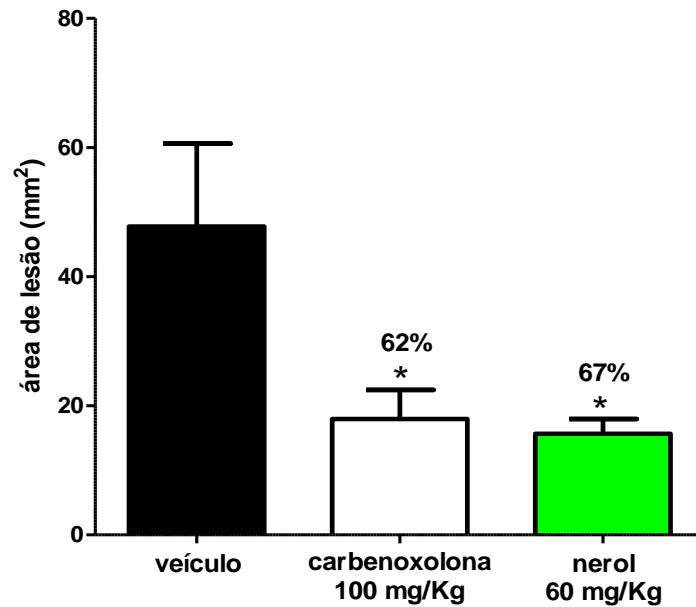


Fig.8: Úlcera gástrica induzida por HCl/Etanol. Valores expressos em média \pm erro padrão da média (e.p.m.) (n=4). Os números em porcentagem indicam proteção em relação ao veículo. Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett. * $p < 0,05$.

IV.2.B - LIGADURA DO PILORO

Os animais tratados com nerol, administrados tanto por via intraduodenal quanto por via oral, não apresentaram alterações significativas dos parâmetros avaliados apresentados na tabela 1, diferentemente da cimetidina que aumentou o pH e reduziu concentração de íons H⁺ nas duas vias de administração e também reduziu o conteúdo gástrico do grupo tratado por via oral (tabela 1).

Os resultados apresentados pela tabela 1 demonstram a ausência de ação antissecretória do nerol.

Tabela 1 - Análise de parâmetros gástricos 4 horas após ligadura do piloro

Tratamento	Grupos	n	pH	conteúdo gástrico (g)	[H ⁺]mEq/g/4hs
Duodenal	Veículo	7	2,0 ± 0,3	2,84 ± 0,69	6,06 ± 0,67
	Cimetidina 100mg/Kg	5	4,6 ± 0,4 ***	2,31 ± 0,25 ^{ns}	1,99 ± 0,52 **
	Nerol 60mg/Kg	7	1,7 ± 0,2 ^{ns}	3,64 ± 0,79 ^{ns}	7,51 ± 0,72 ^{ns}
Oral	Veículo	7	1,1 ± 0,1	6,60 ± 0,58	6,58 ± 0,28
	Cimetidina 100mg/Kg	6	3,8 ± 0,4***	3,26 ± 0,43 ***	2,27 ± 0,37 ***
	Nerol 60mg/Kg	6	1,5 ± 0,2 ^{ns}	5,88 ± 0,36 ^{ns}	6,28 ± 0,4 ^{ns}

Valores expressos como média ± e.p.m. Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett. **p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001. (ns = diferença não significativa)

IV.2.C - MUCO ADERIDO À MUCOSA GÁSTRICA

O grupo de animais tratado com carbenoxolona apresentou maior concentração de muco aderido quando comparado com o veículo. Diferentemente, o grupo tratado com Nerol não apresentou diferença na concentração de muco quando comparado com o grupo tratado com veículo (fig.9). Estes resultados indicam que o nerol não atua na alteração da camada de muco para exercer sua ação gastroprotetora.

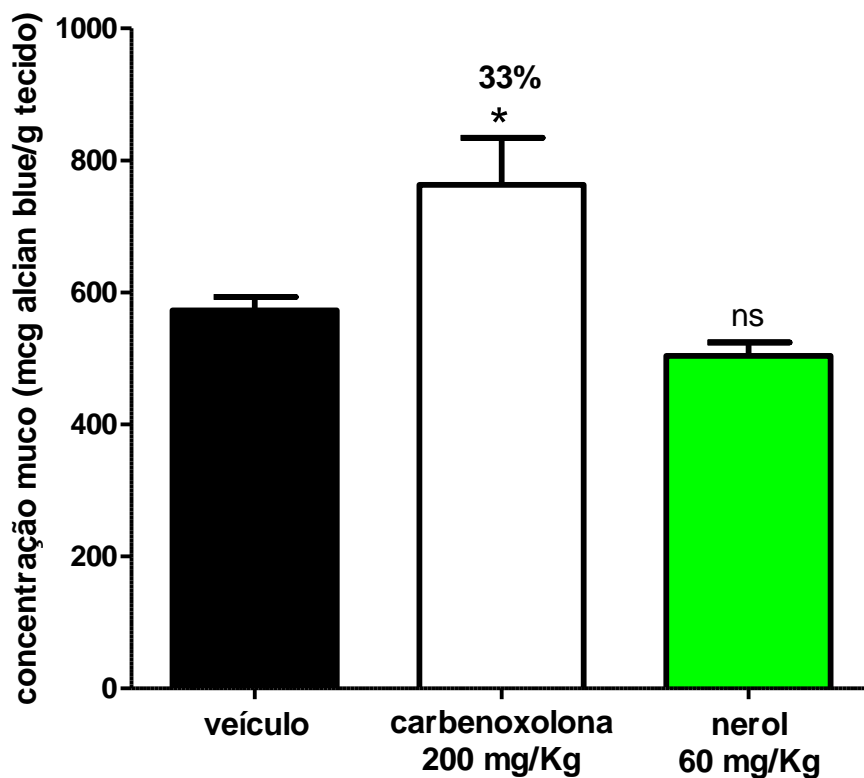


Fig.9.:Quantificação de muco aderido. Valores expressos em média \pm e.p.m (n=5-6). Números em porcentagem indicam o aumento ou redução de muco aderido em relação ao veículo. Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett. * $p < 0,01$ (ns = diferença não significativa)

IV.2.D - ENVOLVIMENTO DE PROSTAGLANDINA

Os grupos de animais tratados com nerol ou com carbenoxolona mantiveram a redução na área de lesão em relação ao veículo quando pré-tratados com solução salina e continuaram apresentando gastroproteção quando os grupos foram pré-tratados com Indometacina. O grupo Indometacina/veículo apresentou aumento na área de lesão quando comparado com o grupo salina/veículo, porém não houve diferença na área de lesão entre os grupos salina/nerol e Indometacina/nerol e entre os grupos salina/carbenoxolona e indometacina/carbenoxolona demonstrando, portanto, que o efeito do nerol não ocorre pela modulação de prostaglandina (fig.10).

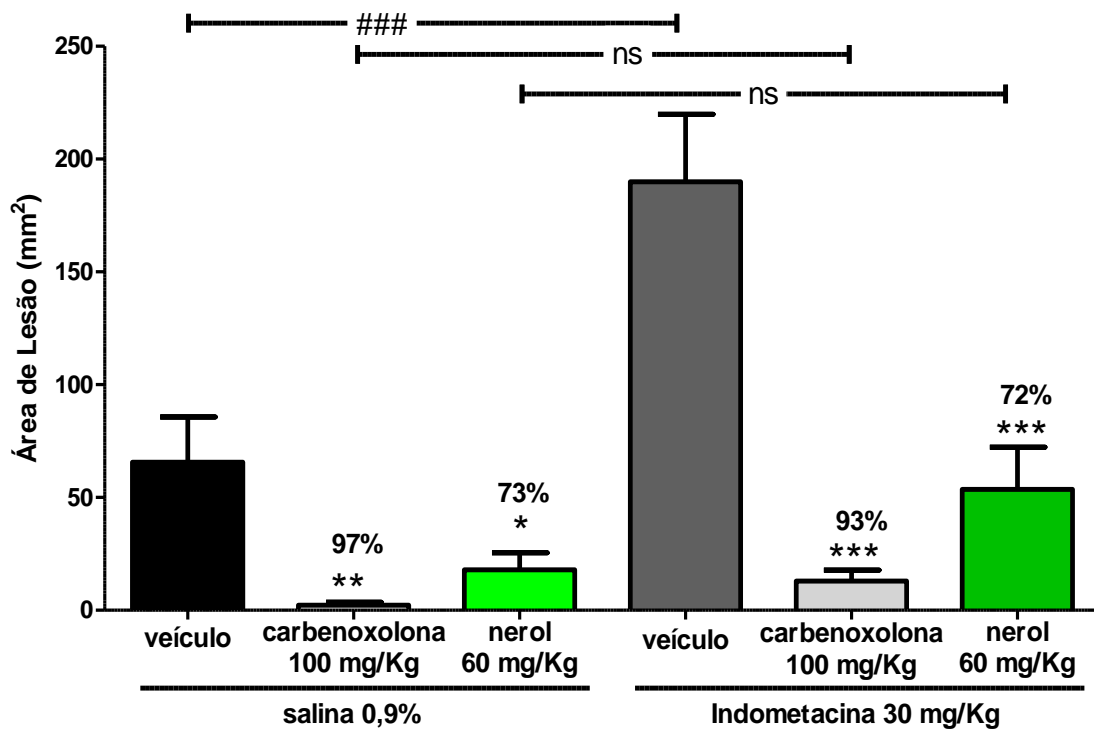


Fig.10: úlcera gástrica induzida por etanol em ratos pré-tratados com DAINES. Valores expressos em média \pm e.p.m. (n=5-7). Os números em porcentagem indicam a proteção em relação ao veículo com o mesmo pré-tratamento. Análise estatística: ANOVA seguido de Dunnett para análise entre os grupos com mesmo pré-tratamento. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e seguido de Tukey para análise entre os pré-tratamentos. ### $p < 0,001$. (ns = diferença não significativa)

IV.2.E - ENVOLVIMENTO DA VIA DO ÓXIDO NÍTRICO

Os grupos de animais tratados com nerol ou com carbenoxolona tiveram a área de lesão reduzida em relação ao veículo quando pré-tratados com solução salina 0,9% e continuaram apresentando suas ações gastroprotetoras quando os grupos foram pré-tratados com L-name. O grupo pré-tratado com L-name e tratado com veículo (L-name/veículo), apresentou aumento na área de lesão quando comparado com o grupo salina/veículo, porém não houve diferença na área de lesão entre os grupos salina/nerol e L-name/nerol e entre os grupos salina/carbenoxolona e L-name/carbenoxolona indicando portanto que nerol também não utiliza diretamente o óxido nítrico para sua ação gastroprotetora (fig.11).

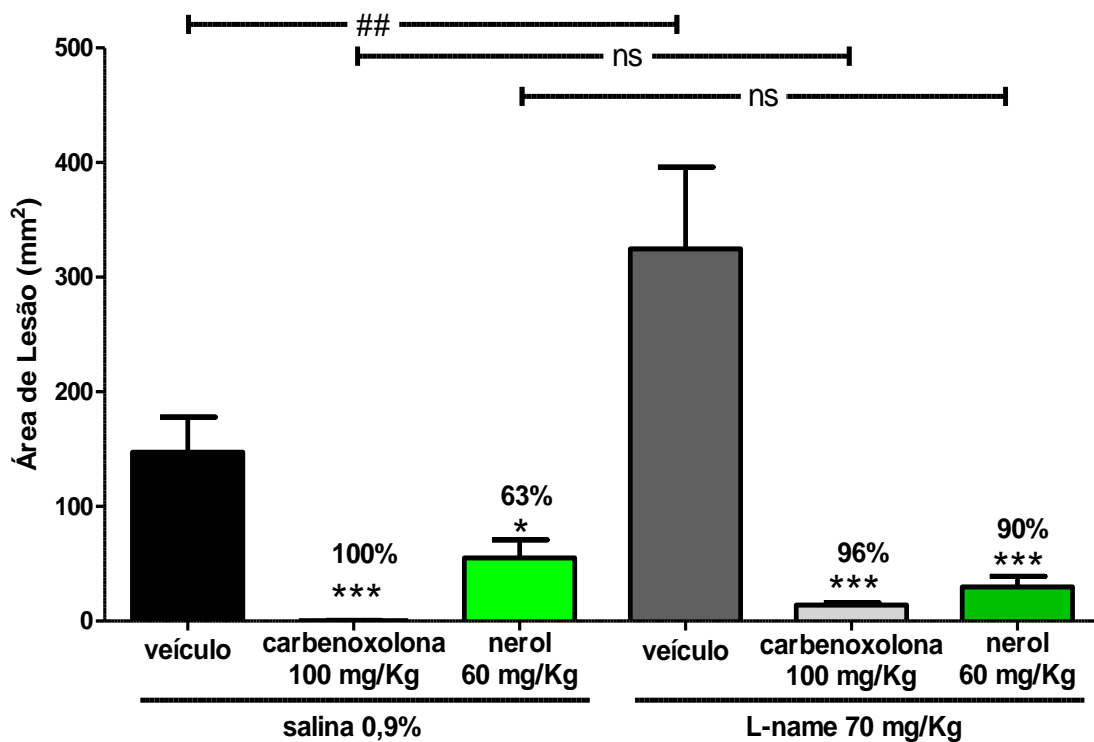


Fig.11: úlcera gástrica induzida por etanol em ratos pré-tratados com L-name. Valores expressos em média \pm e.p.m. (n=5-6). Os números em porcentagem indicam a proteção em relação ao veículo com o mesmo pré-tratamento. Análise estatística: ANOVA seguido de Dunnett para análise entre os grupos com mesmo pré-tratamento. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ e seguido de Tukey para análise entre os pré-tratamentos. ## $p < 0,01$. (ns= diferença não significativa)

IV.2.F - ENVOLVIMENTO DE COMPOSTOS SULFIDRÍLICOS

Os grupos de animais tratados com nerol ou com carbenoxolona tiveram a área de lesão reduzida em relação ao veículo quando pré-tratados com solução salina 0,9% porém não apresentaram redução significativa da área de lesão quando pré-tratados com NEM. Todos os grupos pré-tratados com NEM tiveram aumento significativo da área de lesão quando comparados com os grupos pré-tratados com solução salina. Estes resultados indicam que a gastroproteção exercida pelo nerol é dependente da integridade dos compostos sulfidrílicos (fig.12).

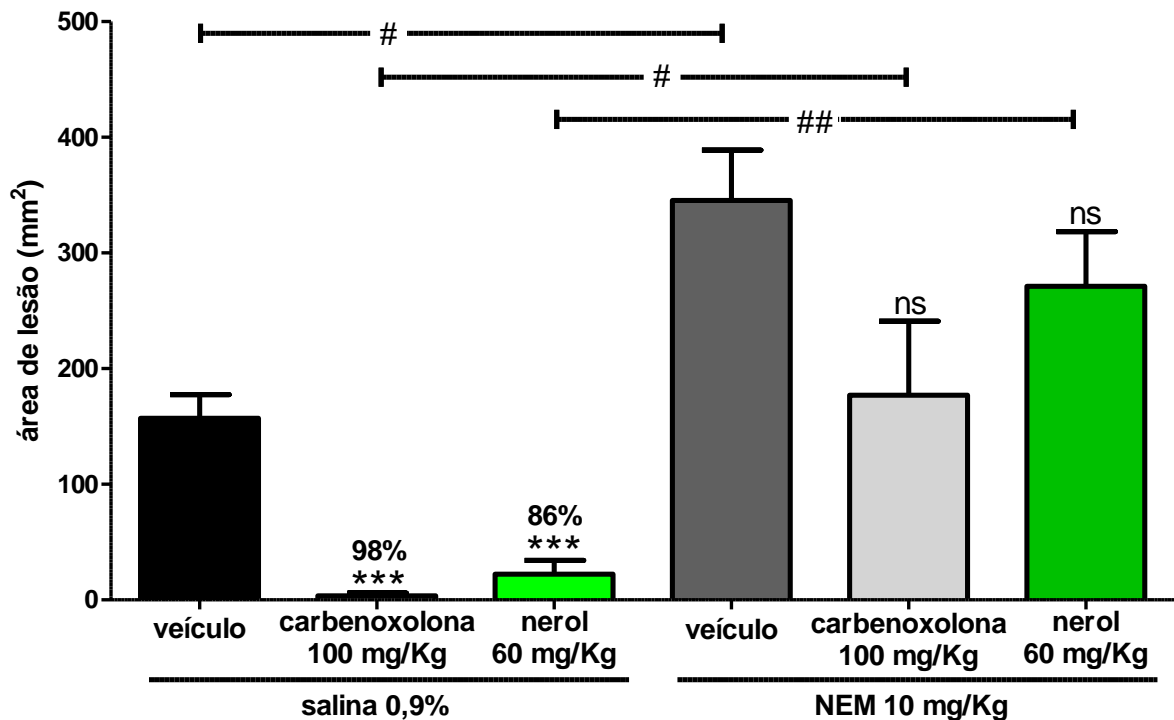


Fig.12: úlcera gástrica induzida por etanol em ratos pré-tratados com NEM. Valores expressos em média \pm e.p.m. (n=5). Os números em porcentagem indicam a proteção em relação ao veículo com o mesmo pré-tratamento. Análise estatística: ANOVA seguido de Dunnett para análise entre os grupos com mesmo pré-tratamento. *** $p < 0,001$ e seguido de Tukey para análise entre os pré-tratamentos. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$. (ns= diferença não significativa).

IV.2.F.1 – DOSAGEM DE GLUTATIONA

Os grupos de animais tratados com nerol ou com carbenoxolona apresentaram maior concentração de glutathione em relação ao grupo tratado com veículo entre os grupos pré-tratados com solução salina 0,9%. Quando os grupos foram pré-tratados com NEM, a diferença na concentração de glutathione entre os tratamentos não foi significativa. Comparando-se os pré-tratamentos, todos os grupos pré-tratados com NEM apresentaram redução significativa na concentração de glutathione em relação aos grupos pré-tratados com solução salina 0,9% (fig.13). Estes resultados indicam portanto o papel da glutathione na ação gastroprotetora do nerol 60 mg/Kg.

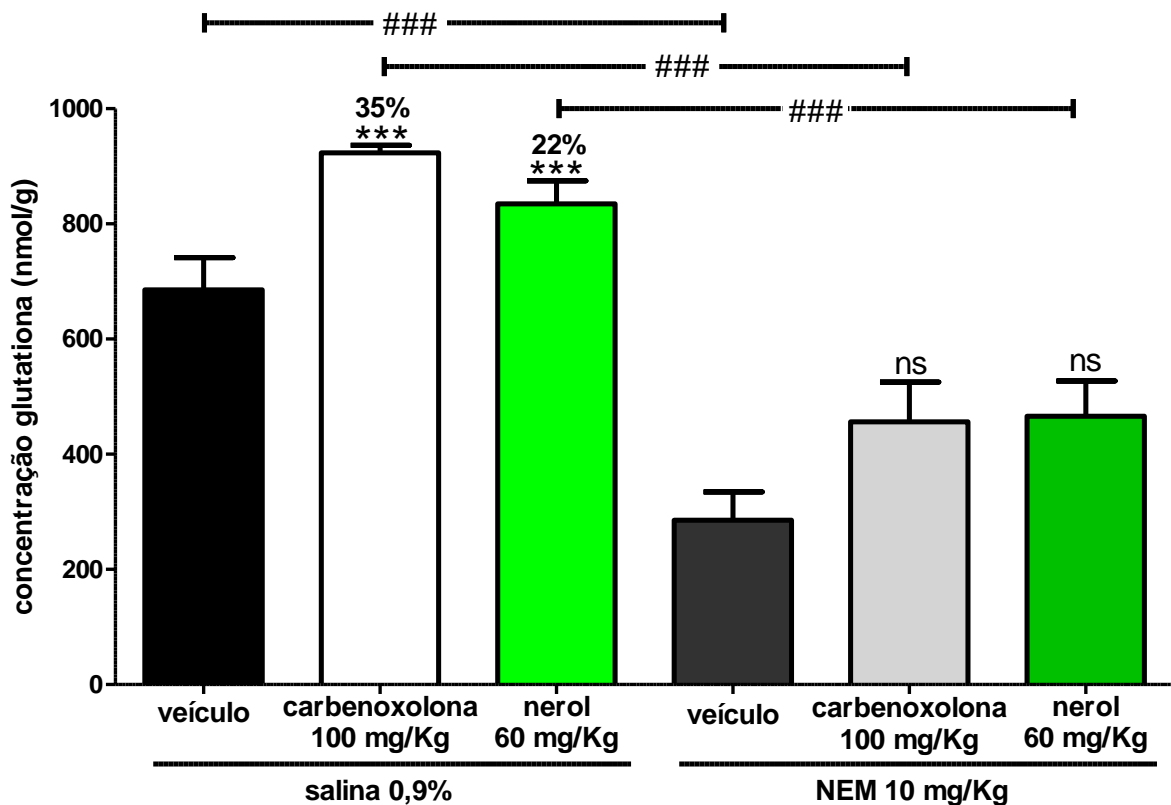


Fig.13: quantificação de glutathione do tecido gástrico de ratos com úlcera gástrica induzida por etanol pré-tratados com NEM. Valores expressos em média \pm e.p.m. (n=5). Os números em porcentagem indicam o aumento da concentração de glutathione em relação ao veículo com o mesmo pré-tratamento. Análise estatística: ANOVA seguido de Dunnett para análise entre os grupos com mesmo pré-tratamento. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e seguido de Tukey para análise entre os pré-tratamentos. ### $p < 0,001$. (ns= diferença não significativa)

IV.2.F.2 – ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE

Grupos tratados com nerol ou com carbenoxolona apresentaram menor concentração de mieloperoxidase em relação ao grupo tratado com veículo nos grupos pré-tratados com solução salina 0,9%. Quando os grupos foram pré-tratados com NEM, o grupo tratado com nerol não apresentou redução significativa na concentração de mieloperoxidase em relação ao grupo tratado com o veículo. Da mesma forma que o grupo tratado com veículo, o grupo tratado com nerol apresentou aumento na concentração de mieloperoxidase quando pré-tratado com NEM comparando-se com os grupos pré-tratados com solução salina (fig.14).

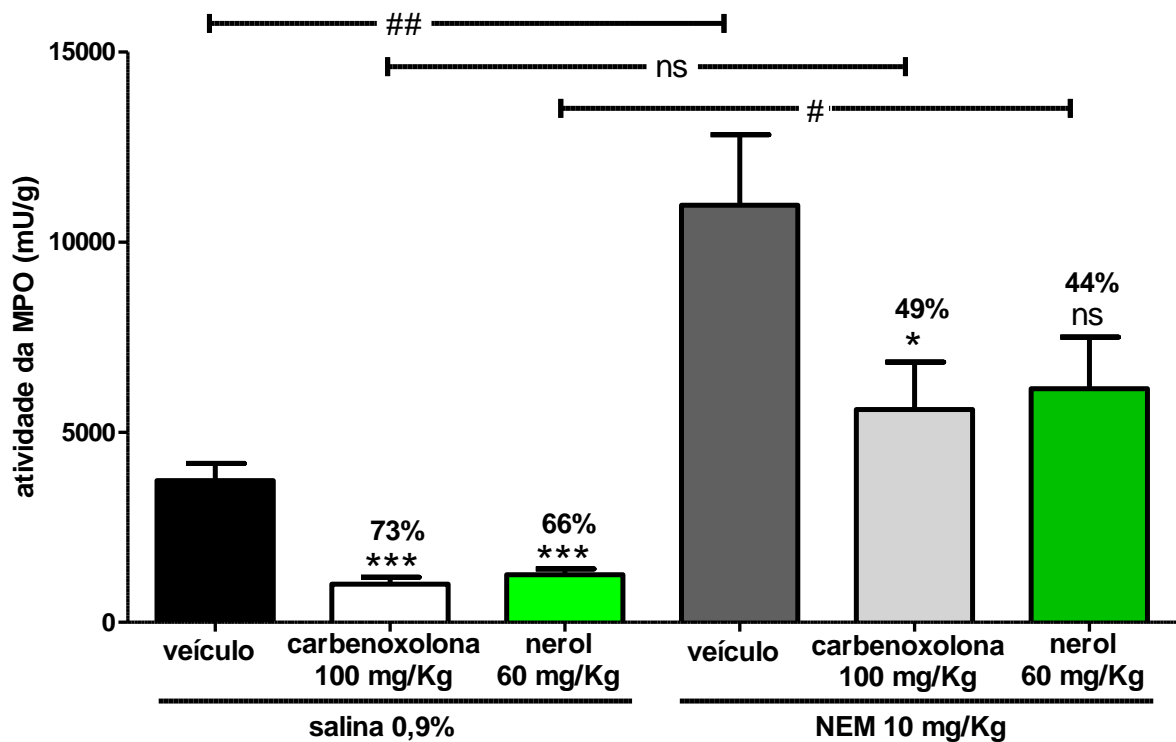


Fig.14: Atividade da mieloperoxidase de tecido gástrico de ratos com úlcera gástrica induzida por etanol pré-tratados com NEM. Valores expressos em média \pm e.p.m. (n=5). Os números em porcentagem indicam a redução da concentração de mieloperoxidase em relação ao veículo com o mesmo pré-tratamento. Análise estatística: ANOVA seguido de Dunnett para análise entre os grupos com mesmo pré-tratamento. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ e seguido de Tukey para análise entre os pré-tratamentos. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$. (ns= diferença não significativa)

IV.2.G - MOTILIDADE GASTROINTESTINAL

Animais que foram tratados com nerol apresentaram redução significativa na relação entre a distância percorrida pelo carvão ativado na luz intestinal e o comprimento total do intestino delgado quando comparados com os animais tratados com veículo (fig.15).

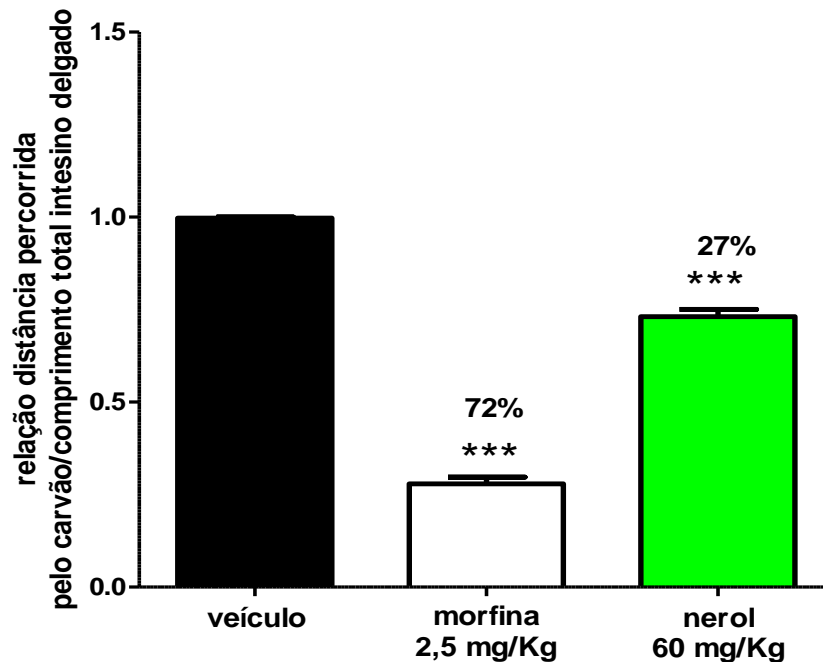


Fig.15: Motilidade gastrointestinal. Valores expressos em média \pm e.p.m. (n=5-6). Os números em porcentagem indicam a redução da motilidade gastrointestinal em relação ao veículo. Análise estatística: ANOVA seguido de Dunnett *** $p < 0,001$.

IV.2.G.1 - DIARRÉIA INDUZIDA POR ÓLEO DE RÍCINO

Camundongos tratados com nerol apresentaram redução na quantidade e no tempo de início de evacuações aquosa quando comparados com camundongos tratados com veículo (tabela 3).

Tabela 3 - Avaliação das evacuações de camundongos.

atividade antidiarréica em camundongos com diarreia induzida por óleo de rícino						
Tratamento	dose (mg/Kg)	n	tempo inicial evacuação aquosa (minutos)	quantidade de evacuações		
				normal	semi-solida	liquida
Veículo		8	92 \pm 11	0,9 \pm 0,4	1,1 \pm 0,2	4,9 \pm 0,8
Loperamida	5	7	240 \pm 0***	0,1 \pm 0,1 ^{ns}	0,0 \pm 0,0*	0,0 \pm 0,0***
nerol	60	8	185 \pm 21***	1,8 \pm 0,6 ^{ns}	1,4 \pm 0,6 ^{ns}	1,1 \pm 0,4***

Valores expressos em média \pm erro padrão da média (e.p.m). Análise estatística: ANOVA seguido de Dunnett para o tempo de início das evacuações aquosas e Kruskal-Wallis seguido de Dunn para a quantidade de evacuações. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. (ns= diferença não significativa)

IV.2.G.2 - BLOQUEIO DE CANAIS DE CÁLCIO

A porção epididimal do ducto deferente de ratos, quando incubadas na presença de diferentes concentrações de nerol, não apresentaram modificações na tensão máxima após a adição de cloreto de cálcio se comparados com os ductos encubados apenas com veículo. Também não foi alterada a quantidade de cloreto de cálcio necessária para contrair o ducto deferente a 50% de sua tensão máxima (EC₅₀) (tabela 2). A figura 16 representa a média da curva concentração-resposta.

Tabela 2 - Efeito do nerol sobre a tensão da porção epididimal do ducto deferente de ratos provocada pela adição de cloreto de cálcio

contração do ducto deferente epididimal de ratos Wistar na presença de concentrações crescente de cloreto de cálcio		
Tratamento	tensão máxima (g)	pEC _{ca²⁺} 50
Veículo	1,327 ± 0,081	2,423 ± 0,097
nerol 1µM	1,214 ± 0,143	2,468 ± 0,188
nerol 3µM	1,593 ± 0,129	2,165 ± 0,124
nerol 10µM	1,560 ± 0,178	2,438 ± 0,215
nerol 30µM	1,507 ± 0,070	2,525 ± 0,093

Valores expressos em média ± e.p.m (n=3). Análise estatística: ANOVA seguido de Dunnett

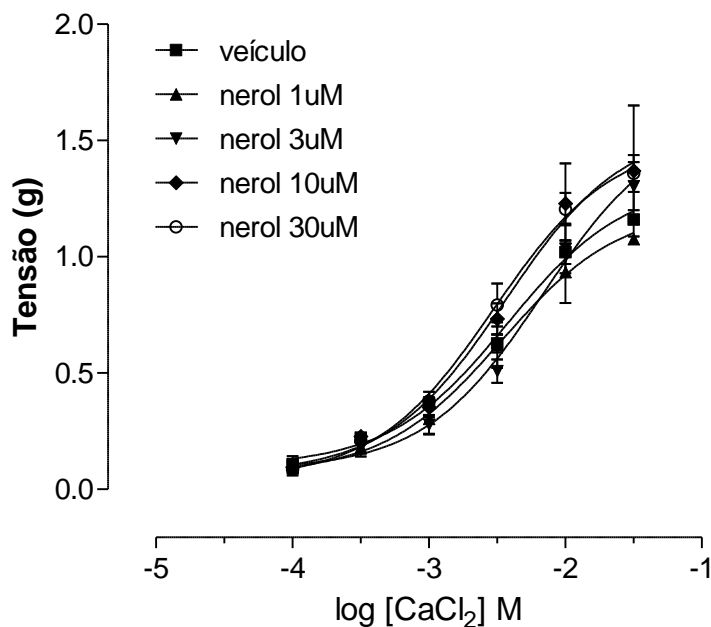


Fig.16: Tensão da porção epididimal do ducto deferente induzida pela a adição de cloreto de cálcio. Média da curva concentração-resposta. Os símbolos representam a média da tensão e as barras verticais ± erro padrão da média (e.p.m).

IV.2.G.3 - ACÚMULO FLUÍDO INTESTINAL

Grupo tratado com Nerol 60 mg/Kg apresentou redução do peso do conteúdo intestinal em relação ao grupo tratado com veículo, porém quando os animais foram pré-tratados com naloxona o nerol não alterou o conteúdo intestinal em relação ao veículo e aumentou o conteúdo intestinal em relação ao grupo tratado com nerol e pré-tratado com salina (fig.17).

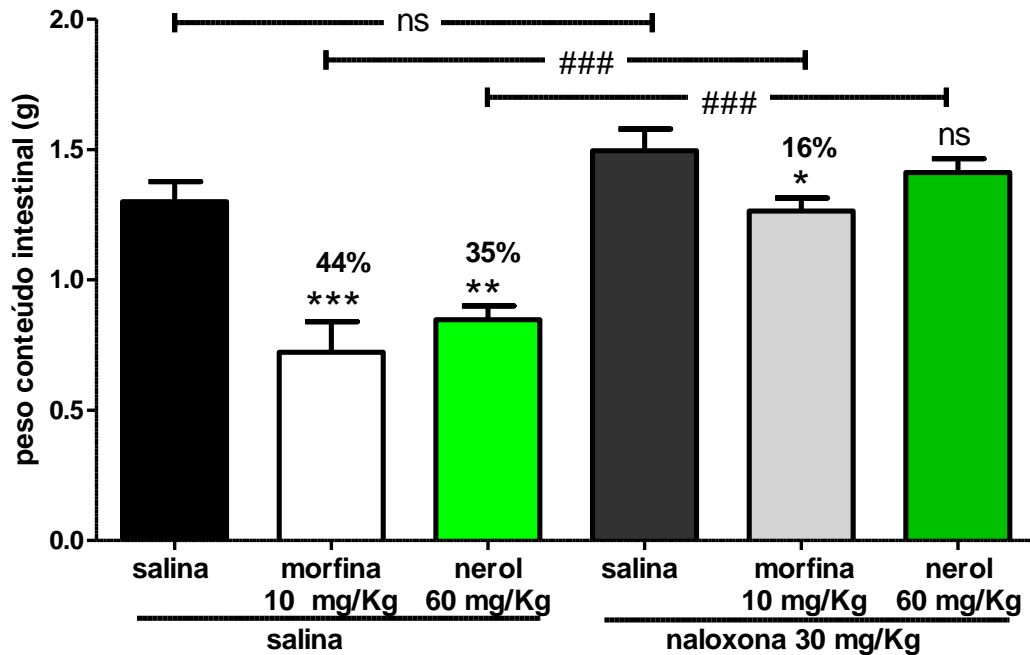


fig.:17. Acúmulo de fluído intestinal. Valores expressos em média \pm epm. (n=6-7). Os números em porcentagem indicam a redução do acúmulo intestinal em relação ao veículo com o mesmo pré-tratamento. Análise estatística: ANOVA seguido de Dunnett para análise entre os grupos com mesmo pré-tratamento. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e seguido de Tukey para análise entre os pré-tratamentos. ### $p < 0,01$.

IV.2.G.4 - ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES OPIÓIDES NA MOTILIDADE GASTROINTESTINAL

A redução da motilidade gastrointestinal do grupo tratado com nerol não foi verificada quando faz-se a comparação entre os grupos pré-tratados com naloxona, além disso, o grupo tratado com nerol e pré-tratado com naloxona apresentou aumento na motilidade gastrointestinal quando comparando com o grupo tratado com nerol que não recebeu pré-tratamento. (fig.18)

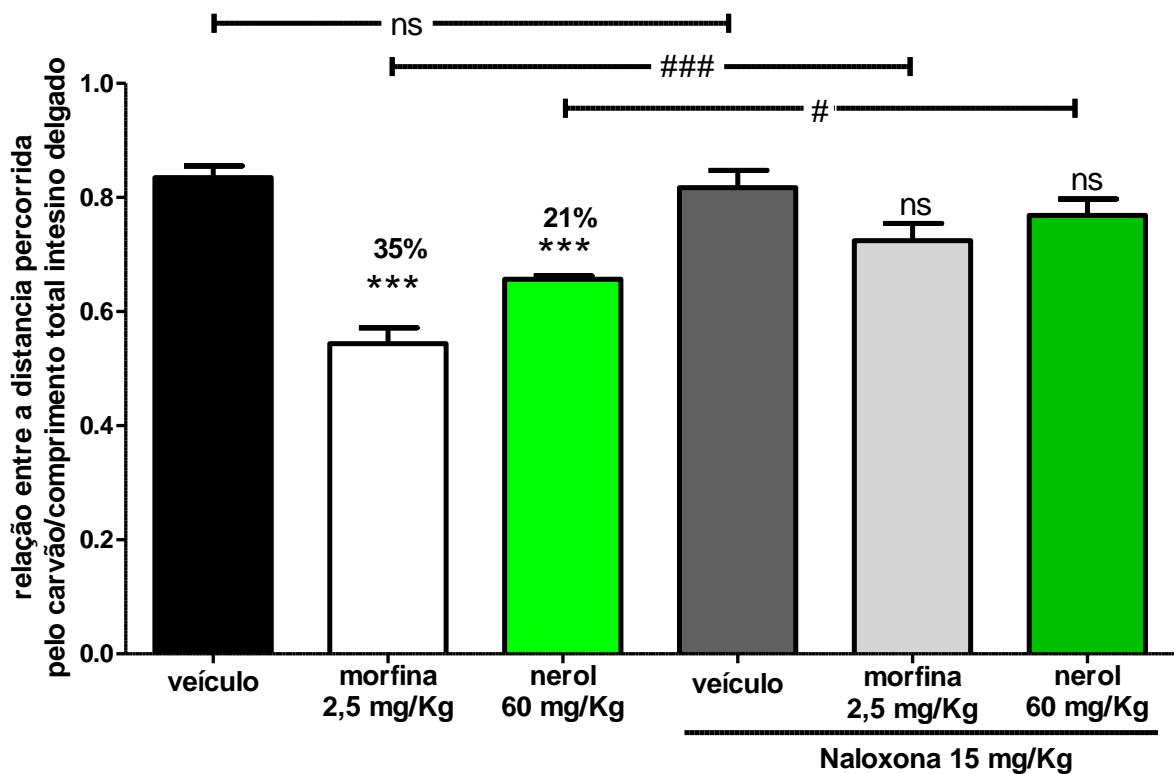


Fig. 18: Envolvimento de receptores opióides na motilidade gastrointestinal em camundongos Swiss. Valores expressos como média \pm e.p.m. (n=4-5). Números percentuais indicam a redução da motilidade gastrointestinal em relação ao veículo. Análise estatística: ANOVA seguido de Dunnett entre os grupos com mesmo o mesmo pré-tratamento *** $p < 0,001$ e seguido de Tukey para análise entre os pré-tratamentos. # $p < 0,05$; ### $p < 0,001$.

IV.2.H - ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES OPIÓIDES NA GASTROPROTEÇÃO

Entre os grupos pré-tratados com salina 0,9%, os animais tratados com nerol ou com morfina apresentaram redução significativa na área de lesão. O pré-tratamento com naloxona reverteu a proteção exercida pela morfina porém, não alterou a proteção exercida pelo nerol. Comparando entre os grupos pré-tratados com naloxona, nerol também exerceu gastroproteção em relação ao grupo tratado com veículo (fig.19).

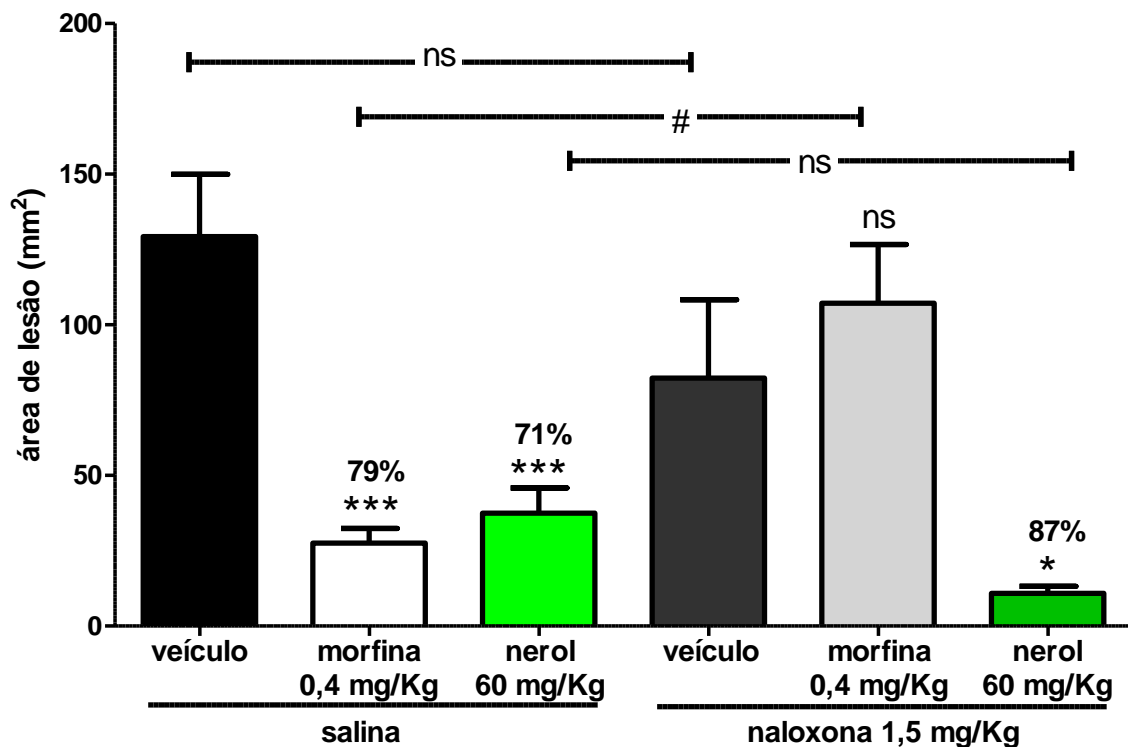


Fig. 19: Envolvimento de receptores opióides na gastroproteção. Valores expressos como média \pm e.p.m. (n=7-8). Números percentuais indicam o aumento ou a redução na área de lesão em relação aos veículos. Análise estatística: ANOVA seguido de Dunnett entre os grupos com mesmo o mesmo pré-tratamento * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ e seguido de Tukey para análise entre os pré-tratamentos. # $p < 0,05$. (ns= diferença não significativa)

IV.2.I. ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES OPIÓIDES NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO

O grupo de animais tratado com sulfato de morfina apresentou aumento na média da área de lesão gástrica provocada pela isquemia e reperfusão da artéria celíaca quando comparado com o grupo tratado apenas com o veículo utilizado para diluição do sulfato de morfina (propilenoglicol 10%), sugerindo desta forma, a participação de receptores opióides no agravamento de lesões gástricas induzidas pelo processo de isquemia e reperfusão da artéria celíaca (fig.20).

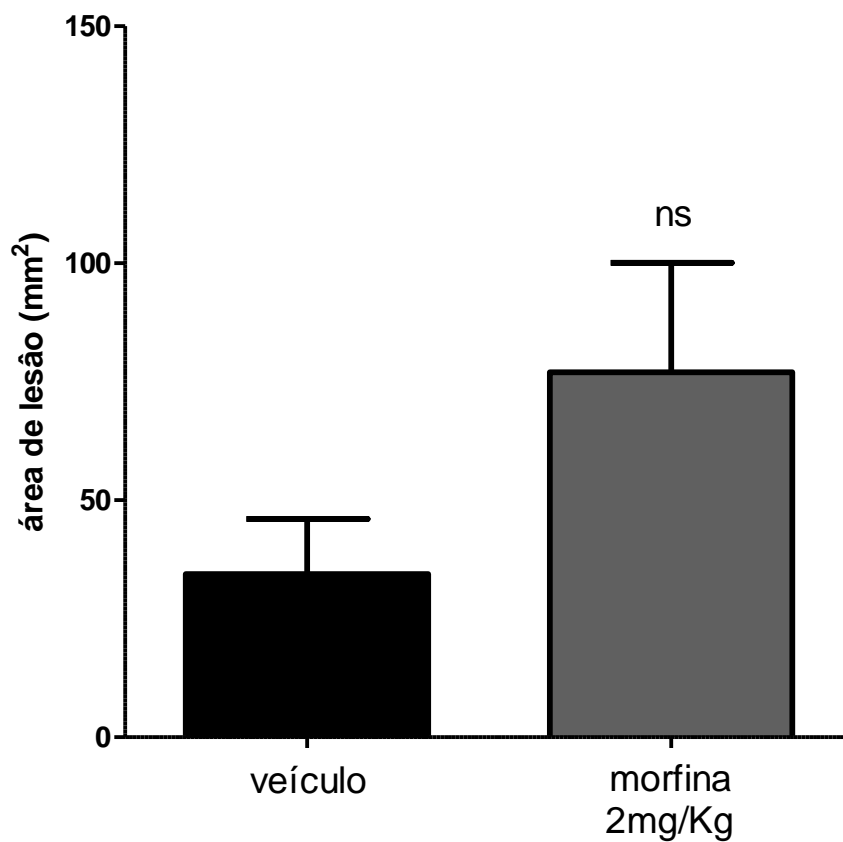


Fig.20: Úlcera gástrica induzida por Isquemia e reperfusão. Valores expressos em média \pm erro padrão da média (e.p.m) (n=6-8). Análise estatística: teste t-student. (ns= diferença não significativa)

IV.3 - TOXICIDADE AGUDA E SCREENING HIPOCRÁTICO

Apenas os grupos de animais tratados com doses muito superiores da que possui atividade farmacológica apresentaram mortes no período de 14 dias após tratamento com Nerol (tabela 4).

Tabela 4 – Mortalidade 14 dias após o tratamento com diferentes doses de nerol

Índice de mortes após o tratamento						
Dose nerol (mg/Kg)	Machos			Fêmeas		
	mortalidade (%)	Mortes	n	mortalidade	mortes	n
5000	100	10	10	100	10	10
2500	90	9	10	56	5	9
1250	56	5	9	44	4	9
600	0	0	11	0	0	9
300	0	0	10	0	0	11
60	0	0	8	0	0	8

Os camundongos tratados com doses letais de nerol apresentaram alterações na maioria dos parâmetros avaliados dentro do período de 6 horas após os tratamentos. Nas doses de 60, 300 e 600 mg/Kg poucos parâmetros apresentaram alterados no grupo, porém algumas alterações foram observadas individualmente como: alterações na aparência geral, frêmito vocal, aperto de cauda e ataxia. Os quadros 1 e 2 apresentam apenas os parâmetros alterados em algum representante dos grupos avaliados. Para os parâmetros que não estão apresentados na tabela, não foi verificada alteração em nenhum dos animais avaliados.

Quadro 1 - Screening hipocrático avaliados durante o período de 6 horas após o tratamento com veículo ou nerol nas doses de 2500, 1250 e 60 mg/Kg.

sinais e sintomas		veículo	nerol 2500 mg/Kg		nerol 1250 mg/Kg		nerol 60 mg/Kg	
			Classificação					
aparência geral	fêmeas	4	0 4	0 0	0 2	0 0	3 3	4 4
	machos		0 0	0 4	1 1	3 3	4 4	4 4
frênilo vocal	fêmeas	0	0 1	0 0	0 2	0 0	3 0	0 0
	machos		0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
resposta ao toque	fêmeas	4	0 4	0 0	1 4	0 0	4 4	4 4
	machos		0 0	0 4	4 3	3 3	4 4	4 4
aperto de cauda	fêmeas	4	3 4	3 3	3 4	2 0	4 4	4 4
	machos		4 0	0 4	3 2	0 2	4 4	4 4
trem posterior	fêmeas	0	2 0	0 0	2 0	2 0	0 0	0 0
	machos		4 4	4 0	0 0	0 0	0 0	0 0
endireitamento	fêmeas	4	4 4	0 0	4 4	3 0	4 4	4 4
	machos		2 2	0 4	4 4	4 4	4 4	4 4
tônus muscular	fêmeas	4	2 4	2 3	2 4	3 1	4 4	4 4
	machos		2 1	1 4	4 3	4 4	4 4	4 4
força de agarrar	fêmeas	4	4 1	0 1	2 4	3 0	4 4	4 4
	machos		2 2	0 4	3 4	4 3	4 4	4 4
Ataxia	fêmeas	0	3 1	4 4	3 0	4 4	0 1	0 0
	machos		4 4	4 0	1 2	0 0	0 0	0 0
reflexo auricular	fêmeas	4	4 0	0 0	0 4	0 0	4 4	4 4
	machos		0 0	0 4	4 0	0 4	4 4	4 4
reflexo corneal	fêmeas	4	0 4	0 0	0 4	1 0	4 4	4 4
	machos		0 0	1 4	2 0	2 3	4 4	4 4
estimulações	fêmeas	4	0 4	0 0	0 4	0 0	4 4	4 4
	machos		0 0	0 4	2 1	2 4	4 4	4 4
Hipnose	fêmeas	0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
	machos		0 0	0 0	1 1	0 0	0 0	0 0
Anestesia	fêmeas	0	0 0	0 0	1 0	0 4	0 0	0 0
	machos		0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
Ptose	fêmeas	0	1 0	1 1	1 1	2 0	0 0	0 0
	machos		2 2	0 0	1 0	2 0	0 0	0 0
Piloereção	fêmeas	0	2 0	0 2	1 0	1 0	0 0	0 0
	machos		0 1	1 0	0 2	0 1	0 0	0 1
Defecação	fêmeas	4	4	0	0	0	4	4
	machos		0	0	1	1	4	4
Respiração	fêmeas	4	3 4	1 2	3 4	2 1	4 4	4 4
	Machos		1 1	1 4	4 3	4 4	4 4	4 4
Cianose	fêmeas	0	0 0	0 0	0 0	0 2	0 0	0 0
	machos		0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0

Os valores de expressos representam a classificação do parâmetro para o animal avaliado. Testes com anotação "0" para o veículo, a intensidade do efeito varia na escala de 1 a 4 e os testes com anotação "4", a intensidade do efeito poderá variar de 0 a 3 quando ocorrer diminuição, 4 quando igual ao controle e de 5 a 8 quando ocorrer aumento.

Quadro 2 - Screening hipocrático avaliados durante o período de 6 horas após o tratamento com veículo ou nerol nas doses de 600 e 300 mg/Kg.

sinais e sintomas		veículo	nerol 600 mg/Kg					nerol 300 mg/Kg					
		tempo (min)	30	70	120	240	360	30	70	120	240	360	
		Classificação											
aparência geral	fêmeas	4	4 4	4 4	4 4	1 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4
	Machos		4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4
frênito vocal	fêmeas	0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
	machos		2 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
resposta ao toque	fêmeas	4	4 4	4 4	4 4	3 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4
	machos		4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 3	4 4	4 4	4 4
aperto de cauda	fêmeas	4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4
	machos		4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 3	4 4	4 4	4 4
força de agarrar	fêmeas	4	3 4	4 4	3 3	4 4	4 4	3 3	3 4	3 3	4 4	4 4	4 4
	machos		2 4	3 4	4 4	4 4	4 4	4 4	2 2	4 4	4 4	4 4	4 4
Ataxia	fêmeas	0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
	machos		0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
reflexo auricular	fêmeas	4	4 3	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4
	machos		3 4	4 4	4 2	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4
reflexo corneal	fêmeas	4	4 3	4 4	4 4	3 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4
	machos		4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4
Piloereção	fêmeas	0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
	machos		1 0	1 0	0 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
Defecação	fêmeas	4	1	2	6	5	4	4	2	0	6	3	
	machos		0	3	2	4	1	1	3	1	3	2	
Respiração	fêmeas	4	4 4	4 4	4 4	4 4	5 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4
	machos		4 5	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4

Os valores expressos representam a classificação do parâmetro para o animal avaliado. Testes com anotação "0" para o veículo, a intensidade do efeito varia na escala de 1 a 4 e os testes com anotação "4", a intensidade do efeito poderá variar de 0 a 3 quando ocorrer diminuição, 4 quando igual ao controle e de 5 a 8 quando ocorrer aumento.

A administração de dose única de nerol nas doses de 2500, 1250, 600, 300 ou 60 mg/Kg não alterou a relação entre os pesos dos órgãos e os pesos corporais dos animais avaliados 14 dias após a administração em camundongos fêmeas (tabela 5) e machos (tabela 6).

Tabela 5 - Avaliação da relação peso do órgão/peso dos animais 14 dias após o tratamento em camundongos fêmeas (n=4-11).

toxicidade fêmeas – arcoseno da relação peso órgãos/ peso animais				
	Veículo	nerol 2,5g/Kg	nerol 1,25g/Kg	nerol 60mg/Kg
Coração	3,82 ± 0,10	3,71 ± 0,05	3,48 ± 0,11	3,55 ± 0,10
Fígado	13,59 ± 0,27	13,94 ± 0,20	13,19 ± 0,41	13,67 ± 0,17
Baço	3,45 ± 0,16	3,54 ± 0,18	3,37 ± 0,27	3,13 ± 0,16
Rim	6,43 ± 0,22	6,16 ± 0,23	6,17 ± 0,12	5,83 ± 0,17
Pulmão	4,04 ± 0,13	4,36 ± 0,05	3,94 ± 0,11	4,19 ± 0,11

toxicidade fêmeas - arcoseno relação peso órgãos/ peso animais			
	veículo	nerol 300 mg/Kg	nerol 600mg/Kg
Coração	3,86 ± 0,10	3,74 ± 0,05	3,87 ± 0,10
Fígado	13,43 ± 0,26	13,28 ± 0,30	14,05 ± 0,35
Baço	3,65 ± 0,22	3,51 ± 0,11	3,84 ± 0,12
Rim	6,14 ± 0,10	6,13 ± 0,08	5,97 ± 0,17
Pulmão	4,52 ± 0,14	4,35 ± 0,10	4,30 ± 0,05

Valores expressos em média ± erro padrão da média (e.p.m) do arcoseno da relação peso do órgão/peso dos animais. Análise estatística: ANOVA com teste posterior de Dunnett

Tabela 6: Avaliação da relação peso do órgão/peso dos animais 14 dias após o tratamento em camundongos machos (n=5-11).

toxicidade machos - relação peso órgãos/ peso animais			
	veículo	nerol 1,25g/Kg	nerol 60mg/Kg
Coração	3,76 ± 0,08	3,93 ± 0,07	3,92 ± 0,04
Fígado	13,82 ± 0,27	14,56 ± 0,24	14,21 ± 0,28
Baço	3,42 ± 0,14	3,33 ± 0,08	3,56 ± 0,29
Rim	6,72 ± 0,19	7,09 ± 0,19	6,61 ± 0,19
Pulmão	4,16 ± 0,17	4,14 ± 0,11	4,29 ± 0,35

toxicidade machos - arcoseno relação peso órgãos/ peso animais			
	veículo	nerol 300 mg/Kg	nerol 600mg/Kg
Coração	4,00 ± 0,12	4,02 ± 0,12	4,13 ± 0,10
Fígado	14,35 ± 0,27	15,07 ± 0,27	14,48 ± 0,35
Baço	3,51 ± 0,12	3,35 ± 0,14	3,27 ± 0,11
Rim	6,79 ± 0,11	6,86 ± 0,13	6,86 ± 0,17
Pulmão	4,72 ± 0,20	5,00 ± 0,13	4,57 ± 0,35

Valores expressos em média ± erro padrão da média do arcoseno da relação peso do órgão/peso dos animais. Análise estatística: ANOVA com teste posterior de Dunnett

A análise dos pesos de camundongos fêmeas e machos no primeiro, sétimo e décimo quarto dia após o tratamento não apresentou diferença entre os grupos tratados com nerol e o grupo tratado com veículo (figuras 21 e 22),

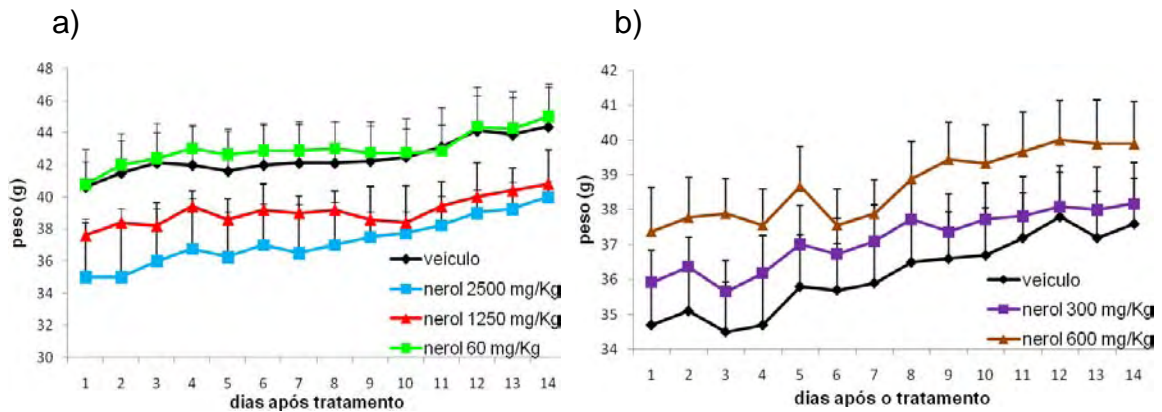


Fig.21: Avaliação do peso de camundongos fêmeas durante 14 dias após o tratamento. **a)** nerol 2500, 1250 e 60 mg/Kg; **b)** nerol 300 e 600 mg/Kg. Valores expressos em média \pm erro padrão da média (e.p.m). Análise estatística: ANOVA seguido de Dunnett

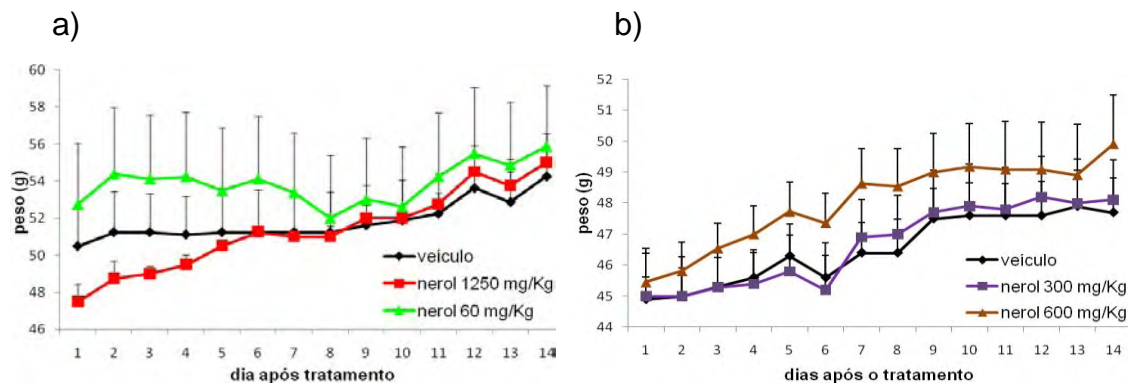


Fig.22: Avaliação do peso de camundongos machos durante 14 dias após o tratamento. **a)** nerol 2500, 1250 e 60 mg/Kg; **b)** nerol 300 e 600 mg/Kg. Valores expressos em média \pm erro padrão da média (e.p.m). Análise estatística: Anova seguido de Dunnett

V - DISCUSSÃO

Visto que outros monoterpenos em estudo em nosso laboratório apresentaram atividade gastroprotetora, inclusive um isômero do Nerol, o geraniol, tomou-se como base a dose destes monoterpenos para avaliar a dose gastroprotetora efetiva do nerol no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol.

O modelo de úlcera gástrica induzida por etanol é um modelo amplamente utilizado para avaliação de substâncias com potencial atividade gastroprotetora. Segundo mecanismo proposto por Szabo (1987), o etanol administrado por via oral penetra rapidamente na mucosa gástrica e danifica a membrana plasmática causando morte celular e esfoliação do epitélio o que deixa as estruturas da lâmina própria e submucosa (mastócitos, macrófagos, vasos sanguíneos) expostas aos agentes lesivos presentes no lúmen gástrico, desta forma o etanol causa lesão de forma direta e de forma indireta através da liberação de produtos vasoativos. Nas três doses avaliadas (15, 30 e 60 mg/Kg), o nerol apresentou significativa atividade gastroprotetora (fig. 1). Foi também avaliado as doses de 3,75 e 7 mg/Kg (resultados não apresentados) porém as mesmas não apresentaram atividade gastroprotetora. Nerol, portanto foi capaz de evitar os efeitos lesivos do etanol sobre a mucosa gástrica.

A prevalência de úlcera gástrica e duodenal apresenta diferente distribuição geográfica e apresenta diferentes mecanismos de lesão. Úlcera duodenal esta essencialmente relacionada a bactéria *H.pylori* e é causada principalmente pelo aumento da acidez e de pepsina e metaplasia gástrica no duodeno (Yuan et al., 2006). O efeito protetor contra úlcera duodenal pode ser avaliado através da indução por cisteamina, substância que pode provocar úlcera duodenal perfurante dentro de 24 horas (Szabo, 1987). Embora haja estudo que demonstra o mecanismo citotóxico provocado pela cisteamina *per si* (Khomeenko et al., 2009), Szabo (1987), cita que o mecanismo de indução de úlcera por cisteamina esta relacionado basicamente ao aumento da secreção ácida e a deficiência de neutralização por íons bicarbonato e redução do transporte do conteúdo neutralizado do duodeno para as regiões distais do intestino. O nerol na dose de 60 mg/Kg não foi capaz de proteger a mucosa duodenal contra a lesão provocada por cisteamina mostrando que o mecanismo protetor pelo qual atua não é capaz de bloquear as alterações provocadas pela cisteamina.

A partir dos resultados da atividade gastroprotetora no modelo de úlcera induzida por etanol, foi estudada a atividade das três doses do nerol no modelo de úlcera gástrica induzida por DAINE. Em contrapartida aos efeitos benéficos anti-inflamatórios e analgésicos, o uso frequente de DAINE é provavelmente a causa mais comum de lesões na mucosa gastrointestinal nos países ocidentais (Yuan et al., 2006). Quando examinados endoscopicamente, 15 a 30% dos usuários de DAINE possui uma ou mais úlcera (Yuan et al., 2006). DAINE pode causar lesão superficial por ação tópica devido a um acúmulo do próprio DAINE por aprisionamento iônico nas células do epitélio, porém, é por ação sistêmica que estes agentes causam lesões mais severas devido principalmente a inibição da síntese de prostaglandina mediada pela enzima cicloxigenase (COX) (Laine et al., 2008). As prostaglandinas são responsáveis pela manutenção da integridade da mucosa gástrica e a consequência de sua inibição resulta em efeitos como a hipermotilidade gástrica, seguido por distúrbios microvascular e ativação de neutrófilos (Laine et al., 2008). Além da ausência de prostaglandina, a inibição da enzima cicloxigenase provoca desvio do metabolismo do ácido aracdônico para a via da 5-lipoxigenase levando ao aumento da produção de leucotrienos (Laine et al., 2008). DAINE também podem causar lesão por mecanismos relacionados a inibição da fosforilação oxidativa na mitocôndria, inibição de quinases ou ativação de apoptose (Laine et al., 2008). Foi verificado que as menores doses de nerol, que no modelo de lesão gástrica induzida por etanol exerceram proteção, não tiveram o mesmo efeito no modelo de úlcera induzida por DAINE. Neste modelo foi evidenciado atividade gastroprotetora apenas na dose de 60 mg/Kg, porém em menor proporção que no modelo anterior. Desta forma presume-se que o nerol esteja atuando através de algum mecanismo que esta sendo inibido em parte por DAINE ou o mecanismo pelo qual atua tem maior relevância na úlcera induzida por etanol do que na úlcera induzida por indometacina ou ainda, que necessita de doses maiores para modificar uma função que esteja envolvida na proteção contra úlcera induzida por DAINE.

Visto que o Nerol, no teste de formalina realizado previamente em nosso laboratório, apresentou atividade antinociceptiva relacionada a fase inflamatória da dor (Hunskar e Hole, 1987) na dose de 200 mg/Kg, foi avaliado neste trabalho se a dose de nerol com propriedade antinociceptiva, a exemplo dos DAINE, também seria capaz de potencializar a lesão gástrica induzida por Indometacina. Porém foi verificado que o nerol manteve a proteção gástrica mesmo na dose que possui

atividade antinociceptiva, portanto o nerol apresenta-se como uma droga com ação antinociceptiva e também gastroprotetora. Foi avaliado também se na menor dose que possui ação gastroprotetora o nerol também apresentaria efeito antinociceptivo no teste de formalina, como foi verificado na dose de 200 mg/Kg. Contudo, nerol não apresentou atividade antinociceptiva na dose de 60 mg/Kg mostrando que a dose de nerol com ação gastroprotetora é menor que a dose de nerol para sua ação antinociceptiva.

Terano et al. (1989) verificou que seqüestradores de espécies reativas de oxigênio e o bloqueio de enzima pró-oxidante reduzem a formação de lesão provocada por etanol, mostrando que radicais livres derivados de oxigênio podem estar envolvidos na patogênese da lesão gástrica induzida por etanol. Semelhantemente, Yoshikawa et al.(1993) verificaram que a administração de seqüestrador de radical hidroxila e enzimas antioxidantes inibiram as alterações patológicas induzidas por indometacina na mucosa gástrica. Um modelo experimental que permite avaliar *in vivo* uma atividade gastroprotetora por mecanismos antioxidantes é o modelo de indução de úlcera gástrica induzida por isquemia e reperfusão (Sasaki e Joh, 2007). A isquemia provoca o acúmulo de hipoxantina e a conversão de xantina desidrogenase a xantina oxidase (Ueda et al., 1989). Com a reperfusão, xantina oxidase cataliza a reação entre hipoxantina e oxigênio formando O^{2-} e H_2O_2 (Ueda et al., 1989). Subsequentemente O^{2-} e H_2O_2 reagem na presença de metal de transição para formar radical hidroxila reativo e citotóxico (Ueda et al., 1989). Edris (2007), mostra em revisão que diversos óleos essenciais possuem atividade antioxidante, podendo ser atribuída à participação de alcoóis monoterpenos nesta atividade. Contudo, nossos resultados demonstram que o tratamento com nerol na dose 60 mg/Kg não protegeu a mucosa gástrica contra a formação de lesão sugerindo desta forma, que o nerol não atua por ação antioxidante ou por modular as defesas antioxidantes endógenas.

Fármacos como sucralfato, produzem polímeros viscosos que aderem a mucosa gástrica formando um revestimento sobre a sua superfície (Brunton et al., 2006). Portanto, para descartar a ação local do nerol como revestimento e avaliar sua possível ação sistêmica foi realizado tratamento com nerol por via intraperitoneal antes da indução de lesão gástrica por HCl/Etanol e foi verificado neste modelo que o nerol manteve o efeito gastroprotetor, o que mostra que o mesmo possui ação

gastroprotetora sistêmica, porém não exclui também a possibilidade de atuar sobre mecanismos locais.

O efeito gastroprotetor de diferentes agentes depende da manutenção dos níveis de prostaglandina (Peskar et al., 2002). Areche et al.(2008) mostrou em seus estudos que a atividade gastroprotetora do diterpeno ferruginol foi revertida quando indometacina foi administrada antes do tratamento. Com o objetivo de avaliar se os DAINES reduzem o potencial gastroprotetor do nerol, e se o mecanismo do nerol é dependente da ação de prostaglandinas, foi administrado previamente indometacina que bloqueou assim a via da cicloxigenase. Mesmo nestas condições, o nerol manteve o mesmo potencial gastroprotetor que o grupo que foi pré-tratado apenas com salina, indicando que a proteção exercida pelo nerol não é dependente da atividade da enzima cicloxigenase.

Ácido clorídrico em altas concentrações é capaz de induzir no estômago severas lesões hemorrágicas (Osada et al., 1990). Hiruma-Lima et al.(2000b), verificou que o diterpeno cordatina em estudo, além de apresentar proteção contra úlcera gástrica induzida por HCl/etanol e por Indometacina/betanecol também reduziu a secreção ácida no modelo de ligadura do piloro inferindo que a atividade antissecretória pode ter participação na proteção gástrica. O modelo de ligadura do piloro permite que a secreção gástrica seja acumulada no estômago, facilitando desta forma, a análise do conteúdo estomacal (Shay, 1945). Contudo foi verificado neste trabalho que o Nerol não alterou a secreção de ácido clorídrico (volume, pH e concentração de H⁺), desta forma exclui-se a suposição de que o nerol atue por mecanismos antissecretórios. Os resultados obtidos estão em conformidade com Souza et al. (2011) que evidenciou que o monoterpene alcoólico α -terpineol possui atividade gastroprotetora, porém não é dependente de prostaglandina nem de efeito antissecretório.

A superfície da mucosa gástrica é coberta por uma camada formada de gel mucoso, bicarbonato e fosfolípideo constituindo a primeira linha de defesa da mucosa gástrica (Laine et al., 2008) e a administração de etanol é capaz de reduzir a quantidade de muco gástrico (Twardowschy et al., 2008). O gel mucoso possui em sua composição a glicoproteína mucina que formam polímeros essenciais para a formação do gel (Laine et al., 2008), através da ligação da mucina ao corante Alcian Blue o muco pode ser quantificado (Corne et al., 1974). Takayama et al. (2011) verificou que o óleo essencial de *Hyptis spicigera*, composto principalmente por

monoterpenos, apresentou atividade gastroprotetora nos modelos de indução por etanol e por indometacina e atribui esta proteção ao aumento da produção de muco verificado por meio da quantificação de Alcian Blue. Contudo foi verificado neste estudo que o nerol não foi capaz de aumentar o muco gástrico em relação ao grupo tratado com veículo e, portanto, seu mecanismo de ação não interfere nas vias envolvidas na manutenção do muco gástrico.

Um dos principais fatores na proteção da mucosa gástrica é a manutenção do fluxo sanguíneo (Laine et al., 2008; Kawano e Tsuji, 2000) de forma que, com uma adequada perfusão vascular danos no epitélio gástrico geralmente não progridem para necrose das camadas mais profundas da mucosa (Wallace, 2008). A presença de etanol na circulação estimula a liberação de substâncias vasoconstritoras pela vasculatura gástrica resultando em distúrbios na microcirculação e precede a formação de úlcera gástrica (Kawano e Tsuji, 2000). DAINÉ também reduzem o fluxo sanguíneo na mucosa gástrica o suficiente para deixá-la mais susceptível a danos por causados por irritantes presentes no lúmen (Wallace, 2008). Em contrapartida, substâncias vasodilatadoras liberadas pelo endotélio como o óxido nítrico e prostaciclina protegem a mucosa gástrica contra a ação lesiva de vasoconstritores (Laine et al., 2008). Embora haja outras substâncias endógenas, a proteção gástrica mediada por modulação da circulação na mucosa tem sido atribuída principalmente ao óxido nítrico (NO) (Laine et al., 2008; Kawano e Tsuji, 2000). A ação do óxido nítrico pode ser inibida por inibidores de sua síntese como o L-NAME (N-nitro-L-arginina metil éster) (Matsuda et al., 1999) e desta forma avaliar a participação dos efeitos mediados pelo óxido nítrico na gastroproteção. Para verificar se há envolvimento da via do óxido nítrico na gastroproteção conferida pelo nerol, ratos foram pré-tratados com L-NAME antes do tratamento com Nerol e mesmo assim o nerol continuou exercendo proteção, não apresentando diferença na área de lesão entre o grupo tratado com L-NAME e o grupo pré-tratado com salina, indicando que não há participação das ações do óxido nítrico na gastroproteção exercida pelo nerol e que dessa forma o nerol não exerce seu efeito na modulação do fluxo sanguíneo. Esses resultados estão em conformidade com Silva et al. (2009) que também verificou que o monoterpene alcoólico isopulegol exerce gastroproteção não mediada pela via do óxido nítrico.

A mucosa gástrica contém altas concentrações de glutathione reduzida que representa o principal componente do conjunto de sulfidrilas não-protéicas

endógenos (Szabo et al., 1981). O principal efeito da citoproteção por compostos sulfidrílicos é a preservação da microcirculação da mucosa através do seqüestro de radicais livres (Konturek, 1990). Compostos sulfidrílicos não protéicos são capazes de ligar-se a radicais livres reativos bloqueando seus efeitos lesivos e podem influenciar as propriedades físicas do muco, visto que estes são unidos por pontes dissulfeto (Szabo et al., 1981). Allen e Flemström (2005) relatam que o gel mucoso é dissolvido através da redução por agentes tióis que destroem a estrutura multimérica do componente mucina e a glutathione pode proteger das pontes dissulfetos da redução (Avila et al., 1996). A administração de etanol por via oral reduz as concentrações de sulfidrilas não-protéicas na mucosa gástrica (Szabo et al., 1981). Também foi verificado que piroxicam (DAINE) reduz os níveis de compostos sulfidrílicos não protéicos (Avila et al., 1996). A administração de agentes bloqueadores de sulfidrilas reduz os níveis de sulfidrilas não-protéicas (Szabo et al., 1981). Portanto, com o objetivo de avaliar o envolvimento de compostos sulfidrílicos na gastroproteção, um procedimento amplamente utilizado é a administração de N-etilmaleimida (NEM), um bloqueador dos compostos sulfidrílicos, antes do tratamento com a substância gastroprotetora (Matsuda et al., 1999). Desta forma foi avaliada a participação de compostos sulfidrílicos no efeito gastroprotetor exercido pelo nerol. Foi verificado que na presença do bloqueador dos compostos sulfidrílicos o nerol perdeu seu efeito gastroprotetor, indicando que o efeito gastroprotetor do nerol é dependente da integridade de compostos sulfidrílicos endógenos.

Como descrito por Anderson (1985), os níveis de glutathione em amostras biológicas podem ser medidos da seguinte forma: primeiramente mantém-se toda a glutathione presente na amostra na forma oxidada, em seguida pela adição da enzima glutathione reductase, toda a glutathione presente no tecido é novamente reduzida permitindo assim que os níveis de glutathione total sejam medidos pela reação da glutathione reduzida com DTNB adicionado a amostra. Grupos tratados com nerol apresentaram níveis de glutathione maiores que o grupo tratado com veículo mostrando que o nerol evitou a depleção de grupamentos sulfidrílicos causado pelo etanol. Quando os grupos foram pré-tratados com depletors de compostos sulfidrílicos, houve significativa redução de glutathione em todos os grupos e o nerol não foi capaz de manter os níveis de glutathione. Silva et al.(2009) também verificaram que os níveis de glutathione no grupo tratado com o monoterpene alcoólico isopulegol estavam elevados em relação ao grupo tratado apenas com

salina. Porém os autores não conseguiram caracterizar se o tratamento com isopulegol foi capaz de elevar os níveis de glutathione ou se o monoterpeno somente evitou a depleção dos níveis basais deste. Contudo, no presente trabalho o tratamento com nerol foi capaz de elevar os níveis de glutathione em relação ao grupo controle negativo. Este efeito de aumento dos níveis de glutathione não representa necessariamente que houve uma maior produção do mesmo. Mas que o nerol foi capaz de evitar sua depleção. Este argumento da manutenção dos níveis de glutathione pode ser fundamentado nos resultados obtidos no modelo de isquemia e reperfusão no qual o nerol não foi capaz de proteger a mucosa gástrica das espécies reativas de oxigênio produzido pelo procedimento. Compostos antioxidantes, como a glutathione exercem ação protetora no modelo de isquemia e reperfusão (Sasaki e Joh, 2007).

A formação de lesões hemorrágicas provocadas por DAINÉ estão diretamente relacionadas a aderência de neutrófilos no endotélio provocado pela supressão de prostaglandinas (Wallace, 2008). O recrutamento de neutrófilos tem sido medido pela mensuração da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) (La Casa et al., 2000). Estudos tem demonstrado aumento da atividade da enzima mieloperoxidase nas lesões induzidas por etanol (Rocha et al., 2011; Li et al., 2011) e por indometacina (Akar et al., 1999) e substâncias com efeito gastroprotetor nestes modelos foram capazes de reduzir a atividade da mieloperoxidase. Animais tratados com nerol apresentaram valores reduzidos da atividade da mieloperoxidase indicando que houve redução de recrutamento de células inflamatórias, contudo na presença de NEM, houve aumento da atividade da MPO, mostrando assim por parâmetros bioquímicos, que na presença do nerol houve redução de lesão e quando a atividade gastroprotetora do nerol foi inibida por NEM houve aumento de lesão.

Mersereau et al.(1988) propõem que a formação de úlcera por DAINÉ é consequência da atividade peristáltica vista neste modelo. Okada et al.(1989) concluíram que na lesão gástrica induzida por indometacina, apenas o aumento na motilidade gástrica é suficiente para causar a lesão e a deficiência de prostaglandina é necessária para tornar a lesão hemorrágica. Verificou ainda pelos mesmos autores que indometacina aumentou a motilidade gástrica acentuadamente e que aumento da secreção ácida e do fluxo sanguíneo ocorreu apenas tardiamente. Takeuchi et al.(1988) sugerem que a proteção conferida por catecolaminas contra

lesão gástrica causada por etanol acidificado, seja devido a uma inibição da atividade motora gástrica visto que apresentaram proteção gástrica na mesma dose que reduziram a atividade gástrica motora. Ko et al.(1995) também mostraram que aumento do volume gástrico basal, redução da área ocupada pelas dobras da mucosa ou redução do esvaziamento gástrico são mecanismos protetores contra lesão gerada por etanol 100%. Desta forma, a redução da atividade gástrica motora pode ser um mecanismo gastroprotetor contra lesão provocada por DAINÉ e por etanol. Através do experimento de ligadura do piloro ficou evidenciado que o nerol não aumenta o volume gástrico. A exposição prévia da mucosa gástrica de ratos ao etanol 20%, um irritante suave, exerce gastroproteção contra as lesões provocadas por etanol 100% (Ko et al., 1995). O etanol a 20% provoca uma resposta adaptativa que reduz o esvaziamento gástrico (Ko et al., 1995). O autor sugere que a redução do esvaziamento gástrico dilui o agente lesivo (etanol 100%) e desta forma contribui para o efeito gastroprotetor (Ko et al., 1995). A atividade do nerol sobre o trânsito gastrointestinal foi avaliado através da distância percorrida do carvão ativado no intestino delgado em camundongos. Nerol reduziu a relação entre a distância percorrida pelo carvão e o comprimento total do intestino delgado, mostrando que o nerol é capaz de reduzir o trânsito gastrointestinal. Segundo Chen et al.(1995), esta técnica não discrimina se ocorre redução na motilidade gástrica ou intestinal, mas caracteriza uma ação redutora no trânsito gastrointestinal. Neste trabalho, portanto não é possível afirmar se o nerol reduz o trânsito gástrico e/ou intestinal, mas foi possível avaliar uma redução deste trânsito.

Estudos complementares foram realizados com nerol para avaliar se a redução da motilidade gastrointestinal iria refletir em uma atividade antidiarréica. Neste trabalho verificou-se que o tratamento com nerol foi capaz de reduzir significativamente a quantidade e a latência para a produção de fezes aquosas.

A motilidade gastrintestinal é dependente da atividade eletrofisiológica das células musculares lisas, impulso neural do sistema nervoso intrínseco e autonômico, interações hormonais e contração coordenada do músculo liso (Kurz e Sessler, 2003). Para avaliar se o nerol inibe a contração do músculo liso inespecificamente (Chen et al., 2009) por bloqueio de canais de cálcio, ducto deferente de ratos foram despolarizados com KCl permitindo que os canais de cálcio voltagem dependentes fossem abertos. Em seguida foi avaliada a contração induzida pela adição de cálcio e verificou-se que o nerol não modificou o padrão de

contração obtido com o veículo. Conclui-se com isso que o nerol não reduz a motilidade gastrointestinal por bloqueio de canais de cálcio. O controle da excitabilidade do músculo liso do trato gastrointestinal pode ser modulado por neurotransmissores, hormônios ou agentes farmacológicos como os opióides, que a semelhança do nerol, são substâncias que além de afetar as funções motoras do trato gastrointestinal (Kurz e Sessler, 2003), também apresenta atividade antinociceptiva na dor inflamatória (Hunnskaar e Hole, 1985) e atividade gastroprotetora (Gyires, 1990). Os opióides no trato gastrointestinal provocam redução da propulsão intestinal, reduzem a motilidade gástrica e aumenta a absorção de fluídos e eletrólitos (Beard et al., 2011).

Nerol reduziu o acúmulo intestinal induzido pela administração oral de óleo de rícino e este efeito foi revertido por naloxona indicando a participação dos receptores opióides na redução de acúmulo intestinal induzida pelo nerol e sugerindo que também há participação de receptores opióides na redução do trânsito gastrointestinal induzida pelo nerol. Visto que entre os grupos pré-tratados com naloxona, o nerol não reduziu a motilidade gastrointestinal quando comparado com o grupo controle e que, o grupo tratado com nerol e pré-tratado com naloxona apresentou aumento na motilidade gastrointestinal em relação ao grupo tratado apenas com nerol, os resultados indicam a participação de receptores opióides na redução da motilidade gastrointestinal.

Bhounsule et al.(1994) mostram que o efeito gastroprotetor de opióides frente a lesão induzida por etanol absoluto é revertido por naloxona, mostrando desta forma a participação de receptores opióides na gastroproteção. Assim como o nerol, Gyres (1990), verificou que a gastroproteção exercida pela morfina é dependente de compostos sulfidrílicos.

Neste trabalho, apesar da naloxona ter revertido o efeito do nerol na motilidade gastrointestinal e acúmulo intestinal, a mesma não foi capaz de reverter a gastroproteção exercida pelo nerol, indicando portanto a participação de outras vias na ação gastroprotetora.

Pouco se sabe sobre o mecanismo dos opióides na gastroproteção visto que há diferentes receptores opióides centrais e periféricos e que podem proteger ou agravar a formação de úlcera nos diferentes modelos de indução de lesão gástrica.

Segundo Beard et al. (2011) e Kurz e Sessler (2003), as funções do trato gastrointestinal podem ser controlados pelos diferentes tipos de receptores opióides que possuem agonistas com diferentes níveis de afinidade. A naloxona é um antagonista opióide com alta afinidade pelos receptores μ e menor afinidade aos receptores δ e κ (Katzung, 2010). Já existem relatos da ação gastroprotetora de opióides mediado por receptores δ (Gyires e Rónai, 2001). Portanto, os resultados com obtidos com nerol indicam a necessidade de se avaliar sua participação sobre outros receptores opióides, como por exemplo, os receptores δ .

Apesar dos relatos de ação gastroprotetora de opióides descritos por Gyires e Rónai, (2001), Till et al.(1988) também mostra a participação de agonistas de receptores opióides no agravamento de lesão gástrica induzida por estresse causado por restrição e frio. Esta dualidade da ação opióide pode justificar o fato do nerol ter agravado a lesão causada por isquemia e reperfusão, pois, como discutido por Gyires et al.(1997) os mecanismos de formação de lesão gástrica por etanol, indometacina e estresse são diferentes, assim como o mecanismo de lesão por isquemia e reperfusão. Till et al. (1988), sugere ainda que o agravamento das lesões gástricas provocado pelos opióides seja devido a um processo de isquemia por excessiva mobilização de endorfina. Com base neste comportamento dual de receptores opióides sobre o trato gastrointestinal, foi avaliado neste trabalho o envolvimento dos receptores opióides no modelo de isquemia e reperfusão através do tratamento com morfina. Verificou-se que o grupo tratado com morfina apresentou aumento da área de lesão em relação ao grupo tratado apenas com o veículo (124%). Conclui-se, portanto, que os receptores opióides estão envolvidos no agravamento das lesões gástricas através do modelo de isquemia e reperfusão. Este resultado corrobora com os resultados obtidos pelo nerol no modelo de isquemia e reperfusão no qual observou-se um aumento de cerca de 190% da área de lesão.

A segurança do uso de nerol em condições experimentais foi avaliada através de teste de toxicidade aguda em camundongos. Foi observado mortalidade de camundongos tratados com nerol nas doses de 1250, 2500 e 5000 mg/Kg. Porém, não se observou mortalidade nos animais tratados com nerol na dose 10 vezes superior à gastroprotetora. No Screening hipocrático, os animais tratados com nerol nas doses de 60, 300 e 600 mg/Kg não apresentaram alterações

expressivas pelo tratamento, apenas alguns casos isolados que requerem novos estudos.

VI - CONCLUSÃO

Nerol possui atividade gastroprotetora nos modelos de úlcera gástrica induzida por etanol e por indometacina mas não protege o duodeno contra lesões induzidas por cisteamina nem o estômago contra lesões induzidas por isquemia e reperfusão

A dose de nerol que possui atividade antinociceptiva também apresenta atividade gastroprotetora no modelo de úlcera induzida por DAINÉ.

A atividade gastroprotetora do nerol nos modelo de úlcera induzida por etanol é dependente de grupamentos sulfidrílicos

A gastroproteção conferida pelo nerol não esta associada à atividade antissecreatória ou ao aumento da produção de muco e é independente da via do óxido nítrico e da presença de prostaglandinas

O nerol atua sobre receptores opióides na redução da motilidade gastrointestinal e do acúmulo intestinal, porém não é possível afirmar se a atividade gastroprotetora do nerol também é mediada por receptores opióides.

Doses de Nerol dez vezes maiores que a dose gastroprotetora e três vezes maiores à antinociceptiva não alteraram os parâmetros de toxicidade avaliados.

Desta forma, nerol mostra-se promissor na prevenção de úlcera gástrica contra um dos agentes mais prevalentes da lesão gástrica, as DAINÉ. A associação deste resultado com a descrição da literatura de que o nerol possui ação antibacteriana contra *H. pylori* destaca o nerol como uma opção de monoterapia na prevenção de úlceras gástricas.

VII - REFERÊNCIAS

- AKAR, F., et al. Protective effect of cromakalim and diazoxide, and proulcerogenic effect of glibenclamide on indomethacin-induced gastric injury. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 374(3), p.461-470, 1999.
- ALLEN, A.; FLEMSTRÖM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, v.288(1), p.C1-19, 2005.
- ANDERSON, M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.* v.113, p.548-555, 1985.
- ARECHE, C., et al. Gastroprotective activity of ferruginol in mice and rats: effects on gastric secretion, endogenous prostaglandins and non-protein sulfhydryls. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.60(2), p.245-251, 2008.
- AVILA, J.R., et al. Role of endogenous sulphhydryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. *Inflamm. Res.*, v.45(2), p.83-88, 1996.
- AWOUTERS, F., et al. Delay of castor oil diarrhoea in rats: a new way to evaluate inhibitors of prostaglandin biosynthesis. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 30(1), p. 41–45, 1978.
- BAGGIO, C.H., et al., Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC in rats. *Pharmacol. Res.*, v.47, p.93-98, 2003.
- BAKKALI, F., et al. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.*, v.46, p.446-475, 2008.
- BEARD, T.L.; LESLIE, J.B.; NEMETH, J. The opioid component of delayed gastrointestinal recovery after bowel resection. *J. Gastrointest. Surg.*, v.15(7), p.1259-1268, 2011.
- BERGONZELLI, G.E., et al. Essential oils as components of a diet-based approach to management of *Helicobacter* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.47, p.3240-3246, 2003.
- BHOUNSULE, S.A.; D'SOUZA, R.S.; DHUME, V.G. Gastric cytoprotective effect of morphine is probably not mediated by mu-receptors. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, v.328(1), p.99-105, 1994.
- BIGHETTI, E.J.B., et al. Anti-inflammatory and Antinociceptive effects in rodents of the essential oil of *Croton cajucara* Benth. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.51, p.1447-1453, 1999.
- BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. *Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 11.ed., Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006. 1821 p.
- CHAN, F.K.L.; LEUNG, W.K. Peptic-ulcer disease. *Lancet*, v.360, p. 933-941, 2002.

CHEN, G., et al. Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, plays a dual role in regulating gastrointestinal motility in vitro and in vivo. *Phytother. Res.*, v.23(4), p.498-506, 2009.

CHEN, T.S., et al. Effects of sex steroid hormones on gastric emptying and gastrointestinal transit in rats. *Am. J. Physiol.* v.268(1 Pt 1), p.G171-G176, 1995.

CORNE, S.J.; MORRISSEY, S.M.; WOODS, R.J. Proceedings: A method for the quantitative estimation of gastric barrier muçus. *J. Physiol.* v.242(2), p.116P-117P, 1974.

EDRIS, A.E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytother. Res.*, v.21, p.308-323, 2007.

ESTEVEZ, I., et al. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. *J. Ethnopharmacol.*, v.101, p. 191-196, 2005.

GYIRES, K. Morphine inhibits the ethanol-induced gastric damage in rats. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* v.306, p.170-181, 1990.

GYIRES, K., et al. Analysis of the role of delta opioid receptors in gastroprotection in the rat. *Life Sci.* v.60(16), p.1337-1347, 1997.

GYIRES, K.; RÓNAI, A.Z. Supraspinal delta- and mu-opioid receptors mediate gastric mucosal protection in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* v. 297(3), p. 1010-1015, 2001

HIRUMA-LIMA, C.A., et al. Gastroprotective effect of essential oil from *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae). *J. Ethnopharmacol.*, v.69, p.229-234, 2000a.

HIRUMA-LIMA, C.A., et al. Evaluation of the gastroprotective activity of cordatin, a diterpene isolated from *Aparisthium cordatum* (Euphorbiaceae). *Biol. Pharm. Bull.*, v.23(12), p.1465-1469, 2000b.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K.; The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, v.30(1), p.103-104, 1987.

KAWANO, S.; TSUJI, S. Role of mucosal blood flow: a conceptual review in gastric mucosal injury and protection. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, v.15 (suppl), p.D1-6, 2000.

KATZUNG, B.C. *Farmacologia Básica e Clínica*. 10.ed. Porto Alegre: AMGH, 2010. 1060 p.

KHOMENKO, T., et al. Role of iron in the pathogenesis of cysteamine-induced duodenal ulceration in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, v. 296(6), p. G1277-86, 2009.

KLOPELL, F.C., et al. Nerolidol, an antiulcer constituent from the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). *Z Naturforsch C.*, v.62(7-8), p.537-542, 2007.

- KO, J.K., et al. The importance of gastric emptying and mucosal folds in the adaptive cytoprotection of mild irritants in rats. *Inflamm. Res.*, v.44(12), p.518-522, 1995.
- KONTUREK, S.J. Mechanisms of gastroprotection. *Scand. J. Gastroenterol.* v.174, p.15-28, 1990.
- KRAWISZ, J.E.; SHARON, P.; STENSON, W.F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology.* v.87, p.1344-1350, 1984.
- KURZ, A.; SESSLER, D.I. Opioid-induced bowel dysfunction: pathophysiology and potential new therapies. *Drugs*, v.63(7), p.649-671, 2003.
- LA CASA, C., et al. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *J. Ethnopharmacol.*, v.71(1-2), p.45-53, 2000.
- LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Reviews in basic and clinical. *Gastroenterology*, v.135, p.41-60, 2008.
- LAPCZYNSKI, A., et al. Fragrance material review on nerol. *Food Chem. Toxicol.* v.46, p.S241–S244, 2008.
- LI, N.S., et al. Phloroglucinol protects gastric mucosa against ethanol-induced injury through regulating myeloperoxidase and catalase activities. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, v.25(4), p.462-468, 2011.
- LIMA, Z.P., et al. Can the aqueous decoction of mango flowers be used as an antiulcer agent? *J. Ethnopharmacol.*, v.106, p.29–37, 2006.
- MALFERTHEINER, P.; CHAN, F.K.L.; MCCOLL, K.E.L. Peptic ulcer disease. *Lancet*, v.374, p.1449-1461, 2009.
- MALONE, M.H.; ROBICHAUD, R.C. A hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Llooydia*, v.25, p.320-322, 1962.
- MARQUES, S.B., et al. High prevalence of duodenal ulcer in a tertiary care hospital in the city of São Paulo, SP, Brazil. *Arq. Gastroenterol.* v.48(3), p.171-174, 2011.
- MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulphhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by mormodin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesion in rats. *Life Sci.*, v.65, p.27-32, 1999.
- MATSUNAGA, T., et al. Isolation of the antiulcer compound in essential oil from the leaves of *Cryptomeria japonica*. *Biol. Pharm. Bull.*, v.23, p. 595-598, 2000.
- MERSEREAU, W.A.; LEHOTAY, D.C.; HINCHEY, E.J. Relative roles of acid and mucosal compression in ulcerogenesis in indomethacin-insulin-treated rat. *Dig. Dis. Sci.*, v.33(11), p.1454-1458, 1988.

MIZUI, T.; DOUTEUCHI M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. *Jap. J. Pharmacol.* v.33, p.934-945, 1983.

MORAES, T.M., et al. Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: Role of prostaglandins and gastric mucus secretion. *Chem. Biol. Interact.*, v.180, p. 499-505, 2009.

MUKHERJEE, P.K., et al. Screening of antidiarrhoeal profiles of some plant extracts of specific region of West Bengal, India. *J. Ethnopharmacol.* v.60(1), p.85–89, 1998.

NOJIMOTO, F.D., et al. Multiple effects of sibutramine on ejaculation and on vas deferens and seminal vesicle contractility. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* v.239, p.233–240, 2009.

OKADA, M., et al. Role of prostaglandin deficiency in pathogenetic mechanism of gastric lesions induced by indomethacin in rats. *Dig. Dis. Sci.*, v.34(5), p.694-702, 1989.

OSADA, T., et al. Role of leukotrienes in hydrochloric acid-induced gastric lesions in rats. *Dig. Dis. Sci.*, v.35(2), p.186-192, 1990.

PESKAR, B.M.; EHRLICH, K.; PESKAR, B.A.; Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.301(3), p.969-974, 2002.

PETERSON, A., et al. Extraction of essential oil from geranium (*Pelargonium graveolens*) with supercritical carbon dioxide. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v. 81 p.167-172, 2006.

RAFATULLAH, S., et al. Evaluation of turmeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. *J. Ethnopharmacol.*, v. 29(1), p.25-34, 1990.

RAINSFORD, K.D. Gastric ulcerogenicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs in mice with mucosa sensitized by cholinomimetic treatment. *J. Pharm. Pharmacol.* v.39, p.669-672, 1987.

ROBERT, A., et al. Enteropooling assay: a test for diarrhoeal produced by prostaglandins. *Prostaglandins*, v. 11, p. 809–814, 1976.

ROBERT, A., et al. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. *Gastroenterology* v.77(3), p.433-443, 1979.

ROCHA, N.F., et al. (-)- α -Bisabolol-induced gastroprotection is associated with reduction in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity and neutrophil migration. *Eur. J. Pharm. Sci.* v.44(4), p.455-461, 2011.

ROZZA, A.L., et al. Gastroprotective mechanisms of *Citrus lemon* (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and β -pinene: Involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E2. *Chem. Biol. Interact.*, v.189, p.82-89, 2011.

- SASAKI, M.; JOH, T. Oxidative stress and ischemia-reperfusion injury in gastrointestinal tract and antioxidant, protective agents. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, v.40(1), p.1–12, 2007.
- SHAH, K.A., et al. *Mangifera Indica* (Mango). *Phcog Rev* [serial online] 2010 [cited 2012 Jan 6]; 4:42-8. Disponível em: <http://www.phcogrev.com/text.asp?2010/4/7/42/65325>
- SHAY, H. A simple for the uniform production of gastric ulceration in rat. *Gastroenterology*, v.5, p.43-61, 1945.
- SILVA, M.I.G., et al. Gastroprotective activity of isopulegol on experimentally induced gastric lesions in mice: investigation of possible mechanisms of action. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* v.380, p.233–245, 2009.
- SOUZA BRITO, A. R. M. *Manual de Ensaio Toxicológicos in vivo*: Ciências médicas. Campinas: Editora da Unicamp, p. 15-22, 1994.
- SOUZA, R.H.L., et al. Gastroprotective activity of α -terpineol in two experimental models of gastric ulcer in rats. *DARU*, v. 19, p. 277-281, 2011.
- STICKNEY, J.C.; NORTHUP, D.W. Effect of gastric emptying upon propulsive motility of small intestine of rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.101, p.582-583, 1959.
- SZABO, S. Animal model for human disease: duodenal ulcer disease. *Am. J. Pathol.*, v.93, p.273-276, 1978.
- SZABO, S. Mechanisms of mucosal injury in the stomach and duodenum: time-sequence analysis of morphologic, functional, biochemical and histochemical studies. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.*, v.127, p.21-28, 1987.
- SZABO, S., SZELENYI, I. 'Cytoprotection' in gastrointestinal pharmacology. *TIPS*, v.8, p.149-154, 1987.
- SZABO, S.; TRIER, J.S.; FRANKEL, P.W. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. *Science*, v.214(4517), p.200-202, 1981.
- TAKAYAMA, C., et al. Gastroprotective and ulcer healing effects of essential oil from *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae). *J. Ethnopharmacol.*, v.135, p.147-155, 2011.
- TAKEUCHI, K.; NISHIWAKI, H.; OKABE, S. Effects of dopamine on gastric mucosal lesions induced by ethanol in rats. Possible involvement of antigastric motor activity mediated with alpha 2-adrenoceptors. *Dig. Dis. Sci.*, v.33(12), p.1560-1568, 1988.
- TERANO, A., et al. Role of Superoxide and hydroxyl radicals in rat gastric mucosal injury induced by ethanol. *Gastroenterol. Jpn.* v.24(5), p.488-493, 1989.
- TILL, M., et al. Effect of [D-Met²,Pro⁵]enkephalinamide on gastric ulceration and transmucosal potential difference. *Eur. J. Pharmacol.*, v.150(3), p.325-330, 1988.
- TWARDOWSCHY, A., et al. Antiulcerogenic activity of bark extract of *Tabebuia avellanedae*, Lorentz ex Griseb. *J. Ethnopharmacol.*, v.118(3), p.455-459, 2008.

UEDA, S., et al. Role of free radicals and lipid peroxidation in gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. *Scand. J. Gastroenterol.* v.24(suppl. 162), p.55-58, 1989.

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

WU H.C., et al. Prevalence of peptic ulcer in dyspeptic patients and the influence of age, sex, and *Helicobacter pylori* infection. *Dig Dis Sci.* v.53(10), p.2650-2656, 2008.

YOSHIKAWA, T., et al. Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats. *Gut*, v.34(6), p.732-737, 1993.

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

VIII - ANEXO





Certificado

Certificamos que o Protocolo nº 354-CEUA, sobre “Avaliação do efeito protetor e curativo em úlceras gástricas e duodenais e efeito antiinflamatório e analgésico do monoterpene Nerol em roedores”, sob a responsabilidade de **Clélia Akiko Hiruma-Lima**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**, em reunião extraordinária de **12/12/2011**.

Botucatu, 12 de dezembro de 2011.



Prof. Dr.ª Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro
Presidente - CEUA

Setor de Incentivo - Direção Técnica Acadêmica
Dicas & Regras para a USP 464-970 - Botucatu, SP, Brasil
Tel. 41 3611 6000/6044 Fax 41 3615 2944 e-mail: unesp@usp.br