



Avaliação do Efeito Protetor e Cicatrizante do Extrato
Hidroalcólico de Folhas de *Solanum paniculatum* L. frente à
úlceras pépticas

Tamires de Souza Rodrigues

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Estrutura e Função de Biomoléculas*.

Orientadora: Profa. Adja. Clélia Akiko Hiruma-Lima

**BOTUCATU – SP
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Avaliação do Efeito Protetor e Cicatrizante do Extrato
Hidroalcóolico de Folhas de *Solanum paniculatum* L. frente à
úlceras pépticas

Tamires de Souza Rodrigues

Profa. Adja. Clélia Akiko Hiruma-Lima

ORIENTADORA

Profa. Dra. Lúcia Regina Machado da Rocha

CO-ORIENTADORA

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Câmpus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de Pós-Graduação
em Biologia Geral e Aplicada, Área de
concentração *Estrutura e Função de
Biomoléculas*.

BOTUCATU – SP
2013

*"A mente que se abre a uma nova ideia nunca
mais volta ao seu tamanho original."*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual “Júlio Mesquita Filho”, por oferecer ensino de qualidade e infraestrutura suficiente para o desenvolvimento deste trabalho;

À pós-graduação do Instituto de Biociências e ao programa de Biologia Geral e Aplicada, pela minha aprovação para que eu pudesse desenvolver este projeto;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo consentimento da minha bolsa;

Aos integrantes do Projeto Biota/FAPESP, por permitir que eu participasse deste grande projeto tão relevante para a busca de tratamento de doenças crônicas;

À Profa. Adja. Clélia Akiko Hiruma-Lima e à Profa. Dra. Lúcia Regina Machado da Rocha pela orientação, apoio e ensinamentos durante estes dois anos e por oferecer suporte físico de qualidade no Laboratório de Produtos Naturais, onde desenvolvemos este trabalho;

À equipe do meu laboratório que trabalhou junto comigo neste trabalho, incluindo o técnico Hélio Kushima;

Ao Pós-Doutorando Gerardo Magela Vieira Júnior e ao Prof. Dr. Wagner Vilegas do Instituto de Química da UNESP de Araraquara pela produção dos extratos de *S. paniculatum*;

À Profa. Dra. Maria José Alves da Rocha, do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia - USP Ribeirão Preto, por auxiliar nos experimentos de biologia molecular;

À banca, pelas correções e sugestões.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente aos meus pais Cida e Agnaldo, pelo amor incondicional e por sempre me apoiarem a buscar meus sonhos e acreditarem no meu potencial, e aos meus irmãos queridos, Tatiana e João Gabriel. Vocês sempre serão minha fortaleza e por vocês que tento ser o melhor que posso;

Aos meus avós, tios, primos e a toda minha família por estarem sempre presentes;

Às amadas Lílían e Marília, amigas de longa data que mesmo longe sempre estão presentes na minha vida;

À querida Rosana, minha eterna orientadora no trabalho e na vida, por participar tanto da minha carreira profissional, por me conhecer MUITO melhor que até eu mesma a ponto de saber o que eu penso e por ser a dona dos melhores conselhos que poderiam existir (risos)

Ao Júlio, pelo amor e carinho por mim, pela parceria e companheirismo, por me estimular a sempre fazer o meu melhor e por ser meu suporte nos momentos difíceis;

À querida Luciara, minha parceira, amiga de todas as horas, que fez da minha estadia em Botucatu muito mais agradável;

Às meninas da BnB, por serem minhas companheiras de lar;

Aos meus queridos colegas de laboratório, especialmente aos meus amigos Rosanna, Juliana, Flávia e Fernando. Sem vocês este trabalho não seria concluído;

Ao técnico Hélio Kushima pelo apoio nos experimentos e por sempre estar de prontidão para tirar minhas dúvidas;

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia, especialmente à Luciana, Janete, Sr. Júnior, Lílían e Juliano, por auxiliar indiretamente no nosso trabalho;

À Ele, que é meu porto-seguro, a quem recorro nas horas tristes e agradeço por permitir que eu acorde todos os dias com capacidade de correr atrás dos meus sonhos.

PRÓLOGO

Durante o mestrado, além das atividades experimentais presentes neste trabalho eu realizei diversas atividades e cursei disciplinas que foram muito importantes para a minha formação. As atividades realizadas permitiram aprofundar meus conhecimentos em farmacologia, principalmente farmacologia de produtos naturais, e metodologia científica. As atividades desenvolvidas estão descritas abaixo.

1. Participação em eventos científicos

- a. Ciência ao cair da tarde. Palestra: Computando com populações de neurônios (carga horária: 4h) – 23 de agosto de 2012, Botucatu-SP.

Créditos obtidos no programa = 0,2

- b. V Simpósio Internacional de Pós-Graduação e Pesquisa (SIMPOSPq) – 12 a 14 de setembro de 2012, Ribeirão Preto-SP.
Mini-curso: Como escrever artigos científicos (carga horária: 4h)

Créditos obtidos no programa = 2

- c. III Simpósio Internacional de Plantas Medicinais e Nutracêuticos (3ISMNP) e III Conferência do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Frutos Tropicais – 14 a 18 de outubro de 2012, Aracaju-SE.

Créditos obtidos no programa = 2

- d. XIII Workshop de Genética – 16 a 18 de maio de 2013, Botucatu-SP.

Mini-curso: MicroRNA: reinventando a expressão gênica (carga horária: 13h).

Créditos obtidos no programa = 2

- e. XII Workshop da Pós-Graduação – 04 a 08 de junho de 2013, Botucatu-SP.

Créditos obtidos no programa = 2

2. *Resumos publicados em anais de eventos científicos*

- a. **RODRIGUES, T.S.**; BRITO, C.; VIEIRA JR., G. M.; VILEGAS, W.; ROCHA, L. R. M.; HIRUMA-LIMA, C. A. Role of nitric oxide and sulphydryl groups in gastroprotection effected by leaves extract of *Solanum paniculatum* L. Apresentação em pôster no V SIMPOSPq.

Créditos obtidos no programa = 2

- b. BESERRA, F. P.; **RODRIGUES, T.S.**; GANEV, E. G.; BONAMIN, F.; SALDANHA, L. L.; DOKKEDAL, A. L.; ROCHA, L. R. M.; HIRUMA-LIMA, C. A. Phytochemical screening of the hydroalcoholic extract of leaves of *Cissus sicyoides* (Vitaceae) and its effect against gastrointestinal disorders in rodents. Apresentação em pôster no V SIMPOSPq.
- c. **RODRIGUES, T.S.**; BRITO, C.; VIEIRA JR., G. M.; VILEGAS, W.; ROCHA, L. R. M.; HIRUMA-LIMA, C. A. Avaliação da atividade antissecretória e antidiarreica do extrato de folhas de *Solanum paniculatum* L. Apresentação oral no 3ISMNP.

Créditos obtidos no programa = 2

3. Disciplinas cursadas

Nome do Programa: BIOLOGIA GERAL E APLICADA						
Curso: MESTRADO						
Nome: TAMIRES DE SOUZA RODRIGUES				matrícula nº: 138543-1		

Disciplinas	Ano	Período Letivo	Créditos	Carga Horária	Freq	Conceito
Ferramentas moleculares para o estudo de genética populacional	2011	2º Semestre	8	120	100	A
Fundamentos sobre Ética e Prática na Experimentação Animal	2011	2º Semestre	2	30	75	A
Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico de Ciências e Biologia	2011	2º Semestre	6	90	100	A
Reatividade Vascular: Papel da Célula Endotelial em Diferentes Fisiopatologias - T	2011	2º Semestre	3	45	100	A
Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada	2012	1º Semestre	2	30	80	B
Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada	2012	2º Semestre	2	30	100	A
Metodologias Aplicadas à Pesquisa Biológica	2012	2º Semestre	2	30	100	A
Total de créditos em disciplinas			23	345		
Total de créditos em atividades complementares (*)						
Total de créditos em dissertação			0	0		
TOTAL GERAL DE CRÉDITOS			23	345		

Regulamento do Programa aprovado pela Resolução UNESP nº 45						
1 crédito correspondente a 12 horas de atividades programadas até 13/9/99 (Res. UNESP 46, DE 18/6/91)						
1 crédito correspondente a 15 horas de atividades programadas a partir de 14/9/99 (Res. UNESP 45, DE 14/9/99)						
CONCEITOS:						
A - Excelente; B - Bom; C - Regular D - Reprovado I - Incompleto T - Transferência J - Cancelamento						
OBS: AE - Disciplina cursada como aluno especial						
TP - Disciplina cursada no programa						
T - Disciplina cursadas fora do Programa						

4. Atividade de extensão

- a. Monitara do “Curso Reprodução de A a Z” (carga horária: 48h). Programa de Extensão Universitária *Difundindo e Popularizando a Ciência na UNESP: Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico* – 23 a 28 de janeiro de 2012, Botucatu-SP.

Créditos obtidos no programa = 3

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	25
1. Anatomia e fisiologia do estômago.....	25
2. Fatores lesivos da mucosa gástrica.....	27
2.1 Secreção ácida.....	27
2.2 Estresse oxidativo.....	29
2.3 Drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (DAINEs).....	30
2.4 <i>Helicobacter pylori</i>	31
2.5 Etanol.....	32
3. Fatores defensivos da mucosa gástrica.....	33
3.1 Barreira muco-bicarbonato.....	33
3.2 Células epiteliais de superfície.....	34
3.3 Microcirculação gástrica.....	35
3.4 Prostaglandinas.....	36
3.5 Óxido Nítrico.....	37
3.6 Antioxidantes.....	38
3.7 Resposta inflamatória aguda.....	40
4. Doença ulcerosa péptica.....	41
5. <i>Solanum paniculatum</i> L.....	42
6. Quadro atual do uso de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil.....	44
7. Justificativa.....	45
II. OBJETIVO GERAL.....	48
a. Objetivos específicos.....	48
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
1. Material vegetal.....	50
2. Extração.....	50
3. Delineamento experimental.....	50
4. Drogas.....	51
5. Parâmetros de toxicidade.....	51

5.1 Modelo de toxicidade aguda.....	51
5.2 Modelo de toxicidade subaguda.....	52
5.3 Modelo de neurotoxicidade.....	52
6. Avaliação da atividade gastroprotetora e curativa do extrato hidroalcólico de <i>S. paniculatum</i>	52
6.1 Modelo de indução de úlceras gástricas por etanol absoluto.....	52
6.2 Modelo de indução de úlceras gástricas por indometacina.....	53
6.3 Modelo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão....	53
6.3.1 Modelo isquemia e reperfusão – avaliação do caráter preventivo da droga.....	53
6.3.2 Modelo de isquemia e reperfusão – avaliação do caráter curativo da droga.....	54
6.4 Modelo de indução de úlceras gástricas por etanol com tratamento intraduodenal.....	54
7. Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na gastroproteção e no potencial efeito curativo do extrato hidroalcólico de folhas de <i>S. paniculatum</i>	55
7.1 Mensuramento do fluxo sanguíneo em animais submetidos ao modelo de indução de úlceras gástricas por etanol.....	55
7.2 Modelo de ligadura do piloro pelo método de Shay.....	55
7.2.1 Modelo de ligadura do piloro com tratamento por via oral.....	55
7.2.2 Modelo de ligadura do piloro com tratamento por via intraduodenal.....	55
7.3 Modelos com administração de inibidores ou antagonistas.....	56
7.3.1 Modelo de indução de úlceras gástricas por etanol em animais pré-tratados com indometacina.....	56
7.3.2 Modelo de indução de úlceras gástricas por etanol em animais pré-tratados com NEM.....	56
7.3.3 Modelo de indução de úlceras gástricas por etanol em animais pré-tratados com L-NAME e L-NIL.....	56
7.3.4 Modelo de indução de úlceras gástricas por etanol em animais pré-tratados com Ruthenium red.....	57
7.4 Dosagens bioquímicas.....	57
7.4.1 Quantificação de muco aderido.....	57

7.4.2	Quantificação de malondialdeído (MDA).....	58
7.4.3	Quantificação de proteínas totais.....	58
7.4.4	Quantificação de glutathione reduzida (GSH).....	58
7.4.5	Quantificação de superóxido dismutase (SOD).....	59
7.4.6	Quantificação de catalase (CAT).....	59
7.4.7	Quantificação de mieloperoxidase (MPO).....	60
7.4.8	Quantificação de citocinas.....	60
7.5	Expressão enzimática de iNOS por Western Blot.....	61
8.	Avaliação da atividade cicatrizante gástrica.....	62
8.1	Modelo de indução de úlceras gástricas por ácido acético.....	62
9.	Avaliação da atividade protetora frente à úlceras duodenais.....	62
9.1	Modelo de indução de úlceras duodenais por cisteamina.....	62
10.	Atividade antidiarreica.....	63
10.1	Modelo de avaliação da motilidade intestinal.....	63
10.2	Modelo de avaliação de acúmulo de fluido intestinal induzido por óleo de rícano.....	63
11.	Análises estatísticas.....	63
IV.	RESULTADOS.....	65
1.	Atividade farmacológica geral.....	65
1.1	Toxicidade aguda.....	65
1.2	Neurotoxicidade aguda.....	66
2.	Avaliação da ação gastroprotetora do extrato frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol.....	67
2.1.	Determinação dos níveis de GSH.....	67
2.2	Determinação dos níveis de MPO.....	68
3.	Avaliação da ação gastroprotetora do extrato frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por indometacina.....	69
3.1	Determinação dos níveis de MPO.....	70
4.	Avaliação da ação antissecretória do extrato.....	71

4.1 Modelo de ligadura do piloro com tratamento oral.....	71
4.2 Modelo de ligadura do piloro com tratamento intraduodenal.....	72
5. Avaliação da ação sistêmica do extrato.....	73
6. Avaliação da participação do muco gástrico através do pré-tratamento oral ou intraduodenal do extrato.....	74
7. Avaliação do fluxo sanguíneo gástrico.....	76
8. Avaliação da participação de PGE ₂	77
9. Avaliação da participação dos compostos sulfidrílicos.....	78
10. Avaliação da participação dos receptores TRPV1 sensíveis à capsaicina.....	79
11. Avaliação da participação do NO.....	80
12. Avaliação da ação gastroprotetora do extrato frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por isquemia e reperfusão.....	81
12.1 Determinação dos níveis de LPO.....	82
12.2 Determinação dos níveis de GSH.....	83
12.3 Determinação dos níveis de SOD.....	84
12.4 Determinação dos níveis de CAT.....	85
12.5 Determinação dos níveis de MPO.....	86
13. Avaliação da ação curativa do extrato frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por isquemia e reperfusão.....	86
13.1 Determinação dos níveis de LPO.....	87
13.2 Determinação dos níveis de SOD.....	88
13.3 Determinação dos níveis de CAT.....	89
13.4 Expressão enzimática de iNOS por Western Blot.....	90

13.5 Determinação dos níveis de MPO.....	91
13.6 Determinação dos níveis de citocinas.....	92
a. Determinação dos níveis de TNF- α	92
b. Determinação dos níveis de IL-1 β	93
c. Determinação dos níveis de IL-10.....	94
14. Caracterização da atividade cicatrizante gástrica do extrato.....	95
14.1 Modelo de indução de úlcera gástrica por ácido acético.....	95
14.2 Toxicidade subaguda.....	96
15. Avaliação da ação antiulcerogênica duodenal do extrato.....	98
16. Avaliação da ação antidiarreica do extrato e sobre o acúmulo de fluidos.....	99
V. DISCUSSÃO.....	102
VI. CONCLUSÃO.....	114
VII. REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116
ANEXOS.....	133

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia do estômago.....	26
Figura 2. Esquema ilustrativo dos fatores envolvidos na regulação da secreção ácida.....	28
Figura 3. Esquema ilustrativo de fatores envolvidos na defesa da mucosa gástrica.....	35
Figura 4. Esquema ilustrativo de fatores envolvidos na proteção da mucosa gástrica. Rota de produção de prostaglandinas (A) e do óxido nítrico (B); enzimas antioxidantes (C).....	38
Figura 5. Imagem fotográfica de <i>Solanum paniculatum</i> L.....	44
Figura 6. Evolução do peso corporal (14 dias) de camundongos Swiss fêmeas (A) e machos (B) tratados com EHSPFl (5.0 g/Kg) no modelo de toxicidade aguda.....	65
Figura 7. Avaliação da neurotoxicidade aguda do EHSPFl na dose de 62.5 mg/Kg em camundongos Swiss machos. (A) tempo de latência e (B) número de quedas.....	66
Figura 8. Avaliação do efeito gastroprotetor do EHSPFl frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos Wistar machos.....	67
Figura 9. Quantificação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) em ratos Wistar machos pré-tratados com EHSPFl submetidos ao modelo de indução de úlceras gástricas por etanol.....	68
Figura 10. Quantificação dos níveis de mieloperoxidase (MPO) em ratos Wistar machos pré-tratados com EHSPFl submetidos ao modelo de indução de úlceras gástricas por etanol.....	69
Figura 11. Avaliação do efeito gastroprotetor do EHSPFl frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por indometacina em ratos Wistar machos.....	70

- Figura 12.** Quantificação dos níveis de mieloperoxidase (MPO) em ratos Wistar machos pré-tratados com EHSPFl submetidos ao modelo de indução de úlceras gástricas por indometacina.....71
- Figura 13.** Avaliação do efeito gastroprotetor do EHSPFl (via intraduodenal) frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos Wistar machos.....74
- Figura 14.** Avaliação da participação do muco gástrico na gastroproteção efetuada pelo EHSPFl (administrado pela via oral) frente ao modelo de ligadura do piloro em ratos Wistar machos.....75
- Figura 15.** Avaliação da participação do muco gástrico na gastroproteção efetuada pelo EHSPFl (administrado por via intraduodenal) frente ao modelo de ligadura do piloro em ratos Wistar machos.....76
- Figura 16.** Avaliação do fluxo sanguíneo gástrico em ratos Wistar machos pré-tratados com EHSPFl frente ao modelo úlceras gástricas induzidas por etanol.....77
- Figura 17.** Avaliação da participação de prostaglandinas (PGE₂) na gastroproteção efetuada pelo EHSPFl frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos Wistar machos pré-tratados com indometacina.....78
- Figura 18.** Avaliação da participação dos compostos sulfidríla na gastroproteção efetuada pelo EHSPFl frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos Wistar machos pré-tratados com NEM.....79
- Figura 19.** Avaliação da participação dos receptores TRPV1 na gastroproteção efetuada pelo EHSPFl frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos Wistar machos pré-tratados com *Ruthenium red*.....80
- Figura 20.** Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) e papel da NOS e iNOS na gastroproteção efetuada pelo EHSPFl frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos Wistar machos pré-tratados com L-NAME ou L-NIL.....81

- Figura 21.** Avaliação do efeito gastroprotetor do EHSPFl frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por isquemia e reperfusão em ratos Wistar machos.....82
- Figura 22.** Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica (LPO) em ratos Wistar machos pré-tratados com EHSPFl submetidos ao modelo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão.....83
- Figura 23.** Quantificação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) em ratos Wistar machos pré-tratados com EHSPFl submetidos ao modelo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão.....84
- Figura 24.** Quantificação dos níveis de superóxido dismutase (SOD) em ratos Wistar machos pré-tratados com EHSPFl submetidos ao modelo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão.....85
- Figura 25.** Quantificação dos níveis de catalase (CAT) em ratos Wistar machos pré-tratados com EHSPFl submetidos ao modelo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão.....85
- Figura 26.** Quantificação dos níveis de mieloperoxidase (MPO) em ratos Wistar machos pré-tratados com EHSPFl e submetidos ao modelo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão.....86
- Figura 27.** Avaliação do efeito curativo do EHSPFl tratados por 6 dias frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por isquemia e reperfusão em ratos Wistar machos.....87
- Figura 28.** Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica (LPO) em ratos Wistar machos tratados com EHSPFl após submetidos ao modelo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão.....88
- Figura 29.** Avaliação dos níveis de superóxido dismutase (SOD) em ratos Wistar machos tratados com EHSPFl após serem submetidos ao modelo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão.....89

Figura 30. Avaliação dos níveis de catalase (CAT) em ratos Wistar machos tratados com EHSPFl após submissão ao modelo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão.....	90
Figura 31. Expressão enzimática da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) avaliada por <i>Western Blot</i> em ratos Wistar machos tratados por 6 dias com o EHSPFl após indução de lesões gástricas por isquemia e reperfusão.....	91
Figura 32. Avaliação dos níveis de mieloperoxidase (MPO) em ratos Wistar machos tratados com EHSPFl após submissão no modelo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão.....	92
Figura 33. Avaliação dos níveis de TNF- α em ratos Wistar machos tratados com EHSPFl e submetidos ao modelo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão.....	93
Figura 34. Avaliação dos níveis de IL-1 β em ratos Wistar machos tratados com EHSPFl após submissão ao modelo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão.....	94
Figura 35. Avaliação dos níveis de IL-10 em ratos Wistar machos tratados com EHSPFl após submissão ao modelo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão.....	94
Figura 36. Avaliação da atividade cicatrizante gástrica do EHSPFl durante 7 (A) ou 14 dias (B) frente às úlceras gástricas induzidas por ácido acético em ratos Wistar machos.....	95
Figura 37. Análise macroscópica de estômagos de ratos Wistar machos tratados por 7 e 14 dias com EHSPFl após indução de úlceras gástricas por ácido acético.....	96
Figura 38. Evolução do peso corporal de ratos Wistar machos tratados durante 14 dias com EHSPFl.....	97
Figura 39. Avaliação do efeito gastroprotetor do EHSPFl frente ao modelo de úlceras duodenais induzidas por cisteamina em ratos Wistar machos.....	99

Figura 40. Avaliação da atividade do EHSPFl frente ao trânsito intestinal em camundongos Swiss machos.....99

Figura 41. Avaliação da atividade do EHSPFl frente ao acúmulo de fluidos intestinais em camundongos Swiss machos.....100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação entre o peso dos órgãos e o peso corporal de camundongos Swiss machos e fêmeas tratados com EHSPFl (5.0 g/Kg) no modelo de toxicidade aguda.....	66
Tabela 2. Avaliação da ação antissecretória do EHSPFl administrado por via oral em ratos Wistar machos.....	72
Tabela 3. Avaliação da ação antissecretória do EHSPFl administrado por via intraduodenal em ratos Wistar machos.....	73
Tabela 4. Relação entre o peso dos órgãos e o peso corporal de ratos Wistar machos tratados durante 14 dias com EHSPFl.....	97
Tabela 5. Determinação de parâmetros bioquímicos do plasma sanguíneo de ratos Wistar machos tratados durante 14 dias com EHSPFl.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ácido araquidônico	ET – Endotelina
Ach – Acetilcolina	GMPc – Guanosina monofosfato cíclica
AMPc – Adenosina monofosfato cíclica	GPx – Glutathione peroxidase
APx – Ascorbato peroxidase	GR – Glutathione reductase
ATP – Adenosina trifosfato	GSH – Glutathione
ATPase – Adenosina trifosfatase	GSSG – Glutathione reduzida
BCA – Ácido bicitrônico	GST – Glutathione-S-transferase
BSA – <i>Bovine serum albumin</i>	H ⁺ - Íon hidrogênio
CAT – Catalase	HCl – Ácido clorídrico
CCK – Colecistocinina	HCO ₃ ⁻ - Íon bicarbonato
Cl ⁻ – Íon cloreto	H ₂ O – Água
CO ₂ – Dióxido de carbono	H ₂ O ₂ – Peróxido de hidrogênio
COX – Ciclooxygenase	HO ₂ – Radical hidroperoxila
DTNB – 5,5’ditio-bis(2-ácido nitrobenzóico)	HOCl – Ácido hipocloroso
ECL – Células enterocromafins	HTAB – Brometo de hexadecil-trimetil-amônio
eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial	I. d. – Via intraduodenal
EGF – Fator de crescimento epidermal	IGF – fator de crescimento dependente de insulina
EHSPF1 – Extrato hidroalcolico de folhas de <i>S. paniculatum</i>	IL – Interleucina
ERO – Espécie reativa de oxigênio	I. m. – Via intramuscular

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível	PBS – <i>phosphate buffer saline</i>
I. p. – Via intraperitoneal	PG – prostaglandina
K ⁺ - Íon potássio	PGE ₂ – prostaglandina E ₂
KCl – Cloreto de potássio	PGI ₂ – prostaciclina
L-NAME - <i>L-arginine methyl ester</i>	PMSF – <i>phenylmethane-sulfonylfluoride</i>
L-NIL - <i>L-Lysine- ω-acetamine dihydrochloride</i>	PKA – proteína quinase
L-NMMA – <i>N_G-monometil L-arginine</i>	RIPA – <i>radioimmunoprecipitation buffer</i>
LOX – lipoxigenase	RO ₂ – Radical peroxila
LPO – Lipoperoxidação (ou peroxidação lipídica)	S. c. – Via subcutânea
MDA – Malondialdeído	SNC – Sistema nervoso central
MPO – Mieloperoxidase	SNE – Sistema nervoso entérico
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase	SOD – Superóxido dismutase
NBT - <i>Nitro blue tetrazolium</i>	TBA – Ácido tiobarbitúrico
NEM - <i>N-ethyl maleimide</i>	TCA - Ácido tricloroacético
NO – Óxido nítrico	TGF-α – fator de crescimento transformante-α
nNOS – Óxido nítrico sintase neuronal	TGI – trato gastrointestinal
O ₂ – Oxigênio molecular	TNF-α – Fator de necrose tumoral α
O ₂ ^{•-} - Radical superóxido	V.o. – Via oral
O ₃ – Ozônio	
OH ⁻ - Radical hidroxila	

RESUMO

Doença ulcerosa péptica, que engloba úlceras gástricas e duodenais, é uma doença crônica com origem multifatorial que acomete cerca de 10% da população mundial. As maiores causas do surgimento de úlceras ocorrem por agentes endógenos (aumento na secreção ácida e de pepsina) ou exógenos (*Helicobacter pylori*, DAINEs, etanol, estresse, processos isquêmicos, dentre outros). O tratamento de úlceras pépticas é feito pelo uso de medicamentos inibidores da bomba protônica (como lansoprazol e omeprazol) e bloqueadores de receptores histaminérgicos (como cimetidina e ranitidina). Entretanto, estas drogas possuem efeitos adversos prejudiciais e não são capazes de promover a cicatrização da mucosa gástrica de maneira eficiente, o que provoca comumente recidiva da doença. A busca por novas substâncias para o tratamento desta doença envolve o uso de produtos naturais. *Solanum paniculatum* L., espécie-alvo deste estudo, é citada por suas propriedades antiulcerogênicas e está presente na RENISUS, porém, existem poucos estudos que elucidam suas propriedades farmacológicas no combate desta doença. Portanto o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito gastroprotetor e cicatrizante do extrato hidroalcólico de folhas de *S. paniculatum* (EHSPFl) frente à úlceras pépticas experimentais. Foi observado que o EHSPFl apresenta significativo efeito gastroprotetor frente aos agentes lesivos etanol e indometacina (DAINE) e ao processo agudo de isquemia e reperfusão tecidual, com a dose efetiva de 62.5mg/Kg. O extrato atua na gastroproteção tanto por ação local quanto sistêmica, sendo capaz de reduzir os níveis de LPO, aumentar a produção de muco e reduzir a infiltração de neutrófilos, além de atuar via modulação do NO. No entanto, o extrato não foi capaz de restabelecer os níveis de GSH, CAT e SOD nos modelos agudos, além de não diminuir a secreção ácida. No modelo curativo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão, observou-se proteção efetiva do EHSPFl com redução da LPO e de MPO, aumento dos níveis de CAT e SOD e aumento na produção de NO devido à elevação da expressão da iNOS. Porém, o extrato não foi capaz de modular a resposta inflamatória, apesar de reduzir o recrutamento de neutrófilos para a área lesionada. No modelo agudo de indução de úlceras duodenais com cisteamina, o EHSPFl não apresentou proteção significativa, além de não possuir atividade cicatrizante gástrica no modelo subagudo de indução de úlceras. Com os resultados deste trabalho é possível inferir que o EHSPFl apresenta ação gastroprotetor frente à diferentes agentes lesivos. O efeito curativo do extrato na recuperação da mucosa gástrica submetido ao processo de isquemia e reperfusão se deve a efetiva ação antioxidante do extrato.

Palavra-chave: *Solanum paniculatum* L.; Solanaceae; atividade antiulcerogênica; ação cicatrizante; doenças crônicas; úlceras pépticas.

ABSTRACT

Peptic ulcer disease, which includes gastric and duodenal ulcers, is a chronic disease with multifactorial etiology that affects about 10% of the world population. The biggest cause of the appearance of ulcers occur by endogenous agents (increased secretion of acid and pepsin) or exogenous (*Helicobacter pylori*, NSAIDs, ethanol, stress, ischemic processes, among others). The treatment of peptic ulcers is made by the use of drugs proton pump inhibitors (such as omeprazole and lansoprazole) and histamine receptor blockers (such as cimetidine and ranitidine). However, these drugs have harmful side effects and are not able to promote the healing of gastric mucosa efficiently, which usually causes disease relapse. The search for new substances for treating this disease involves the use of natural products. *Solanum paniculatum* L., target species of this study, is cited for antiulcerogenic properties and is present in RENISUS, however, there are few studies that elucidate their pharmacological properties against this disease. Therefore, the aim of this study was to evaluate the gastroprotective and healing effect of the hydroalcoholic extract of the leaves of *S. paniculatum* (EHSPFl) against the experimental peptic ulcers. Was observed that EHSPFl presents significant gastroprotective effect against ethanol and indomethacin (NSAIDs) damaging agents and the acute ischemia and reperfusion, with the effective dose of 62.5mg/Kg. The extract acts in gastroprotection by both local and systemic action, being able to reduce the levels of LPO, increased mucus production and reduce neutrophil infiltration, in addition to acting via modulation of NO. However, the extract was unable to restore the levels of GSH, SOD and CAT in acute models, and did not decreased acid secretion. In the curative model of gastric ulcers induced by ischemia and reperfusion, we observed effective protection of EHSPFl with reduced LPO and MPO, increased levels of CAT and SOD and increased NO production due to the increased expression of iNOS. However, the extract was not able of modulating the inflammatory response, while reducing the neutrophils recruitment to the lesioned area. In the acute model of induction of duodenal ulcers with cysteamine, the EHSPFl showed no significant protection, besides having no healing activity in gastric subacute model of induction of ulcers. With the results of this study is possible to infer that the EHSPFl presents gastroprotective action against the different lesive agents. The curative effect of the extract on the repair of gastric mucosa subjected to the process of ischemia and reperfusion is due to effective antioxidant extract.

Keywords: *Solanum paniculatum* L.; Solanaceae; antiulcerogenic activity; healing action; chronic diseases; peptic ulcers.

Introdução

I. INTRODUÇÃO

Úlceras pépticas, que abrangem úlceras gástricas e duodenais, têm sido grande ameaça para a população mundial ao longo dos últimos dois séculos devido à alta morbidade e mortalidade humana (MALFERTHEINER et al., 2009). No Brasil há poucos estudos epidemiológicos atuais que relatam a ocorrência de úlceras pépticas, mas um levantamento realizado em 2005 no Hospital das Clínicas de São Paulo (SP) relatou que 33,4% dos pacientes com dispepsia submetidos à endoscopia foram diagnosticados com presença de úlceras pépticas, sendo que 26,5% possuíam úlceras duodenais e 7% úlceras gástricas (MARQUES et al., 2011).

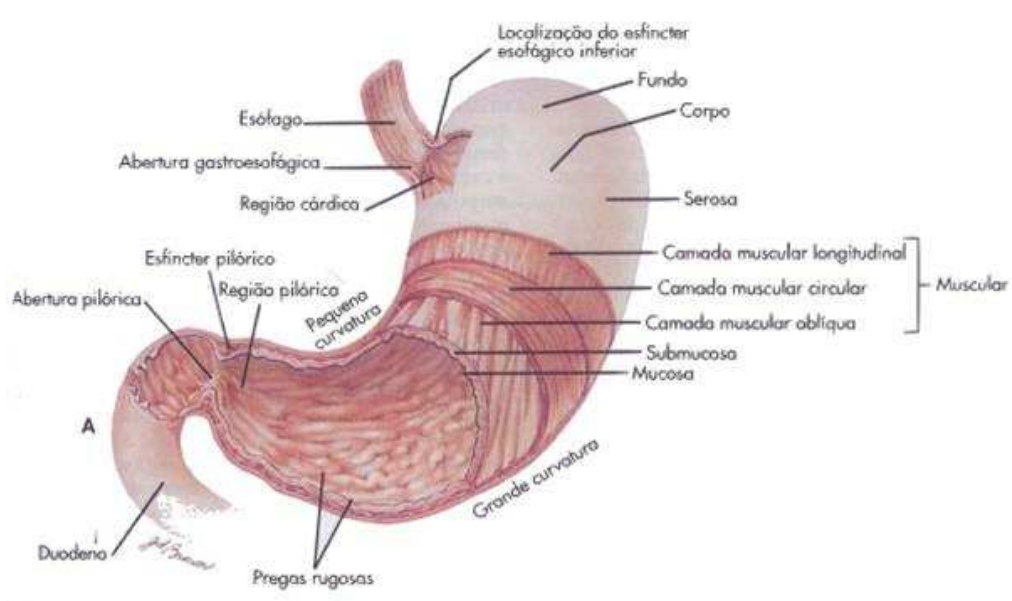
A doença ulcerosa péptica é considerada de alto risco por possuir recidivas constantes, e por isso é caracterizada como uma doença crônica. Para compreender os estágios de desenvolvimento das lesões pépticas até o estabelecimento das úlceras, é necessário avaliar como os fatores lesivos contribuem para o desenvolvimento da doença e quais são os mecanismos fisiológicos que participam da proteção do organismo e reduzem os danos provocados, que foi a finalidade deste trabalho.

1. *Anatomia e fisiologia do estômago*

O estômago é dividido em três regiões: o fundo, situado na região superior e tangencia a junção esofagogástrica; o corpo, maior parte do órgão; e o antro, localizado na região próxima ao canal pilórico (DANGELO & FATTINI, 2007). As três porções do estômago são limitadas por dois sistemas de esfíncteres: o esofágico inferior, na parte proximal do estômago, e o pilórico ou piloro, na região distal do estômago (HOGBEN et al., 1974) (**figura 1**).

A parede do estômago é constituída por várias camadas de tecido, compreendendo as camadas serosa, muscular longitudinal, circular e oblíqua, submucosa e mucosa. A camada serosa é a que reveste a maior parte do órgão, exceto pela região cárdica, uma pequena porção da parte distal do estômago. A camada submucosa é constituída de tecido conjuntivo frouxo e possui uma rica rede vascular e um plexo submucoso (**figura 1**). A camada mucosa é a camada mais interna do estômago e que abriga numerosas glândulas gástricas, sendo a região responsável pela produção e secreção de compostos necessários para o funcionamento do sistema digestório (DANGELO & FATTINI, 2007).

Figura 1. Anatomia do estômago.



Fonte: google imagens.

Funcionalmente, a mucosa do estômago pode ser dividida em três porções glandulares, de acordo com as glândulas presentes. A região glandular cardíaca se localiza abaixo do esfíncter esofágico inferior e contém células secretoras de muco. A glandular oxíntica abrange 80% do estômago (fundo e corpo) e possui: células parietais secretoras de ácido clorídrico (HCl); células principais produtoras de pepsinogênio, que é convertido em pepsina na presença de HCl; células D produtoras de somatostatina, que inibe a secreção de HCl; e células do tipo enterocromafins (ECL), que liberam histamina. A porção glandular pilórica abrange 20% da área total do estômago (antro) e compreende as mesmas células da glandular oxíntica, com exceção das células principais, e incluem as células G produtoras de gastrina (**figura 1**). Adicionalmente, a superfície gástrica é constituída de células do tipo mucosa especializadas em secretar grande quantidade de muco alcalino com elevada viscosidade, formando uma barreira física protetora contra danos que podem ser provocados pela secreção ácida, além de favorecer o transporte do alimento por lubrificá-lo (JAIN et al., 2006; SCHUBERT & PEURA, 2008).

2. Fatores lesivos da mucosa gástrica

2.1 Secreção ácida

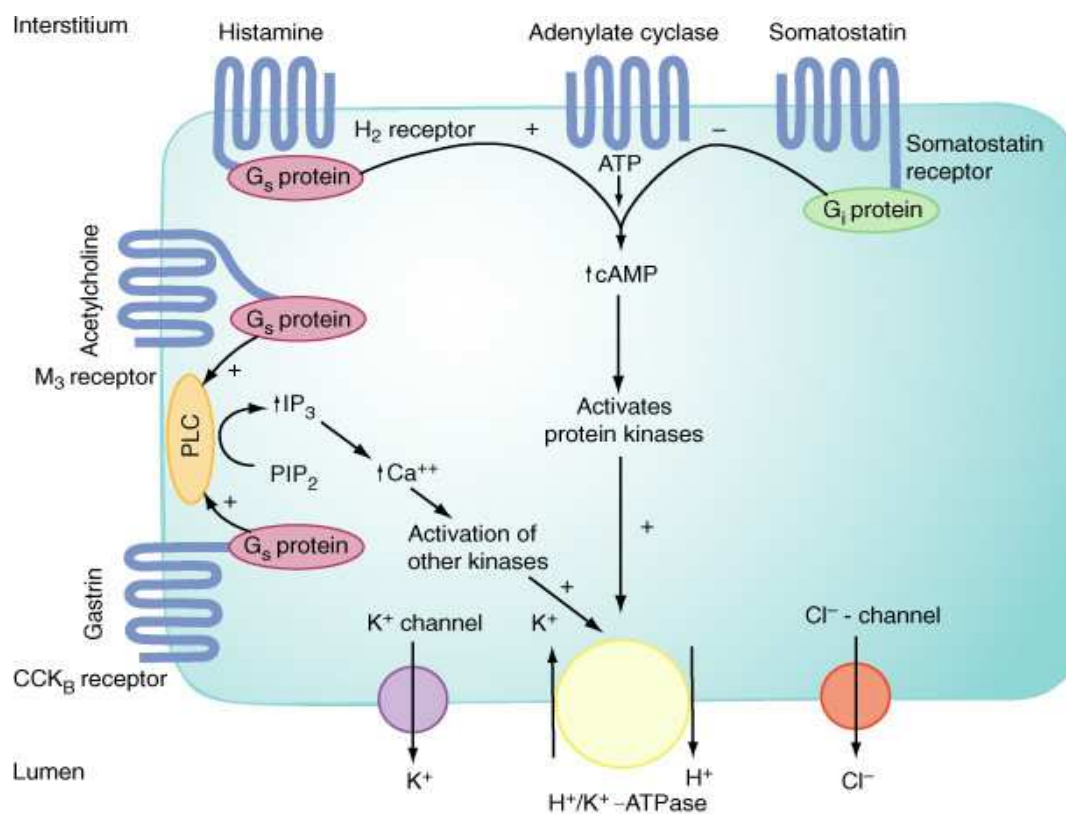
A secreção de ácido gástrico é essencial para o processo de digestão, participando da formação do bolo alimentar que posteriormente será absorvido no intestino delgado, além de impedir a contaminação bacteriana e facilitar a digestão de proteínas e absorção de ferro, cálcio e vitamina B-12 (SCHUBERT & PEURA, 2008). No entanto, o excesso de produção de ácido se torna um agente endógeno lesivo e, por isto, a regulação fisiológica da secreção ácida é o principal alvo terapêutico frente às doenças gástricas, pois com a redução de HCl há diminuição da dissolução da barreira muco-bicarbonato e reduz os danos à mucosa gástrica. Atualmente, há drogas sintéticas que atuam inibindo a produção e secreção de ácido, como lansoprazol e omeprazol. Porém, há mais mecanismos envolvidos no desenvolvimento de úlceras pépticas do que não somente a produção de ácido.

O mecanismo de produção do ácido clorídrico ocorre nas células parietais através da bomba de prótons $H^+K^+/ATPase$. Esta bomba consiste de duas subunidades: a subunidade catalítica, responsável pela troca de H^+ intracelular pelo K^+ luminal, acompanhada de liberação de Cl^- também para o lúmen através de canais de íons cloreto; a subunidade responsável por manter a estrutura e funcionalidade da bomba, protegendo a enzima da degradação. Os íons H^+ e Cl^- transportados para o lúmen se ligam, formando o HCl (SCHUBERT & PEURA, 2008). Para que haja secreção de HCl, é necessário um estímulo. A célula parietal contém abundantes vesículas que estocam bombas $H^+K^+/ATPase$ em estado de repouso; quando estimuladas, através do aumento de cálcio intracelular e/ou AMPc, uma cascata bioquímica intracelular envolvendo proteínas quinases é ativada e essas vesículas se fundem com a membrana apical das células parietais, promovendo a ativação das bombas de prótons e iniciando a formação de HCl. O retorno à condição não estimulada promove a reciclagem e retornam ao compartimento vesicular dentro das células (SCHUBERT, 2005).

A regulação da secreção ácida é feita por via neuronal, parácrina e endócrina (KONTUREK et al., 2004). Os neurônios aferentes e eferentes fornecem uma comunicação bidirecional entre o sistema nervoso central (SNC) e o estômago, além dos neuropeptídeos, que agem por vias central e periférica para efetuar essa regulação (SCHUBERT, 2005). Os principais estimulantes da secreção de HCl são: acetilcolina (ACh) - liberada de neurônios pós-ganglionares entéricos; a gastrina - liberada de células G do antro gástrico; e a histamina - liberada das células

enterocromafins (ECL). O principal inibidor da secreção do ácido gástrico é a somatostatina liberada das células D da mucosa oxíntica e pilórica. Na via neuronal, o SNC regula a atividade do sistema nervoso entérico (SNE) através da liberação de Ach liberada pelos neurônios pós-ganglionares do nervo vago, que estimula a secreção ácida em resposta aos estímulos pelo alimento, como visão, odor e salvação. As fibras eferentes chegam ao estômago pelo nervo vago e fazem sinapse com células ganglionares do SNE. A Ach é então liberada e estimula a secreção ácida por atuar em receptores muscarínicos (M_3) localizados na membrana basolateral das células parietais. Adicionalmente, há liberação de histamina e gastrina pela na região do antro por estímulo indireto (SCHUBERT, 2005). Estes mediadores, juntamente com a somatostatina, também regulam a secreção de ácido gástrico (**figura 2**).

Figura 2. Esquema ilustrativo dos fatores envolvidos na regulação da secreção ácida.



Fonte: www.misodor.com. Ca^{++} : íon cálcio; Cl^- : íon cloreto; K^+ : íon potássio; H^+/K^+ -ATPase: bomba de prótons. CCK_B : colecistoquinina B; M_3 : muscarínicos 3; H_2 : histamínico 2

A histamina quando liberada da ECL estimula a secreção de HCl diretamente por se ligar aos receptores histaminérgicos (H_2) das células parietais, desencadeando uma cascata bioquímica que ativa proteína quinase (PKA) e aumenta os níveis de AMPc (JAIN, et al., 2007). De maneira

indireta, a histamina atua nos receptores H_3 das células D do antro, inibindo a secreção de somatostatina, hormônio responsável por inibir a secreção de ácido e bloquear a liberação de gastrina, e consequentemente aumenta a secreção de ácido. A histamina também atua nas células G estimulando a liberação de gastrina (VOYYURU, et al., 1995; ROULEAU, et al., 2004) (**figura 2**).

A gastrina é o principal mediador da secreção de HCl, agindo principalmente na liberação de histamina das ECL no corpo e fundo do estômago. Quando é liberada da célula G, a gastrina se liga aos receptores de gastrina/colecistocinina do tipo 2 ou tipo B (CCK-B) das células parietais, aumentando os níveis de cálcio intracelular que estimula a bomba de prótons, ativando a produção de ácido (ALY, et al., 2004; BEALES, 2004). Em contrapartida, a somatostatina presente nas células D da glândula oxíntica e pilórica inibem a secreção ácida por agir diretamente na célula parietal e indiretamente inibindo a liberação de histamina e gastrina. A redução excessiva do pH no lúmen do estômago estimula a secreção de somatostatina, bloqueando a liberação de ácido (SCHUBERT, 2005) (**figura 2**).

2.2 Estresse oxidativo

Processos oxidativos ocorrem naturalmente no organismo, originando radicais livres provenientes do metabolismo de células saudáveis. O radical livre é qualquer espécie química que contém um ou mais elétrons desemparelhados. As espécies reativas de oxigênio (EROs) é o grupo de radicais livres que possuem moléculas de oxigênio na sua constituição, como os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxila ($OH^{\bullet}$), peroxila ($RO_2^{\bullet}$) e hidroperoxila ($HO_2^{\bullet}$) e outros agentes oxidantes que não são radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e ozônio (O_3), mas que podem ser convertidos rapidamente em radicais (HALLIWELL & GUTRIDGE, 1989).

À medida que aumenta o estresse oxidativo, os níveis de EROs também se elevam, e estas reagem com a membrana lipídica através do ataque de elétrons desemparelhados, ocasionando perda de funcionalidade ou até mesmo apoptose celular, fenômeno denominado de peroxidação lipídica. Os danos oxidativos quando atingem várias células começam a provocar lesões teciduais mais graves, e o organismo tende a desenvolver doenças degenerativas, tais como as doenças cardiovasculares, câncer, doenças neurodegenerativas como Alzheimer e doenças inflamatórias (SREEJAYAN & RAO, 1996; GERBER et al., 2002; DI MATTEO & ESPOSITO, 2003).

A peroxidação lipídica também provoca danos às células gástricas, desencadeando processos oxidativos envolvidos no desenvolvimento de úlceras pépticas. Vários estudos têm demonstrado que as EROs estão envolvidas em diversos modelos de indução de úlceras pépticas, principalmente o modelo de isquemia, que produz as espécies reativas, seguida de reperfusão tecidual, no qual promove lesões através do carreamento de espécies reativas para a mucosa gástrica (UEDA et al., 1989). Entretanto, estudos que avaliaram a resposta oxidativa gástrica frente ao modelo de úlceras induzidas por DAINES também demonstraram que ocorre aumento nos níveis de CAT (ODABASOGLU et al., 2005; DENGIZ et al., 2007; BILICI et al., 2008) e redução de GSH e SOD (ODABASOGLU, et al., 2005; MOTAWI, et al., 2008). INEU et al. (2008) também relatam que os níveis de SOD diminuíram após indução de úlceras gástricas por etanol.

2.3 Drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (DAINES)

As DAINES, como a indometacina, são drogas de grande relevância clínico devido às suas propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas. No entanto, o uso não controlado destas drogas tem propiciado o surgimento de diversos efeitos colaterais, como desenvolvimento de lesões ulcerogênicas. As DAINES causam dissipação do gel mucoso e da camada de fosfolipídios, causando a lesão na mucosa, além de diminuir os níveis de prostaglandinas (PG) devido à inibição das COXs (LAINE et al., 2008). A maioria dos DAINES são ácidos fracos, que nas condições ácidas do estômago são convertidos na forma não-ionizada, facilitando a entrada na célula onde o pH é neutro; isto promove retenção e liberação de íons H^+ , que podem alterar a funcionalidade celular. Grande parte das DAINES bloqueiam a via COX, mas mantém a via das lipoxigenases (LOX) ativa, gerando aumento nos níveis de leucotrienos B_4 e E_4 que estão envolvidos na formação de lesões gástricas (BIAS et al., 2004). Em humanos, os DAINES estão diretamente relacionados com o surgimento de úlceras hemorrágicas, devido à inibição dos efeitos vasoconstritores e de agregação plaquetária dos tromboxanos A_2 (TOMLINSON & BLIKSLAGER, 2003).

O mecanismo de formação de lesões ulcerativas pelas DAINES envolve inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial nas células produtoras de muco, alterando suas características hidrofóbicas. Para reduzir os efeitos colaterais dessas drogas, pesquisadores desenvolveram moléculas sintéticas que inibem especificamente COX-2, conhecidos como COXIBs (celecoxib, deracoxib, etoricoxib, lumiracoxib, parecoxib, rofecoxib e valdecoxib). Entretanto, o uso destas drogas podem aumentar o risco de doença cardiovascular trombótica pela redução de PGI_2 , que é

sintetizada pela COX-2 (MUKHERJEE, 2002). Por isto, ainda é necessário a busca por novas substâncias que apresentem efeitos adversos reduzidos.

2.4 *Helicobacter pylori*

H. pylori é uma bactéria gram-negativa que pode estar presente no epitélio gástrico de superfície luminal de indivíduos infectados, desde o antro pilórico até a cárdia. Este microrganismo infecta humanos geralmente nos primeiros anos de vida; ao menos 50% da população mundial apresenta infecção por *H. pylori*, mas a grande maioria dos pacientes não tem complicações clinicamente significantes. Esta bactéria é a principal causa do desenvolvimento de doença ulcerosa péptica, estando associada ao surgimento de 95% das úlceras duodenais e 70% das gástricas. Antibióticos associados à outros medicamentos antiulcerogênicos são capazes de acelerar o processo de cicatrização das úlceras e prevenir recidivas, mas cepas resistentes à antibióticos já estão sendo identificadas, o que dificulta o tratamento de úlceras pépticas (WANNMACHER, 2011). Além do mais, o uso de DAINES pelos pacientes também retarda o processo de cicatrização. Estudo de triagem realizado em pacientes com infecção por *H. pylori* e que utilizam DAINES, a longo prazo, demonstrou que não houve efeito benéfico do tratamento sob a ocorrência de úlceras, erosões ou dispepsia (DE LEEST et al., 2007).

Os fatores determinantes para a identificação de infecção por *H. pylori* envolve mudanças na homeostase de hormônios gástricos e secreção ácida, metaplasia péptica, interação da bactéria com a barreira muco-protetora, imunopatogênese e fatores genéticos. A infecção por esta bactéria promove um *feedback* negativo, estimulando a liberação de gastrina e consequentemente aumentando a secreção de ácido gástrico. *H. pylori* estimula a ativação de urease, produzindo amônia alcalina para se proteger do ambiente ácido; este aumento do pH local estimula a liberação de somatostatina, a qual aumenta a secreção ácida por estimular a gastrina. A via neuronal também é afetada por *H. pylori*: conexões neuronais fundo-antral que controlam a produção de ácido são rompidas, aumentando a secreção de HCl. A hipersecreção ácida rompe a barreira muco-protetora e provoca danos hemorrágicos ao epitélio gástrico, facilitando a colonização da bactéria. Adicionalmente, *H. pylori* e as lesões provocadas pelo contato da mucosa com o HCl causam resposta inflamatória, com infiltração de neutrófilos e macrófagos, ativação de citocinas, predominantemente interleucinas (ILs) 8 e 1 β , aumento de enzimas lisossomais, leucotrienos e EROs. Linfócitos T e B e citocinas pró-inflamatórias regulam a resposta imune local e sistêmica frente à infecção, ativando anticorpos e outras citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10) (MALFERTHEINER et al., 2009).

2.5 Etanol

O etanol é um potente agente lesivo da mucosa gástrica por produzir lesões hemorrágicas erosivas. O aumento do consumo de álcool pela população mundial é relevante no quadro atual da etiologia de úlceras gástricas. De acordo com o estudo “*Global Status Report on Alcohol and Health*”, elaborado pela OMS (2011), em 2005 o consumo de bebidas alcoólicas atribuído aos indivíduos maiores de 15 anos (*per capita*), foi de 6,13 litros de álcool puro. Deste valor, 28,6% é originado de produção caseira, o que aumenta o risco de danos ao consumidor. Este álcool caseiro pode estar com determinadas impurezas ou contaminados com agentes potencialmente perigosos, que podem gerar prejuízos à saúde (OMS, 2011).

Modelos experimentais com o etanol têm demonstrado o efeito ulcerogênico e necrotizante quando o etanol entra em contato direto com a mucosa; em culturas de células gástricas, este agente lesivo é relatado por retardar a restituição epitelial por ocasionar danos ao citoesqueleto dessas células, fazendo com que as mesmas percam a sua função (MATSUHASHI et al., 2007). O etanol também atua: estimulando a liberação de endotelinas, que possuem ação vasoconstritora; na degranulação de mastócitos, aumentando a resposta inflamatória; inibindo a síntese de prostaglandinas (PGs); reduzindo a produção de muco; provocando danos no endotélio vascular da mucosa gástrica; provocando isquemia e reduzindo o fluxo sanguíneo local; aumentando a produção de EROs (PAN et al., 2008).

3. Fatores defensivos da mucosa gástrica

3.1 Barreira muco-bicarbonato

A barreira muco-bicarbonato (**figura 3-1**) é a primeira linha de defesa da mucosa gástrica, constituída por muco, bicarbonato e fosfolipídios surfactantes secretados pelas células epiteliais estimuladas pela gastrina, secretina, prostaglandinas E_2 (PGE_2) e agentes colinérgicos. Juntamente, esses componentes do muco formam um gel viscoso por todo o trato gastrointestinal (TGI) desde o estômago até o cólon, que adere à superfície da mucosa, protegendo-a. O bicarbonato é responsável por manter um microambiente de pH neutro no epitélio gástrico (**figura 3-1**), prevenindo a ação proteolítica da pepsina e impedindo a difusão do ácido gástrico (ALLEN & FLEMSTRÖM, 2005), enquanto os fosfolipídios surfactantes possuem propriedades hidrofóbicas,

formando uma barreira que previne a entrada de substâncias hidrofílicas; sua deficiência provoca predisposição ao surgimento de úlceras (ETHELL et al., 1999).

O muco alcalino é constituído de 95% de água e 5% de mucina, uma glicoproteína composta de 80% do peso em carboidratos constituídos de quatro monômeros similares ligados por pontes de dissulfeto. A polimerização destas unidades da mucina formam a viscosidade do muco, e juntamente com seus outros constituintes são responsáveis por manter as suas características físico-químicas. É importante a manutenção da funcionalidade da camada de muco através da síntese de novas mucinas em substituição àquelas que foram degradadas pela ação de pepsinas, para manter a barreira física protetora contra agentes lesivos (LAI et al., 2009).

As alterações nas propriedades físico-químicas do gel viscoso afetam a funcionalidade da barreira muco-protetora, e estas mudanças dependem principalmente de glicoproteínas (CARBAJAL et al., 2000). Em humanos, por exemplo, a invasão da bactéria *Helicobacter pylori* na mucosa gástrica aumenta a viscoelasticidade do muco, na tentativa de impedir a entrada de patógenos móveis (MARKESICH et al., 1995). A viscoelasticidade também é aumentada no ambiente ácido do lúmen gástrico, através da redução de cargas negativas dos grupamentos carboxila sobre o ácido siálico nas regiões glicosiladas das fibras de mucina (LAMONT, 1992).

O bicarbonato é secretado pelas células epiteliais e fica retido no muco viscoso, tornando-o alcalino (**figura 3-1**). As taxas de secreção de muco e bicarbonato aumentam com a ingestão de alimentos, sendo a taxa máxima de secreção de bicarbonato 10% da taxa de secreção de ácido gástrico (HCl) (BERNE et al., 2004; LAINE et al., 2008). No evento de liberação de íons H^+ pelas células parietais, há o transporte simultâneo de íons bicarbonato (HCO_3^-) pela membrana basolateral através da troca de Cl^-/HCO_3^- , resultando no aumento da disponibilidade de bicarbonato. Além disso, para cada íon H^+ secretado, uma molécula de CO_2 é convertida em bicarbonato, provocando o fenômeno conhecido como maré alcalina (DONG & KAUNITZ, 2006). As células parietais produtoras de HCl no lúmen gástrico também secretam bicarbonato e o direciona para os capilares sanguíneos (**figura 3-4**), que é transportado para as células epiteliais de superfície, onde irá formar a barreira de muco e bicarbonato. A secreção de bicarbonato também é estimulada pela Ach liberada dos terminais nervosos próximos às células epiteliais de superfície (**figura 3-6**) (BERNE et al., 2004; LAINE et al., 2008).

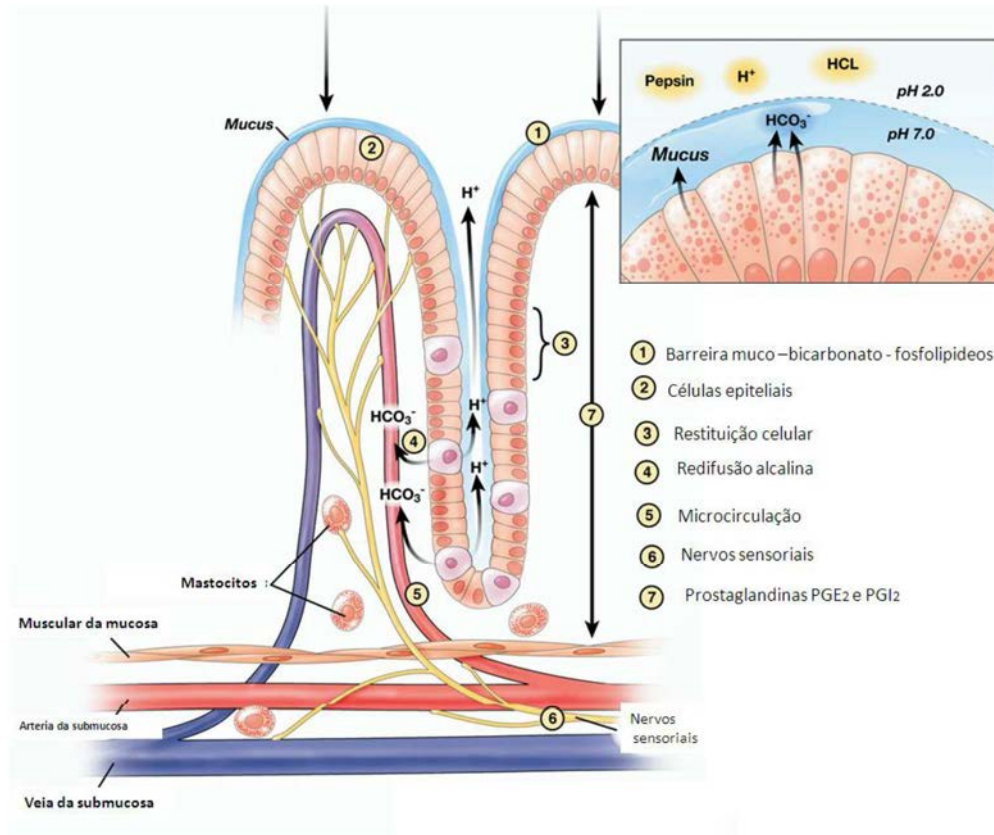
A participação da barreira muco-bicarbonato na defesa da mucosa gástrica já está bem caracterizada, e por isso agentes farmacológicos que estimulam a secreção de muco podem resultar

em efeitos benéficos na profilaxia de úlceras pépticas. A carbenoxolona é um exemplo de fármaco que, apesar de não ser mais utilizado na terapêutica, é responsável por aumentar a produção de muco e fortalecer a barreira gastroprotetora (ENE et al., 1988).

3.2 Células epiteliais de superfície

A camada de células epiteliais (**figura 3-2**) corresponde ao segundo mecanismo de defesa da mucosa gástrica, produzindo tanto os componentes do muco quanto os estímulos para sua produção. Os fosfolipídios de membrana possuem propriedades hidrofóbicas, repelindo o ácido gástrico e agentes lesivos hidrossolúveis (LICHTENBERGER, 1999). As células epiteliais gástricas estão organizadas pelas junções estreitas e as uniões do tipo GAP, fornecendo aderência e integridade entre as células, impedindo a retrodifusão de HCl e pepsina, um dos mecanismos de defesa da mucosa. A renovação contínua da camada celular epitelial (**figura 3-3**) garante a manutenção da integridade da mucosa, bem como a secreção de fatores importantes para a estimulação e produção de muco (LAINE et al., 2008). Esta renovação é coordenada por fatores de crescimento, como os fatores de crescimento: epidermal (EGF), transformante- α (TGF- α) e dependente de insulina-1 (IGF-1), ativados por PGE2 e gastrina (PAI et al., 2002). Fatores importantes que foram descobertos recentemente com o uso de ferramentas de biologia molecular identificaram diversas proteínas com funções importantes para a defesa da mucosa gástrica, como as proteínas: de choque térmico, que protegem contra variações de temperaturas, estresse oxidativo e agentes citotóxicos (TANAKA et al., 2007); catelicidina e β -defensinas, que atuam evitando a colonização bacteriana, sendo relevante para impedir o estabelecimento de úlceras por *H. pylori* (YANG et al., 2006); survivina, que impede a apoptose e promove multiplicação celular (CHIOU et al., 2005).

Figura 3. Esquema ilustrativo de fatores envolvidos na defesa da mucosa gástrica.



Fonte: LAINE et al. (2008). HCO₃⁻: íon bicarbonato; H⁺: íon hidrogênio; HCl: ácido clorídrico.

3.3 Microcirculação gástrica

A microcirculação gástrica (**figura 3-5**), além de ser relevante na produção e secreção de muco por auxiliar na manutenção da barreira muco-protetora, supre o tecido gástrico com nutrientes, oxigênio e hormônios necessários para a sua funcionalidade. Além do mais, a circulação sanguínea na superfície da mucosa remove materiais residuais (KAWANO & TSUJI, 2000). A arquitetura vascular da mucosa gástrica facilita a distribuição de fatores protetores, pois as células glandulares estão em proximidade com os capilares sanguíneos, e a remoção de substâncias tóxicas, devido às células epiteliais de superfície estarem próximas ao sistema venoso (**figura 3-5**).

O endotélio microvascular antagoniza o efeito de vasoconstritores tais como leucotrienos C₄, tromboxanos A₂ e endotelina através da geração de prostaciclina (PGI₂) e óxido nítrico (NO), tentando remover ou diluir o agente lesivo (LAINE et al., 2008). PGI₂ e NO também promove aumento do fluxo sanguíneo local por prevenir a adesão de plaquetas e leucócitos na parede dos capilares sanguíneos da mucosa. As PGI₂ juntamente com prostaglandinas E₂ (PGE₂) atuam

inibindo a secreção de ácido, aumenta a produção de muco e bicarbonato e o fluxo sanguíneo, contra a motilidade gastrointestinal e acelera a restituição epitelial (KOBAYASHI & ARAKAWA, 1995; KANEKO et al., 2008).

3.4 Prostaglandinas

A barreira muco-bicarbonato é apenas a primeira linha de defesa da mucosa gástrica. Quando esta barreira é danificada, outros mecanismos protetores devem ser ativados para efetuar a gastroproteção. As prostaglandinas (PGs) são derivadas de ácidos graxos e são encontradas em praticamente todos os tecidos, com funções variadas. Elas são produzidas a partir do metabolismo de diferentes precursores, e um deles é o ácido araquidônico (AA), que é convertido em PGG₂ e PGH₂ pela ação da ciclooxygenase (COX) (**figura 4A**). As COXs possuem três isoformas: COX-1, que é expressa constitutivamente; COX-2, produzida através de estímulo; e COX-3, uma variante da COX-1 (CHANDRASEKHARAN, et al., 2002). É importante ressaltar que COX-1 e 2 atuam em sinergismo, uma vez que a COX-2 aumenta sua atividade para suprir a deficiência de PGs quando há inibição da COX-1. A inibição da COX-1 produz aumento na motilidade gástrica, alteração do fluxo sanguíneo e hipóxia tecidual, fatores que podem ser controlados pela ação reflexa da COX-2; isto destaca a relevância de ambas as COXs na defesa da mucosa gástrica (TANAKA et al., 2002). As PGs derivadas do AA são especificamente as PGs de série-2, como PGE₂ e PGI₂ (**figura 3-7**), produzidas a partir de PGH₂, e que estão diretamente envolvidas na proteção do TGI por serem agentes citoprotetores importantes (CALDER, 2001).

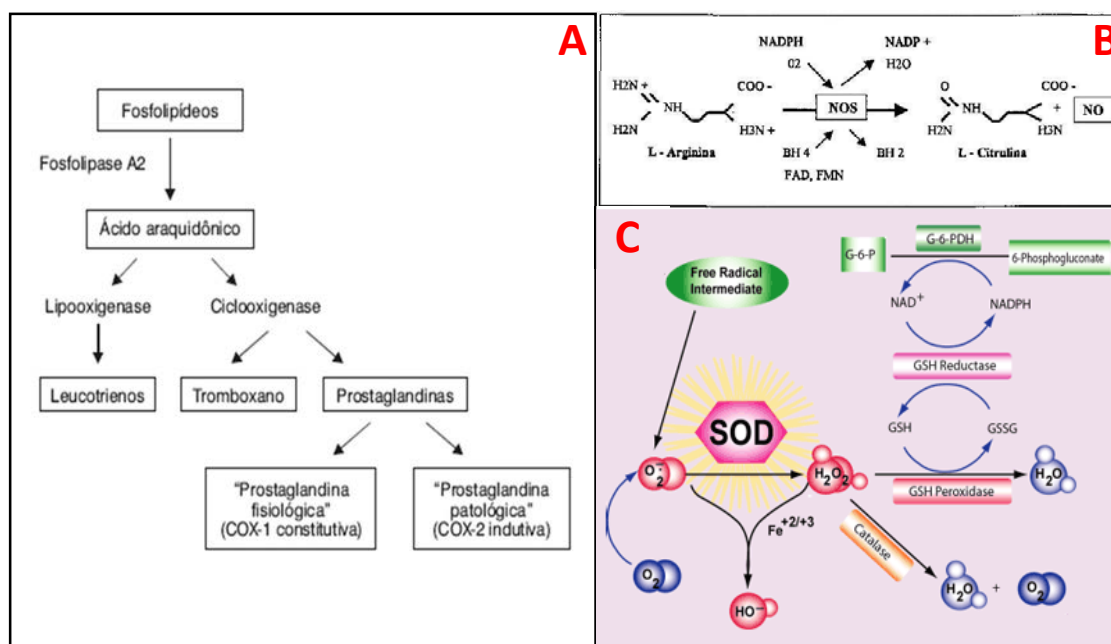
As PGs são responsáveis por inibir a secreção de ácido, estimular a secreção de muco, bicarbonato e fosfolipídios, aumentar o fluxo sanguíneo da mucosa e acelerar a recuperação epitelial e cicatrização da mucosa, além de inibir a ativação de mastócitos e leucócitos, assim como a aderência de plaquetas no endotélio vascular (LAINE, et al., 2008). O mecanismo de ação das PGs envolve receptores EP 1-4, sendo que os EP-1 são responsáveis direto pela defesa da mucosa gástrica, enquanto EP-3 está envolvido na secreção ácida e EP-4 na secreção de muco (NARUMIYA et al., 1999). A PGE₂ é responsável por aumentar a secreção de bicarbonato no estômago através da ativação de EP-1 e no duodeno via ativação de EP-3 e 4 em ratos (AOI, et al., 2004; NAKASHIMA, et al., 2004). Além da PGE₂, o fator liberador de corticotrofina, a melatonina, a uroguanilina e a orexina A, também estimulam a secreção de bicarbonato (LAINE et al., 2008). Estudos relatam que a acidificação do tecido gastroduodenal já estimula o aumento de PGE₂ e promovem a secreção de bicarbonato (SUGAMOTO, et al., 2001; KAGAWA, et al., 2003; NAKASHIMA et al., 2004).

3.5 Óxido Nítrico

Assim como as PGs, o NO é um importante agente protetor da mucosa gástrica. Esta molécula gasosa é formada a partir da reação de conversão da L-arginina em L-citrulina pela óxido nítrico sintase (NOS) (**figura 4B**). Há três diferentes isoformas de NOS: NOS neuronal (nNOS) e NOS epitelial (eNOS), expressas constitutivamente; e NOS induzível (iNOS), que precisa ser estimulada para ser ativada. O mecanismo de ação do NO é via aumento intracelular de GMPC, no qual o NO se liga ao grupo heme da guanilil ciclase solúvel (GCs), convertendo GTP em GMPC, que se liga aos domínios específicos de moléculas efetoras, como proteínas quinases, canais iônicos e fosfodiesterases, que desencadeiam respostas à nível celular. No TGI, nNOS e eNOS são expressas a níveis basais no sistema nervoso entérico e nas células endoteliais vasculares, respectivamente. A iNOS é expressa em macrófagos e neutrófilos, além de estar presente em células epiteliais e neurônios. Esta enzima é cálcio-dependente, e sua expressão é elevada quando há estímulos lesivos e/ou processos inflamatórios com o intuito de aumentar a produção de NO.

O NO atua na manutenção da homeostase no TGI, mantendo a integridade da mucosa gástrica e a barreira de muco e bicarbonato, além de aumentar o fluxo sanguíneo gástrico. Experimentos realizados em ratos revelam que o N^G-monometil L-arginina (L-NMMA), inibidor não-seletivo de NOS induz aumento na pressão arterial sistêmica com curva dose-resposta dependente e uma redução no fluxo sanguíneo da mucosa gástrica. Outros estudos relataram que os doadores de NO provocam aumento da camada de muco em ratos e, pesquisas mais recentes indicam que NO também inibe a secreção de ácido gástrico: aplicação de doadores de NO via intragástrica reduzem a secreção estimulada por pentagastrina (LANAS, 2008).

Figura 4. Esquema ilustrativo de fatores envolvidos na proteção da mucosa gástrica. Rota de produção de prostaglandinas (A) e do óxido nítrico (B); enzimas antioxidantes (C).



Fonte: google imagens, modificado. COX: ciclooxigenase; NO: óxido nítrico; NOS: óxido nítrico sintase; SOD: superóxido dismutase; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; HO[•]: radical hidroxila; O₂: oxigênio molecular; O₂^{•-}: radical superóxido; H₂O: molécula de água; GSH: glutatona; GSSG: glutatona oxidada; G-6-P: glicose 6-fosfato; G-6-PDH: glicose 6-fosfato desidrogenase.

3.6 Antioxidantes

As EROs produzidas, apesar de ser produto do metabolismo natural das células, podem ocasionar danos celulares e eventualmente morte celular. Quando há um desbalanço entre a elevada quantidade de espécies reativas produzidas e a pequena disponibilidade de captadores de radicais livres, há ocorrência de estresse oxidativo à nível celular (SMITH *et al.*, 2000; PEUCHANT *et al.*, 2004). No entanto, o próprio ambiente redox (oxidação-redução) do interior celular impede os danos oxidativos através da atuação de antioxidantes constituintes do próprio sistema fisiológico, tais como enzimas e moléculas não-enzimáticas captadoras de radicais livres, como a glutatona reduzida (GSH), glutatona peroxidase (GPx) e redutase (GR), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), dentre outras (**figura 4C**).

A glutatona reduzida (GSH) é uma molécula proteica não-enzimática de baixo peso molecular (tripeptídeo) que possui radicais sulfidríla em sua estrutura química e que atua como a primeira linha de defesa celular frente a danos oxidativos. A GSH age decompondo íons peróxido

(O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) antes que eles possam interagir e formar radicais hidroxil ($OH^\bullet$), que são mais reativos. Os níveis de GSH são modulados por mecanismos enzimáticos glutamyltranspeptidase (-GT), transportador de aminoácidos, glutathione sintase (GS), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR) (ISHIKAWA, et al., 1997).

A GPx é responsável por captar radicais livres através da peroxidação da GSH, formando glutathione oxidada (GSSG), e age no controle dos níveis de H_2O_2 e hidroperóxidos lipídicos no organismo, enquanto a glutathione reductase não age diretamente na remoção de espécies reativas, mas é responsável pela regeneração de GSH a partir de GSSG, na presença de NADPH, co-fator doador de átomos de H^+ necessário para que a reação ocorra. A reação efetuada pela glutathione reductase impede a paralisação do ciclo metabólico da GSH, pois parte dela está sendo regenerada pela glutathione reductase (GR) enquanto parte da glutathione está sendo convertida pela GPx para GSSG (MEISTER & ANDERSON, 1983). Em condições de estresse oxidativo, há aumento na exportação de GSSG para o fora da célula por proteínas transportadoras dependentes de ATP, depletando os níveis de GSH no interior das células por falta de GSSG para restabelecer o ciclo de produção de GSH (LEIER, et al., 1996). Já em condições normais, o GSSG é reduzido a GSH pela GR (LU, 2000). A enzima glutathione-S-transferase (GST) age conjugando peróxidos de lipídeos com GSH, reduzindo a lipoperoxidação, e catalisando a redução/inativação dependente de GSH do H_2O_2 , formando glutathione oxidada (GSSG) (MARRS, 1996).

A enzima SOD é uma metaloproteína que age dismuta radical $O_2^{\bullet-}$ produzidos por diferentes metabolismos aeróbicos que ocorrem naturalmente no organismo convertendo-o em H_2O_2 , e oxigênio moléculas (O_2) (MC-MILLAN *et al.*, 1998). A formação do radical $O_2^{\bullet-}$ ocorre espontaneamente na membrana de mitocôndrias pelo processo de respiração celular, mas pode ser produzido endogenamente por flavoenzimas, como a xantina oxidase ativada por processos de isquemia e reperfusão, lipoxigenase (LOX), COX e NADPH oxidase (NORDBERG & ARNER, 2001).

A enzima CAT atua subsequentemente convertendo o excesso de H_2O_2 em água (H_2O) e oxigênio (O_2), que são moléculas quimicamente estáveis (MAC-MILLAN *et al.*, 1998). A CAT se localiza principalmente nos peroxissomos, onde realiza a reação, e apresenta outra função de detoxificar o organismo de substâncias potencialmente tóxicas, como fenóis e álcoois, pela redução do H_2O_2 . Ao se ligar ao NADPH, há aumento de sua eficiência e se protege da inativação (KIRKMAN & GAETANI, 1984; KIRKMAN *et al.*, 1999). O H_2O_2 não é um radical livre, mas é relevante por sua habilidade de transpassar membranas biológicas e por participar da formação de

outras EROs como radicais HOCl, pela ação da mieloperoxidase (MPO) presente nos fagossomas de neutrófilos, radicais OH⁻. O H₂O₂ também é removido pela glutathione peroxidase (GPx) e peroxiredoxinas (NORDBERG & ARNER, 2001).

As enzimas SOD, CAT e ascorbato peroxidase (APx), que capta radicais livres através da peroxidação do ascorbato, são os maiores captadores de EROs dentre as antioxidantes. Entretanto, CAT se localiza especificamente em peroxissomos, enquanto APx está presente em todos os compartimentos celulares, possuindo alta afinidade por H₂O₂ e responsável pela modulação dos níveis de EROs (MITTLER, 2002). Além do mais, acredita-se que APx em combinação com moléculas não-enzimáticas (ascorbato e GSH) e enzimas que participam da regeneração do ascorbato (monodehidroascorbato redutase, dehidroascorbato redutase e glutathione redutase) são os principais mecanismos antioxidantes (NOCTOR & FOYER, 1998).

3.7 Resposta inflamatória aguda

Quando um agente lesivo é capaz de romper a barreira de muco e bicarbonato, lesões no epitélio gástrico estimulam outros fatores protetores. A resposta inflamatória aguda atua como uma forma de defesa da mucosa gástrica, promovendo liberação de mediadores pró-inflamatórios como: citocinas, que incluem fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucinas (IL-1 β e IL-6); aminas biogênicas, incluindo histamina e serotonina; fator de agregação plaquetária e substância P (KIM et al, 2007; O'SHEA & MURRAY, 2008).

As lesões gástricas promovem o recrutamento de neutrófilos e monócitos, que liberam quimocinas nas quais atraem macrófagos para o tecido lesionado. Em seguida, citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6) são liberadas pelas células inflamatórias e aumentam a expressão de moléculas integrinas presentes nos neutrófilos, mobilizando-os para a superfície do endotélio vascular. Os metabólitos originados do AA também possuem atividade pró-inflamatória significativa, através do aumento na expressão de COX-2 e consequente produção de PGs. A via das LOXs também atua sobre o AA; o leucotrieno B₄ induz a migração e adesão de polimorfonucleares no endotélio vascular através do aumento de integrinas na parede do endotélio vascular (JANEWAY et al, 2001; NATHAN 2002; LAWRENCE et al, 2002) (**figura 4A**).

Outra citocina importante é a proteína quimiotática de monócitos, que atraem monócitos para o tecido inflamado e estes se diferenciam em macrófagos, que atuam juntamente com neutrófilos para estabelecer a resposta inflamatória (WALLACE, 2001). Os leucócitos polimorfonucleares, especialmente os neutrófilos, são as primeiras células a serem recrutadas para a área lesionada, iniciando uma cascata de eventos que promove a liberação de enzimas proteolíticas como leucócitos,

elastase ou catepsina G, além de EROs, geradas predominantemente pela NADPH oxidase. (POECKEL et al., 2008). Nos neutrófilos, a enzima MPO também resulta na formação de EROs, como o ácido hipocloroso (HOCl), a partir do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na presença de Cl⁻ (NAITO & YOSHIKAWA, 2002).

4. *Doença ulcerosa péptica*

Quando há um desbalanço entre os fatores protetores e lesivos da mucosa gástrica, ocorre o desenvolvimento de úlceras pépticas, que são caracterizadas por lesão profunda da mucosa gástrica, que ultrapassa os limites da camada muscular, e ocorre nas regiões que ficam expostas à ação do ácido gástrico (TYTGAT, 2011). Esta doença heterogênea e multifatorial acomete de 5 a 10% da população mundial, representando uma das doenças crônicas mais comuns. O sintoma predominante nos primeiros momentos de desenvolvimento de úlceras pépticas é dor epigástrica, que pode estar acompanhada de outros sintomas dispépticos, como distensão abdominal, saciedade precoce e náuseas. Em pacientes com úlceras duodenais, dor epigástrica ocorre tipicamente durante o estado de jejum ou até mesmo a noite, sendo aliviada com consumo de alimentos ou ingestão de agentes neutralizantes de ácido. Cerca de um terço dos pacientes também têm azia (MALFERTHEINER et al., 2002). Úlceras crônicas podem ser assintomáticas (DEW, 1987).

Devido à sua complexidade, a etiologia da doença ulcerosa péptica ainda não está totalmente estabelecida. Dentre os fatores que podem estar envolvidos no desenvolvimento da doença, são citados: fatores genéticos; fatores endógenos, como distúrbios fisiopatológicos que aumentem a secreção de ácido e pepsina; e fatores exógenos, como uso descontrolado de DAINES, infecção por *H. pylori*, consumo de álcool, choque séptico (que pode provocar isquemia no tecido gastroduodenal), estresse, tabagismo e dieta alimentar (CARVALHO, 2000). Atualmente, sabe-se que o consumo de DAINES por período prolongado e infecção por *H. pylori* são os principais fatores que induzem o surgimento de úlceras. No entanto, o aumento no consumo de bebidas alcoólicas e principalmente na frequência provoca lesões na mucosa gástrica de maneira gradativa, até a formação da úlcera. A ingestão excessiva de álcool pode resultar em gastrite, hemorragia abaixo do epitélio gástrico, esfoliação celular, devido ao contato agressivo direto com a mucosa, e infiltração de células inflamatórias (JAHOVIC, et al., 2007; MATSUHASHI, et al., 2007). Sabe-se atualmente que os danos ulcerogênicos no TGI provocados por ingestão contínua de DAINES, álcool, processos isquêmicos, *H. pylori* e estresse pode estar relacionado ao mecanismo de produção de EROs (DONG & KAUNITZ, 2006).

5. *Solanum paniculatum* L.

S. paniculatum L. (**figura 5**), espécie-alvo deste estudo, pertence ao gênero *Solanum* (família Solanaceae) e foi caracterizado em 1753 por Carolus Linnaeus. Este gênero, um dos maiores dentro do táxon das Angiospermas, é considerado o mais complexo pertencente a essa família e compreende 7 subgêneros e cerca de 60 a 70 seções (D'ARCY, 1972). O gênero *Solanum* possui aproximadamente 1500 espécies descritas e distribuídas pelas regiões subtropicais e tropicais, habitando principalmente a América do Sul, continente no qual a maioria das espécies foram originadas. Atualmente, há centros de endemismo de espécies deste gênero nas Américas do Norte e Central, assim como no Brasil, nas Índias Ocidentais, África, Madagascar e Austrália (AGRA, 1999; HUNZIKER, 2001).

Do ponto de vista farmacológico, o gênero *Solanum* se destaca por suas propriedades medicinais. As espécies deste gênero são frequentemente utilizadas para o tratamento de febres, dores e inflamações, bem como auxiliam no tratamento de doenças do fígado (como a cirrose), do trato gastrointestinal (úlceras, diarreias) e cardiovasculares. Na literatura, já existem descrições, para o gênero, de suas propriedades diurética, hipotensiva, espasmolítica, gastroprotetora, entre outras (VISIOLI *et al.*, 2000; ANTONIO *et al.*, 2004; SHAHILADEVI *et al.*, 2006; GUPTA *et al.*, 2009; PARMAR *et al.*, 2010; HEMAMALINI *et al.*, 2011).

S. paniculatum é uma espécie arbustiva, com cerca de 1,5m, sendo distribuída de norte a sul do país e encontrada com frequência no estado de São Paulo. Esta é citada na medicina popular como tônico, antitérmico e no tratamento de disfunções gástricas. Seus frutos são utilizados como purgante, para tratar icterícia, hepatite e distúrbios intestinais e suas folhas no tratamento de parasitas intestinais e desordens estomacais (MESIA-VELA, *et al.*, 2002; BOTION, *et al.*, 2005). Na literatura científica pesquisada, há poucos estudos relativos a esta espécie. Entretanto, existem relatos de estudos que determinaram o potencial farmacêutico de *S. paniculatum*, tais como: atividade anti-helmíntica; potencial citotóxico e genotóxico; inibição da secreção gástrica da raiz desta espécie (VILELA *et al.*, 2009; VIEIRA *et al.*, 2010; MESIA-VELA, 2002).

Estudos científicos realizados com espécies de *Solanum* relacionam seus efeitos farmacológicos às classes de compostos químicos presentes no gênero. A maioria das pesquisas apontam os compostos fenólicos, principalmente alcaloides, flavonoides e saponinas, como a principal classe química envolvida nos efeitos terapêuticos, especialmente devido à abundância desta classe no gênero (TURKMEN *et al.*, 2006; AKANITAPICHAT *et al.*, 2010). As espécies de

Solanum que possuem compostos fenólicos em sua composição fitoquímica são utilizadas no tratamento de doenças, pois estes compostos possuem efetiva ação antioxidante e combate ao estresse oxidativo produzido por diversas doenças. O estresse oxidativo estão diretamente associada à mais de 100 doenças, incluindo aquelas as quais ainda não possuem tratamentos eficazes e seguro, como as doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, aterosclerose, diabetes e câncer (BECKMAN & AMES, 1998; GHASANFARI *et al.*, 2006).

Os estudos fitoquímicos de *S. paniculatum*, apesar de escassos, puderam demonstrar que esta espécie possui alto teor de alcaloides nas raízes e caule, mas tem quantidade reduzida nas folhas, sendo isolados alguns como jurubebina, jubebina, solanina, jupebina e jupebenina (SIQUEIRA-JACCOUND *et al.*, 1982; COSTA, 1940). Detectou-se também frutose, glicose e galactose nos frutos (LEEKNING e ROCCA, 1968) e solanina foi isolada das raízes e caules (SIQUEIRA e MACAN, 1976). Adicionalmente, glicoalcaloides, esteroides, saponinas (paniculonina A, paniculonina B, jurubina, isojuripidina, isojurubidina, isopaniculidina e jurubidina) e flavonoides também são citados como grupos químicos presentes na planta (RIPPERGER *et al.*, 1967a,b; RIPPERGER & SCHREIBER, 1968; SCHREIBER & RIPPERGER, 1966; SCHREIBER *et al.*, 1965).

Figura 5. Imagem fotográfica de *Solanum paniculatum* L.



Fonte: Google imagens.

6. Quadro atual do uso de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil

A difusão do uso de plantas medicinais e de compostos isolados obtidos a partir destas ocorre categoricamente pelo mundo. A OMS (2011) relata que aproximadamente 80% da população mundial já fizeram uso de algum tipo de erva para aliviar sintomas desagradáveis, como dor ou febre, e que apenas 30% desse valor, seja oriundo uso com indicação médica, além de 25% dos medicamentos prescritos mundialmente serem de origem vegetal. Além do mais, plantas e seus derivados são as maiores fontes de novas drogas, movimentando cerca de 30% do mercado farmacêutico (KIRKPATRICK *et al.*, 2002). De acordo com Newman *et al.* (2003), entre os anos de 1981 e 2002, de 877 novas moléculas introduzidas no mercado, em torno de 49% eram substâncias isoladas de produtos naturais, semissintéticos, derivados de produtos naturais ou então moléculas sintetizadas tomando como modelos, estruturas de origem natural.

O quadro atual das plantas medicinais e fitoterápicos no mundo revela que estes deixam aos poucos de serem considerados crença popular, passando a ter relevância na ciência médica. Como exemplo, cita-se a aprovação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) (Portaria nº 971 de 03 de maio de 2006) e do Decreto nº 5813, de 22 de junho de 2006 (que aprova a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos e dá outras providências) no Brasil em 2010, implementando o uso de plantas medicinais e fitoterápicos como opção de tratamento para doenças de baixa gravidade. A partir da aprovação da PNPIC, o governo brasileiro criou uma Relação Nacional de Plantas de Interesse ao SUS (RENISUS), no qual 71 plantas foram listadas nesta relação devido ao seu grande uso popular. Este programa estimula o aumento de pesquisas científicas que comprovem a indicação popular das espécies presentes na lista, com objetivo de validar as propriedades farmacológicas dessas plantas e a segurança da utilização das mesmas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; ANVISA, 2010). *S. paniculatum* está presente na RENISUS, o que torna relevante pesquisas que validem as propriedades medicinais desta espécie.

7. Justificativa

Há no mercado medicamentos utilizados no tratamento de úlceras gástricas, tais como as pertencentes à família de antagonistas de receptores histaminérgicos H₂, como a cimetidina e ranitidina, ou de inibidores de bomba protônica, como lansoprazol, omeprazol, esomeprazol, pantoprazol e rabeprazol (LI *et al.*, 2004). Porém, todas estas drogas apresentam efeitos colaterais como desenvolvimento da hipergastrinemia, aumento do risco de infecção bacteriana, incluindo

H. pylori, principal agente responsável pelo surgimento de úlceras pépticas, e em casos mais graves podem levar à formação de câncer gástrico (YUAN, et al., 2006; BRUNTON, et al., 2006). Além do mais, apesar destas drogas serem efetivas e frequentemente utilizadas no tratamento de úlceras pépticas estas comumente não promovem a cura, pois o processo de cicatrização é ineficiente em restabelecer a circulação sanguínea local, necessária para manter a funcionalidade da mucosa gástrica, o que provoca o surgimento de recidivas. Adicionalmente, o uso prolongado de medicamentos anti-úlceras pode levar a efeitos adversos, como o risco de desenvolvimento de câncer gástrico e duodenal (LA VECCHIA & TAVANI, 2002; RAGHUNATH *et al.*, 2005). Isto demonstra a necessidade de maior número de pesquisas envolvendo doenças gastrointestinais, bem como a busca por novas drogas capazes de otimizar o tratamento e/ou promover a cura para estes distúrbios.

Dentre as novas drogas, destacam-se aquelas oriundas de plantas medicinais, que podem apresentar efeitos colaterais menores do que medicamentos sintéticos. Devido à confiabilidade terapêutica oferecida às plantas medicinais e fitoterápicos, além dos compostos obtidos a partir de isolamento, faz-se necessário investir em pesquisas científicas que investiguem o uso com eficácia, segurança e potencial terapêutico, garantindo-lhes viabilidade e credibilidade no ramo da ciência médica.

A avaliação do potencial medicinal das plantas aumenta a possibilidade de se encontrar novas moléculas, e com isso potencializa a descoberta de novos compostos ativos. Como exemplo, cita-se os alcaloides, flavonoides e saponinas esteroidais, compostos presentes em *S. paniculatum* e que são geralmente citados na literatura por possuir atividades biológicas envolvidas na atividade gastroprotetora e de lesões ulcerativas, sendo alvos de vários estudos com a finalidade de caracterizar novas estruturas de efeitos farmacológicos sobre o TGI (DRYDEN *et al.*, 2006). *S. paniculatum*, espécie-alvo deste estudo, é a que mais se destaca entre as plantas medicinais pesquisadas por possuir diferentes usos populares, além de ser a única representante do gênero *Solanum* presente na RENISUS. Além do mais, há poucos estudos científicos que comprovem as atividades terapêuticas desta espécie citadas na medicina popular, incluindo na prevenção e/ou tratamento de úlceras pépticas, o que demonstra a relevância deste estudo.

Objetivo

II. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito gastroprotetor e cicatrizante do extrato hidroalcoólico de folhas de *S. paniculatum* frente à úlceras pépticas.

a. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a toxicidade aguda e subaguda do extrato em experimentos *in vivo*;
- ✓ Realizar experimentos agudos *in vivo* que avaliem o potencial protetor frente à úlceras gástricas e duodenais;
- ✓ Investigar o efeito cicatrizante subagudo frente à úlceras gástricas;
- ✓ Avaliar os mecanismos de ação envolvidos na gastroproteção e cicatrização;
- ✓ Adicionalmente, avaliar sua propriedade antidiarreica em modelos *in vivo*.

Material e métodos

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. *Material vegetal*

Folhas de *S. paniculatum* foram coletadas em janeiro de 2010 no município de Araraquara, São Paulo, pelo Pós-doutorando Gerardo Magela Vieira Júnior, sob tutoria do Prof. Dr. Wagner Vilegas do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, São Paulo. As exsiccatas foram depositadas no Herbário “Irina Delanova Gemtchujnicóv” do Instituto de Biociências (IB) da UNESP, Campus de Botucatu, São Paulo, sob os números BOTU027535, BOTU027536 e BOTU027537.

2. *Extração*

Folhas foram secas em estufas a 40°C por 7 dias e moídas em moinho de facas. O pó obtido das folhas foi entumecido com solução hidroalcolica a 70%, durante duas horas. O material foi submetido à percolação utilizando a vazão de 1 mL/min. O extrato obtido foi concentrado em rotaevaporador à vácuo sob temperatura de 40°C e a solução restante foi liofilizada para a obtenção do extrato seco, que foi armazenado e posteriormente analisado fitoquimicamente. A produção do extrato foi realizada em cooperação científica com o Pós-Doutorando Gerardo Magela Vieira Júnior, sob tutoria do Prof. Dr. Wagner Vilegas do Instituto de Química da UNESP de Araraquara como parte integrando do projeto FAPESP/BIOTA (FAPESP/Proc. 2009/52237-9).

3. *Delineamento experimental*

Foram utilizados ratos Wistar machos (200-250g) ou camundongos Swiss machos e/ou fêmeas (35-50g) nos experimentos. Os animais foram provenientes do Biotério Central da UNESP-Botucatu ou adquiridos Empresa Anilab em Paulínia, São Paulo, aclimatados às condições controladas do biotério setorial (sob temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e ciclo claro-escuro de 12 h) por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental. Os animais foram alimentados com ração Guabi® e água *ad libitum* e antes de cada experimento, os mesmos foram mantidos em gaiola especial (para evitar coprofagia), sem maravalha e com água *ad libitum*.

Após o término dos procedimentos experimentais os animais sofreram morte humanitária em câmara de CO₂, seus estômagos retirados e abertos ao longo da grande curvatura para então serem prensados entre placas de vidro no intuito de realizar a captura das imagens que foram

analisadas no programa LabIris Pro. As imagens foram analisadas através de demarcação das áreas de lesão e calculadas pelo programa (mm²). Dependendo do modelo experimental, os animais foram mantidos em jejum de 6 ou 12h antes dos procedimentos para evitar que o alimento interferisse no efeito das drogas teste. Amostras de tecido gástrico ou duodenal foram armazenadas em freezer a -80°C para posterior avaliação de parâmetros bioquímicos. Todos os experimentos obedeceram aos protocolos experimentais aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA), do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu, sob o número 371 (anexo I).

4. Drogas

Os reagentes utilizados são da marca Vetec® Química Fina Ltda. e todas as drogas-padrão utilizadas foram oriundas da empresa Sigma Aldrich, com exceção do lansoprazol obtido da Cruz Vermelha Farmácia e Manipulação Ltda. Os anticorpos anti-iNOS e anti-Rabbit foram obtidos da empresa Abcam, e β -actina da empresa Santa Cruz.

5. Parâmetros de toxicidade

5.1 Modelo de toxicidade aguda

Os grupos de camundongos Swiss machos e fêmeas adultos (n=10) foram tratados com solução salina (controle positivo) ou extrato hidroalcolico 70% de folhas de *S. paniculatum* (EHSPFI) na dose de 5.0 g/Kg (10 mL/Kg) por via oral (v.o.) e foram avaliados parâmetros comportamentais (*screening* hipocrático) durante o período de 6 horas (OECD, 2001; anexo II). Em cada momento da avaliação, analisou-se os 10 animais de cada grupo para uma análise comparativa entre grupos. A partir do dia seguinte ao tratamento, os animais foram pesados diariamente durante 14 dias consecutivos. No 15º dia, após a pesagem, os animais foram mortos e o fígado, rins, coração, baço, pulmão e órgãos reprodutivos (ovários, útero ou testículos) foram pesados e avaliados macroscopicamente. Posteriormente, foi realizada a determinação da relação entre o peso dos órgãos e o peso total do animal (SOUZA-BRITO, 1994).

5.2 Modelo de toxicidade subaguda

Ratos Wistar machos (n=10) oriundos do modelo de cicatrização gástrica receberam tratamento com salina (controle negativo), lansoprazol 30 mg/Kg (controle positivo) ou EHSPFI 62.5 mg/Kg (10 mL/Kg, v.o.) por 14 dias consecutivos. No 15º dia, os animais foram mortos e tiveram seus órgãos retirados (fígado, rins, coração, baço, pulmão e testículos), pesados e macroscopicamente avaliados. Posteriormente foi realizada a determinação da relação entre o peso dos órgãos e o peso total do animal. Parâmetros bioquímicos (ureia, creatina, albumina, proteínas totais, TGO, TGP, FA e GGT) foram avaliados do plasma sanguíneo coletado de cada um dos animais para verificação da toxicidade do extrato.

5.3 Modelo de neurotoxicidade

Camundongos Swiss machos (n=8) foram tratados com salina (controle negativo), EHSPFI 62.5 mg/Kg (v.o.), administrados 60 min. antes da avaliação, e diazepam 2.0 mg/Kg (controle positivo) por via intraperitoneal (i.p.), administrado 30 minutos antes da avaliação. Os animais foram colocados em um aparato de barra giratória (rota rod), que consiste em um aparelho contendo uma barra de ferro giratória com velocidade regulável, que foi padronizado a 6 rpm neste experimento. Os parâmetros analisados foram: número de quedas por animal registrado durante 3 minutos e tempo de latência para a primeira queda do animal (DUNHAM & MYIA, 1957).

*6. Avaliação da atividade gastroprotetora e curativa do extrato hidroalcólico de *S. paniculatum**

6.1 Modelo de indução de úlceras gástricas por etanol absoluto

Este modelo foi descrito por Robert et al. (1979), com modificações. Ratos Wistar machos (n=7-8) receberam tratamentos orais com solução salina (veículo), carbenoxolona 100 mg/Kg (controle positivo), EHSPFI de *S. paniculatum* nas doses de 31.25, 62.5, 125, 250 e 500 mg/Kg (10 mL/Kg), para se obter curva dose-resposta. A carbenoxolona, droga controle positivo neste experimento, age aumentando a produção de muco alcalino, formando uma barreira protetora contra a ação lesiva do ácido clorídrico (BRUNTON et al., 2006). Decorrida uma hora após os pré-tratamentos, 1 mL de etanol (99.5%) foi administrado oralmente e após mais uma hora, todos os animais foram mortos e os estômagos retirados. Tiras dos estômagos foram coletadas e armazenadas em Biofreezer (-80°C) para a análise de parâmetros bioquímicos.

6.2 Modelo de indução de úlceras gástricas por indometacina

O experimento foi realizado segundo a metodologia descrita por Guidobono (1997), com modificações. As lesões gástricas foram induzidas pela administração de indometacina (DAINE – droga anti-inflamatória não-esteroidal que depleta os níveis de prostaglandinas através do bloqueio da atividade de COX-1 e 2, causando lesões ulcerativas) na dose de 50 mg/Kg, solubilizada em carbonato de Sódio 0.5% (pH 7.4), por via oral (v.o.). Os pré-tratamentos dos ratos Wistar machos (n=7-8) por via oral com EHSPFl nas doses efetivas pré-selecionadas no modelo de indução de úlceras por etanol (62.5, 125 e 250 mg/Kg), lansoprazol 30 mg/Kg e solução salina foram realizados 30 min. antes da administração do agente indutor de úlcera (indometacina). O lansoprazol, age diretamente na bomba de H^+/K^+ ATPase inibindo a secreção ácida gástrica (BRUNTON et al., 2006). Os animais foram mortos quatro horas após o estímulo lesivo para a retirada dos estômagos. Tiras dos estômagos foram coletadas e armazenadas para a análise de parâmetros bioquímicos.

6.3 Modelo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão

6.3.1 Modelo isquemia e reperfusão – avaliação do caráter preventivo da droga

Este modelo foi baseado na metodologia descrita por Ueda et al. (1989), com modificações, no qual se avaliou o potencial efeito preventivo de uma substância frente ao modelo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão. Ratos Wistar machos (n=8-10) foram pré-tratados com veículo, EHSPFl (dose de 62.5 mg/Kg) ou lansoprazol na dose de 30 mg/Kg, no volume fixo de 10 mL/Kg. Após a realização do tratamento oral, os animais foram anestesiados com Ketamina 0.08 mL/100g + Xilasina 0.04 mL/100 g via intramuscular (i.m.). Decorridos 30 min., realizou-se uma incisão de aproximadamente 3 cm, do lado esquerdo do abdômen no qual a artéria celíaca foi identificada e isolada. Um *clamp* microvascular foi colocado nessa artéria e permaneceu ocluída durante 30 min. Após este período de isquemia, o *clamp* foi removido, para permitir a reperfusão, permanecendo assim os 60 min. subsequentes. O grupo denominado Sham passou pelo procedimento cirúrgico de abertura da cavidade abdominal, mas não teve a artéria clampada, além de não ter sido submetido ao tratamento oral com nenhuma droga. Após este período, os animais foram mortos e tiveram seus estômagos retirados para as análises. Tiras dos estômagos foram coletadas e armazenadas para a análise de parâmetros bioquímicos.

6.3.2 Modelo de isquemia e reperfusão – avaliação do caráter curativo da droga

Neste modelo, avaliou-se o potencial curativo de uma droga frente ao modelo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão. Ratos Wistar machos (n=8-10) foram anestesiados e sofreram o mesmo procedimento do modelo preventivo de indução por isquemia e reperfusão descrito anteriormente. No entanto, ao final do procedimento de isquemia e reperfusão, os animais foram suturados e tratados por 6 dias com veículo, EHSPFl 62.5 mg/Kg ou lansoprazol 30 mg/Kg (10 mL/Kg, v.o.). Durante este período, os animais foram pesados diariamente para verificar a evolução do peso corporal dos diferentes grupos. No 7º dia, os animais foram mortos, os estômagos foram retirados, tiras foram coletadas e armazenadas para a análise dos parâmetros bioquímicos. O grupo denominado Sham também passou pelo procedimento cirúrgico, porém não recebeu nenhum tratamento oral (UEDA et al., 1989, com modificações).

6.4 Modelo de indução de úlceras gástricas por etanol com tratamento intraduodenal

Ratos Wistar machos (n=7-8) foram pré-tratados com veículo, EHSPFl 62.5 mg/Kg, sucralfato 1.0 g/Kg (citoprotetor de ação local que forma uma barreira mecânica na mucosa gástrica) ou carbenoxolona 100 mg/Kg (5 mL/Kg) pela via intraduodenal (i.d.). Foi realizada leve amarradura do piloro no momento da administração intraduodenal para evitar o refluxo do conteúdo para o estômago. Após 1h, retirou-se a amarradura pilórica e administrou-se etanol (99.5%) por via oral no volume fixo de 1 mL. Transcorridos 60 min. da administração do etanol, os animais foram mortos e os estômagos retirados para análise da área de lesão, como descrito anteriormente.

*7. Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na gastroproteção e no potencial efeito curativo do extrato hidroalcolico de folhas de *S. paniculatum**

7.1 Mensuramento do fluxo sanguíneo em animais submetidos ao modelo de indução de úlceras gástricas por etanol

Ratos Wistar machos (n=10) receberam tratamentos orais com veículo, carbenoxolona 100 mg/Kg ou EHSPFl 62.5 mg/Kg (10 mL/Kg). Grupo controle que não recebeu tratamento (branco) foi adicionado no experimento para avaliar o fluxo sanguíneo em condições normais. Decorrida

uma hora após os pré-tratamentos, 1 mL de etanol (99.5%) foi administrado oralmente e após mais uma hora, o fluxo sanguíneo foi medido com o Laser Doppler (Morr Instruments, modelo VMS-LDF2, monitor de perfusão sanguínea e temperatura Millwey, Axminster, UK). Os valores foram expressos em unidade de perfusão (UP) (KWIENCIEN et al., 2002).

7.2 Modelo de ligadura do piloro pelo método de Shay

Ratos Wistar machos (n=10) foram anestesiados e sofreram uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifoide para a localização e amarradura do piloro e, em seguida, as incisões foram suturadas. Quatro horas após o procedimento cirúrgico, estômagos foram retirados e o conteúdo estomacal foi coletado para determinação do volume (mL), pH e concentração de íons H^+ na secreção ácida gástrica (mEq/mL) (SHAY et al., 1945).

7.2.1 Modelo de ligadura do piloro com tratamento por via oral

Após 30 min. do procedimento cirúrgico, descrito anteriormente, os animais foram suturados e receberam tratamento por via oral com solução salina, lansoprazol 30 mg/Kg e EHSPFl 62.5 mg/Kg (10 mL/Kg).

7.2.2 Modelo de ligadura do piloro com tratamento por via intraduodenal

Neste experimento, os animais receberam tratamento por via intraduodenal com solução salina, lansoprazol 30 mg/Kg e EHSPFl 62.5 mg/Kg (10 mL/Kg), imediatamente após a ligadura ter sido realizada e posteriormente foi realizada a sutura.

7.3 Modelos com administração de inibidores ou antagonistas

7.3.1 Modelo de indução de úlceras gástricas por etanol em animais pré-tratados com indometacina

Neste modelo, avaliou-se a participação de prostaglandinas (PGE_2) na gastroproteção com uso de indometacina, inibidora não-seletiva de COX (ciclooxigenase). Ratos Wistar machos (n=7-8) divididos em grupos receberam pré-tratamentos com salina ou indometacina 50 mg/Kg, por via subcutânea (s.c.) e 30 min. após, foi realizado o tratamento oral com veículo, carbenoxolona 100 mg/Kg ou EHSPFl nas doses de 62.5, 125 e 250 mg/Kg (10 mL/Kg). Transcorrido uma hora após os tratamentos, todos os grupos receberam por 1 mL de etanol absoluto (v.o.) e 60 min. após, os

animais foram mortos e tiveram os estômagos removidos para análise de área de lesão (MATSUDA et al., 1999).

7.3.2 *Modelo de indução de úlceras gástricas por etanol em animais pré-tratados com NEM*

Este modelo foi utilizado para avaliar a participação de compostos sulfidrílicos na gastroproteção. Ratos Wistar machos (n=7-8) foram pré-tratados com veículo ou *N-ethyl maleimide* (NEM) 10 mg/Kg (bloqueador de compostos sulfidrílicos), via intraperitoneal (i.p.). Após 30 min., os grupos receberam oralmente os tratamentos com solução salina, carbenoxolona 100 mg/Kg e EHSPFl 62.5 mg/Kg (10 mL/Kg). Uma hora após o pré-tratamento foi administrado etanol (1 mL) e após 60 min. os animais foram mortos e os estômagos removidos para avaliar área de lesão (MATSUDA et al., 1999).

7.3.3 *Modelo de indução de úlceras gástricas por etanol em animais pré-tratados com L-NAME e L-NIL*

Este modelo foi utilizado para avaliar a participação de óxido nítrico (NO) na gastroproteção. Ratos Wistar machos (n=7-8) foram pré-tratados com veículo, *ω-nitro-L-arginine methyl ester* (L-NAME) na dose de 70 mg/Kg (bloqueador da enzima NOS) ou *L-Lysine- ω-acetamine dihydrochloride* (L-NIL) na dose de 6 mg/Kg (inibidor seletivo de iNOS) administrados pela via intraperitoneal (i.p.). Após 30 min., os grupos receberam oralmente os tratamentos com solução salina, carbenoxolona 100 mg/Kg ou EHSPFl 62.5 mg/Kg (10 mL/Kg). Uma hora após o pré-tratamento foi administrado etanol (1 mL). Uma hora após o tratamento com etanol, os animais foram mortos e os estômagos removidos para análise de área de lesão (MATSUDA et al., 1999; DUDAR et al., 2008, com modificações).

7.3.4 *Modelo de indução de úlceras gástricas por etanol em animais pré-tratados com Ruthenium red*

Este modelo foi utilizado para avaliar a participação dos receptores TRPV1 na gastroproteção. Ratos Wistar machos (n=7-8) foram pré-tratados com veículo (10 mL/Kg) ou *Ruthenium red* (bloqueador dos receptores TRPV1) na dose de 6 mg/Kg (5 mL/Kg) via subcutânea (s.c.). Após 30 min., os grupos receberam os tratamentos: solução salina (v.o.); capsaicina dissolvida em solução salina, Tween 80% e etanol (8:1:11) 5 mg/Kg (i.p.) que se liga aos receptores TRPV1 e promove gastroproteção, carbenoxolona 100 mg/Kg (v.o.) e EHSPFl 62.5 mg/Kg (v.o.). Todos os tratamentos foram feitos com volume de 10 mL/Kg. Uma hora após o pré-tratamento foi

administrado etanol (1 mL) em todos os grupos e uma hora após o tratamento com etanol, os animais foram mortos e os estômagos removidos para análise de área de lesão (PONGPIRIYADACHA et al., 2003).

7.4 Dosagens bioquímicas

7.4.1 Quantificação de muco aderido

O muco da parede gástrica foi determinado em animais submetidos à ligadura do piloro com tratamento oral ou intraduodenal, de acordo com o método de Shay descrito anteriormente. Os estômagos foram removidos e abertos no sentido de maior curvatura, sendo os segmentos glandulares do estômago removidos e pesados. Cada segmento foi transferido imediatamente para um tubo contendo 10 mL de Alcian blue 0.1% (em solução de sacarose 0,16 M tamponada com acetato de sódio 0,05 M, pH=5). Após imersão por 2 h nesta solução, o excesso de Alcian blue do estômago foi removido através de duas lavagens sucessivas com 10 mL de solução de sacarose 0.25 M, primeiramente por 15 min. e em seguida por mais 45 min. O Alcian blue complexado com o muco da parede gástrica foi extraído com 10 mL de $MgCl_2$ de 0.5 M com agitação intermitente por 2 min., em intervalos de 30 min. no período de 2 horas. Uma alíquota de 4 mL da solução de Alcian blue foi vigorosamente agitada com um volume igual de éter dietílico. A emulsão resultante foi centrifugada a 3600 rpm por 20 min. e a absorbância da camada aquosa determinada a 580 nm. A quantidade de Alcian blue extraída por grama de tecido glandular foi então calculada, e, expressa como concentração do corante em $\mu g/mL$ de solução por grama de porção glandular (RAFATULLAH et al., 1990). Os resultados foram expressos em μg de Alcian blue/g de tecido.

7.4.2 Quantificação de malondialdeído (MDA)

Este método é utilizado para avaliar o nível de peroxidação lipídica do tecido. Tiras de tecido gástrico armazenadas do modelo preventivo e curativo de isquemia e reperfusão foram homogeneizadas com KCl 1.15% (1:5). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 9000 rpm por 10 min. a 4°C e o sobrenadante foi coletado. A cada 400 μL de amostra, foram adicionados 400 μL de água destilada, 200 μL de lauril 8.1%, 1500 μL de ácido acético 20% pH 3.5 e 1500 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8% diluído em ácido acético 20%. A solução foi incubada a 95°C por 1h em banho-maria e posteriormente foi centrifugada a 4000 rpm por 10 min., foi coletado 200 μL de cada amostra e adicionado em placa de 96 poços. O malondialdeído (MDA) formado reage com o TBA produzindo uma reação colorimétrica que foi determinada utilizando

um espectrofotômetro com comprimento de onda de 532 nm. Os resultados foram expressos em nmol de MDA/g de tecido. O grupo denominado Sham foi incluído no experimento para uma análise comparativa dos parâmetros de normalidade (ZINGARELLI et al., 1999, com modificações).

7.4.3 *Quantificação de proteínas totais*

Este método se baseia na reação do azul de Coomassie com grupos proteicos, originando um complexo colorido que foi analisado em espectrofotômetro a 595 nm. Proteínas totais foram determinadas para que os dados dos parâmetros analisados posteriormente sejam expressos em relação à quantidade de proteínas da amostra em miligramas (BRADFORD, 1976).

7.4.4 *Quantificação de glutathiona reduzida (GSH)*

Tiras armazenadas de úlceras gástricas induzidas por etanol e por isquemia e reperfusão (modelo preventivo) foram pesadas e armazenadas em 1 mL de solução de ácido tricloroacético a 5% (TCA). O conteúdo de glutathiona reduzida do estômago foi determinado utilizando a substância 5,5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) (ANDERSON et al., 1985). A reação enzimática é constituída através da formação de uma solução de 200 µL da amostra contendo 2 mg/mL de proteína, 0.2 M de tampão fosfato (pH 8.0), 0.5 mM DTNB (2.0 mg em 10 mL de citrato de sódio 1%) em um volume final de 2 mL. A absorbância foi determinada em 412 nm utilizando um espectrofotômetro e os valores foram expressos em nmol/g de tecido. Os grupos branco (sem procedimento e sem tratamento) e sham (que foi submetido ao procedimento sem o tratamento oral) foram incluídos nos experimentos para uma análise comparativa dos parâmetros de normalidade.

7.4.5 *Quantificação de superóxido dismutase (SOD)*

Tiras de estômagos armazenadas dos modelos preventivo e curativo de úlceras gástricas induzidas por isquemia e reperfusão foram utilizadas nas dosagens. As amostras foram homogeneizadas (1:200) em tampão fosfato 50 mM, pH 7.0 e Triton X-100 (1:9). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas (6000 rpm, 4°C por 15 min.) e o sobrenadante foi coletado. Diluição foi feita em tampão fosfato 0.1M pH 7.4 (1:20). A atividade da SOD foi determinada pela inibição da redução do NBT (*nitro blue tetrazolium*) pelo radical superóxido gerado através do sistema hipoxantina/xantina oxidase, a 37 °C. A reação enzimática foi composta de: 0,1 M tampão fosfato 0,1 M (pH 7.4), 0.07 U de xantina oxidase/mL, 100 µM hipoxantina,

600 μ M NBT e 1 mg/mL de proteína da amostra (WINTERBOURN et al., 1995). A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro à 560nm e os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína. O grupo sham (que foi submetido ao procedimento sem o tratamento oral) foi incluído no experimento para uma análise comparativa dos parâmetros de normalidade.

7.4.6 *Quantificação de catalase (CAT)*

Atividade da catalase (CAT) foi mensurada de acordo com o método descrito por Aebi (1984). Tiras armazenadas dos modelos preventivo e curativo de isquemia e reperfusão foram homogeneizadas (1:200) em tampão fosfato 50 mM, pH 7.0 e Triton X-100 (1:9). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas (6000 rpm, 4°C por 15 min.) e o sobrenadante foi coletado; para 200 μ L de homogenato, foram adicionados 100 μ L de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30 mM. A absorbância foi mensurada a 240nm por 2 min., em espectrofotômetro com câmara UV. Os resultados foram expressos em U de CAT/mg de proteína. O grupo sham (que foi submetido ao procedimento sem o tratamento oral) foi incluído no experimento para uma análise comparativa dos parâmetros de normalidade.

7.4.7 *Quantificação de mieloperoxidase (MPO)*

Tiras armazenadas dos modelos de úlceras gástricas induzidas por etanol, indometacina e isquemia e reperfusão (modelos preventivo e curativo) foram utilizadas nas dosagens. Foi utilizado o tampão de reação HTAB (a 0.5% em tampão fosfato sódico 50 mM, pH 6.0) que atua como detergente lisando os grânulos dos neutrófilos que contem a enzima, sendo esta liberada. A atividade enzimática foi determinada seguindo a cinética da reação da enzima com água oxigenada do tampão de reação, sendo que uma unidade de MPO determinada é capaz de degradar 1nmol/min. de água oxigenada a 25°C (KRAWISZ et al., 1984). A atividade da MPO é proporcional ao número de neutrófilos infiltrados na mucosa. A absorbância foi determinada em 450 nm utilizando um espectrofotômetro e os valores foram expressos em nmol/g de tecido. Os grupos branco (sem procedimento e sem tratamento) e Sham (que foi submetido ao procedimento sem o tratamento oral) foram incluídos nos experimentos para uma análise comparativa dos parâmetros de normalidade.

7.4.8 *Quantificação de citocinas*

Tiras armazenadas do modelo curativo de úlceras gástricas induzidas isquemia e reperfusão, incluindo o grupo sham, foram utilizadas nas dosagens. Foi utilizado o tampão PBS (1:5) para

homogeneização das amostras. A dosagem de proteínas por BCA foi realizada utilizando-se de um Kit de dosagem imunoenzimático ELISA (DuoSet®, R&D Systems). Posteriormente, as amostras foram agitadas em banho-maria a 37°C por 20 min. e depois centrifugadas a 10000 rpm por 5 min. a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-10 foram quantificados usando Kits de dosagem imunoenzimático ELISA (DuoSet®, R&D Systems).

7.5 Expressão enzimática de iNOS por Western Blot

Tiras armazenadas do modelo curativo de úlceras gástricas induzidas isquemia e reperfusão, incluindo o grupo sham, foram utilizadas nas dosagens. Para homogeneização das amostras (1:5), foi utilizada uma solução na proporção de 900 μ L de RIPA, 100 μ L do *cocktail* inibidor de proteases (já diluído 1:10) e 5 μ L de PMSF 200 mM. Realizou-se inicialmente a dosagem de proteínas por BCA utilizando um Kit de dosagem imunoenzimático ELISA (Pierce BCA *protein assay kit*). As amostras foram diluídas em água Milli-Q (1:20), e essas amostras diluídas foram pipetadas na placa em volume equivalente a 10 μ L. Ao final 200 μ L do reagente diluente foi adicionado em todos os poços e a absorbância foi determinada por espectrofotometria em comprimento de onda de 562 nm. A concentração de proteínas das amostras utilizadas para realizar o *Western Blot* foi de 30 μ g. Realizou-se o tratamento das amostras a 95°C por 5 min. O gel de empacotamento utilizado foi de 4% e o gel de separação foi de 10%. Foi realizada a eletroforese em gelo por 1h e 30 min. a 125V e a transferência em gelo com metanol 20% por 2 horas a 300V. O bloqueio da membrana foi realizado com BSA 5% por 1 hora a temperatura ambiente com agitação. O primeiro anticorpo aplicado foi o anti-iNOS feito em *rabbit*, com diluição 1,5 μ g/mL e o controle foi a β -actina feita em *mouse* (1:5000). A membrana foi incubada *overnight* em *plot box* a temperatura ambiente (18°C) e com agitação. O segundo anticorpo aplicado foi o anti-rabbit (1:10000), e o segundo anticorpo controle foi a β -actina anti-mouse (1:10000). A incubação do segundo anticorpo foi realizada por 2 horas em *plot box* a temperatura ambiente (18°C) e com agitação. Na revelação, utilizou-se um kit de reação de quimiluminescência (*enhanced chemiluminescence* [ECL], GE Healthcare) normal e supersensível nos tempos de 10 segundos, 30 segundos, 1 min. e 2 min (OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2013). Este experimento foi conduzido em colaboração com a Profa. Dra. Maria José Alves da Rocha, do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia, na USP de Ribeirão Preto, São Paulo.

8. Avaliação da atividade cicatrizante gástrica

8.1 Modelo de indução de úlceras gástricas por ácido acético

Ratos Wistar machos (n=10) foram divididos em grupos, pesados e anestesiados para a realização de uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifoide. A parede anterior do estômago foi exposta e um volume de 0.05 mL de ácido acético 30%, foi injetado na camada submucosa da junção do fundo com o corpo. Imediatamente em contato com o ácido, ocorreu a formação da lesão hemorrágica profunda. Logo em seguida, os animais foram suturados e levados ao biotério. Os animais foram tratados por via oral durante 7 ou 14 dias com solução salina, lansoprazol 30 mg/Kg e EHSPFl 62.5 mg/Kg (10 mL/Kg). Após o tratamento de 7 ou 14 dias, todos os animais serão mortos e seus estômagos retirados para avaliação da área de lesão (OKABE & AMAGASE, 2005).

9. Avaliação da atividade protetora frente à úlceras duodenais

9.1 Modelo de indução de úlceras duodenais por cisteamina

Ratos Wistar machos (n=7-8) foram tratados com veículo, lansoprazol 30 mg/Kg ou EHSPFl 62.5 mg/Kg por via oral. Após 30 min., iniciou-se 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 os tratamentos, os animais foram mortos e se retirou o duodeno para mensuração das lesões de acordo com os índices de lesão (SZABO, 1978):

0 - Ausência de lesão

1 - Erosão superficial da mucosa

2 - Lesões necrosantes;

3 - Lesões perfurantes da mucosa.

10. Atividade antidiarreica

10.1 Modelo de avaliação da motilidade intestinal

Camundongos Swiss machos (n=10) foram tratados com veículo, morfina 2.5 mg/Kg (s.c.) ou EHSPFl (v.o.) nas doses de 62.5, 125, 250 e 500 mg/Kg para determinação da curva dose-resposta. Após uma hora foi administrado por via oral suspensão de carvão ativado a 10%, marcador de motilidade, todos os tratamentos com volume fixo de 10 mL/Kg. Após 30 min., os animais foram mortos e feita a relação entre a distância percorrida pelo carvão ativado e o tamanho total do intestino delgado, expressa em centímetros (STICKNEY & NORTHUP, 1959 com modificações).

10.2 Modelo de avaliação de acúmulo de fluido intestinal induzido por óleo de rícino

Camundongos Swiss machos (n=10) foram tratados (v.o.) com veículo, EHSPFl 250 mg/Kg ou morfina 10 mg/Kg (s.c.), em volume fixo de 10 mL/Kg. Após 1 hora, administrou-se oralmente 0,2 mL por animal de óleo de rícino (agente indutor de diarreia). Transcorridos 30 min. da administração do óleo de rícino, os animais foram mortos e o intestino delgado foi removido após a ligadura final do piloro e da junção ileocecal. O intestino foi então pesado, retirou-se o fluido intestinal e o mesmo foi pesado vazio novamente. A diferença entre os pesos foi determinado em mg (ROBERT et al., 1976).

11 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos na forma de média $\pm$ erro padrão da média. Análise estatística utilizada foi a Análise de Variância (ANOVA), seguida por testes de significância. Para os dados não-paramétricos foram expressos sob a forma de mediana e foram analisados pelo teste Dunn, e dados paramétricos foram analisados pelo teste de Dunnet (para comparação com o veículo) e de Tukey (para comparação entre os grupos), com $p < 0,05$.

Resultados

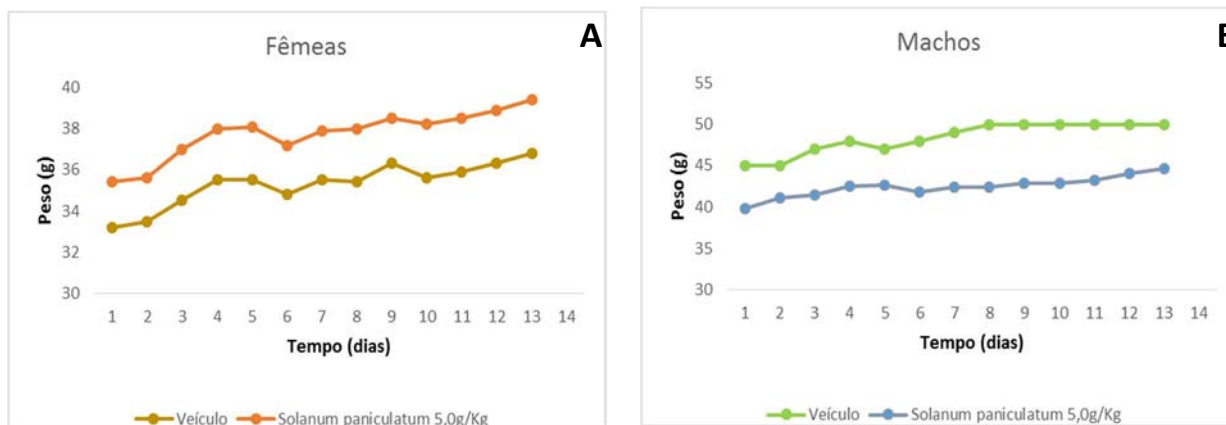
IV. RESULTADOS

1. Atividade farmacológica geral

1.1 Toxicidade aguda

A administração oral de uma dose única de 5.0 g/Kg do EHSPFI, em camundongos Swiss de ambos os sexos, não promoveu efeito tóxico agudo nos animais com base nos parâmetros avaliados neste trabalho. Não se observou alteração nos parâmetros comportamentais aferidos pelo *screening* hipocrático, tanto de animais machos quanto de fêmeas tratados com o extrato, em comparação com o grupo de animais que recebeu veículo (vide anexo II). Também não houve variabilidade estatística no peso corporal e dos órgãos dos animais tratados com EHSPFI, durante os 14 dias de observação, em relação aos grupo controle negativo (**figura 6**) (**tabela 1**) ($p > 0.05$).

Figura 6. Evolução do peso corporal (14 dias) de camundongos Swiss fêmeas (**A**) e machos (**B**) tratados com EHSPFI (5.0 g/Kg) no modelo de toxicidade aguda.



Valores expressos em média (n=10). Análise estatística: ANOVA seguido do teste t' Student para comparação com o grupo controle tratado com o veículo, com $p < 0.05$.

Tabela 1. Relação entre o peso dos órgãos e o peso corporal de camundongos Swiss machos e fêmeas tratados com EHSPFI (5.0 g/Kg) no modelo de toxicidade aguda.

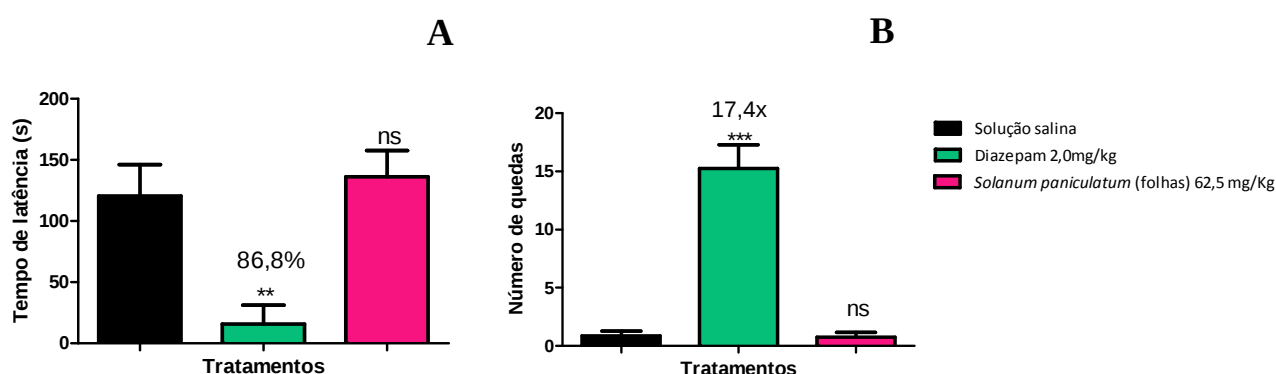
	Tratamentos	Coração	Rins	Pulmões	Fígado	Baço	Ovários*100	Útero
FÊMEAS	Solução salina	4.01 ± 0.12	6.32 ± 0.19	4.82 ± 0.11	12.77 ± 0.34	3.31 ± 0.12	8.92 ± 1.35	2.32 ± 0.19
	EHSPFI (5.0 g/Kg)	3.81 ± 0.11 ^{ns}	6.20 ± 0.16 ^{ns}	4.68 ± 0.17 ^{ns}	13.01 ± 0.33 ^{ns}	3.63 ± 0.12 ^{ns}	8.61 ± 0.87 ^{ns}	2.43 ± 0.22 ^{ns}
		Coração	Rins	Pulmões	Fígado	Baço	Testículos	
MACHOS	Solução salina	3.86 ± 0.07	6.80 ± 0.17	4.28 ± 0.15	13.09 ± 0.38	3.08 ± 0.14	4.09 ± 0.13	
	EHSPFI (5.0 g/Kg)	3.78 ± 0.07 ^{ns}	7.02 ± 0.21 ^{ns}	4.25 ± 0.11 ^{ns}	13.83 ± 0.28 ^{ns}	3.54 ± 0.09 ^{ns}	4.32 ± 0.17 ^{ns}	

Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=10). Análise estatística: ANOVA seguido do teste t' Student para comparação com o controle negativo tratado com solução salina, com $p < 0.05$. Ovário*100 = peso do ovário x100 (ajuste para a realização das análises estatísticas). ns= diferença não significativa.

1.2 Neurotoxicidade aguda

Os camundongos Swiss machos tratados com EHSPFI na dose de 62.5 mg/Kg não apresentaram indícios de neurotoxicidade aguda quando submetidos ao aparato de roda giratória. Não houve diferença significativa no tempo de latência e no número de quedas entre os animais tratados com o extrato e aqueles tratados com o veículo (**figura 7**) ($p > 0.05$). Em relação ao grupo controle tratado com diazepam 2.0 mg/Kg, houve redução significativa no tempo de latência ($p < 0.01$) e aumento no número de quedas promovido pela administração do diazepam ($p < 0.001$).

Figura 7. Avaliação da neurotoxicidade aguda do EHSPFI na dose de 62.5 mg/Kg em camundongos Swiss machos. (A) tempo de latência e (B) número de quedas.

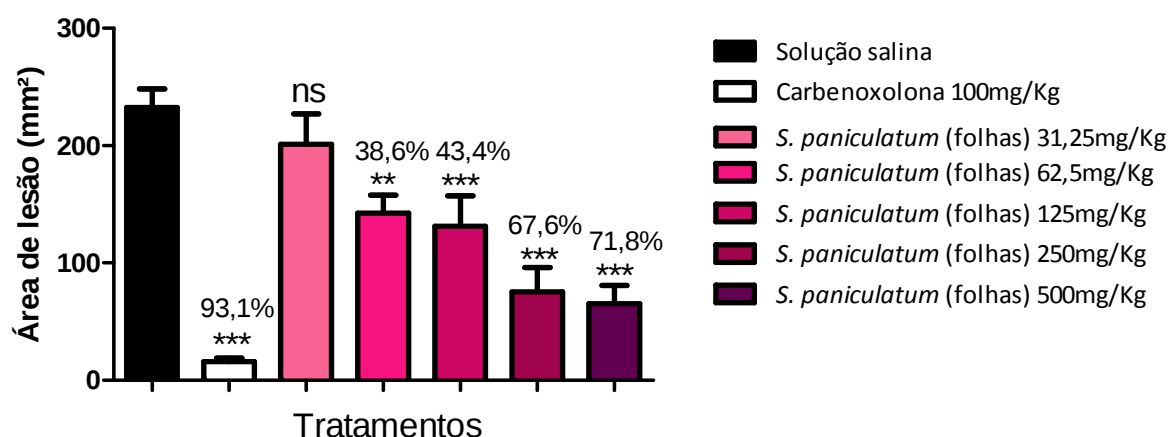


Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=8). Os números indicam em porcentagem (%) a redução no tempo de latência ou o aumento no número de quedas (X) em relação ao grupo tratado com o veículo. Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparação com o controle solução salina e teste de Tukey para comparação entre os grupos, com $**p < 0.01$, $***p < 0.001$. ns= diferença não significativa

2. Avaliação da ação gastroprotetora do extrato frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol

O EHSPFI reduziu a área de lesão nas doses de 62.5, 125, 250 e 500 mg/Kg, com efeito protetor da mucosa gástrica de 38.6%, na menor dose efetiva, em relação ao grupo tratado com veículo ($p<0.01$). Apenas os animais tratados com o extrato na dose de 31.25 mg/Kg não foram capazes de reduzir significativamente a área de lesão. Os animais tratados com o EHSPFI apresentaram curva dose-efeito nas doses testadas e não houve diferença estatisticamente significativa entre as doses efetivas do extrato. O grupo controle positivo neste modelo (carbenoxolona) reduziu a área de lesão em 93.1% em relação ao grupo tratado com solução salina ($p<0.001$) (**figura 8**). Não houve diferença significativa entre as doses testadas, exceto entre a dose de 31.25 e 250 mg/Kg e entre 31.25 e 500 mg/Kg ($p<0.01$).

Figura 8. Avaliação do efeito gastroprotetor do EHSPFI frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos Wistar machos.



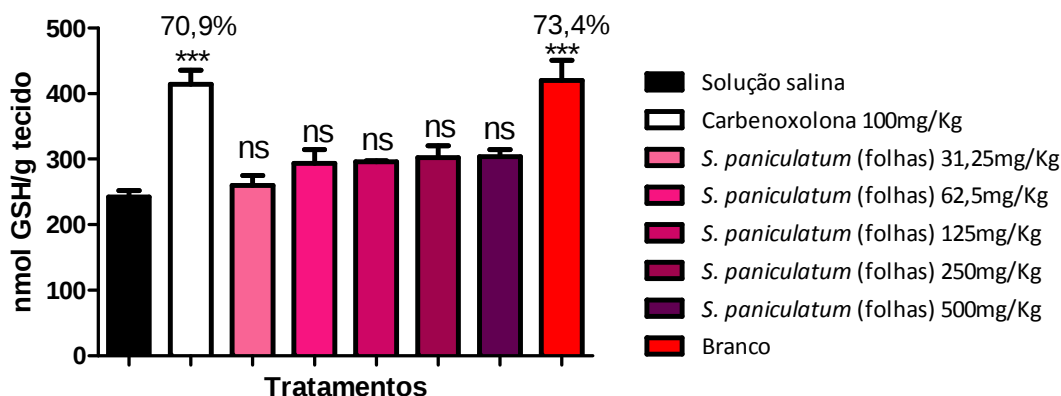
Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($n=7-8$). Os valores em porcentagem indicam a proteção em relação ao grupo pré-tratado com veículo (solução salina). Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparação com o grupo controle solução salina e teste de Tukey para comparação entre os grupos, com ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. ns= diferença não significativa.

2.1. Determinação dos níveis de GSH

No modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol foi observado que os níveis de GSH presentes em amostras de tecido gástrico de animais tratados com EHSPFI mantiveram-se próximos aos do grupo controle (solução salina) e não houve diferença estatística com as diferentes doses testadas ($p>0.05$) ou mesmo entre as doses testadas ($p>0.05$). O grupo tratado com carbenoxolona e o grupo branco não apresentaram depleções nos níveis de GSH, mas aumentos

de 70.9 e 73.4% de GSH em relação ao grupo controle negativo ($p<0.001$). Houve diferença significativa também entre todas as doses testadas do EHSPFl e o grupo branco que não recebeu tratamento ($p<0.001$) (**figura 9**).

Figura 9. Quantificação dos níveis de glutatona reduzida (GSH) em ratos Wistar machos pré-tratados com EHSPFl submetidos ao modelo de indução de úlceras gástricas por etanol.



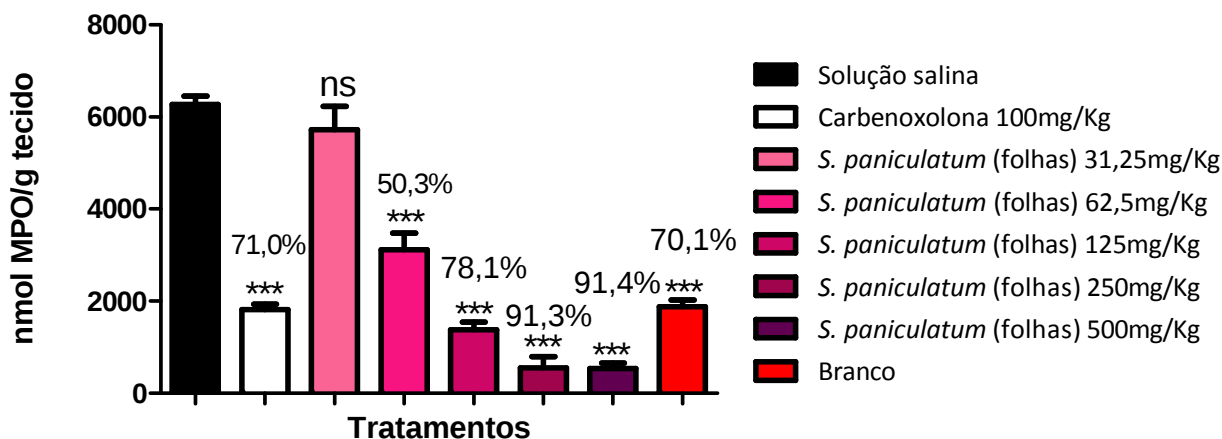
Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($n=7-8$). Os valores em porcentagem indicam os níveis de GSH que não sofreram depleção em relação ao grupo pré-tratado com o veículo (solução salina). Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparação com o grupo controle (solução salina) e teste de Tukey para comparação entre os grupos, com *** $p<0.001$. ns= diferença não significativa.

2.2 Determinação dos níveis de MPO

No modelo de indução de úlceras por etanol, houve significativa redução nos níveis de MPO em todas as doses testadas do EHSPFl, com exceção da dose de 31.25 mg/Kg ($p<0.001$). O EHSPFl não preveniu significativamente o aumento dos níveis de MPO na dose de 31.25 mg/Kg, dose que também não apresentou proteção no modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol (**figura 8**). Nas doses de 62.5, 125, 250 e 500 mg/Kg o EHSPFl promoveu reduções nos níveis de MPO em 50.3, 78.1, 91.3 e 91.4% em relação ao grupo tratado com salina, respectivamente ($p<0.001$). Foi observada relação dose-dependente na redução dos níveis de MPO, a mesma relação obtida na avaliação da área de lesão no modelo de úlceras induzidas por etanol (**figura 8**). Os níveis de MPO do grupo que não recebeu tratamento foram mantidos reduzidos (70.1%) em relação ao grupo controle negativo. Houve diferença significativa entre a dose de 31.25 mg/Kg e as doses de 62.5, 125, 250 e 500 mg/Kg ($p<0.001$), e entre a dose de 62.5 mg/Kg ($p<0.01$) e as

doses de 125, 250 e 500 mg/Kg ($p<0.001$). Houve diferença significativa também entre a dose de 31.25 mg/Kg e o branco ($p<0.001$), e entre as doses de 62.5, 250 e 500 mg/Kg ($p<0.01$) e o branco (**figura 10**).

Figura 10. Quantificação dos níveis de mieloperoxidase (MPO) em ratos Wistar machos pré-tratados com EHSPFI submetidos ao modelo de indução de úlceras gástricas por etanol.

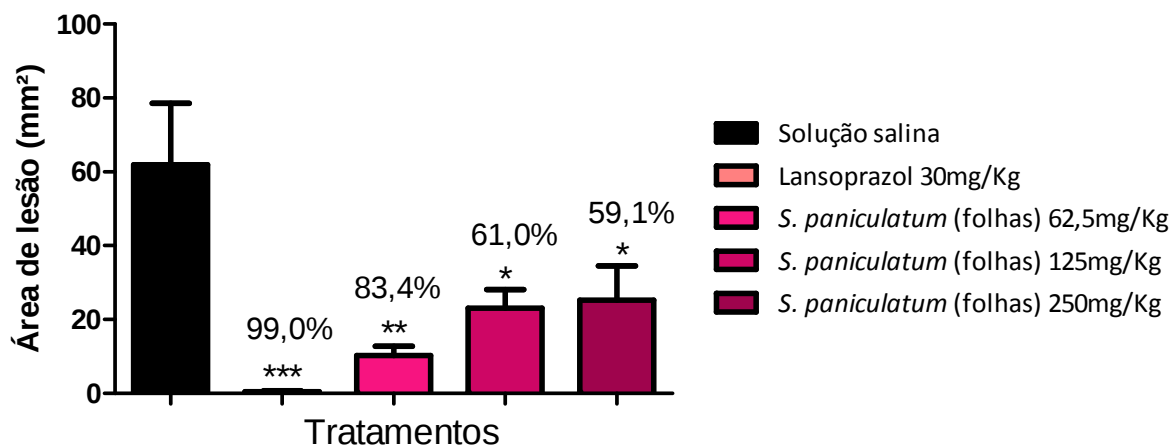


Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($n=7-8$). Os valores em porcentagem indicam a redução nos níveis de MPO em relação ao grupo pré-tratado com veículo (solução salina). Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparação com o controle solução salina e teste de Tukey para comparação entre os grupos, com *** $p<0.001$. ns= diferença não significativa.

3. Avaliação da ação gastroprotetora do extrato frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por indometacina

Neste modelo de indução de úlceras por indometacina, as doses testadas do extrato foram selecionadas a partir dos resultados obtidos no modelo de indução por etanol. Como a menor dose do extrato de 31.25 mg/Kg não apresentou efeito gastroprotetor e a maior dose do extrato (500 mg/Kg) não apresentou diferença significativa com relação a dose de 250 mg/Kg, foram utilizados neste modelo experimental as doses do extrato de 62.5, 125 e 250 mg/Kg. O EHSPFI foi capaz de reduzir significativamente a área lesionada em relação ao grupo tratado com a solução salina nas doses testadas de 62.5 mg/Kg ($p<0.01$), 125 e 250 mg/Kg ($p<0.05$), com redução de 83.4, 61.0 e 59.1%, respectivamente (**figura 11**). O tratamento dos animais com o extrato apresentou um padrão peculiar de curva dose-resposta com maior ação gastroprotetora na menor dose do extrato. O grupo controle positivo lansoprazol apresentou proteção de 99.0% em relação ao grupo tratado com solução salina ($p<0.001$). Não houve diferença significativa entre as doses avaliadas ($p>0.05$).

Figura 11. Avaliação do efeito gastroprotetor do EHSPFI frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por indometacina em ratos Wistar machos.

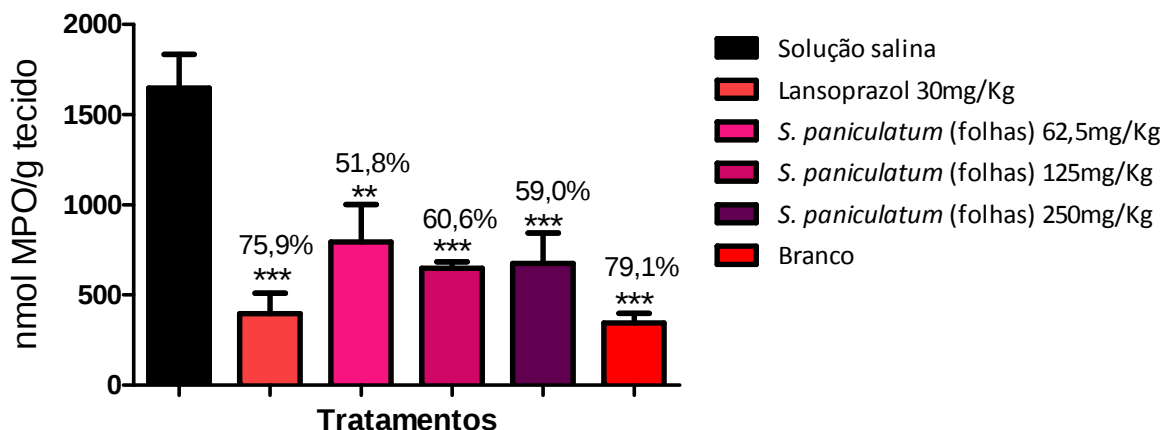


Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (n=7-8). Os valores em porcentagem indicam proteção em relação ao grupo pré-tratado com o veículo (solução salina). Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparação com o controle solução salina e teste de Tukey para comparação entre os grupos, com * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.1 Determinação dos níveis de MPO

O tratamento dos animais com as diferentes doses de EHSPFI foram capazes de reduzir os níveis de MPO em relação ao grupo controle negativo ($p < 0.001$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as doses ou entre cada dose e o grupo branco ($p > 0.05$). Não foi observada relação dose-dependente nos níveis de MPO, assim como na gastroproteção promovida pelo extrato no modelo de indução de úlcera promovida pela indometacina (**figura 11**). A dose do extrato de 125 mg/Kg foi aquela que promoveu a redução mais expressiva nos níveis de MPO (**figura 12**).

Figura 12. Quantificação dos níveis de mieloperoxidase (MPO) em ratos Wistar machos pré-tratados com EHSPFI submetidos ao modelo de indução de úlceras gástricas por indometacina.



Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($n=7-8$). Os valores em porcentagem indicam a redução nos níveis de MPO em relação ao grupo pré-tratado com o veículo (solução salina). Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparação com o controle solução salina e teste de Tukey para comparação entre os grupos, com $**p<0.01$, $***p<0.001$.

4. Avaliação da ação antissecretória do extrato

4.1 Modelo de ligadura do piloro com tratamento oral

O tratamento prévio dos animais com o EHSPFI administrado pela via oral, na menor dose efetiva, não alterou significativamente os parâmetros avaliados (volume do conteúdo gástrico, pH e concentração de íons hidrogênio) em relação ao grupo tratado com solução salina ($p>0.05$). Estes resultados sugerem que a gastroproteção efetuada pelo extrato na dose de 62.5 mg/Kg não ocorre em decorrência da inibição da secreção de ácido gástrico. Os animais tratados com lansoprazol, por via oral, apresentam aumento significativo no pH ($p<0.001$) e redução no volume gástrico ($p<0.01$) e na concentração de H^+ do suco gástrico ($p<0.001$) (**tabela 2**).

Tabela 2. Avaliação da ação antissecretória do EHSPFl administrado por via oral em ratos Wistar machos.

Tratamentos	Volume (mL)	pH	[H ⁺] (mEq/mL)
Solução salina	3.829 ± 0.374	1.377 ± 0.093	8.853 ± 0.437
Lansoprazol (30 mg/Kg)	1.514 ± 0.315**	5.927 ± 0.4588***	3.663 ± 0.311***
EHSPFl (62.5 mg/Kg)	4.300 ± 0.443 ^{ns}	1.285 ± 0.039 ^{ns}	9.893 ± 0.409 ^{ns}

Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=10). Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnet para comparação com o controle solução salina e teste de Tukey para comparação entre os grupos, com ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. ns= diferença não significativa em relação ao controle salina.

4.2 Modelo de ligadura do piloro com tratamento intraduodenal

Com o tratamento por via intraduodenal, o EHSPFl não alterou significativamente os valores de pH e concentração de íons hidrogênio em relação ao grupo tratado com solução salina, mas houve aumento do volume do conteúdo gástrico ($p < 0.01$). Como o extrato não altera o pH e a concentração de H⁺ em relação ao controle solução salina ($p > 0.05$), isto é indicativo de que não há inibição da secreção de ácido gástrico exercida pelo extrato por esta via. Os animais tratados com lansoprazol 30 mg/Kg por via intraduodenal promoveram aumento significativo no pH ($p < 0.001$), redução no volume gástrico ($p < 0.01$) e na concentração de H⁺ gástrico ($p < 0.001$) (tabela 3).

Tabela 3. Avaliação da ação antissecretória do EHSPFl administrado por via intraduodenal em ratos Wistar machos.

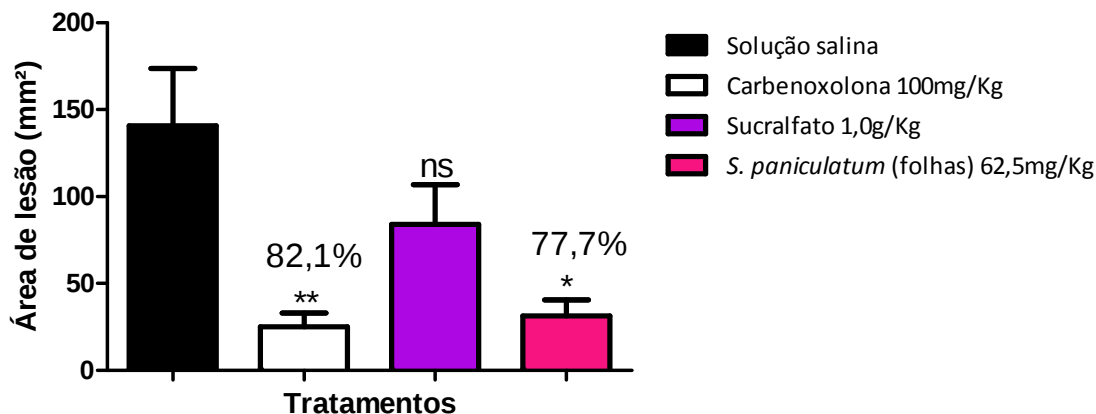
Tratamentos	Volume (mL)	pH	[H ⁺] (mEq/mL)
Solução salina	5.540 ± 0.861	1.442 ± 0.058	8.473 ± 0.473
Lansoprazol (30 mg/Kg)	2.460 ± 0.116**	5.922 ± 0.361***	3.024 ± 0.303***
EHSPFl (62.5 mg/Kg)	8.840 ± 0.433**	1.243 ± 0.024 ^{ns}	8.670 ± 0.280 ^{ns}

Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=10). Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnet para comparação com o controle solução salina e teste de Tukey para comparação entre os grupos, com ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. ns= diferença não significativa em relação ao controle (salina).

5. Avaliação da ação sistêmica do extrato

O EHSPFl administrado por via intraduodenal continuou exercendo ação gastroprotetora (77.7%) no estômago de ratos desafiado pelo etanol absoluto ($p < 0.05$). Este resultado demonstra que o extrato exerce sua ação gastroprotetora por atuação sistêmica e não somente através da formação de uma barreira mecânica sobre a mucosa gástrica. O grupo controle positivo (carbenoxolona) manteve sua proteção com redução da área de lesão (82.1%) quando comparado ao grupo controle negativo tratado com o veículo ($p < 0.01$). O grupo de animais tratado com sucralfato, que geralmente protege a mucosa gástrica quando administrado oralmente por formar uma barreira protetora na mucosa gástrica, como esperado, não apresentou efeito gastroprotetor quando administrado pela via intraduodenal ($p > 0.05$) (**figura 13**).

Figura 13. Avaliação do efeito gastroprotetor do EHSPFl (via intraduodenal) frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos Wistar machos.

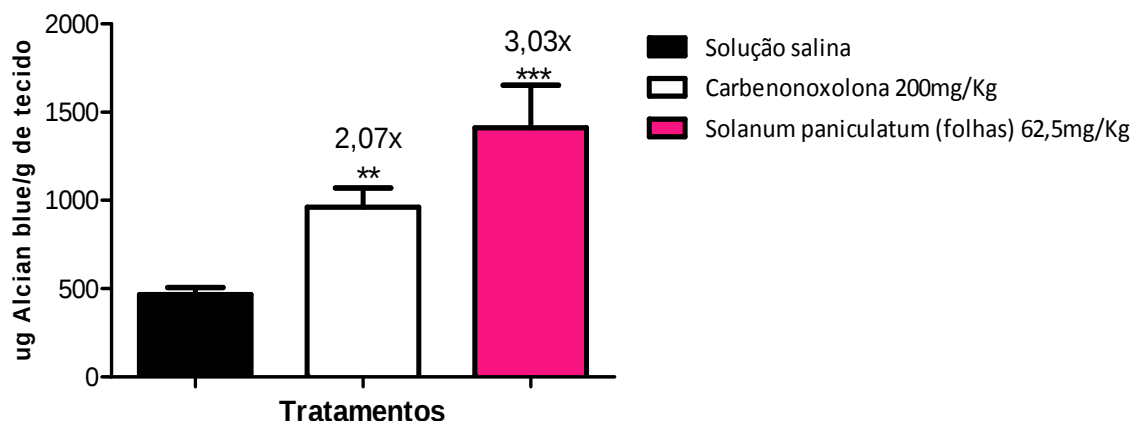


Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($n=7-8$). Os valores em porcentagem indicam proteção em relação ao grupo pré-tratado com solução salina. Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparação com o controle solução salina e teste de Tukey para comparação entre os grupos, com $*p<0.05$, $**p<0.01$. ns= diferença não significativa.

6. Avaliação da participação do muco gástrico através do pré-tratamento oral ou intraduodenal do extrato

O EHSPFl (62.5 mg/Kg) administrado por via oral foi capaz de elevar significativamente a quantidade de muco gástrico no modelo de ligadura do piloro. O extrato foi capaz de aumentar em aproximadamente três vezes a quantidade de muco em comparação ao grupo tratado com o veículo ($p<0.001$). O grupo controle positivo tratado com carbenoxolona (200 mg/Kg) aumentou em cerca de duas vezes a produção de muco em relação ao grupo controle negativo ($p<0.01$) (figura 14).

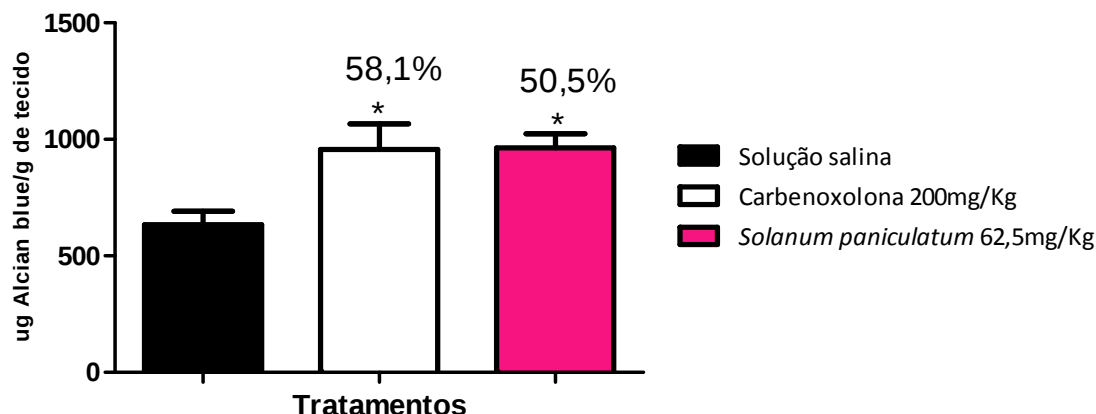
Figura 14. Avaliação da participação do muco gástrico na gastroproteção efetuada pelo EHSPFl (administrado pela via oral) frente ao modelo de ligadura do piloro em ratos Wistar machos.



Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (n=8-10). Os números em vezes (x) indicam o aumento na produção de muco em relação ao grupo tratado com solução salina. Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparação com o grupo controle negativo, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Quando administrado por via intraduodenal, o extrato também aumentou significativamente a produção de muco (50.5%, $p < 0.05$), assim como o grupo controle carbenoxolona que aumentou em 58.1% em relação ao grupo controle negativo ($p < 0.05$), indicando o efeito sistêmico do extrato (**figura 15**). Portanto, um dos mecanismos gastroprotetores exercidos pelo extrato é o aumento na produção de muco.

Figura 15. Avaliação da participação do muco gástrico na gastroproteção efetuada pelo EHSPFl (administrado por via intraduodenal) frente ao modelo de ligadura do piloro em ratos Wistar machos.

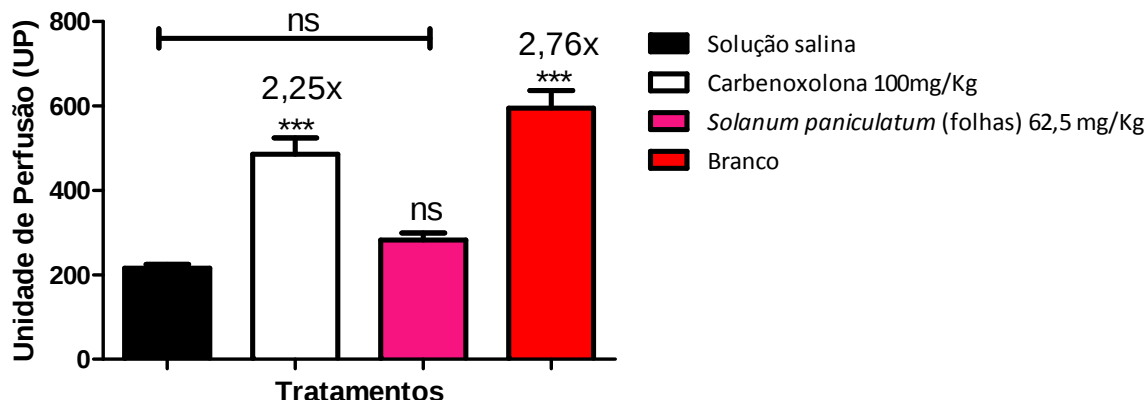


Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($n=8-10$). Os valores em porcentagem indicam o aumento na produção de muco em relação ao grupo pré-tratado com veículo (solução salina). Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparação com o grupo controle negativo, $*p<0.05$.

7. Avaliação do fluxo sanguíneo gástrico

O EHSPFl na dose de 62.5 mg/Kg não aumentou significativamente o fluxo sanguíneo gástrico no modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em relação ao grupo que não recebeu tratamento (branco) e ao grupo controle negativo ($p>0.05$), comprovando que o extrato não é capaz de restabelecer o fluxo sanguíneo após a administração do agente lesivo. O grupo tratado com carbenoxolona aumentou o fluxo sanguíneo em 2,25 vezes comparado com o controle negativo ($p<0.001$). O grupo branco manteve o fluxo sanguíneo em 2,76 vezes maior que o grupo controle salina ($p<0.001$) (**figura 16**).

Figura 16. Avaliação do fluxo sanguíneo gástrico em ratos Wistar machos pré-tratados com EHSPFl frente ao modelo úlceras gástricas induzidas por etanol.

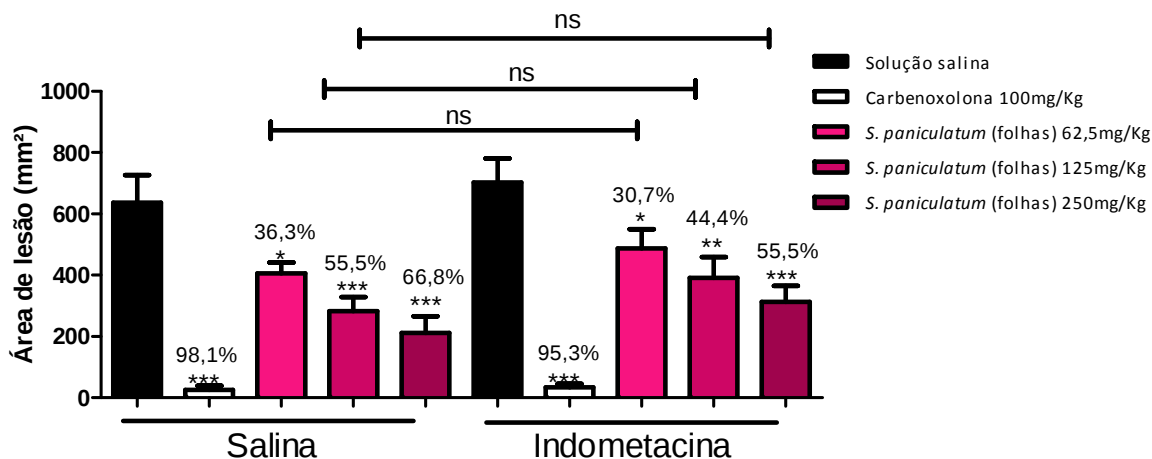


Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (n=10). Os números em vezes (x) indicam o aumento do fluxo sanguíneo em relação ao grupo pré-tratado com solução salina. ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparação com o controle solução salina e teste de Tukey para comparação entre os grupos, com *** $p < 0.001$. ns= diferença não significativa.

8. Avaliação da participação de PGE_2

Avaliou-se a participação da prostaglandina (PGE_2) na gastroproteção efetuada pelo EHSPFl através da atuação de dois agentes indutores de lesão (etanol e indometacina). A suposta gastroproteção exercida pelo extrato via PGE_2 no modelo de etanol poderia ser abolida com a prévia administração de indometacina. Porém, apesar da inibição da produção de PGE_2 , os grupos pré-tratados com indometacina e tratados com EHSPFl nas doses de 62.5, 125 e 250 mg/Kg continuaram exercendo proteção da mucosa gástrica com redução na área de lesão de 30.7% ($p < 0.05$), 44.4% ($p < 0.01$) e 55.5% ($p < 0.001$) em relação ao controle tratado com solução salina e pré-tratado com indometacina. O grupo carbenoxolona 100 manteve a gastroproteção, com redução na área lesionada de 95.3% em relação ao controle ($p < 0.001$) (**figura 17**). Portanto, estes resultados descartam definitivamente a participação de PGE_2 na gastroproteção exercida pelo extrato.

Figura 17. Avaliação da participação de prostaglandinas (PGE₂) na gastroproteção efetuada pelo EHSPFl frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos Wistar machos pré-tratados com indometacina.

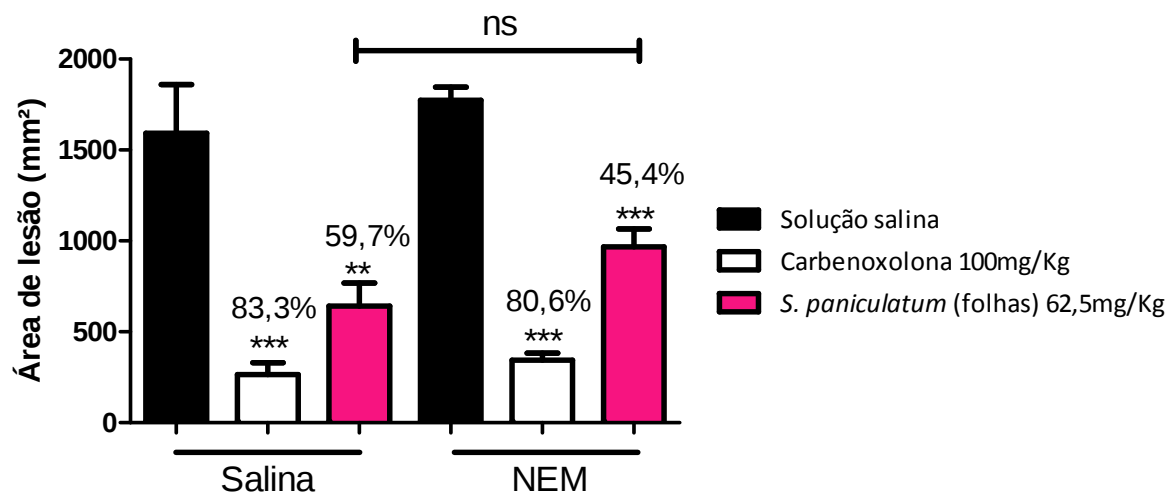


Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (n=7-8). Os valores em porcentagem indicam proteção em relação ao grupo pré-tratado com solução salina. Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparação com o controle solução salina e teste de Tukey para comparação entre os grupos, com * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. ns= diferença não significativa.

9. Avaliação da participação dos compostos sulfidrílicos

Observou-se que os animais pré-tratados com solução salina e tratados com EHSPFl na dose de 62.5 mg/Kg mantiveram proteção significativa (59.7% em relação ao controle negativo, $p < 0.01$), observada nos modelos de triagem. Quando estes foram pré-tratados com NEM, inibidor endógeno de grupamentos sulfidrílicos, o EHSPFl manteve a gastroproteção, com redução de 45.4% na área lesionada em relação ao grupo tratado com veículo ($p < 0.001$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os respectivos grupos pré-tratado com solução salina. O grupo controle positivo (carbenoxolona) manteve sua proteção quando pré-tratado com NEM, com gastroproteção de 80.6% ($p < 0.01$). Com estes resultados é possível descartar a participação dos compostos sulfidrílicos na gastroproteção efetuada pelo extrato (**figura 18**).

Figura 18. Avaliação da participação dos compostos sulfidríla na gastroproteção efetuada pelo EHSPFl frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos Wistar machos pré-tratados com NEM.

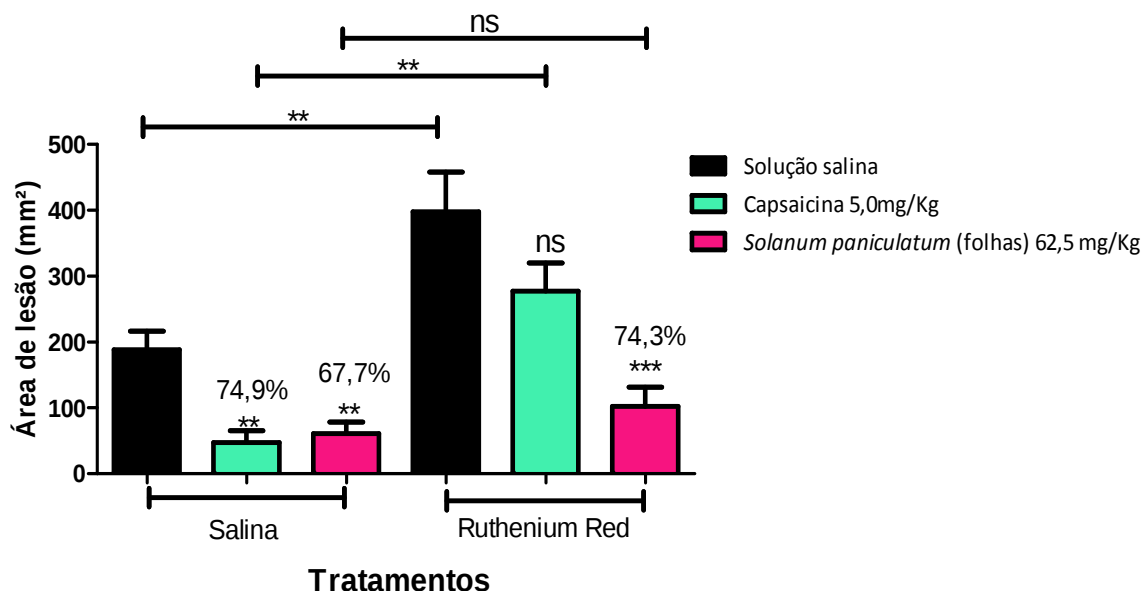


Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($n=7-8$). Os valores em porcentagem indicam proteção em relação ao grupo pré-tratado com solução salina. Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparação com o controle solução salina e teste de Tukey para comparação entre os grupos, com $**p<0.01$, $***p<0.001$. ns= diferença não significativa.

10. Avaliação da participação dos receptores TRPV1 sensíveis à capsaicina

Os animais que receberam EHSPFl apresentaram significativa gastroproteção (67.7%) em relação ao controle negativo quando pré-tratados com solução salina ($p<0.01$). O grupo controle positivo (capsaicina 5.0 mg/Kg) exerceu proteção de 74.9% em relação ao grupo salina ($p<0.01$), mas perdeu sua proteção quando os animais foram pré-tratados com o *Ruthenium red*, inibidor de receptores TRPV1 ($p<0.01$). O EHSPFl continuou protegendo a mucosa gástrica da ação do etanol, mesmo com o pré-tratamento com *Ruthenium red* ($p<0.001$), indicando que não há envolvimento dos receptores TRPV1 na gastroproteção efetuada pelo extrato (**figura 19**).

Figura 19. Avaliação da participação dos receptores TRPV1 na gastroproteção efetuada pelo EHSPFl frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos Wistar machos pré-tratados com *Ruthenium red*.

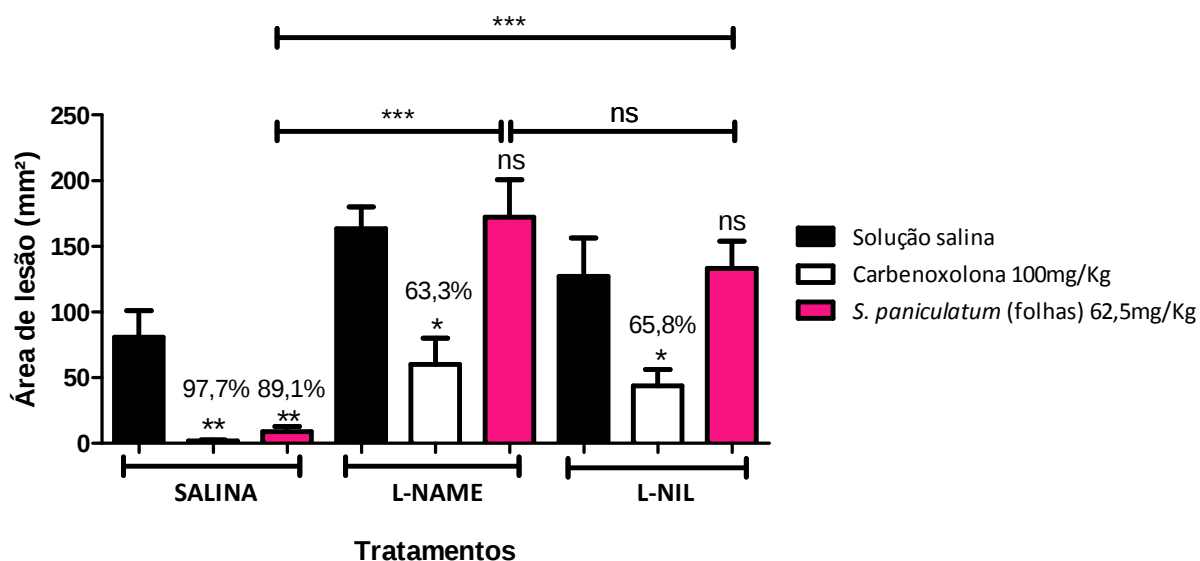


11. Avaliação da participação do NO

O grupo pré-tratado com solução salina e tratado com o EHSPFl na dose de 62.5 mg/Kg manteve a gastroproteção observada nos modelos anteriores, com redução na área de lesão de 89.1% em relação ao controle solução salina ($p < 0.01$). Os animais pré-tratados com L-NAME, inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), e tratados com EHSPFl perderam expressivamente a gastroproteção em relação ao grupo pré-tratado com L-NAME e tratado com solução salina ($p > 0.05$). Os animais pré-tratados com L-NAME e tratados com o extrato apresentou diferença significativa em relação ao grupo pré-tratado com solução salina e tratado com o extrato ($p < 0.001$). Estes resultados são indicativos da participação do NO na proteção da mucosa gástrica exercida pelo extrato (**figura 20**). Quando os animais foram pré-tratados com inibidor seletivo de iNOS (L-NIL), o grupo tratado com EHSPFl também perdeu significativamente a proteção em relação ao grupo que recebeu solução salina ($p > 0.05$). O grupo pré-tratado com solução salina e tratado com o extrato diferiu estatisticamente do grupo pré-tratado com L-NIL e tratado com o extrato ($p < 0.001$). No entanto, não houve diferença estatística

significativa entre os grupos pré-tratados com L-NAME e L-NIL e tratados com EHSPFl ($p>0.05$), indicando que o extrato tem grande participação no aumento na produção de NO através da ativação da enzima iNOS. O controle carbenoxolona 100 mg/Kg continuou protegendo quando os animais foram pré-tratados com L-NAME (63.3%, $p<0.05$) e L-NIL (65.8%, $p<0.05$) (**figura 20**).

Figura 20. Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) e papel da NOS e iNOS na gastroproteção efetuada pelo EHSPFl frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos Wistar machos pré-tratados com L-NAME ou L-NIL.

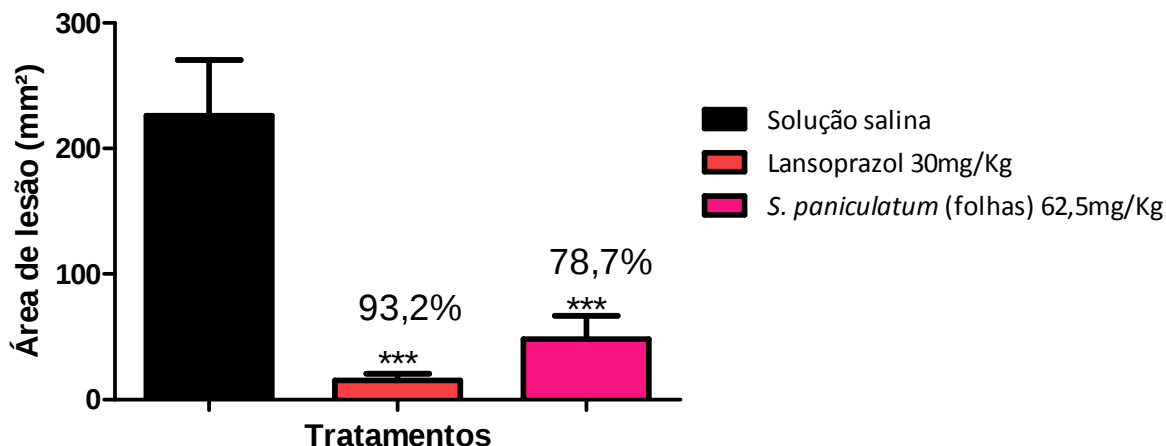


Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($n=7-8$). Os valores em porcentagem indicam proteção em relação ao grupo pré-tratado com solução salina. Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparação com o controle solução salina e teste de Tukey para comparação entre os grupos, com $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$.

12. Avaliação da ação gastroprotetora do extrato frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por isquemia e reperusão

Neste modelo, observou-se que o EHSPFl foi efetivo em proteger a mucosa gástrica do processo isquêmico reduzindo significativamente a área lesada em 78.7% em relação ao grupo tratado com o veículo ($p<0.001$). O grupo de animais tratados com lansoprazol (30 mg/Kg) reduziu em 93.2% as lesões gástricas quando comparado aos animais tratados com veículo ($p<0.001$) (**figura 21**). Neste modelo experimental, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados com lansoprazol e o extrato ($p>0.05$).

Figura 21. Avaliação do efeito gastroprotetor do EHSPFI frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por isquemia e reperfusão em ratos Wistar machos.

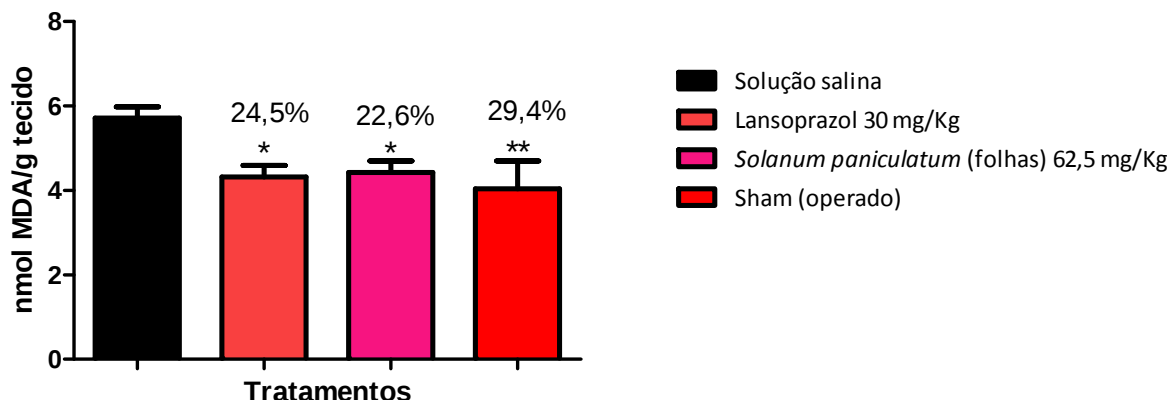


Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($n=8-10$). Os valores em porcentagem indicam proteção em relação ao grupo pré-tratado com o veículo (solução salina). Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparação com o controle solução salina e teste de Tukey para comparação entre os grupos, com *** $p<0.001$.

12.1 Determinação dos níveis de LPO

No modelo preventivo de úlceras gástricas induzidas por isquemia e reperfusão, o EHSPFI reduziu a peroxidação lipídica provocado pelas lesões ulcerativas de forma significativa, com 22.6% de redução em relação ao grupo controle negativo tratado com salina ($p<0.05$). O grupo controle positivo (lansoprazol 30 mg/Kg) também reduziu os níveis de LPO, com média de 24.5% em relação ao controle negativo, e o sham (operado porém sem sofrer o procedimento de isquemia e reperfusão) manteve os níveis de LPO 29.4% menor que o controle negativo ($p<0.05$) (**figura 22**). O extrato não teve diferença significativa do controle positivo e do grupo sham ($p>0.05$), indicativo de que o EHSPFI atua reduzindo a LPO no modelo preventivo.

Figura 22. Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica (LPO) em ratos Wistar machos pré-tratados com EHSPFI submetidos ao modelo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão.

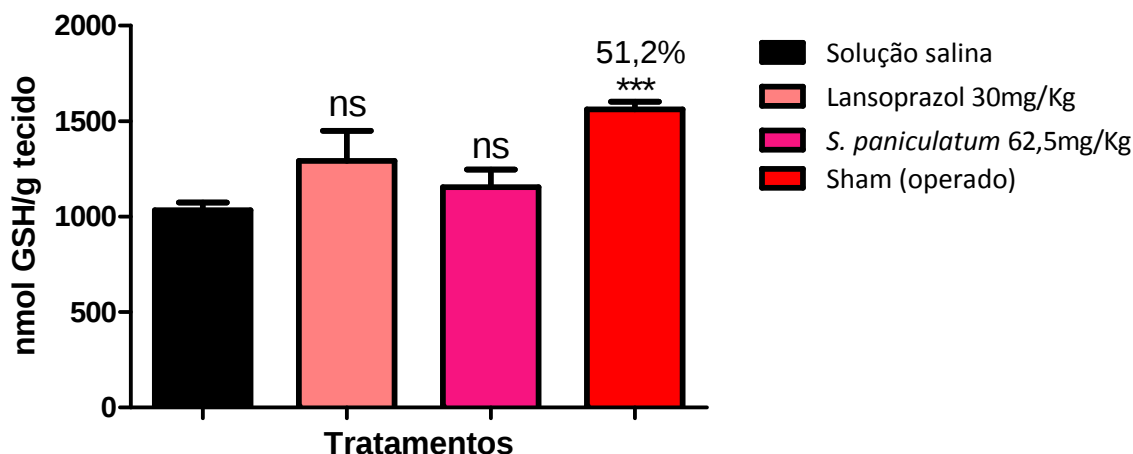


Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($n=8-10$). Os números em porcentagem indicam prevenção de LPO. Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparação com o controle solução salina e teste de Tukey para comparação entre os grupos, com $*p<0.05$, $**p<0.01$.

12.2 Determinação dos níveis de GSH

No modelo preventivo de úlceras gástricas induzidas por isquemia e reperfusão, foi observado que os níveis de glutathione do EHSPFI na dose de 62.5 mg/Kg não diferiram estatisticamente do grupo controle negativo ($p>0.05$). Não houve diferença estatística entre o grupo tratado com lansoprazol e o grupo controle negativo ($p>0.05$). O grupo Sham (operado sem sofre o procedimento de isquemia e reperfusão) manteve os níveis de GSH em 51.2%, comparado ao grupo tratado com solução salina ($p<0.001$). Não houve diferença significativa entre o EHSPFI na dose testada e o Sham ($p>0.05$) (**figura 23**). Os resultados de avaliação dos níveis de GSH nos modelos agudos de indução de úlceras gástricas por etanol (**figura 9**) e por isquemia e reperfusão indicam que o extrato não atua via glutathione na gastroproteção efetuada pelo extrato e por isso as dosagens de GSH não foram realizadas nos outros modelos experimentais.

Figura 23. Quantificação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) em ratos Wistar machos pré-tratados com EHSPFl submetidos ao modelo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão.

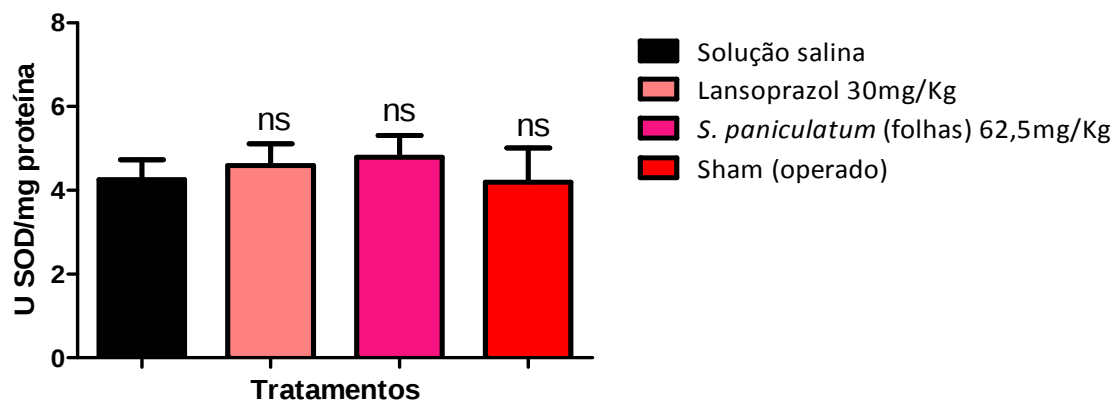


Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($n=8-10$). Os valores em porcentagem indicam níveis de GSH que não sofreram depleção em relação ao grupo tratado com o veículo (solução salina) submetido ao processo de Isquemia e reperfusão. Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparação com o controle solução salina e teste de Tukey para comparação entre os grupos, com *** $p<0.001$. ns= diferença não significativa.

12.3 Determinação dos níveis de SOD

Os níveis de SOD no tecido gástrico de animais pré-tratados com o EHSPFl no modelo preventivo de úlceras gástricas induzidas por isquemia e reperfusão se mantiveram próximos aos do grupo controle negativo e do grupo Sham (que não sofreu o processo de isquemia e reperfusão) não variando estatisticamente entre eles ($p>0.05$). Não houve diferença significativa entre o controle negativo e os grupos lansoprazol 30 mg/Kg e Sham ($p>0.05$) (**figura 24**).

Figura 24. Quantificação dos níveis de superóxido dismutase (SOD) em ratos Wistar machos pré-tratados com EHSPFI submetidos ao modelo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão.

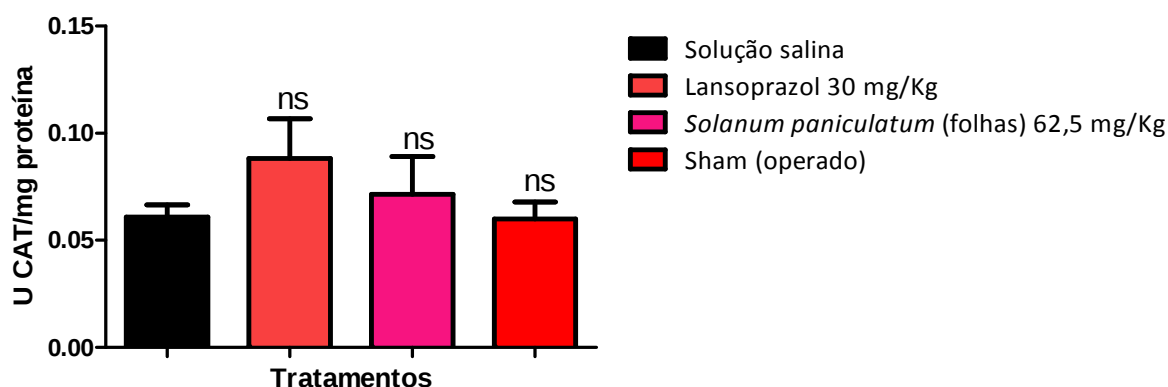


Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (n=8-10). Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparação com o controle solução salina e teste de Tukey para comparação entre os grupos, com $*p < 0.05$. ns= diferença não significativa.

12.4 Determinação dos níveis de CAT

Os níveis de CAT em amostras do tecido gástrico de animais pré-tratados com o EHSPFI no modelo de úlceras gástricas induzidas por isquemia e reperfusão se mantiveram próximos ao controle solução salina e do grupo Sham, não variando estatisticamente ($p > 0.05$). Não houve diferença significativa entre o controle negativo e os grupos lansoprazol 30mg/Kg e Sham ($p > 0.05$) (figura 25).

Figura 25. Quantificação dos níveis de catalase (CAT) em ratos Wistar machos pré-tratados com EHSPFI submetidos ao modelo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão.



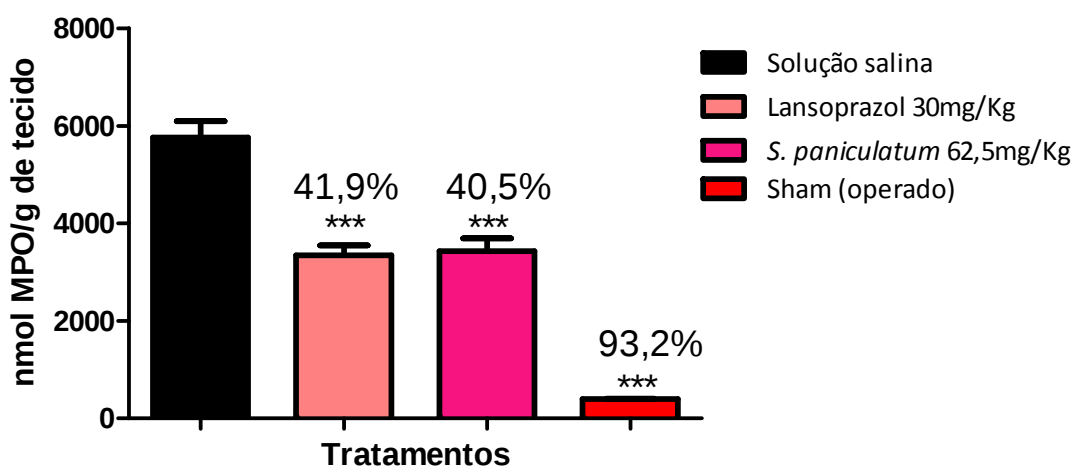
Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (n=8-10). Análise estatística: ANOVA seguido do teste de

Dunnett para comparação com o controle solução salina e teste de Tukey para comparação entre os grupos, com $*p<0.05$. ns= diferença não significativa.

12.5 Determinação dos níveis de MPO

No modelo preventivo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão, o extrato foi capaz de reduzir os níveis de MPO (40.5%) quando comparado ao grupo controle negativo tratado com salina ($p<0.001$). O grupo controle positivo (lansoprazol 30 mg/Kg) reduziu os níveis de MPO em 41.9% quando comparados ao grupo controle negativo ($p<0.001$). Os níveis de MPO do grupo Sham operado (grupo que não sofreu o processo de isquemia e reperfusão) foram 93.2% menores do que o grupo controle negativo (**figura 26**). Houve diferença estatística entre o grupo Sham operado e o tratado com o extrato ($p<0.05$).

Figura 26. Quantificação dos níveis de mieloperoxidase (MPO) em ratos Wistar machos pré-tratados com EHSPFI e submetidos ao modelo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão.

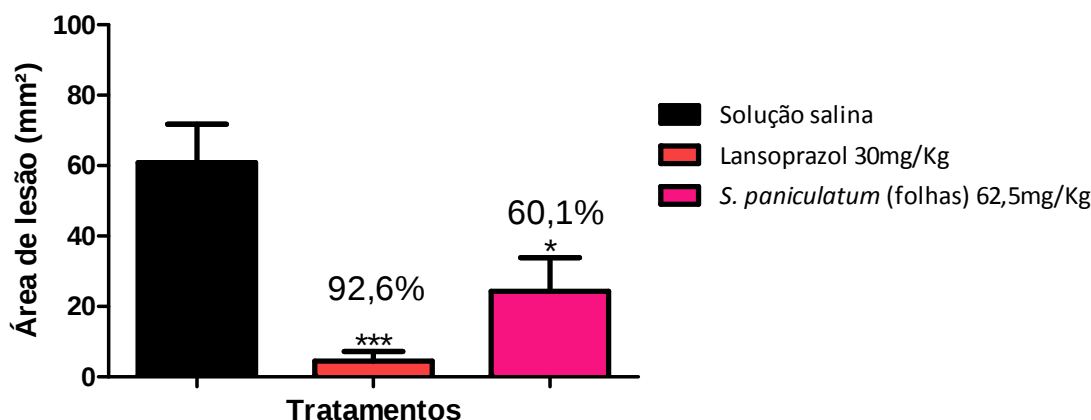


Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($n=8-10$). Os valores em porcentagem indicam prevenção no aumento nos níveis de MPO em relação ao grupo tratado com o veículo (solução salina). Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparação com o controle solução salina e teste de Tukey para comparação entre os grupos, com $***p<0.001$.

13. Avaliação da ação curativa do extrato frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por isquemia e reperfusão

Tanto o tratamento preventivo quanto curativo com o EHSPFI foi capaz de reduzir as lesões gástricas induzidas por isquemia e reperfusão. O extrato reduziu em 60.1% a área lesionada em relação ao grupo tratado com o veículo ($p<0.05$) e o lansoprazol foi capaz de reduzir em 92.6% o processo isquêmico em comparação ao grupo tratado somente com o veículo ($p<0.001$) (**figura 27**).

Figura 27. Avaliação do efeito curativo do EHSPFl tratados por 6 dias frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por isquemia e reperfusão em ratos Wistar machos.

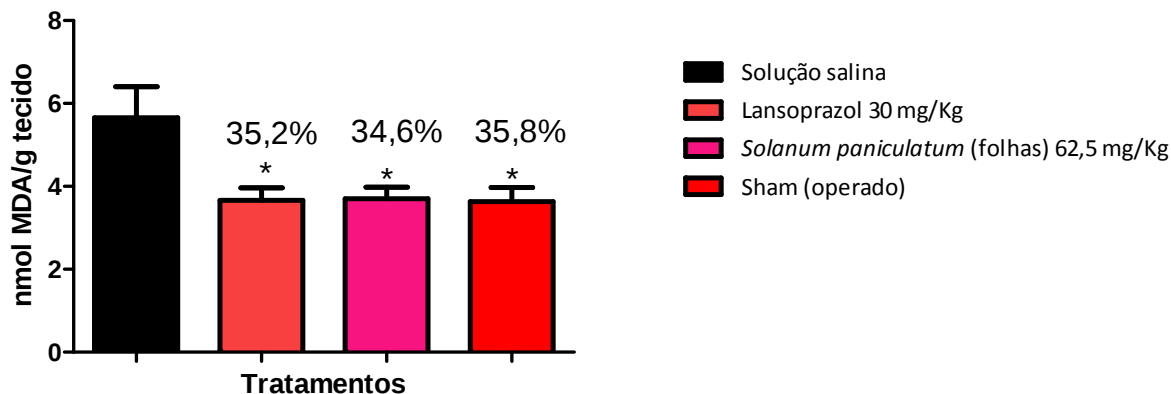


Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($n=8-10$). Os valores em porcentagem indicam proteção em relação ao grupo tratado com veículo (solução salina). Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparação com o controle solução salina e teste de Tukey para comparação entre os grupos, com $*p<0.05$, $***p<0.001$.

13.1 Determinação dos níveis de LPO

Os níveis de LPO foram reduzidos com a administração do extrato, no modelo curativo de úlceras induzidas por isquemia e reperfusão, em 34.6% em relação ao grupo tratado com solução salina. O grupo controle positivo (lansoprazol 30 mg/Kg) reduziu em 35.2%, e o grupo Sham (operado mas não submetido ao processo de isquemia e reperfusão) reduziu em 35.8% os níveis de LPO quando comparado ao grupo controle negativo ($p<0.05$) (**figura 28**). O extrato não apresentou diferença significativa do controle positivo e do grupo Sham ($p>0.05$), indicativo que o EHSPFl atua reduzindo a LPO no modelo curativo.

Figura 28. Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica (LPO) em ratos Wistar machos tratados com EHSPFl após submetidos ao modelo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperusão.

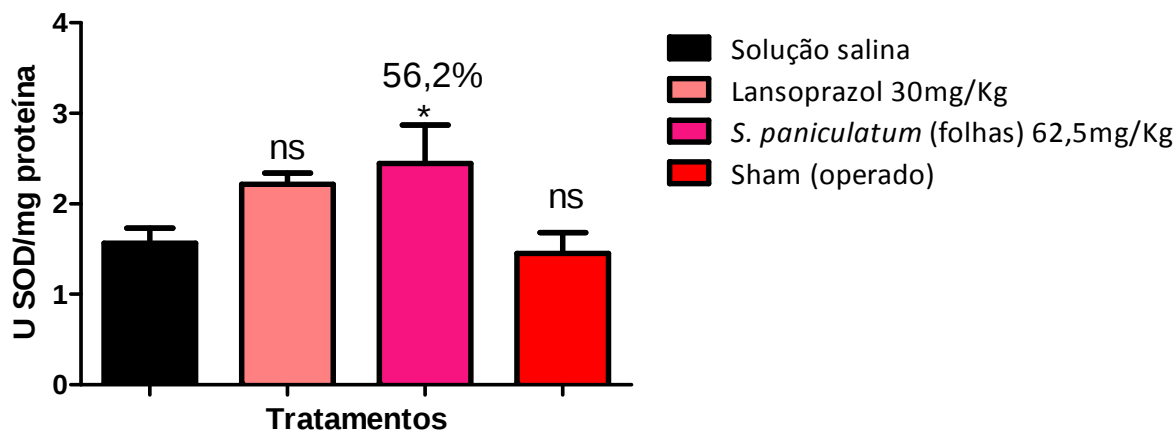


Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($n=8-10$). Os valores em porcentagem indicam redução de LPO. Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparação com o controle solução salina e teste de Tukey para comparação entre os grupos, com $*p<0.05$.

13.2 Determinação dos níveis de SOD

No modelo curativo de isquemia e reperusão, o extrato aumentou significativamente os níveis de SOD em 56.2% em relação ao controle tratado com solução salina ($p<0.05$). Não houve diferença significativa entre o grupo controle negativo e o grupo controle positivo (lansoprazol 30 mg/Kg) ou o grupo Sham ($p>0.05$) (**figura 29**). A ausência de diferença estatística nos níveis de SOD entre o controle negativo e o grupo Sham pode ser indicativo do estresse oxidativo gerado pela cirurgia e exposição do estômago dos animais do grupo Sham.

Figura 29. Avaliação dos níveis de superóxido dismutase (SOD) em ratos Wistar machos tratados com EHSPFl após serem submetidos ao modelo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão.

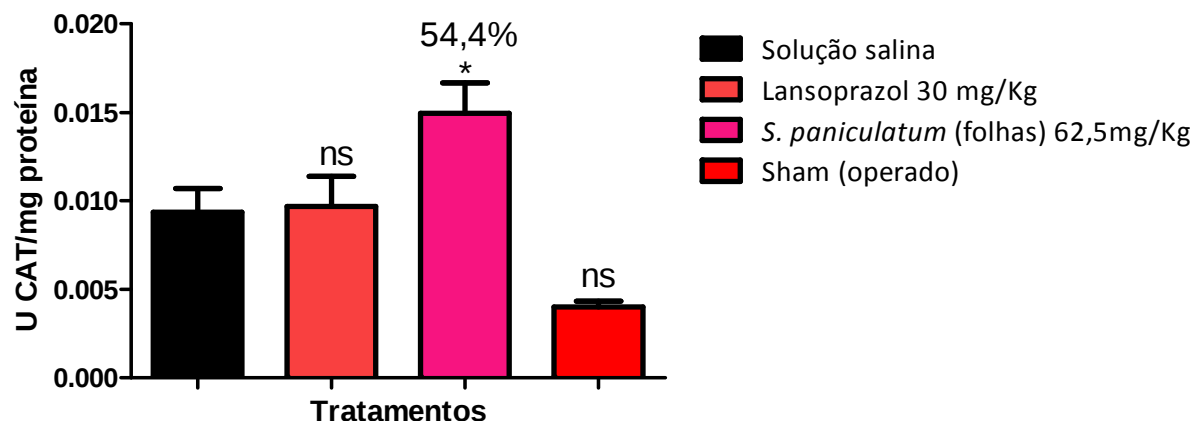


Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (n=8-10). Os valores em porcentagem indicam aumento nos níveis de SOD em relação ao grupo tratado com a solução salina (controle negativo). Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparação com o controle solução salina e teste de Tukey para comparação entre os grupos, com $*p < 0.05$. ns= diferença não significativa.

13.3 Determinação dos níveis de CAT

No modelo curativo de isquemia e reperfusão o extrato aumentou significativamente os níveis de CAT em 54.4% em relação ao controle tratado com solução salina ($p < 0.05$). Não houve diferença significativa entre o grupo controle negativo e o grupo controle positivo ou Sham ($p > 0.05$). O grupo tratado com o EHSPFl e o grupo Sham apresentaram diferença estatística ($p < 0.001$) (**figura 30**). A ausência de diferença estatística nos níveis de CAT entre o controle negativo e o grupo Sham operado pode ser devido ao estresse oxidativo gerado pela cirurgia e exposição do estômago dos animais.

Figura 30. Avaliação dos níveis de catalase (CAT) em ratos Wistar machos tratados com EHSPFl após submissão ao modelo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão.

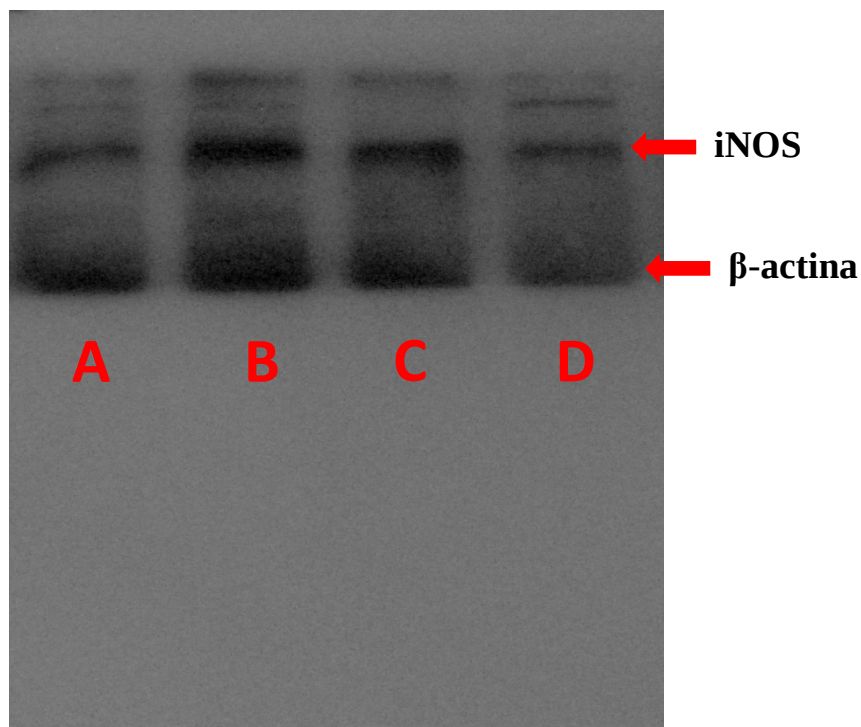


Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (n=8-10). O valor em porcentagem indica aumento nos níveis de CAT em relação ao grupo controle negativo tratado com veículo (solução salina). Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparação com o controle solução salina e teste de Tukey para comparação entre os grupos, com $*p < 0.05$. ns= diferença não significativa.

13.4 Expressão enzimática de iNOS por Western Blot

Após a comprovação da participação de NO na ação do EHSPFl (**figura 20**) foi avaliada a expressão da enzima iNOS após o tratamento com o extrato por 6 dias consecutivos no modelo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão. O grupo de animais tratados com o extrato na dose de 62.5 mg/Kg apresentou banda mais escura (**figura 31C**), comparada aos grupos tratado com veículo (**figura 31A**) e ao grupo Sham (**figura 31D**). Portanto, este resultado confirmam que o extrato promove aumento da produção de NO pela estimulação da expressão do iNOS. O grupo controle lansoprazol também é capaz de promover aumento da expressão da enzima em relação ao controle negativo (**figura 31B**).

Figura 31. Expressão enzimática da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) avaliada por *Western Blot* em ratos Wistar machos tratados por 6 dias com o EHSPFl após indução de lesões gástricas por isquemia e reperfusão.

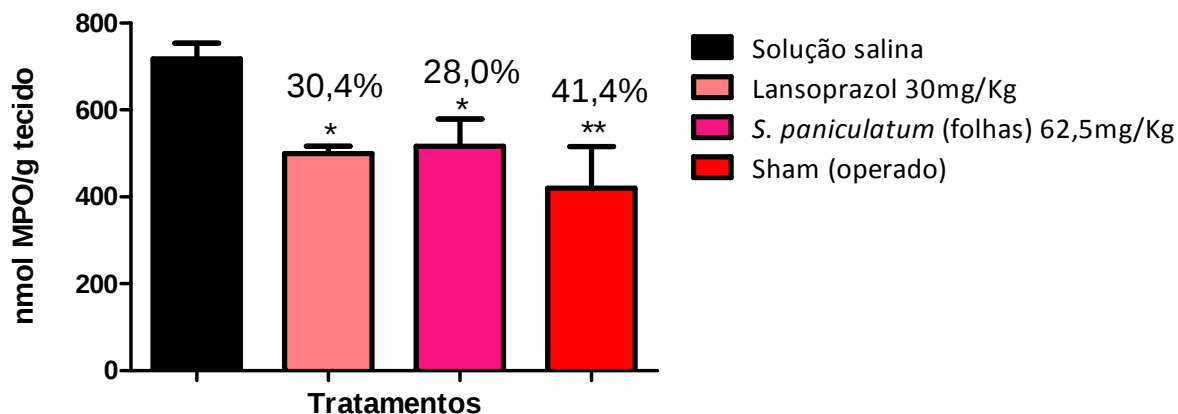


Nota-se que as bandas relativas aos grupos que receberam lansoprazol 30 mg/Kg (**B**) e EHSPFl 62.5 mg/Kg (**C**) estão mais escuras do que a banda do grupo controle tratado com solução salina (**A**) e sham operado (**D**), indicando aumento na expressão da enzima. A proteína padrão utilizada foi a β -actina.

13.5 Determinação dos níveis de MPO

No modelo curativo, o EHSPFl reduziu os níveis de MPO em 28.0% em relação ao controle solução salina, enquanto o lansoprazol 30 mg/Kg diminuiu em 30.4%. Os níveis de MPO do grupo sham foram mantidos 41.4% menor que o grupo salina ($p < 0.05$) (**figura 32**). Não houve diferença significativa entre os grupos sham e o extrato ($p > 0.05$).

Figura 32. Avaliação dos níveis de mieloperoxidase (MPO) em ratos Wistar machos tratados com EHSPFl após submissão no modelo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão.



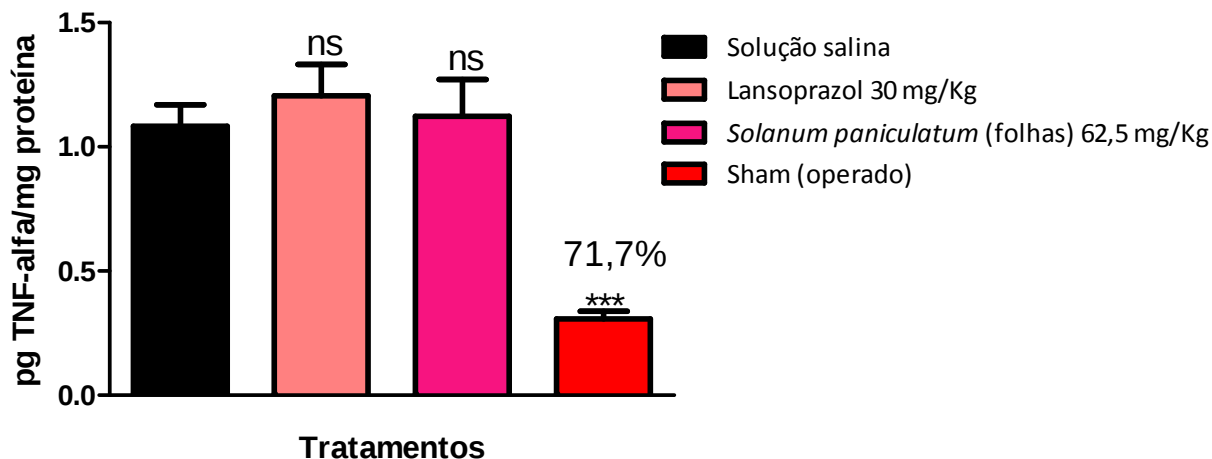
Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (n=8-10). Os valores em porcentagem indicam redução nos níveis de MPO em relação ao grupo tratado com veículo (solução salina). Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparação com o controle solução salina e teste de Tukey para comparação entre os grupos, com * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

13.6 Determinação dos níveis de citocinas

a. Determinação dos níveis de TNF- α

O tratamento dos animais com o EHSPFl durante 6 dias não foi capaz de reduzir significativamente os níveis de TNF- α da mucosa gástrica, da mesma forma que os animais tratados com lansoprazol ($p>0.05$). Houve diferença significativa nos níveis de TNF- α entre o grupo tratado com o extrato e o grupo sham ($p<0.001$), que manteve os níveis 71.7% menores que o grupo controle negativo (**figura 33**).

Figura 33. Avaliação dos níveis de TNF- α em ratos Wistar machos tratados com EHSPFl e submetidos ao modelo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão.

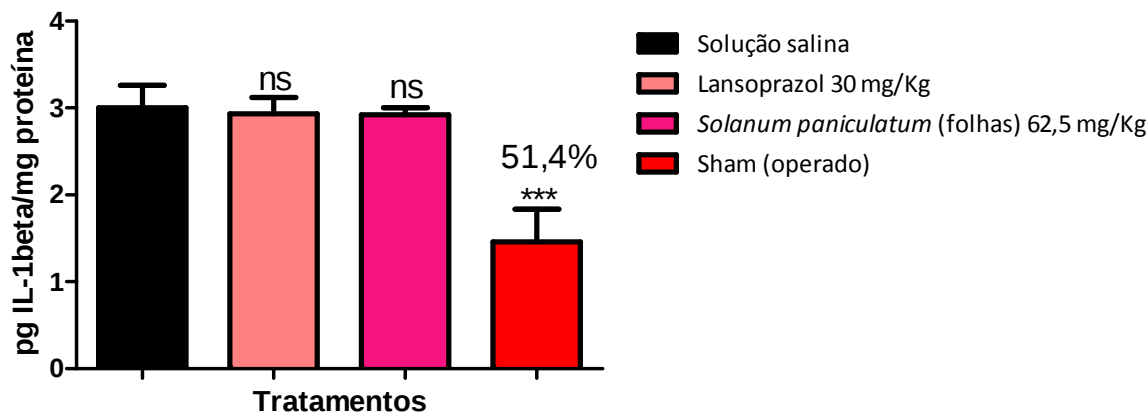


Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (n=8-10). O número em porcentagem indica que o grupo manteve os níveis de em relação ao grupo tratado com solução salina. Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparação com o controle solução salina e teste de Tukey para comparação entre os grupos, com *** $p < 0.001$. ns= diferença não significativa.

b. Determinação dos níveis de IL-1 β

De forma semelhante ao TNF, o tratamento dos animais com o EHSPFl durante 6 dias não foi capaz de reduzir significativamente os níveis de IL-1 β da mucosa gástrica, da mesma forma que os animais tratados com lansoprazol ($p > 0.05$). O grupo de animais tratados com extrato e o grupo Sham diferiram significativamente ($p < 0.001$) com relação aos níveis desta interleucina com redução expressiva nos animais do grupo Sham (**figura 34**).

Figura 34. Avaliação dos níveis de IL-1 β em ratos Wistar machos tratados com EHSPFI após submissão ao modelo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão.

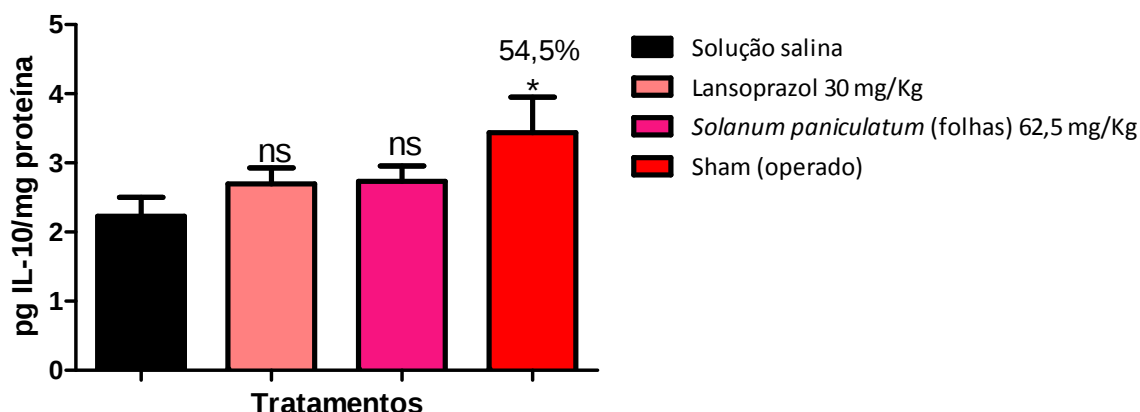


Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (n=8-10). O valor em porcentagem indica que o grupo manteve os níveis de em relação ao grupo tratado com solução salina. Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparação com o controle solução salina e teste de Tukey para comparação entre os grupos, com *** $p < 0.001$. ns= diferença não significativa.

c. Determinação dos níveis de IL-10

Os níveis de IL-10 não foram significativamente aumentados com o tratamento do EHSPFI em relação ao grupo controle negativo ($p > 0.05$). O grupo Sham manteve níveis elevados de IL-10 (54.5%) quando comparado ao grupo controle negativo ($p < 0.05$). Não houve diferença significativa entre o grupo tratado com o extrato e o grupo sham ($p > 0.05$) (**figura 35**).

Figura 35. Avaliação dos níveis de IL-10 em ratos Wistar machos tratados com EHSPFI após submissão ao modelo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão.



Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (n=8-10). O valor em porcentagem indica que o grupo manteve os níveis de em relação ao grupo controle negativo. Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett para

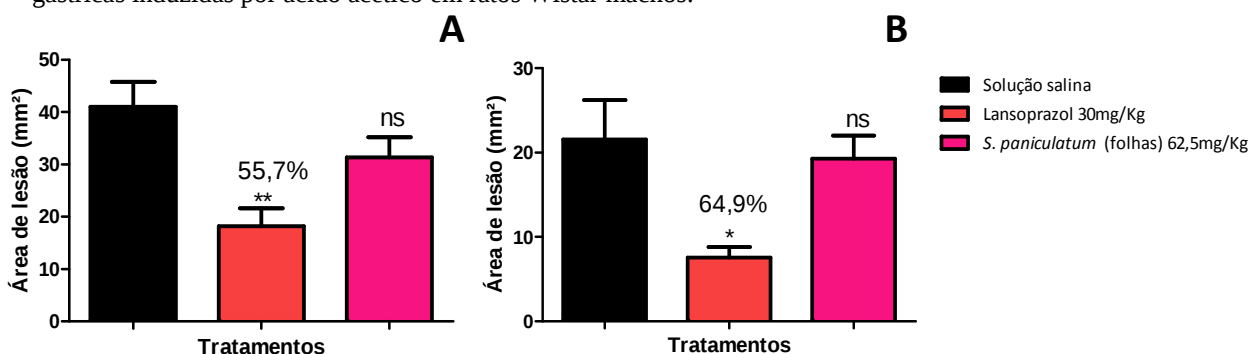
comparação com o controle solução salina e teste de Tukey para comparação entre os grupos, com $**p<0.01$. ns= diferença não significativa.

14 Caracterização da atividade cicatrizante gástrica do extrato

14.1 Modelo de indução de úlcera gástrica por ácido acético

Os grupos tratados com o EHSPFl por 7 ou 14 dias não apresentaram reduções significativas nas áreas de lesão gástrica em relação ao grupo controle negativo ($p>0.05$) (**figura 36**), mas foi possível observar redução na hiperemia gástrica com administração do extrato por 14 dias (**figura 37**).

Figura 36. Avaliação da atividade cicatrizante gástrica do EHSPFl durante 7 (A) ou 14 dias (B) frente às úlceras gástricas induzidas por ácido acético em ratos Wistar machos.



Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (n=8-10). Os valores em porcentagem indicam redução da área de lesão em relação ao grupo controle negativo. Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparação com o controle solução salina e teste de Tukey para comparação entre os grupos, com $*p<0.05$, $**p<0.01$. ns= diferença não significativa.

Figura 37. Análise macroscópica de estômagos de ratos Wistar machos tratados por 7 e 14 dias com EHSPFI após indução de úlceras gástricas por ácido acético.

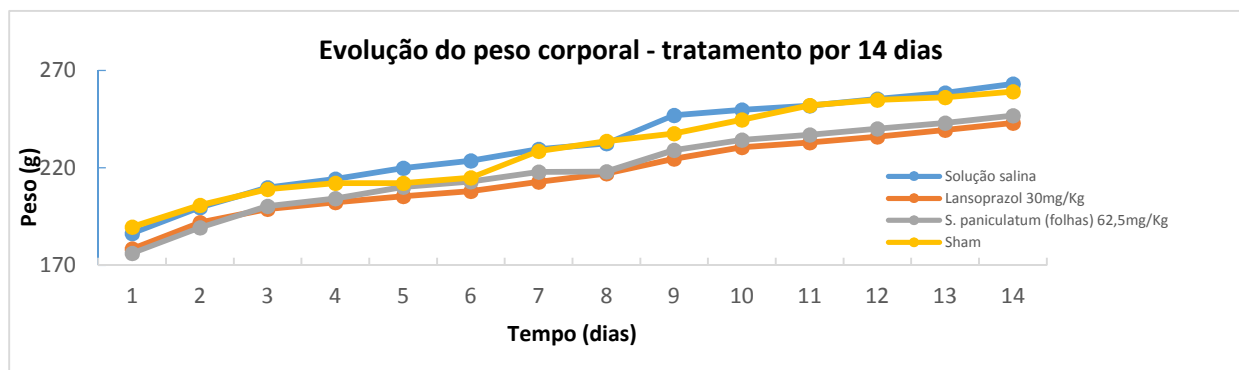


Observa-se que o extrato apesar de não reduzir a área de lesão em relação ao grupo salina, diminuiu a hiperemia gástrica. Fonte: arquivo pessoal.

14.2 Toxicidade subaguda

Os ratos Wistar machos tratados durante 14 dias com EHSPFI (62.5 mg/Kg/dia) não apresentaram variações significativas em relação: à evolução do peso corporal (**figura 38**), ao peso dos órgãos/peso corporal (**tabela 4**) e aos parâmetros bioquímicos obtidos do plasma (**tabela 5**) quando comparados aos animais tratados com o veículo. Os grupos tratados com lansoprazol (controle positivo) e o grupo sham também não apresentaram diferenças significativas com o grupo controle negativo em relação aos parâmetros observados ($p>0.05$).

Figura 38. Evolução do peso corporal de ratos Wistar machos tratados durante 14 dias com EHSPFI.



Valores expressos na forma de média (n=10). Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnet para comparação com o controle negativo (solução salina) e Tukey para comparação entre os grupos, com $p < 0.05$.

Tabela 4. Relação entre o peso dos órgãos e o peso corporal de ratos Wistar machos tratados durante 14 dias com EHSPFI.

Tratamentos	Coração	Rins	Pulmões	Fígado	Baço	Testículos
Solução salina	14.16 ± 0.10	16.89 ± 0.12	15.93 ± 0.43	25.87 ± 0.18	12.79 ± 0.21	19.06 ± 0.23
Lansoprazol (30 mg/Kg)	14.24 ± 0.12 ^{ns}	17.15 ± 0.10 ^{ns}	16.05 ± 0.16 ^{ns}	25.46 ± 0.26 ^{ns}	12.83 ± 0.07 ^{ns}	19.44 ± 0.12 ^{ns}
EHSPFI (62.5 mg/Kg)	14.27 ± 0.16 ^{ns}	17.03 ± 0.10 ^{ns}	16.00 ± 0.23 ^{ns}	25.54 ± 0.27 ^{ns}	12.61 ± 0.13 ^{ns}	19.29 ± 0.12 ^{ns}
Sham	13.89 ± 0.10 ^{ns}	16.73 ± 0.13 ^{ns}	15.97 ± 0.25 ^{ns}	25.19 ± 0.25 ^{ns}	12.29 ± 0.18 ^{ns}	18.90 ± 0.12 ^{ns}

Valores expressos em média ± erro padrão da média do arcoseno (n=10). Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnet para comparação com grupo controle negativo tratado com veículo (solução salina) e Tukey para comparação entre os grupos, com $p < 0.05$. ns= diferença não significativa em relação ao grupo tratado com solução salina.

Tabela 5. Determinação de parâmetros bioquímicos do plasma sanguíneo de ratos Wistar machos tratados durante 14 dias com EHSPFL.

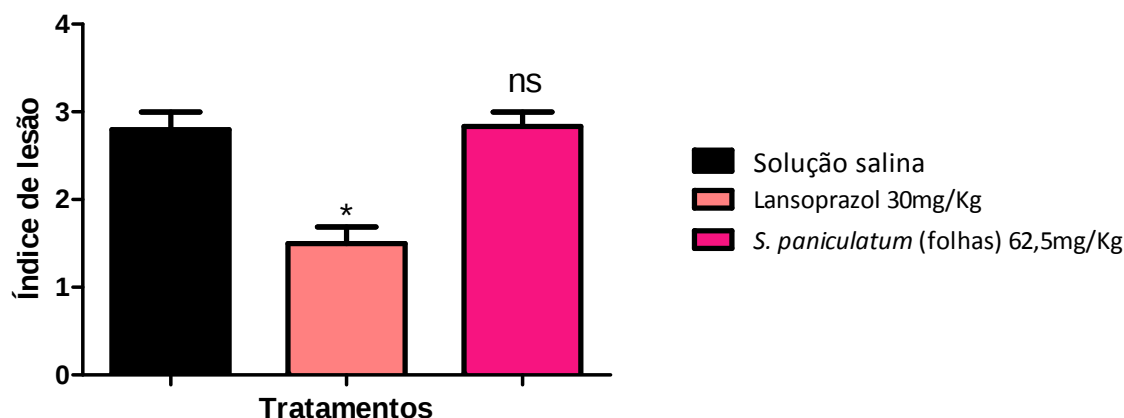
Parâmetros bioquímicos	Solução salina	Lansoprazol (30 mg/Kg)	EHSPFL (62.5 mg/Kg)	Sham
Ureia (mg/dL)	27.40 ± 2.09	25.40 ± 1.12 ^{ns}	26.40 ± 2.25 ^{ns}	25.00 ± 1.55 ^{ns}
Creatinina (mg/dL)	0.30 ± 0.00	0.24 ± 0.02 ^{ns}	0.28 ± 0.04 ^{ns}	0.30 ± 0.03 ^{ns}
Albumina (g/L)	3.77 ± 0.05	3.54 ± 0.11 ^{ns}	3.50 ± 0.07 ^{ns}	3.88 ± 0.07 ^{ns}
Proteínas totais (g/L)	6.66 ± 0.12	6.40 ± 0.23 ^{ns}	6.18 ± 0.18 ^{ns}	6.42 ± 0.68 ^{ns}
TGO (U/L)	161.60 ± 14.75	172.20 ± 13.11 ^{ns}	158.60 ± 5.63 ^{ns}	163.80 ± 10.26 ^{ns}
TGP (U/L)	49.20 ± 3.18	49.40 ± 4.46 ^{ns}	39.60 ± 2.91 ^{ns}	47.20 ± 4.55 ^{ns}
FA (U/L)	378.60 ± 46.17	305.00 ± 40.35 ^{ns}	343.00 ± 56.29 ^{ns}	388.00 ± 41.56 ^{ns}
GGT (U/L)	3.82 ± 0.76	2.12 ± 0.26 ^{ns}	2.18 ± 0.44 ^{ns}	2.68 ± 0.75 ^{ns}

Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=10). Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnet para comparação com o controle negativo (solução salina) e Tukey para comparação entre os grupos. ns= diferença não significativa em relação ao controle negativo.

15. Avaliação da ação antiulcerogênica duodenal do extrato

O tratamento prévio com o EHSPFL na dose de 62.5 mg/Kg não preveniu o surgimento de lesões ulcerativas perfurantes induzidas por cisteamina ($p>0.05$), com índice de lesão duodenais próximo ao grupo tratado com solução salina (**figura 39**). Portanto, o extrato na dose testada não possui atividade antiulcerogênica frente à úlceras duodenais induzidas por cisteamina.

Figura 39. Avaliação do efeito gastroprotetor do EHSPFl frente ao modelo de úlceras duodenais induzidas por cisteamina em ratos Wistar machos.

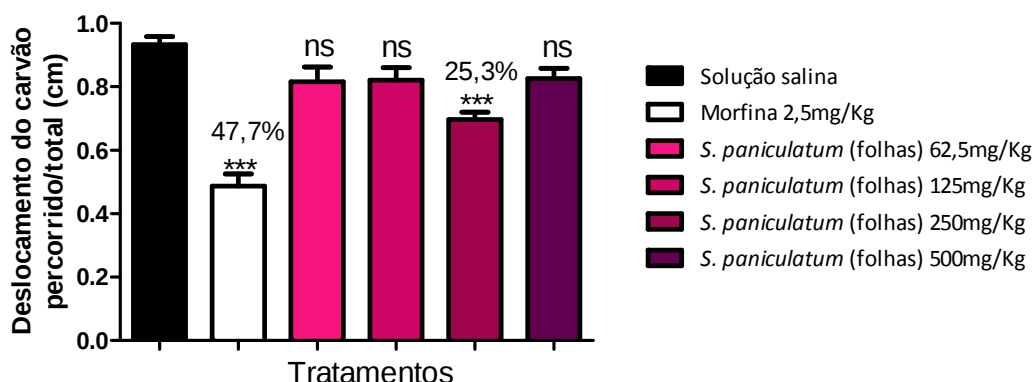


Valores expressos em mediana $\pm$ erro padrão da mediana (n=7-8). Análise estatística: ANOVA seguido do teste não-paramétrico de Dunn para comparação com o controle solução salina, com $*p<0.05$. ns= diferença não significativa.

16. Avaliação da ação antidiarreica do extrato e sobre o acúmulo de fluidos

O EHSPFl reduziu significativamente a motilidade intestinal em relação ao grupo controle negativo apenas na dose de 250 mg/Kg ($p<0.001$), apesar de não haver diferença significativa entre as doses testadas ($p>0.05$). O grupo controle positivo (morfina 2.5 mg/Kg) reduziu em 47.7% o trânsito intestinal em relação ao controle negativo ($p<0.001$) (**Figura 40**).

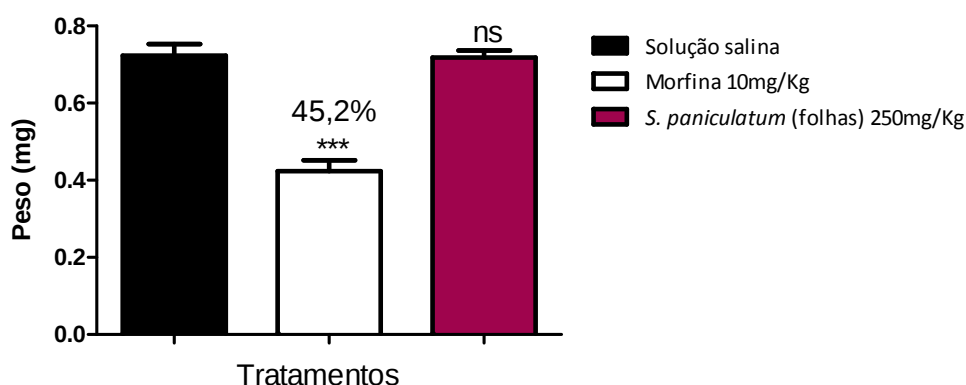
Figura 40. Avaliação da atividade do EHSPFl frente ao trânsito intestinal em camundongos Swiss machos.



Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (n=10). Os valores em porcentagem indicam redução do trânsito intestinal. Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparação com o controle solução salina e teste de Tukey para comparação entre os grupos, com $***p<0.001$. ns= diferença não significativa.

A partir do experimento que avalia a atividade do EHSPFl na redução da motilidade intestinal, selecionou-se a dose de 250 mg/Kg para prosseguir com o teste de avaliação de acúmulo de fluidos intestinais, mas não houve redução significativa no acúmulo de fluidos dos animais tratados com o extrato ($p>0.05$). O grupo controle positivo (morfina) reduziu em 45.2% o acúmulo de fluidos intestinais em relação ao grupo controle negativo ($p<0.001$) (**Figura 41**).

Figura 41. Avaliação da atividade do EHSPFl frente ao acúmulo de fluidos intestinais em camundongos Swiss machos.



Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($n=10$). Os valores em porcentagem indicam redução de líquidos intestinais. Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparação com o controle solução salina ($***p<0.001$) e teste de Tukey para comparação entre os grupos. ns= diferença não significativa.

Discussão

V. DISCUSSÃO

O primeiro passo a ser requerido para que se possa iniciar os testes biológicos com determinada droga é avaliar seu possível efeito tóxico. Para tal, procedeu-se a avaliação do efeito do EHSPFl no modelo de toxicidade aguda em camundongos Swiss de ambos os sexos. Observou-se neste trabalho que a administração do extrato em dose única de 5.0 g/Kg não promoveu alterações nos parâmetros avaliados. O Guia *Organization for Economic Co-operation Development* (OECD) para Testes de Substâncias Químicas, em seu tópico que descreve as práticas corretas para avaliação da toxicidade oral aguda de substâncias, indica que o método mais adequado para garantir a segurança da droga avaliada deve ser feito com doses entre 2.0 a 5.0 g/Kg e em animais de ambos os sexos. Portanto, de acordo com o experimento conduzido neste trabalho, o tratamento dos animais com EHSPFl não produziu sinais de toxidade com base nos parâmetros observados (OECD, 2008). Outro modelo experimental utilizado para investigar um possível efeito neurotóxico do EHSPFl, na dose de 62.5 mg/Kg (menor dose efetiva), foi a observação de alterações neuromotoras dos animais tratados com o extrato no teste de Rota Rod. Neste ensaio foi descartado qualquer efeito neurotoxicidade gerado pelo tratamento com o extrato, que pudesse interferir com os demais resultados experimentais que foram desenvolvidos a seguir.

Todos estes ensaios preliminares com o EHSPFl foram realizados em decorrência da presença de alcaloides esteroidais na composição fitoquímica de *S. paniculatum*. Alcaloides são classes de compostos fitoquímicos que requerem cautela em sua utilização na terapêutica. Já existem relatos de efeito teratogênico da solanina, um dos principais constituintes presentes no gênero *Solanum* (GAFFIELD & KEELER, 1996; CRAWFORD & MYHR, 1995). Almança et al., (2011) também descreveram a espécie *S. cernuum* apresentou efeito hepatotóxico em experimento no qual o tratamento como o extrato hidroalcólico foi realizado durante 30 dias.

Neste trabalho, também realizou-se o tratamento como o extrato durante 14 dias, utilizando ratos Wistar, no qual avaliou-se o efeito cicatrizante do EHSPFl sobre as úlceras gástricas induzidas por ácido acético. Observou-se que não houve indícios de toxicidade subaguda do extrato, pois os parâmetros morfológicos e bioquímicos avaliados não sofreram alterações significativas em relação ao grupo controle negativo (solução salina). Possíveis indícios de alterações hepáticas induzidas pelo extrato foram avaliados através da observação do peso do fígado dos animais e da quantificação de enzimas como TGO e TGP. Estas enzimas são utilizadas como importantes marcadores da função hepática e a elevação dos níveis destas transaminases são

indicativos de lesão deste órgão (ALMANÇA et al., 2011). Não foram observadas alterações que evidenciassem possíveis efeitos tóxicos do extrato nas doses avaliadas.

O modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol é um modelo clássico para avaliar atividade gastroprotetora de alguma droga a ser testada, pois este agente lesivo penetra na mucosa gástrica solubilizando o muco protetor da barreira mucosa, expondo o tecido epitelial à ação hidrolítica e proteolítica do ácido clorídrico e da pepsina (OATES & HAKKINEN, 1988). O etanol também estimula a secreção ácida, reduz o fluxo sanguíneo local, gera um desequilíbrio sobre os fatores antioxidantes e pró-oxidantes. O etanol promove a liberação de radicais livres, que atacam as membranas celulares promovendo peroxidação lipídica (GLAVIN & SZABO, 1992; REPETTO & LLESUY, 2002). Segundo 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 e vasos sanguíneos) expostas aos agentes lesivos presentes no lúmen gástrico. Desta forma o etanol causa lesão, tanto de forma direta, como indireta, através da liberação de produtos vasoativos. Devido ao fato do etanol promover lesões ulcerativas severas na mucosa gástrica e atuar reduzindo os fatores gastroprotetores, o modelo de úlceras gástricas induzidas por este agente lesivo é ideal para realizar uma triagem de substâncias com potencial ação gastroprotetora e também para avaliar os mecanismos de ação envolvidos na proteção da mucosa gástrica.

Um dos principais fatores envolvidos na proteção da mucosa gástrica é o fluxo sanguíneo local. A perfusão sanguínea adequada é responsável por manter o tecido com oxigênio, nutrientes e hormônios, e auxiliar na produção de muco e bicarbonato que fortalece a barreira muco-protetora (KAWANO & TSUJI, 2000). O fluxo sanguíneo também contribui para a retrodifusão de íons de hidrogênio do lúmen gástrico (KAWANO & TSUJI, 2000). Lesões gástricas provocadas por etanol causam hemorragia local aguda formando edema, congestão vascular e hiperemia (TRIER, 1987).

Neste trabalho, apesar da expressiva ação gastroprotetora do EHSPFl sobre as lesões induzidas por etanol em ratos, o tratamento prévio dos animais como EHSPFl não foi capaz de restaurar significativamente o fluxo sanguíneo após a ingestão oral de etanol.

Sabe-se que o NO atua como vasodilatador regulando o fluxo sanguíneo gástrico e que o etanol induz distúrbios da microcirculação sanguínea do estômago através da atuação da endotelina-I (ET-1), um peptídeo com potente ação vasoconstritora (KAWANO & TSUJI, 2000). Masuda et al., (1995) sugere que a ocorrência de distúrbios da hemodinâmica da mucosa gástrica induzida por etanol se dá por alterações no equilíbrio entre a ET-1 (vasoconstritor) e o NO (vasodilatador), ambos derivados do endotélio. Assim, a vasoconstrição induzida por etanol ocorre

predominantemente através da ação da ET-1 na mucosa gástrica que sob estas condições pode mascarado o efeito vasodilatador do NO. Esta hipótese poderia explicar a ausência de aumento do fluxo sanguíneo observado neste projeto. Entretanto, os resultados deste projeto indicam claramente a participação do NO na gastroproteção efetuada pelo EHSPFl. Estes resultados foram comprovados através do pré-tratamento com o inibidor não-seletivo de NOS (L-NAME). MacNaughton et al. (1989) relataram que o NO endógeno é capaz de reduzir os danos hemorrágicos causados pelo etanol em ratos quando atua inibindo a ação da endotelina-1 (ET-1), que possui ação vasoconstritora. Devido à participação do NO na gastroproteção efetuada pelo extrato, sugere-se que o NO também atue sobre a ET-1 impedindo a vasoconstrição e a redução do fluxo sanguíneo peculiar no modelo de úlcera por etanol. O aumento na produção de NO promovido pela ação do extrato provavelmente se deve à grande participação da NOS induzível (iNOS) que foi demonstrado neste trabalho através da utilização do inibidor seletivo de iNOS (L-NIL). Adicionalmente, também se observou neste trabalho que a expressão da enzima iNOS foi aumentada em animais que foram pré-tratados com o extrato e que sofreram indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão. Com isso, pode-se concluir que o extrato exerce gastroproteção pelo aumento na produção de NO a partir de iNOS.

O NO, além de regular o fluxo sanguíneo, inibe a secreção de ácido gástrico (LANAS, 2008). No entanto, apesar do efeito gastroprotetor do extrato envolver participação do NO, os resultados deste estudo não apontaram para uma ação antissecretória do extrato no modelo de ligadura do piloro quando o EHSPFl foi previamente administrado por via oral ou intraduodenal. É importante ressaltar que parte considerável da produção do NO se deve pelo aumento da atividade enzimática de iNOS e que esta enzima deve sofrer algum estímulo para ser ativada, como um agente endógeno e/ou exógeno capaz de estimular a secreção ácida ou de reduzir os fatores protetores (LANAS, 2008). Sugere-se que a redução da secreção ácida, efetuada pelo aumento na produção de NO pela iNOS, deve ocorrer somente na presença de um agente lesivo (SAKAGUCHI et al., 1999). É importante ressaltar também que há outros mecanismos envolvidos na redução da secreção de ácido, como o controle da liberação de histamina, acetilcolina e pentagastrina (BOUGHTON-SMITH & WHITTLE, 1981). Estudo realizado por Mesia-Vela et al. (2002), em que avaliaram o potencial antissecretório de todas as partes de *S. paniculatum* pelo mesmo modelo, demonstrou que as folhas não apresentou redução significativa na concentração de H^+ em todas as doses testadas, assim como neste trabalho.

O aumento na produção de muco, além de ser estimulado pelo fluxo sanguíneo, também pode ser em decorrência do aumento da concentração de NO na mucosa gástrica (LANAS, 2008).

No modelo de ligadura do piloro efetuado neste estudo, o tratamento oral do EHSPFl foi capaz de aumentar consideravelmente a produção de muco, o que é importante para fortalecer a barreira mucoprotetora e evitar danos graves à mucosa gástrica por agentes lesivos. Estes resultados, portanto, confirmam o efeito local do extrato, devido à proteção mecânica realizada pela barreira formada pelo muco. Porém, deve-se ressaltar que a administração intraduodenal do extrato também foi capaz de aumentar significativamente a produção de muco, comprovando que o extrato também é capaz de atuar sistemicamente no fortalecimento da barreira mucosa gástrica.

O receptor de capsaicina ou receptor de potencial transitório vaniloide 1 (TRPV1) é um dos fatores que podem estar envolvido na gastroproteção de alguns compostos de origem natural. TRPV1 é responsável por aumentar o fluxo sanguíneo na mucosa gástrica, e está expresso por um subgrupo de neurônios nociceptivos aferentes importantes no controle da dor (HOLZER et al. 1991; SZOLCSANYI, 2004). Foi investigada a participação destes receptores na proteção efetuada pelo EHSPFl através do uso de um inibidor de TRPV1 (*Ruthenium red*), mas os resultados deste projeto apontam que o extrato não atua por esta via.

Os compostos sulfidrílicos são relevantes na proteção da mucosa gástrica (SZABO & VATTAY, 1990). As pontes de dissulfeto presentes em sua constituição podem ser rompidas frente aos agentes lesivos deixando os radicais sulfidrílicos expostos a ação dos ácidos. Estes compostos sulfidrílicos, por sua vez, podem reagir com os radicais livres, prevenindo os danos oxidativos que estas espécies radicalares poderiam provocar no tecido (UESHIMA et al., 1992). Além do mais, compostos sulfidrílicos também participam da produção de muco (SALIM, 1993). O experimento utilizado para avaliar a participação dos compostos sulfidrílicos na gastroproteção efetuada pelo EHSPFl foi realizado utilizando-se de um inibidor de grupamentos sulfidrílica (NEM). O extrato, entretanto, não exerce efeito gastroprotetor por este mecanismo.

A glutatona reduzida (GSH) é um composto sulfidrílico não-proteico que participa da defesa antioxidante da célula, sendo encontrada em elevadas quantidades na mucosa gástrica (BODY et al., 1979). Os níveis de GSH, quantificada no tecido gástrico de animais pré-tratados com o EHSPFl e posteriormente submetidos à indução de úlceras por diferentes indutores, mantiveram-se reduzidos de modo semelhantes ao grupo controle negativo (solução salina), demonstrando que não houve participação da via GSH na ação do extrato. Considerando que a GSH é um composto sulfidrílico e que o extrato continuou protegendo mesmo com a inibição dessa via, a quantificação de glutatona neste trabalho somente reiterou a ausência da participação dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção efetuada pelo EHSPFl.

Apesar do EHSPFl não atuar via glutathiona, outros mecanismos antioxidantes podem auxiliar na gastroproteção do extrato. Dentre os modelos de indução de úlceras gástricas avaliados neste estudo, o modelo de isquemia e reperfusão é o mais específico para avaliar lesões provocadas por radicais livres. Este modelo promove lesões tanto através da isquemia local - pois o tecido não recebe quantidade suficiente de oxigênio e nutrientes, quanto da reperfusão tecidual - processo que promove a recirculação sanguínea local levando radicais livres, especialmente EROs para a mucosa gástrica, as quais entram em contato com o tecido promovendo processos oxidativos que levam formação de úlceras (UEDA et al., 1989). As enzimas antioxidantes capazes de converter radicais livres em moléculas mais estáveis são diversificadas e possuem mecanismos de atuação distintos. Dentre eles destacam-se a SOD e CAT que são captadoras específicas de EROs, especificamente de radicais superóxido e H_2O_2 , respectivamente (PRYOR et al., 2006; KIRKMAN E GAETANI et al., 2007). O possível efeito antioxidante do EHSPFl foi investigado através da quantificação destas enzimas, tanto nos modelos preventivo e curativo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão.

No modelo preventivo, avaliou-se o potencial efeito gastroprotetor do EHSPFl antes do procedimento isquêmico e o extrato foi capaz de prevenir os danos causados pelos EROs na mucosa gástrica. Porém, não houve aumento significativo na atividade das enzimas SOD e CAT nestes grupos pré-tratados com extrato em relação ao grupo pré-tratado com veículo (controle negativo). Entretanto, este efeito pode ser explicado pelo fato do pré-tratamento com o extrato (pela via oral) ser responsável pela produção aumentada de muco promovendo assim uma proteção mecânica à mucosa gástrica (LAINE et al., 2008). O efeito curativo do extrato foi observado através do tratamento por seis dias com o EHSPFl que foi capaz de reduzir significativamente as lesões ulcerativas induzidas por isquemia e reperfusão. Neste procedimento, onde a lesão isquêmica foi instalada e depois houve o tratamento com o extrato durante 6 dias consecutivos, houve aumento significativo das enzimas SOD e CAT na mucosa gástricas destes animais, confirmando, portanto, a ação antioxidante do extrato mediada pelas ação das enzimas SOD e CAT.

A atuação das enzimas antioxidantes são relevantes para prevenir o surgimento de úlceras gástricas, mas elas são ainda mais importantes quando estão sendo ativadas em resposta ao aparecimento de lesões ulcerativas. Isto porque os processos isquêmicos que podem levar à formação de úlceras são imprevisíveis, pois são originados a partir de eventos de estresse importantes como queimaduras extensas, choque, sepse, cirurgias de grande porte e trauma grave (DAS et al., 1997; JIA et al., 2007). Sob condições de hipóxia isquêmica, as EROs são produzidas

rapidamente, originando lesões no epitélio gástrico devido ao ataque na membrana das células da mucosa, promovendo peroxidação lipídica e perda da função celular. Neste estudo, o nível de peroxidação lipídica foi mensurado nos modelos preventivo e curativo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão, através da quantificação do produto final do processo de peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA) (ZINGARELLI et al., 1999). Observou-se que o EHSPFl reduziu o nível de lipoperoxidação em ambos os modelos avaliados, confirmando seu potente efeito antioxidante.

Estudos fitoquímicos realizados em parceria com a Universidade Estadual Paulista de Araraquara-SP indicam a presença de compostos fenólicos, flavonoides e saponinas esteroidais no extrato de folhas de *S. paniculatum* (dados não publicados até o presente). Os compostos fenólicos, flavonoides e saponinas esteroidais possuem um ou mais anéis aromáticos e um ou mais grupos hidroxila que são capazes de bloquear as espécies reativas por dois principais mecanismos: transferência de elétrons e doação de átomos de hidrogênio (TURKMEN et al., 2006; SKROVANKOVÁ et al., 2012). Os grupamentos fenóis são doadores de prótons (H^+) e capazes de transferir elétrons de maneira eficaz, reagindo com radicais livres e/ou EROs produzindo radicais intermediários estáveis. Esta reação impede o ataque oxidativo às membranas celulares, bloqueando ou reduzindo a peroxidação lipídica e evitando a inativação de componentes celulares importantes para que estas permaneçam funcionalmente ativas. Além do mais, subprodutos do processo de peroxidação podem causar danos às diversas biomoléculas, incluindo DNA (ESTERBAUER, 1996; BOX & MACCUBBIN, 1997).

Os flavonoides, encontrados em quantidades significativas no EHSPFl, são compostos abundantes e com relevância farmacológica no gênero *Solanum* como um todo. No trabalho de revisão realizado por Silva et al. (2003), os autores sumarizam em uma tabela compostos abundantemente encontrados e já descritos nas diversas espécies de *Solanum*, que totalizam 87 flavonoides, flavonas e flavonóis glicosilados. As saponinas esteroidais presentes em diversas espécies do gênero merecem destaque, assim como os compostos fenólicos e flavonoides, por também estarem associados à atividade antioxidante e à habilidade de captar radicais livres (ROSS & KASUM, 2002). A presença de compostos fenólicos, flavonoides e saponinas esteroidais no extrato explica sua atividade antioxidante, principalmente o potencial em reduzir a lipoperoxidação.

Estudo realizado por Odabasoglu et al. (2008) descreveram que aumento de H_2O_2 e OH^- com o uso de DAINes, especificamente a indometacina. O aumento na acidez do estômago e a perda da barreira mucoprotetora pode ocasionar estresse oxidativo e peroxidação lipídica, gerando

lesões ulcerativas. Neste trabalho, a indometacina também foi utilizada como modelo agudo de indução de úlceras gástricas, além de ser um modelo de estudo relevante devido ao aumento do uso indiscriminado de DAINEs pelos humanos. O EHSPFl foi capaz de reduzir a área de lesão da mucosa gástrica de maneira significativa, reduzindo o estresse oxidativo gerado pela DAINE. Além do mais, a indometacina age inibindo a atividade das ciclooxigenases 1 e 2 (COX 1 e 2), e consequentemente diminui a produção de prostaglandinas E_2 (PGE_2). A redução da PGE_2 aumenta a susceptibilidade da mucosa à formação de úlceras gástricas por aumentar a secreção ácida, reduzir o fluxo sanguíneo, diminuir a produção de muco e bicarbonato, aumentar motilidade gástrica e retardar a restituição e cicatrização epitelial (KOBAYASHI & ARAKAWA, 1995; HAWKEY, 2000; AOI et al., 2004). Para avaliar o papel da PGE_2 na gastroproteção do extrato, foi desenvolvido um modelo experimental no qual foi realizado o pré-tratamento com indometacina. Observou-se que não há participação da PGE_2 na ação do extrato. Estes dados corroboram como os dados anteriores em que não se observou aumento no fluxo sanguíneo gástrico ou alteração da secreção ácida promovida pela administração prévia do extrato.

Os agentes lesivos utilizados neste estudo promovem aumento do estresse oxidativo, levando ao aumento de lipoperoxidação e à formação de lesões ulcerativas. Conforme os danos vão atingindo as camadas mais profundas da mucosa gástrica, fatores envolvidos na resposta inflamatória aguda começam a ser ativados. Os primeiros tipos celulares a serem recrutados para área lesionada são os neutrófilos. Estas células produzem radicais superóxido, que reagem com os componentes lipídicas da membrana formando peróxido de lipídios, que são metabolizados até a formação de MDA. A SOD, enzima antioxidante captadora de radicais superóxido, juntamente com fatores que reduzem a infiltração de neutrófilos no tecido lesionado agem conjuntamente para reduzir o surgimento de úlceras (BRZOZOWSKI et al., 2001). A forma de avaliar se o EHSPFl é capaz de reduzir a resposta inflamatória é através da determinação dos níveis da mieloperoxidase (MPO), enzima presente nos neutrófilos. O rompimento dos neutrófilos promove a liberação de MPO, que inicia a resposta inflamatória (BAYIR et al., 2006). O extrato atua diminuindo os níveis de MPO na mucosa gástrica nos modelos agudos e subagudos avaliados, indicativo de que há redução no recrutamento de neutrófilos para a região lesada.

Os neutrófilos infiltram no tecido gástrico lesionado através do estímulo promovido pelo fator de necrose tumoral ($TNF-\alpha$), citocina pró-inflamatória presente nos macrófagos que tem sua secreção aumentada em condições de estresse ulcerativo agudo (HAMAGUCHI et al., 2001; WEI et al., 2003). A inibição de $TNF-\alpha$ e a infiltração de neutrófilos são responsáveis pela destruição tecidual gerada por EROs, e com isso estão diretamente relacionadas com a resposta antioxidante

(KWIECIEN et al., 2002). Embora o tratamento dos animais EHSPFl tenha diminuído a infiltração de neutrófilos no modelo curativo de úlceras gástricas induzidas por isquemia e reperfusão, os níveis de TNF- α não foram alterados. No entanto, sabendo que o recrutamento de neutrófilos é dependente do estímulo provocado pelo TNF- α , e mesmo que os seus níveis não tenham diminuído é possível sugerir que houve inibição de TNF- α na resposta anti-inflamatória do EHSPFl. Além do mais, esta citocina é um potente estimulador da expressão de iNOS (CALATAYUD et al., 2001); considerando que o extrato aumentou a expressão de iNOS no mesmo modelo curativo de isquemia e reperfusão usado para dosagens de TNF- α , é possível afirmar que a manutenção dos níveis dessa citocina pelo extrato é importante para manter a ativação de iNOS e consequentemente aumentar a produção de NO, um importante fator atuante na diminuição de lesões ulcerativas.

Outra citocina pró-inflamatória importante na inflamação aguda é a interleucina 1 beta (IL-1 β), que está presente em monócitos/macrófagos (MULLIGAN & WARD, 1992). Estas células também estão envolvidas na ativação de neutrófilos, provocando o aumento da expressão de moléculas de adesão endoteliais, síntese de PGE₂ e collagenase e estimulação da síntese de várias citocinas, incluindo elas mesmas. Apesar de também estar envolvida na infiltração de neutrófilos, o EHSPFl não reduziu significativamente os níveis de IL-1 β . Como esta citocina é responsável pela síntese de PGE₂, que não está envolvida na gastroproteção efetuada pelo extrato, uma das hipóteses deste estudo é que esta via está sendo pouco ativada quando se administra o extrato.

A IL-10, interleucina anti-inflamatória investigada neste estudo, é responsável por inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias dos linfócitos Th1 e estimular linfócitos B e Th2, regulando a resposta inflamatória (DE WAAL et al., 1991; NELSON et al., 2000). No modelo curativo de isquemia e reperfusão utilizado, o EHSPFl não aumentou significativamente os níveis de IL-10; talvez por este fato não houve redução nos níveis de IL-1 β e TNF- α , já que IL-10 tem função de inibir estas citocinas.

Os processos envolvidos na gastroproteção envolvem fatores antioxidantes, estimulação da produção de muco e bicarbonato, inibição da secreção de ácido gástrico e ativação de mediadores anti-inflamatórios. Quando uma lesão ulcerativa já está estabelecida, fatores responsáveis pela cicatrização do tecido lesado devem ser ativados, e muitos destes fatores são similares aos que participam da proteção gástrica. No início do processo cicatricial, há aumento do fluxo sanguíneo na área lesada e nos níveis plasmáticos de gastrina e citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , sendo que esses níveis decaem ao longo da cicatrização (BRZOZOWSKI, 2003; BRZOZOWSKI et al., 2005). A hipergastrinemia observada no período inicial do processo de cicatrização gástrica pode ser devido à supressão da secreção ácida e a expressão de fatores de

crescimento, como o epidermal (EGF) e alfa ($TGF-\alpha$), os quais controlam a proliferação celular e possuem atividade antissecretória, sendo responsáveis pela regeneração tecidual. É possível observar ao longo do processo de cicatrização angiogênese próxima à região lesionada (BRZOZOWSKI, 2003; BRZOZOWSKI et al., 2005). Apesar do efeito gastroprotetor do EHSPFl ser eficaz, além de atuar reduzindo a área de lesão no modelo curativo de indução de úlceras por isquemia e reperfusão com tratamento por 6 dias, o mesmo não promoveu cicatrização gástrica durante 7 ou 14 dias. Entretanto, sugere-se que o extrato pode estar modulando fatores pró e anti-inflamatórios, e fatores de crescimento, mas para que seja observada reestruturação tecidual necessitaria de um período maior de tratamento.

Sabe-se que as úlceras pépticas englobam úlceras gástricas e duodenais, e por isso experimentos que investigam o potencial protetor do EHSPFl frente à úlceras duodenais também são relevantes. O modelo agudo escolhido para essa investigação foi o de indução por cisteamina, modelo clássico e já muito bem definido (SELYE & SZABO, 1973). A cisteamina age aumentando a secreção de ácido via gastrina, que é carregado por movimentos peristálticos que ocorrem naturalmente para o duodeno, lesando-o, além de reduzir a secreção de muco alcalino e do fluxo sanguíneo local, via aumento de ET-1, que é um vasoconstritor (JEINTER & LAWRENCE, 2001; KHOMENKO et al., 2009). O EHSPFl não promoveu proteção significativa da mucosa duodenal frente à cisteamina e sugere-se que a ausência de proteção do extrato pode estar relacionada ao fato do mesmo não atuar como agente antissecretório como o lansoprazol que exerceu efetiva proteção do duodeno neste modelo.

O desenvolvimento de úlceras pépticas está diretamente relacionado à bactéria *Helicobacter pylori* (MALFERTHEINER et al., 2009). Experimentos microbiológicos *in vitro* conduzidos na UNESP de Araraquara-SP mostraram que o EHSPFl apresentaram concentração inibitória mínima (CIM) de 125 $\mu\text{g/mL}$. Considerando que CIM de 250 $\mu\text{g/mL}$ para extratos vegetais são considerados como agentes antimicrobianos relevantes, novos estudos estão em desenvolvimento para caracterizar melhor esta ação do extrato (dados não publicados até o presente).

Além dos estudos de ação antiulcerogênico, avaliou-se também o efeito do extrato sobre o trânsito intestinal, pois extratos vegetais que atuam aumentando o trânsito gastrointestinal pode prejudicar o processo de absorção intestinal ao ponto de interferir em sua ação terapêutica. Através do modelo de avaliação do trânsito intestinal foi possível observar que o EHSPFl não altera a motilidade intestinal na dose que apresenta ação antiulceronica. O extrato pode interferir no trânsito intestinal apenas a dose de 250 mg/Kg (4 vezes superior a dose efetiva). Prosseguiu-se

avaliando se o extrato é capaz de reduzir o acúmulo de fluidos intestinais induzido por óleo de rícino. O óleo de rícino promove mudanças na permeabilidade à água e eletrólitos, resultando em aumento do fluido luminal que eleva rapidamente o fluxo intestinal (MBAGWU & ADEYEMI, 2008). Seu mecanismo de ação é atribuído ao ácido ricinoleico presente em sua constituição, o qual estimula a produção de diversos mediadores como prostaglandinas, NO, fator ativador de plaquetas, cAMP e taquiquininas. O NO, que participa da gastroproteção efetuada pelo EHSPFl, é responsável por aumentar a motilidade gástrica através do acúmulo de fluidos intestinais; isto explica a ausência de redução da motilidade gástrica na dose de 62.5 mg/Kg (IZZO et al., 1998). É possível sugerir que na dose em que houve redução do trânsito intestinal (250 mg/Kg) pode estar ocorrendo a formação de uma barreira mecânica, impedindo o fluxo intestinal e, portanto, não pode ser comprovado potencial antidiarreico do extrato.

Até o presente é possível caracterizar a ação antiulcerogênica do extrato hidroalcóolico das folhas de *Solanum paniculatum*. A relevância desta caracterização farmacológica reside não somente no fato de que esta espécie é a única representante do gênero *Solanum* a ser citada como potencial fitoterápico na lista de plantas medicinais a ser utilizada na rede SUS (BRASIL, 2006). Além disso, estudos anteriores realizados por Mesia-Vela (2002) já havia avaliado a atividade antissecretória do extrato aquoso de todas as partes de *S. paniculatum*, inclusive as folhas. Porém, os mesmos autores descreveram que as folhas de *S. paniculatum* não apresentou ação antissecretória em doses superiores a 500 mg/Kg. Neste trabalho, apresentou-se a ação antiulcerogênica de extrato hidroalcóolico das folhas de *S. paniculatum* em uma dose efetiva de 62.5 mg/Kg. Portanto não somente a parte da planta estudada neste projeto, bem como a dose do extrato hidroalcóolico avaliado e os mecanismos apontados neste trabalho podem aportar para o desenvolvimento de um fitoterápico de *S. paniculatum* efetivo no tratamento das úlceras gástricas.

Conclusão

VI. CONCLUSÃO

Observou-se neste estudo que o EHSPFl foi efetivo em proteger a mucosa gástrica frente à modelos de indução de úlceras por etanol, indometacina (DAINE) e por isquemia e reperfusão, e apresentou efeito cicatrizante no modelo curativo de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão, com menor dose efetiva de 62,5mg/Kg. No entanto, o extrato não apresentou efeito cicatrizante frente à indução de úlceras gástricas por ácido acético com tratamento por 7 ou 14 dias e não protegeu a mucosa duodenal de úlceras induzidas por cisteamina. Dentre os mecanismos de ação avaliados, foi observado que o extrato age tanto localmente como sistemicamente, e atua: reduzindo a lipoperoxidação; elevando a produção de muco; reduzindo os danos hemorrágicos provocados pelo etanol; aumentando os níveis de enzimas antioxidantes (SOD e CAT); modulando a produção de NO, principalmente pelo aumento da expressão de iNOS; e diminuindo a infiltração de neutrófilos. Em suma, o efeito gastroprotetor e cicatrizante frente ao processo isquêmico do EHSPFl foram elucidados, principalmente devido ao aumento na produção de NO, muco e pela ação antioxidante do extrato. Experimentos futuros serão realizados para quantificar os subprodutos de NO resultantes da oxidação (nitrito e nitrato), com o intuito de confirmar se o extrato está realmente aumentando a produção de NO, e para avaliar a participação do NO na redução do fluxo sanguíneo local.

Referências bibliográficas

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol**, 105:121-126, 1984.
- AKANITAPICHAT, P.; PHRAIBUNG, K.; NUCHKLANG, K.; et al. Antioxidant and hepatoprotective activities of five eggplant varieties. **Food Chem Toxicol**, 48:3017-3021, 2010.
- ALLEN, A.; FLEMSTRÖM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **Am J Physiol Cell Physiol**, 288:1-9, 2005.
- ALMANÇA, C. C.; SALDANHA, S. V.; DYEIME, R. S.; et al. Toxicological evaluation of acute and sub-chronic ingestion of hydroalcoholic extract of *Solanum cernuum* Vell. in mice. **J Ethnopharmacol**, 138(2):508-12, 2011.
- ALY, A.; SHULKES, A.; BALDWIN, G. S. Gastrins, cholecystokinins and gastrointestinal cancer. **Biochim Biophys Act**, 1704:1-10, 2004.
- ANDERSON, M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods Enzymol**, 113:548-555, 1985.
- ANTONIO, J. M.; GRACIOSO, J. S.; TOMA, W.; et al. Antiulcerogenic activity of ethanol extract of *Solanum variabile* (false "jurubeba"). **J Ethnopharmacol**, 93(1):83-88, 2004.
- AOI, M.; AIHARA, E.; NAKASHIMA, M.; et al. Participation of prostaglandin receptor EP4 subtype in duodenal bicarbonate secretion in rats. **Am J Physiol**, 287:96-103, 2004.
- BAYIR, H. Reactive oxygen species. **Critic Care Med**, 33:498-501, 2005.
- BEALES, I. L. P. Gastrin and interleukin-1b stimulate growth factor secretion from cultured rabbit gastric parietal cells. **Life Sci**, 75:2983-2995, 2004.
- BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. The free radical theory of aging matures. **Physiol Rev**, 78:547–581, 1998.
- BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; et al. **Fisiologia**. 5ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

BIAS, P.; BUCHNER, A.; KLESSER, B. et al. The gastrointestinal tolerability of the LOX/COX inhibitor, licoferone, is similar to placebo and superior to naproxen therapy in healthy volunteers: results from a randomized, controlled trial. **Am J Gastroenterol**, 99:611-618, 2004.

BILICI, M.; OZTURK, C.; DURSUN, H.; et al. Protective Effect of Mirtazapine on Indomethacin-Induced Ulcer in Rats and Its Relationship with Oxidant and Antioxidant Parameters. **Dig Dis Sci**, 54(9):1868-1875, 2009.

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

BOX, H. C.; MACCUBBIN, A. E. Lipid peroxidation and DNA damage **Nut**, 13:920-921, 1997.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **J Biol Chem**, 164:321-329, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Decreto nº. 5813, de 22 de junho de 2006: **Aprovação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Portaria 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde.** Disponível em: <http://legis.anvisa.gov.br>. Acesso em 8 de novembro 2012.

BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P. C.; DROZDOWICZ, D. et al. Role of central and peripheral Ghrelin in the mechanism of gastric mucosal defence. **Inflammopharm**, 13:45-62, 2005.

BOUGHTON-SMITH, N. K.; WHITTLE, B. J. R. Some characteristics of the gastric antisecretory actions of prostaglandins in mammalian perfused whole-stomachs *in vitro*. **Br J Pharmac**, 68:153-154P, 1979.

BRZOZOWSKI, T.; KWIECIEN, S.; KONTUREK, P. C. H. et al. Comparison of nitric oxide-releasing NSAID and vitamin C with classic NSAID in healing of chronic gastric ulcers; involvement of reactive oxygen species. **Med Sci Monit**, 7(4):592-599, 2001.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006. 1821p.

CALATAYUD, S.; BARRACHINA, D.; ESPLUGUES, J. V. Nitric oxide: relation to integrity, injury and healing of the gastric mucosa. **Microscopy Research and Technique**, 53, 325–335, 2001.

CALDER, P.C. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. **Lip**, 36:1007-1023, 2001.

CARBAJAL, D.; MOLINA, V.; NOA, M. et al. Effect of d-002 on gastric mucus composition in ethanol-induced ulcer. **Pharmacol Res**, 42:329-332, 2000.

CARVALHO, A. S. T. Úlcera péptica. **J Pediat**, 76:127-134, 2000.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L.; et al. COX-3, a ciclooxigenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. **Procc Nation Acad Sci**, 99: 13926-13931, 2002.

CHIOU, S. K.; TANIGAWA, T., AKAHOSHI, T. et al. Survivin a novel target for indomethacin induced gastric injury. **Gastroenterol**, 128:63-73, 2005.

COSTA, O. A. Jurubeba. **Rev Bras Farm**, 21(12):404–416, 1940.

CRAWFORD, L.; MYHR, B. A preliminary assessment of the toxic and mutagenic potential of steroidal alkaloids in transgenic mice. **Food Chem Toxicol Exeter**, 33(3):191-194, 1995.

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

D'ARCY, W. G. Solanaceae studies II: typification of subdivisions of *Solanum*. **Ann Missouri Bot Gard**, 59:262-278, 1972.

DAS, D.; BANDYOPADHYAY, D.; BHATTACHARJEE, M.; et al. Hydroxyl radical is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration. **Free Radic Biol Med**, 23:8–18, 1997.

DE LEEST H. T.; STEEN, K. S.; LEMS, W. F.; et al. Eradication of *Helicobacter pylori* does not reduce the incidence of gastroduodenal ulcers in patients on long-term NSAID treatment: doubleblind, randomized, placebo-controlled trial. **Helicobact**, 12(5):477-485, 2007.

DENGIZ, G. O.; ODABASOGLU, F.; HALICI, Z.; et al. Gastroprotective and Antioxidant Effects of Montelukast on Indomethacin-Induced Gastric Ulcer in Rats. **J Pharmacol Sci**, 105:94- 102, 2007.

DE WAAL MALEFYT, R.; ABRAMS, J.; BENNETT, B.; et al. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J Exp Med**, 174:1209–1220, 1991.

DEW, M. J. Asymptomatic peptic ulcer disease. **Br Med J (Clin Res Ed)**, 15: 401, 1987.

DI MATTEO, V.; ESPOSITO, E. Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. **Curr Drug Targets CNS Neurol Disord**, 2:95–107, 2003.

DRYDEN, G.W.; SONG, M.; MCCLAIN, C. Polyphenols and gastrointestinal diseases. **Curr Opin Gastroenterol**, 22(2):165-170, 2006.

DONG, M. H.; KAUNITZ, J. D. Gastroduodenal mucosal defense. **Curr Opin Gastroenterol**, 22(6):599-606, 2006.

DUDAR, G. K.; D'ANDREA, L. D.; DI STASI, R.; et al. A vascular endotelial growth factor mimetic accelerates gastric ulcer healing in a iNOS-dependent manner. **Am J Physiol Gastroint Liver Physiol**, 295:G364-G381, 2008.

DUNHAM, N. W.; MYIA, T. S. A note on a simple apparatus for detection of neurological deficit in rats and mice. **J Am Pharm Assoc**, 46:208-209, 1957.

ENE, M. D.; CLAMP, J. R.; ROBERTS, C. J. Effects of cimetidine and carbenoxolone on gastric mucus. **Gut**, 29:636-641, 1988.

ESTERBAUER, H. Estimation of peroxidative damage: a critical review **Pathol Biol**, 44:25–28, 1996.

ETHELL, M. T.; HODGSON, D. R.; HILLS, B. A. Ultrastructure of the hydrophobic gastric surfactant barrier in the dog. **Aust Vet J**, 77:240-244, 1999.

GAFIELD, W.; KEELER, R. F. Induction of terata in hamsters by solanidine alkaloids derived from *Solanum tuberosum*. **K Toxicol**, 9:426-433, 1996.

GERBER, M.; BOUTRON-ROUAULT, M. C.; HERCBERG, S. et al. Food and Cancer: state of the art about the protective effect of fruits and vegetables. **Bull Cancer**, 89:293–312, 2002.

GHASANFARI, G. B.; MINAIE, N.; YASA, A. N.; et al. Biochemical and histopathological evidences for beneficial effects of *Satureja Khuzestanica* Jamzad essential oil on the mouse model of inflammatory bowel diseases. **Toxicol Mech Meth**, 16:365-72, 2006.

GIUST, A. M.; RAIMONDI, M.; RAVAGNAN, G.; et al. Human cell membrane oxidative damage induced by single and fractional doses of ionizing radiation: a fluorescence spectroscopy study. **Int J Radic Biol**, 74:595–605, 1998.

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

GUIDOBONO, F.; [PAGANI, F.](#); [TICOZZI, C.](#); et al. Protection by amylin of gastric erosions induced by indomethacin or ethanol in rats. **Br J Pharmacol**, 120: 581-586, 1997.

GUPTA, A. K.; GANGULY, P.; MAJUMDER, U. K.; et al. Hepatoprotective and antioxidant effects of total extracts and steroidal saponins of *Solanum xanthocarpum* and *Solanum nigrum* in paracetamol induced hepatotoxicity in rats. **Pharmacol Online**, 1:757–768, 2009.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **An Review Nut**, 16:33-50, 1996.

HAMAGUCHI, M.; WATANABE, T.; HIGUCHI, K.; et al. Mechanisms and roles of neutrophil infiltration in stress-induced gastric injury in rats. **Dig Dis Sci**, 46:2708–2715, 2001.

HAWKEY, C. J. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Gastropathy. **Gastroenterol**, 119:521-535, 2000.

HEMAMALINI, K.; ASHOK, P.; SUNNY, G. Gastroprotective activity of *Gymnosporia emerginata*, *Solanum pubescence* and *Anogessius acuminate* leaf extract against ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. **Int J Pharm Biomed Res**, 2(1):38-42, 2011.

HOGBEN, C. A. M.; KENT, T. H.; WOODWARD, P. A.; et al. Quantitative histology of gastric mucosa: Man, dog, cat, guinea pig, and frog. **Gastroenterol**, 67:1143-1154, 1974.

HOLZER, P.; LIVINGSTON, E. H.; SARIA, A.; et al. Sensory neurons mediate protective vasodilatation in rat gastric mucosa. **Am J Physiol**, 260:363-370, 1991.

HUNZIKER, A. T. Genera *Solanacearum*: the genera of *Solanaceae* illustrated, arranged according to a new system. Liechtenstein: **Arg Gantner Verlag**, 2001.

INEU, R. P.; PEREIRA, M. E.; ASCHNER, M.; et al. Diphenyl diselenide reverses gastric lesions in rats: Involvement of oxidative stress. **Food Chem Toxicol**, 46:3023-3029, 2008.

ISHIKAWA, T.; LI, Z. S.; REA, P. A. The GS-X pump in plant, yeast and animal cells: function and gene expression. **Biosci Rep**, 17:189-208.

JAHOVIC, N.; ERKANLI, G.; ISERI, S.; ARBAK, S.; ALICAN, I. Gastric protection by α -melanocyte-stimulating hormone against ethanol in rats: Involvement of somatostatina. **Life Sci**, 80:1040-1045, 2007.

JAIN, K. S.; SHAH, A. K.; BARIWAL, J.; et al. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. **Bioorg Med Chem**, 15:1181-1205, 2007.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; et al. **Immunobiology: The immune system in health and disease**. 5ed. New York: Garland Science, 2001.

JIA Y. T.; MA, B.; WEI, W.; et al. Sustained activation of nuclear factor-kappa B by reactive oxygen species is involved in the pathogenesis of stress-induced gastric damage in rats. **Crit Care Med**, 35:1582-1591, 2007.

KAWANO, S.; TSUJI, S. Role of mucosal blood flow: a conceptual review in gastric mucosal injury and protection. **J Gastroent Hepat**, 15 (Supl.):D1-D6, 2000.

KHOMENKO, T.; DENG, X.; JADUS, M. R. Effect of cysteamine on redox-sensitive thiol-containing proteins in the duodenal mucosa. **Biochem Biophys Res Commun**, 309:910-916, 2003.

KIRKMAN, H N; GAETANI, G F Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries *Trends Biochem Sci*, v 32, p 44 - 50, 2007

KIRKPATRICK, P. Stitching together naturally. **Nat**, 1:748, 2002.

KOBAYASHI, K.; ARAKAWA, T. Arachidonic acid cascade and gastric mucosal injury, protection, and healing: topics of this decade. **J Clin Gastroenterol**, 21:12-17, 1995.

KONTUREK, P. C.; KONTUREK, S. J.; OCHMANSKI, W. Neuroendocrinology of gastric H^+ and duodenal HCO_3 secretion: the role of brain-gut axis. **Eur J Pharmacol**, 499:15 - 27, 2004.

KRAWISZ, J.E.; SHARON, P.; STENSON, W.F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in the rat and hamster model. **Gastroenterol**, 87:1344-1350, 1984.

KWIECIEN, T.; BRZOZOWSKI, S. J.; KONTUREK, S. J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. **J Physiol Pharmacol**, 53(1):39-50, 2002.

LAI, S. K.; WANG, Y. Y.; WIRTZ, D. et al. Micro- and macrorheology of mucus. **Advan Drugs Deliv Rev**, 61:86-100, 2009.

LAMONT, J. T. Mucus: the front line of intestinal mucosal defense. **Ann N Y Acad Sci**, 664:190-201, 1992.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. **Gastroenterol**, 135:41-60, 2008.

LANAS, A. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract. **Arth Res Therap**, 10: S2-S4, 2008.

[LA VECCHIA, C.](#); [TAVANI, A.](#) A review of epidemiological studies on cancer in relation to the use of anti-ulcer drugs. **Eur J Cancer Prev**, 11(2):117-23, 2002.

LEEKING, M. E.; ROCCA, M. A. Contribuição para o estudo Químico dos frutos do *Solanum paniculatum* L. **Rev Fac Farm Odontol Araraquara**, 2(2):299-300, 1968.

LEIER, I.; JEDLITSCHKY, G.; BUCHHOLZ, U.; et al. ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump. **Biochem J**, 314: 433-437, 1996.

LI, X.; ANDERSSON, T. B.; AHLSTROM, M.; WEIDOLF, L. Comparison of inhibitory effects of the proton pump-inhibiting drugs omeprazole, esomeprazole, lansoprazole, pantoprazole, and rabeprazole on human cytochrome p450 activities. **Drug Metab Dispos**, 32(8): 821-827.

LICHTENBERGER, L. M. Gastroduodenal mucosal defense. **Curr Opin Gastroenterol**, 15:463-472, 1999.

LU, S.C. Regulation of glutathione synthesis. **Curr Topics Cell Regul**, 36:95-116, 2000.

MBAGWU, H. O.; ADEYEMI, O. O.; Anti-diarrhoeal activity of the aqueous extract of *Mezoneuron benthamianum* Baill (Caesalpiniaceae). [J Ethnopharmacol](#), 116(1):16-20, 2008.

MAC MILLAN, L. A.; CROW, J. P.; et al. Peroxynitrite mediated inactivation of manganese SOD involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. **Biochem**, 37:1613, 1998.

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

MALFERTHEINER, P.; DENT, J.; ZEIJLON, L.; et al. Impact of *Helicobacter pylori* eradication on heartburn in patients with gastric or duodenal ulcer disease: results from a randomized trial programme. **Aliment Pharmacol Ther**, 16:1431–1442, 2002.

MALFERTHEINER, P.; CHAN, F. K. L.; MCCOLL, K. E. L. Peptic ulcer disease. **Lancet**, 374:1449–1461, 2009.

MARKESICH, D. C.; ANAND, B. S.; LEW, G. M. et al. *Helicobacter pylori* infection does not reduce the viscosity of human gastric mucus gel. **Gut**, 36:327-329, 1995.

MARQUES, S. B.; MATTAR, R.; ARTIFON, E. L.; et al. High prevalence of duodenal ulcer in a tertiary care hospital in the city of São Paulo, SP, Brazil. **Arq Gastroenterol**, 48(3):171-174, 2011.

MASUDA, E.; KAWANO, S.; NAGANO, K.; et al. Endogenous Nitric Oxide Modulates Ethanol-Induced Gastric Mucosal Injury in Rats. **Gastroenterol**, 108:58-64, 1995.

MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulphydryls, and prostaglandins in gastroprotection by mormodin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesion in rats. **Life Sci**, 65:27-32, 1999.

MATSUHASHI, T.; OTAKA, M.; ODASHIMA, M.; et al. Protective effect of a novel rice extract against ethanol-induced gastric mucosal injury in rat. **Dig Dis Sci**, 52:434-441, 2007.

MOTAWI, T. K.; ELGAWAD, H. M. A. SHAHIN, N. N. Gastroprotective effect of leptin in indomethacin-induced gastric injury. **Dig Dis Sci**, 15:405-412, 2008.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Ann Rev Biochem**, 52:711-760, 1983.

MESIA-VELA, S.; SANTOS, M. T.; SOUCCAR, C.; et al. *Solanum paniculatum* L. (Jurubeba): Potent inhibitor of gastric acid secretion in mice. **Phytomed**, 9:508-514, 2002.

MITTLER R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Sci**, 7:405-410, 2002.

MUKHERJEE, D. Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors and potential risk of cardiovascular events. **Biochem Pharmacol**, 63:817-821, 2002.

MULLIGAN, M. S.; WARD, P.A. Immune complex-induced lung and dermal vascular injury: differing requirements for tumor necrosis factor- α and IL-1. **J Immunol**, 149:331-339, 1992.

NAITO, Y.; TOSHIKAZU, Y. Molecular and cellular mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation and Oxidative stress. **Free Radic Biol Med** 33(3):323-336, 2002.

NAKASHIMA, M.; AOI, M.; AIHARA, E.; et al. No role for prostacyclin IP receptors in duodenal HCO₃ secretion induced by mucosal acidification in mice: comparison with capsaicin-induced response. **Dig**, 70:16-25, 2004.

NARUMIYA, S. Prostanoid receptors. Structure, function and distribution. **Ann N Y Ac Sci**, 744:126-138, 1994.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nat**, 420:846-852, 2002.

NELSON, D. R.; LAUWERS, G. Y.; LAU, J. Y. Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial of interferon non-responders. **Gastroenterol**, 118: 655-660, 2000.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J Nat Prod**, 66:1022-1037, 2003.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, 49:249-279, 1998.

NORDBERG, J.; ARNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, 31:1287-1312, 2001.

OATES, P. J.; HAKKINEN, J. P. Studies on the mechanisms of ethanol-induced gastric damage in rats. **Gastroenterol**, 94:10-21, 1988.

ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; SULEYMAN, H.; et al. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. **J Ethnopharmacol**, 103:59-65, 2006.

OKABE, S.; AGAMASE, K. An Overview of Acetic Acid Ulcer Models - The History and State of the Art of Peptic Ulcer Research. **Biol Pharm Bull**, 28(8):1321-1341, 2005.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION DEVELOPMENT (OECD). **Guideline for testing of chemicals: Acute Oral Toxicity**. 423, 2001. 14p.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Disponível em <http://www.who.int/en/>. Acessado em 8 de abril de 2011.

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

PAI, R.; SOREGHAN, B. A.; SZABO, I. L. et al. Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. **Nat Med**, 8:289-293, 2002.

PAN, J. S.; HE, S. Z.; XU, H. Z.; et al. Oxidative stress disturbs energy metabolism of mitochondria in ethanol-induced gastric mucosa injury. **World J Gastroenterol**, 14:5857-5867, 2008.

PARMAR, S.; GANGWAL, A.; SHETH, N. Evaluation of antiasthmatic activity of a polyherbal formulation containing four plant extracts. **J Curr Pharm Res**, 2:40-44, 2010.

PELEGRIIN, G. R. O.; BASSO, P. J.; SOARES, A. S.; et al. Cleaved caspase-3 expression in hypothalamic magnocellular neurons may affect vasopressin secretion during experimental polymicrobial sepsis. **J Neuroimmunol**, 1-7, 2013.

PEUCHANT, E.; BRUN, J.; RIGALLEAU, V. et al. Oxidative and antioxidative status in pregnant women with either gestational or type 1 Diabetes. **Clin Biochem**, 37:293-298, 2004.

POECKEL, D.; GREINER, C.; VERHOFF, M.; et al. Carnosic acid and carnosol potentially inhibit human 5-lipoxygenase and suppress pro-inflammatory responses of stimulated human polymorphonuclear leukocytes. **Biochem pharmacol**, 76:91-97, 2008.

PONGPIRIYADACHA, Y.; MATSUDA, H.; MORIKAWA, T.; et al. Protective effects of polygodial on gastric mucosal lesions induced by necrotizing agents in rats and the possible mechanisms of action. **Biol Pharm Bull**, 26(5):651-657, 2003.

PRYOR, W. A.; HOUK, K. N.; FOOTE, C. S.; et al. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 291:491-511, 2006.

RAFATULLAH, S.; [TARIQ, M.](#); [AL-YAHYA, M. A.](#); et al. Evaluation of turmeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. **J Ethnopharmacol**, 29(1):25-34, 1990.

RAGHUNATH, A. S.; HUNGIN, A. P.; WOOFF, D. et al. Systematic review: the effect of *Helicobacter pylori* and its eradication on gastro-oesophageal reflux disease in patients with duodenal ulcers or reflux oesophagitis. **Aliment Pharmacol Ther**, 20:733-744, 2004.

REPPETO, M. G.; LLESUY, S. F. Antioxidant proprieties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Braz J Med Biol Res**, 35:523-534, 2003.

RIPPERGER, H.; SCHREIBER, K.; BUDZIKIEWICZ H. Isolierung von Neochlorogenin and Paniculogenin aus *Solanum paniculatum* L. **Chem Berrichte**, 100:1741-1752, 1967.

RIPPERGER, H.; SCHREIBER, K. Struktur von Paniculonin A und B, zweineuen Spirostanglykosiden aus *Solanum paniculatum* L; **Chem Berrichte**, 101:2450-2458, 1968.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J. E.; LANCASTER, C.; et al. Enteropooling assay: a test for diarrhoeal produced by prostaglandins. **Prostagland**, 11:809-814, 1976.

ROBERT, A.; [NEZAMIS, J. E.](#); [LANCASTER, C.](#); et al. Cytoprotection by prostaglandins in rats: prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. **Gastroenterol**, 77(3):433-443, 1979.

ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids, bioavailability, metabolic effects and safety **Ann Rev Nutr**, 22:19-34, 2002.

ROULEAU, A.; HERON, A.; COCHOIS, V.; et al. Cloning and expression of the mouse histamine H3 receptor: evidence for multiple isoforms. **J Neurochem**, 90:1331-1338, 2004.

SAKAGUCHI, A. A.; MIURA, S.; TAKEUCHI, T. et al. Increased expression of inducible nitric oxide synthase and peroxynitrite in helicobacter pylori gastric ulcer. **Free Radic Biol Med**, 27 (7-8):781-789, 1999.

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

SCHREIBER, K.; RIPPERGER, H.; BUDZIKIEWICZ, H. (22R:25S)-3-amino-5-spirostan, in Steroid alkaloid neuartigen Strukturtyps aus *Solanum paniculatum* L. **Tetrahed Lett**, 45:3999–4002, 1965.

SCHREIBER, K.; RIPPERGER, H. Jurubine, a novel type of steroidal saponin with (25S)-3-amino-5-furostane-22, 26-diol o (26)-D-Glucopyranoside structure from *Solanum paniculatum* L. **Tetrahed Lett**, 48:5997–6002, 1966.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Curr Opin Gastroenterol**, 21:636 -643, 2005.

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

SELYE, H.; SZABO, S. Experimental model for production of perforating duodenal ulcers by cysteamine in the rat. **Nat**, 244(5416):458–459, 1973. SHAY, H. A simple for the uniform production of gastric ulceration in rat. **Gastroenterol**, 5:43-61, 1945.

SHAHILADEVI, S.; JAYANTHI, G.; JAGADEESAN, M. Comparative diuretic activity of seeds and fruit wall extracts of *Solanum surattense* Brum.F. and *Solanum melongena* var. Insanum(L.) Prain. **Indian Drugs**, 43:856–859, 2006.

SILVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R.; et al. Ocorrência de Flavonas, Flavonóis e seus Glicosídeos em Espécies do Gênero *Solanum* (Solanaceae) **Quim Nov**, 26(4):517-522, 2003.

SIQUEIRA-JACCOUD, R.J.; PEREIRA, N.A.; LAINETTI, R. Jurubeba. **Rev Bras Farm**, 1:121–131, 1982.

SIQUEIRA, N. S.; MACAN, A. Cromatografia dos alcaloides da *Solanum paniculatum* L. **Trib Farm**, 44(1–2):101–105, 1976.

ŠKROVÁNKOVÁ, S; MIŠURCOVÁ, L; MACHŮ, L. Antioxidant Activity and Protecting Health Effects of Common Medicinal Plants **Advanc Food Nut Res**, 67:75-124, 2012.

SMITH, M. A.; ROTTKAMP, C. A.; NUNOMURA, A. et al. Oxidative stress in Alzheimer's disease. **Biochem Biophys Acta**, 1502:139-144, 2000.

SOUZA-BRITO, A. R. M. **Manual de Ensaio Toxicológicos in vivo: Ciências médicas**. 1ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1994. p.15-22.

SREEJAYAN, N.; RAO, M. Free radical scavenging activity of Curcuminoids. **Drug Res**, 46:169-171, 1996.

STICKNEY, J. C.; NORTHUP, D. W. Effect of gastric emptying upon propulsive motility of small intestine of rat. **Proc Soc Exp Biol Med**, 101:582-583, 1959.

SZABO, S. Animal model for human disease: duodenal ulcer disease. **Am J Pathol**, 93:273-276, 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**, 127(Suppl.):21-28, 1987.

SZABO, S.; VATTAY, P. Experimental gastric and duodenal ulcers. Advances in pathogenesis. **Gastroenterol**, Clin North Am 19:67-85, 1990.

SZOLCSÁNYI, J. Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. **Neuropeptide**, 38, 377-84, 2004.

TANAKA, A.; ARAKI, H.; HASE, S. et al. Inhibition of both COX1 and COX2 is required for development of gastric damage in response to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **J Physiol Paris**, 95:2-27, 2001.

TANAKA, A.; ARAKI, H.; HASE, S. et al. Up-regulation of COX2 by inhibition of COX1 in the rat: a key to NSAID-induced gastric injury. **Aliment Pharmacol Ther**, 16:90-101, 2002.

TOMLINSON, J.; BLIKSLAGER, A. Role of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in gastrointestinal tract injury and repair. **J Am Vet**, 222:946-951, 2003.

TRIER, J. S.; SZABO, S.; ALLAN, C. H. Ethanol-induced damage to mucosal capillaries of rat stomach. **Gastroenterol**, 92:13-22, 1987.

TURKMEN, N.; SARI, F.; VELIOGLU, Y. S. Effect of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. **Food Chem**, 99:838-841, 2006.

TYTGAT, G. N. J. Etiopathogenetic Principles and Peptic Ulcer Disease Classification. **Dig Dis**, 29 (5):454–458, 2011.

UEDA, S.; YOSHIKAWA, T.; TAKAHASHI, S.; et al. Role of free radicals and lipid peroxidation in gastric mucosal injury induced by ischemia–reperfusion in rats. **Scand J Gastroenterol**, 162:55–58, 1989.

UESHIMA, K.; TAKEUCHI, K.; Okabe S. Effects of sulfhydryl-related compounds on indomethacin-induced gastric lesions in rats: Role of endogenous sulfhydryls in the pathogenesis. **Jap J Pharmac**, 58, 157 165, 1992.

VIEIRA, P. M.; COSTA, P. M.; SILVA, C. R. et al. Assessment of the Genotoxic, Antigenotoxic, and Cytotoxic Activities of the Ethanolic Fruit Extract of *Solanum lycocarpum* A. St. Hill. (Solanaceae) by Micronucleus Test in Mice. **J Med Food**, 13(6):1409-1414, 2010.

VILELA, V. L. R.; FEITOSA, T. F.; LÔBO, K. M. S. et al. Potencial anti-helmíntico da raiz de *Solanum paniculatum* Linnaeus (1762) em ovelhas do semi-árido paraibano. **Acta Vet Bras**, 3(1):20-24, 2009.

VISIOLI, F.; BORSANI, L.; GALLI, C. Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. **Cardiovasc Res**, 47:419–425, 2000.

VUYYURU, L.; SCHUBERT, M. L.; HARRINGTON, L.; ARIMURA, A.; MAKHLOUF, G. M. Dual inhibitory pathways link antral somatostatin and histamine secretion in human, dog, and rat stomach. **Gastroenterol**, 109:1566-1574, 1995.

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

WANNMACHER, L. Review of the evidence for *H. Pylori* treatment regimens. 18th Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines. Section 17.1: **Antacids and other antiulcer medicines-Adults and children** (Review), 33p.

WEI, X. M.; HEYWOOD, G. J.; DI GIROLAMO, N.; et al. Nicorandil inhibits the release of TNF alpha from a lymphocytes. **Int Immunopharmacol**, 3:1581–1588, 2003.

WINTERBOURN, C.C.; HAWKINS R.E.; BRIAN M.; et al. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. **J Lab Clin Med**, 85(2):337-41, 1975.

YANG, L.; WEI-PING, W.; HONG-YING, W.; et al. Intragastric administration of heparin enhances gastric ulcer healing through a nitric oxidized-dependent mechanism in rats. **Eur J Pharmacol**, 399:205-214, 2000.

ZINGARELLI, B.; SZABO, C.; SALZMAN, A. L. Blockade of Poly(ADP-ribose) synthetase inhibits neutrophil recruitment, oxidant generation, and mucosal injury in murine colitis. **Gastroenterol**, 116:335-345, 1999.

Anexos

Anexo I. Certificado de aceite pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em experimentos com roedores.



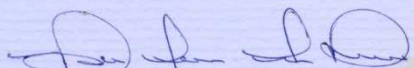
 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Certificado

Certificamos que o Protocolo nº **361-CEUA**, sobre "EFEITO GASTROPROTETOR E AVALIAÇÃO DE MECANISMOS DE AÇÃO ANTIULCEROGÊNICA DOS EXTRATOS E PARTIÇÕES DE FOLHAS E FRUTOS DE SOLANUM PANICULATA", 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.


Profª Drª Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro
Presidente - CEUA

Instituto de Biociências - Diretoria Técnica Acadêmica
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Botucatu-SP Brasil
Tel 14 3811 6043/6044 Fax 14 3815 3744 e-mail: iac@ibb.unesp.br

Anexo II. Tabela representativa do *screening* hipocrático observado no modelo de toxicidade aguda e descrição dos parâmetros avaliados (OECD, 2011).

Sintomas	Normal	Sexo*	Tempo				
			30	60	120	240	360
Aparência geral	4	F	4	4	4	4	4
		M	4	4	4	4	4
Frênito vocal	0	F	0	0	0	0	0
		M	0	0	0	0	0
Irritabilidade	0	F	0	0	0	0	0
		M	0	0	0	0	0
Reposta ao toque	4	F	4	4	4	4	4
		M	4	4	4	4	4
Aperto da cauda	4	F	4	4	4	4	4
		M	4	4	4	4	4
Contorção	0	F	0	0	0	0	0
		M	0	0	0	0	0
Trem posterior	0	F	0	0	0	0	0
		M	0	0	0	0	0
Endireitamento	4	F	4	4	4	4	4
		M	4	4	4	4	4
Tônus muscular	4	F	4	4	4	4	4
		M	4	4	4	4	4
Força de agarrar	4	F	4	4	4	4	4
		M	4	4	4	4	4
Ataxia	0	F	0	0	0	0	0
		M	0	0	0	0	0
Reflexo auricular	4	F	4	4	4	4	4
		M	4	4	4	4	4
Reflexo corneal	4	F	4	4	4	4	4
		M	4	4	4	4	4
Tremores	0	F	0	0	0	0	0
		M	0	0	0	0	0
Convulsões	0	F	0	0	0	0	0
		M	0	0	0	0	0
Estimulações	4	F	4	4	4	4	4
		M	4	4	4	4	4
Straub	0	F	0	0	0	0	0
		M	0	0	0	0	0
Hipnose	0	F	0	0	0	0	0
		M	0	0	0	0	0
Anestesia	0	F	0	0	0	0	0
		M	0	0	0	0	0
Lacrimação	0	F	0	0	0	0	0
		M	0	0	0	0	0
Ptose	0	F	0	0	0	0	0
		M	0	0	0	0	0
Micção	4	F	4	4	4	4	4

		M	4	4	4	4	4
Piloereção	0	F	0	0	0	0	0
		M	0	0	0	0	0
Defecação	4	F	4	4	4	4	4
		M	4	4	4	4	4
Hipotermia	0	F	0	0	0	0	0
		M	0	0	0	0	0
Respiração	4	F	4	4	4	4	4
		M	4	4	4	4	4
Cianose	0	F	0	0	0	0	0
		M	0	0	0	0	0
Morte		F	-	-	-	-	-
		M	-	-	-	-	-

Códigos: Testes com anotação normal "0", a intensidade do efeito varia na escala de 1 a 4

Teste com anotação normal "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.

*M= macho; F= fêmea

Descrição dos parâmetros a serem analisados

Recomendações

- 1) Todos devem ser analisados em relação ao grupo controle negativo
- 2) Para cada análise utilize somente 2 animais por caixa e não utilizar os mesmos para análises sucessivas, sempre revezar (trocar o animal).

- Aparência geral: observação do comportamento geral dos animais, como nível de agitação, brigas, movimentação, etc
- Frênito vocal: emissão frequente de ruídos, vocalização.
- Irritabilidade: reação ao indivíduo que está ao lado ou ao manuseá-lo
- Resposta ao toque: utilize uma pinça ou caneta, em direção ao focinho do animal, até que ele desvie.
- Aperto da cauda: pressionar a ponta da cauda do animal com um a pinça (sempre buscando a mesma intensidade). O animal movimenta a cauda rapidamente desde que esteja em condições normais.
- Contorção: o animal faz movimentos sinuosos (em "S").
- Trem posterior: se as patas posteriores dos animais estão abaixadas.
- Endireitamento: segurando o rabo do animal, deve-se realizar movimentos que projetem o animal contra a bancada (de maneira sutil) em diferentes posicionamentos do corpo (projetar as costas, lado direito e esquerdo) de modo a observar a capacidade do animal de reconhecer a alteração espacial causada pelo movimento, simulando um a queda livre.

- Tônus muscular: puxar a pele do animal para verificar a capacidade de retorna à condição normal.
- Força de agarrar: o animal deve ser posto em contato com a grade de caixa e assim deve ser puxado pelo rabo para medir a força com que ele agarra a grade.
- Ataxia: posicionar o animal na borda da caixa para ver se sua capacidade de caminhar em linha reta se mantém.
- Reflexo auricular: mexer a orelha do animal com uma pinça.
- Reflexo corneal: levar uma pinça ou algo pontiagudo em direção ao olho do animal. A resposta normal seria o animal fechar os olhos rapidamente.
- Tremores: comparação com o controle.
- Convulsões: são medidas de forma subjetiva de 1 a 4 de acordo com a severidade e duração.
- Estimulações: movimentos repentinos.
- Straub: cauda levantada como se fosse um mastro de bandeira.
- Hipnose: os animais dormem agrupados.
- Anestesia: pressionar o dedo ou a pata do animal com a pinça, o animal normal rejeita o estímulo rapidamente.
- Lacrimação: comparação com o controle.
- Ptose: olhos meio cerrados.
- Micção: considerar subjetivamente a frequência e quantidade (colocar papel toalha no fundo)
- Piloereção: a gradação é analisada subjetivamente do aspecto do pêlo.
- Defecação: verificar a alteração e a consistência das fezes.
- Hipotermia: tocar o animal e verificar se há alteração na temperatura dos animais em relação ao controle.
- Respiração: comparar com o normal.
- Cianose: observar a cor da orelha, patas dos animais se estariam azulados.
- Morte: contar o número de animais que morreram.