

Zeila Pinheiro Lima

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA DOS
EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Alchornea glandulosa* E *Alchornea
triplinervia*.**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências de Botucatu da Universidade
Estadual Paulista – UNESP, para obtenção
do título de mestre em Ciências Biológicas
(área de concentração: Farmacologia) .

ORIENTADORA: PROFA. DRA. CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA

CO-ORIENTADORA: PROFA.DRA.CLAUDIA HELENA PELLIZZON

BOTUCATU-SP

2006

UM MANUAL DE SOBREVIVÊNCIA

“Depois de algum tempo você aprende a diferença, a sutil diferença entre dar a mão e acorrentar uma alma. E você aprende que amar não significa apoiar-se. E que companhia nem sempre significa segurança. E começa aprender que beijos não são contratos e nem promessas. E começa a aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olhos adiante, com a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança.

E aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos, e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão. Depois de um tempo você aprende que o sol queima se ficar exposto por muito tempo. E aprende que não importa o quanto você se importe, algumas pessoas simplesmente não se importam... e aceita que não importa quão boa seja uma pessoa, ela vai feri-lo de vez em quando e você precisa perdoá-la por isso. Aprende que falar pode aliviar dores emocionais.

Descobre que leva-se um certo tempo para construir confiança e apenas segundos para destruí-la, e que você pode fazer coisas em um instante, das quais se arrependerá pelo resto da vida.

Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias. E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida. E que bons amigos são a família que nos permitem escolher.

Aprende que não temos que mudar de amigos se compreendemos que os amigos mudam, percebe que seu melhor amigo e você podem fazer qualquer coisa, ou nada e terem bons momentos juntos. Descobre que as pessoas com quem você mais se importa na vida são tomadas de você muito depressa... Por isso, sempre devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas, pode ser a última vez que as vejamos.

Aprende que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos. Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser. Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto.

Aprende que não importa aonde já chegou, mas onde está indo, mas se você não sabe onde está indo, qualquer lugar serve. Aprende que, ou você controla seus atos ou eles o controlarão. E que ser flexível não significa ser fraco ou não ter personalidade, pois não importa quão delicada e frágil seja uma situação sempre existem dois lados.

Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando as conseqüências. Aprende que paciência requer muita prática. Descobre que algumas vezes, a pessoa que você espera que o chute quando você cai, é uma das poucas que o ajudam a levantar-se.

Aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que você aprendeu com elas, do que com quantos aniversários você celebrou.

Aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha.

Aprende que nunca se deve dizer a uma criança que sonhos são bobagens, poucas coisas são tão humilhantes e seria uma tragédia se ela acreditasse nisso.

Aprende que quando está com raiva tem o direito de estar com raiva, mas isso não te dá o direito de ser cruel.

Descobre que só porque alguém não o ama do jeito que você quer que ame, não significa que esse alguém não o ama com tudo o que pode, pois existem pessoas que nos amam. Mas simplesmente não sabem como demonstrar ou viver isso.

Aprende que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém, algumas vezes você tem que aprender a perdoar-se a si mesmo.

Aprende que com a mesma severidade com que julga, você será em algum momento condenado.

Aprende que não importa em quantos pedaços seu coração foi partido, o mundo não pára para que você o conserte.

Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás. Portanto, plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores.

E você aprende que realmente pode suportar...

Que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe... depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida”.

(W. Shakespeare)

Auxílio financeiro : CAPES

DEDICATÓRIAS E AGRADECIMENTOS:

Tentar e falhar é, pelo menos, aprender. Não chegar a tentar é sofrer a inestimável perda do que poderia ter sido. (Geraldo Eustáquio)

A DEUS:

Por acreditar que DEUS sempre escreve certo por linhas tortas...

À MEUS PAIS:

“Bondade é amar as pessoas mais do que elas merecem. (Joseph Joubert)”

Que durante toda a minha vida forneceram uma base sólida para que eu pudesse ser o que quisesse... Por me sentir amparada e protegida, pois me apoiaram e me ajudaram e estiveram presentes em todos os momentos... Amo vocês!

AO “MEU” MARCELO:

“Mas o teu amor me cura de uma loucura qualquer, encostar no teu peito esse isso for algum defeito por mim tudo bem...”

Por me amar do jeito que eu sou... Por estar presente na minha vida em todos os momentos bons e ruins, ajudando ou simplesmente não atrapalhando, mas sempre se esforçando pra me fazer feliz, por mais que isso signifique me ver fazer tudo errado e me esperar voltar e procurar teu colo. Seu companheirismo e carinho têm me ajudado e fortalecido. Te amo !

AOS FAMILIARES:

Agora que estou escrevendo estou me dando conta de quanta gente se preocupa comigo, minhas tias queridas, primas, primos e avós...Gente valeu a força!

À MINHAS IRMÃS:

“Amigo é coisa pra se guardar debaixo de sete chaves, dentro do coração.” (Fernando Brant)

Minha irmã de verdade Lizia, minha prima Ludmila e minha grande amiga Juliana, que sempre estiveram do meu lado desde o vestibular...E sempre vão estar, agradeço pelo apoio e pelas conversas...

AOS AMIGOS:

*“Aqueles que passam por nós”.
não nos deixam sós.
Deixam um pouco de si,
levam um pouco de nós“*

Antoine de Sant-Exupery

AOS AMIGOS DO LABORATÓRIO:

Aos meus amigos do laboratório, os antigos: Gaiz, Melada, Enxente, Kenny, Bruna. Aos atuais Thiago, Vítor, Pompom, Renata, Paty, Fábio, Catharine e Pocotó. Agradeço por escutarem os meus problemas, compartilharem dificuldades e tornarem o ambiente de trabalho agradável.

Agradeço ao pessoal de Campinas: Maíra, Vítor, Elis pela ajuda nos experimentos.

Em especial ao VÍTOR (CEBÓLA) obrigada pela amizade, pelos chocolates e por todos os ratos...

AS MINHAS AMIGAS DA FACULDADE:

Relaxo, Melão, Erva e Tarada... Pelas baladas, pelos conselhos, conversas e pelo bolo de chocolate que cura tudo!

AS MINHAS AMIGAS DA FARMACO:

Aline, Carol, Claudinha, Débora e Érika, por partilharmos nossas inseguranças não só sobre a dissertação, qualificação, mas sobre a vida. Beijos meninas se cuidem!

À PROFESSORA LUCIA ROCHA

Pela ajuda na qualificação. Obrigada!

À PROFESSORA MARIA DE LURDES

Por tornar o estágio de docência realmente proveitoso.

À PROFESSORA CLAUDIA HELENA PELLIZZON

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina. (Cora Coralina)”

Por ser responsável por grande parte do trabalho. Agradeço a paciência que sempre teve e pelas conversas...

À MINHA CHEFE ! CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA

“Ninguém é tão grande que não possa aprender, nem tão pequeno que não possa ensinar.”

Que bom que tem os agradecimentos pra gente dizer o que sente... Sei que muitas vezes fui teimosa, mas tudo que eu fiz foi querendo agradar por te admirar muito! Aprendi que nem sempre o que é bom pra mim é bom pros outros e o que parece óbvio pode não ser! Muito obrigada por tudo, estou mais madura agora, nunca vou esquecer as coisas que aprendi.

OUTROS AGRADECIMENTOS:

Aos animais e plantas que foram utilizados neste trabalho.

A Luis Fernando Rolim por me ajudar na coleta e trazer os extratos .

A todos os professores dos departamentos de farmacologia e fisiologia que contribuíram para minha formação.

Aos funcionários do departamento e da seção de pós-graduação, pela ajuda.

A todos que contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

I- SUMÁRIO

RESUMO

I-INTRODUÇÃO

18

1.1 Considerações gerais sobre úlcera gástrica

18

a) A fisiopatologia da úlcera: *H.pylori* e DAINES

22

b) Modulação da secreção ácida

23

c) Fatores protetores

25

d) Tratamento clínico

25

1.2 Plantas medicinais

29

1.3 As espécies estudadas

31

a) O gênero *Alchornea*

31

b) *Alchornea glandulosa*

32

c) *Alchornea triplinervia*

34

II-OBJETIVOS

37

III- MATERIAL E MÉTODOS

39

IV- RESULTADOS

50

Artigo *Alchornea glandulosa*

50

Artigo *Alchornea triplinervia*

85

Resumos dos resultados

131

IV- DISCUSSÃO

133

V- CONCLUSÃO

144

VI- REFERENCIAS

146

VII-ANEXOS E COMPLEMENTOS

158

RESUMO

Espécies do gênero *Alchornea* foram citadas num levantamento realizado por E.S. Costa e C.A. Hiruma-Lima no estado do Tocantins, Brasil em dezembro de 2000. Várias espécies deste gênero são conhecidas popularmente como tapiá, tanheiro-de-folha-redonda, iporuru e tem seus usos medicinais amplamente explorados. Considerando-se o uso popular avaliou-se as atividades gastroprotetora e cicatrizante dos extratos metanólicos de *Alchornea glandulosa* e *Alchornea triplinervia*. As frações também foram avaliadas com o objetivo de descobrir novos compostos com atividade antiúlcera e bem como seus prováveis mecanismos de ação. Nenhum dos extratos mostrou toxicidade aguda na dose de 5000 mg/Kg. Nos modelos de úlceras agudas induzidas por etanol e HCl-etanol, foi possível constatar que ambos os extratos reduziram significativamente as lesões gástricas em relação aos seus respectivos grupos controles. No modelo de úlceras induzidas por piroxicam houve aumento das lesões gástricas nos animais tratados com extrato metanólico de ambas espécies. A partir destes resultados selecionou-se a dose mais efetiva para investigação do possível mecanismo de ação dos extratos. Os parâmetros de secreção gástrica foram avaliados para *Alchornea glandulosa* e *Alchornea triplinervia* em camundongos submetidos à ligadura do piloro, onde se observou uma redução da concentração de íons H^+ do conteúdo gástrico em animais pré-tratados com extratos metanólicos pelas vias oral e intraduodenal. Não foi constatado envolvimento do óxido nítrico ou do grupamento sulfidríla na gastroproteção de ambos extratos. As frações aquosa e acetato de *Alchornea triplinervia* foram avaliadas quanto ao seu efeito gastroprotetor frente ao etanol absoluto. A fração acetato se mostrou mais eficaz do que a aquosa, em exercer a gastroproteção. A dose de 100mg/Kg foi selecionada para a realização dos experimentos, sendo realizada a quantificação de PGE2 da mucosa gástrica. Houve um aumento na produção/síntese de PGE2 da mucosa gástrica dos animais pré-tratados com a fração acetato de *A. Triplinervia* em relação aos controles. O extrato de *Alchornea glandulosa* (250 mg/Kg) e a fração de *Alchornea triplinervia* (100 mg/Kg) foram avaliados quanto ao seu

efeito cicatrizante das úlceras induzidas por ácido acético, onde se realizou análises histológicas e imunohistoquímicas. Os tratamentos não mostraram diferenças significativas nas áreas de cicatrização em uma análise macroscópica. Na análise histológica apontou um aumento nas áreas de regeneração da mucosa gástrica dos animais tratados com relação aos controles. Na análise imunohistoquímica de *Alchornea triplinervia* são observados os aumentos de células positivas marcadas para a enzima COX-2, aumento de células produtoras de somatostatina e diminuição de células produtoras de gastrina. Os resultados obtidos justificam o uso popular de ambas as espécies, com efeito, gastroprotetor e cicatrizante da mucosa gástrica e o principal mecanismo de ação da fração acetato de *Alchornea triplinervia* está na modulação de PG endógenas.

ABSTRACT

Species of the *Alchornea* genus had been cited in a survey carried through for E.S. Costa and C.A. Hiruma-Lima in the state of the Tocantins, Brazil in December of 2000. Some species of this genus are known how iporuru, tapiá, popularly tanheiro de folha redonda and have its widely explored medicinal uses. Considering the popular use we had evaluated the activities gastroprotective and healing of methanolic extracts of *Alchornea glandulosa* and *Alchornea triplinervia*. The fractions had been also evaluated with the objective to discover new compounds with activity antiulcer and its probable mechanisms of action. None of extracts showed acute toxicity in the dose of 5000 mg/Kg. In the models of induced acute ulcers for ethanol and HCl-ethanol, it was possible to evidence that both the extracts had significantly reduced the gastric injuries in relation to its respective groups controls. In the model of induced ulcers for NSAID it had increase of the gastric injuries in the animals treated with methanolic extract of both species. From these results the more effective dose was selected for inquiry of the possible mechanism of action of extracts. The gastric secretion parameters had been evaluated for *Alchornea glandulosa* and *Alchornea triplinervia* in mice submitted to the ligation of piloro, where was observed a reduction of the concentration of H⁺ ions of the gastric content in animals treated with methanolic extracts for oral and intraduodenal routes. Involvement of nitric oxide or the endogenous sulphhydryl compounds was not evidenced in the mechanism of gastroprotection of both extracts. The aqueous and acetate fractions of *Alchornea triplinervia* had been evaluated for its gastroprotector effect front to absolute ethanol. The acetate fraction showed more efficient than the aqueous fraction, in exerting the gastroprotection in this model. The dose of 100mg/Kg was selected for the segment of the experiments, being carried through the quantification of PGE₂ of the gastric mucosa. It had an increase in production of PGE₂ of the gastric mucosa of the animals treated with the fraction acetate of the *A. Triplinervia* in relation to the control ones. The extract of *Alchornea glandulosa* (250 mg/Kg) and the fraction of *Alchornea triplinervia* (100

mg/Kg) had been evaluated for this healing effect of the induced ulcers for acetic acid, where if it carried through histologys and imunohistochemical analysis. The treatments had not shown significant differences in the in healing areas in a macroscopic analysis. In the histologic analysis it pointed an increase in the areas of regeneration of the gastric mucosa of the treated animals in the relation to the controls ones. In imunohistochemical analysis we observed a large number of COX₂ cells main in the submucosa and the results shows that G cells declined while D cells increased. The results justify the popular use of both species with gastroprotective and healing effects and the main mechanism of action of the acetate fraction of *Alchornea triplinervia* is in the modulation of endogenous PG.

I – INTRODUÇÃO

I.1- Considerações Gerais sobre úlcera gástrica

Antigamente a dispepsia, era atribuída unicamente ao excesso de comida, porém apenas em 1900 foi levado em conta que úlcera gástrica, tem sido uma das maiores causas de morbidade e mortalidade. O desenvolvimento de tecnologias levou a um aumento dos diagnósticos (Grob, 2004). Distúrbios gastrointestinais como as úlceras pépticas ocorrem em número expressivo tanto em países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento (Dayal e Delellis, 1991). As úlceras são tão comuns que, cerca de 10% da população, carregam ao longo de suas vidas, esta patologia ou seqüelas deixadas por ela (Lewis e Hanson, 1991).

Atualmente considera-se que 25% da população dos EUA já tiveram alguma desordem relacionada à acidez gástrica e o custo de medicamentos para suprimir a acidez chega a US\$ 1.3 bilhões por ano (Manjumdar et al., 2003). Apesar da ausência de registros epidemiológicos, existem estimativas no Brasil de centenas de milhares de casos envolvendo esse tipo de patologia por isso as drogas antiulcerogênicas possuem tanto importância de utilização, quanto mercadológica (Alper, 1993).

a) A fisiopatologia das úlceras

A fisiopatologia da úlcera gástrica está centrada em um desbalanço entre fatores agressores e protetores no estômago (Chan e Leung, 2002). Os fatores agressores incluem ácido clorídrico juntamente com bile e enzimas pancreáticas, os fatores de defesa incluem muco, bicarbonato secretado pelas células epiteliais superficiais, prostaglandinas, compostos sulfidríla e a manutenção do fluxo sanguíneo da mucosa (Coelho, 1998).

Atualmente sabe-se que uma das causas principais para o surgimento de úlceras gástricas é a infecção por uma bactéria chamada *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). A segunda causa é o uso constante ou indiscriminado de medicações para dor chamado de antiinflamatórios não esteróides (DAINEs). Estudos relacionam que 80% das úlceras na população estão relacionadas a *H.pylori* e ao uso de DAINEs. Existem ainda outros fatores envolvidos como cigarro, personalidade, estresse psicológico, alimentação ou fatores genéticos (Konturek et al., 2003). Fumantes são mais propensos a úlceras, estudos realizados por Bielansky. (1990) demonstrou que a infecção por *H.pylori* aumenta em fumantes.

- *Helicobacter pylori*

O prêmio Nobel de fisiologia e medicina 2005 foi para os cientistas Robin Warren e Barry Marshall, pela descoberta da influência do *Helicobacter pylori* em úlceras gástricas; reconhecendo que o trabalho afeta a saúde de milhares de pessoas pelo mundo e incentivando ao estudo da microbiota humana (Hassan, 2005).

Existem hoje várias evidências que conferem à infecção pelo *H. pylori* um papel importante na etiopatogenia da doença ulcerosa gastroduodenal. O microorganismo está presente em aproximadamente 95% dos casos de úlcera gastroduodenal e em 80% dos pacientes portadores de úlcera gástrica. Há uma variação da prevalência da infecção *H. pylori* entre diferentes países, faixas etárias e níveis sócio-econômicos. Nos países desenvolvidos, existe um progressivo aumento da infecção com a idade, sendo pouco freqüente na infância e acometendo cerca de 50% da população na velhice. A infecção do antro gástrico pelo *H.pylori* induz a uma hipersecreção ácida através da inibição das células produtoras de somatostatina e conseqüente aumento da liberação de gastrina pelas células G do antro gástrico (El-Omar et al., 1995).

Atualmente o grande avanço na área das úlceras é o uso de antibióticos para combater o *H.pylori*. Estudos demonstram que atualmente com o uso de medicações para bloquear a produção de ácido do estômago associado a antibióticos para erradicação do *H.pylori*, pode-se obter uma cura de 80-90 %. Vários outros estudos mostram que um número considerável de pessoas têm a bactéria no estômago, mas não desenvolvem úlceras. A explicação encontrada por alguns cientistas é que além da infecção pela bactéria o paciente tem uma predisposição genética a ter úlcera; 30 a 40% dos pacientes portadores de úlcera péptica têm familiares de primeiro grau acometidos pela doença (Coelho, 1998).

-DAINEs

Drogas antiinflamatórias não esteroidais (DAINEs), por exemplo, aspirina; estão entre as drogas mais consumidas mundialmente por suas propriedades analgésicas, antipiréticas e antiinflamatórias; entretanto apesar dos ótimos benefícios associados com as DAINEs, mais de 25% dos pacientes que usam DAINEs cronicamente têm efeitos adversos no trato gastrointestinal, pois estas drogas levam a inibição de prostaglandinas (Chan e Graham, 2004).

DAINEs são hoje considerados como uma causa estabelecida de úlcera péptica, podendo ocorrer após administração oral ou sistêmica das drogas (Singh e Tradafilopoulos, 2005). Acredita-se que as DAINEs promovam lesão gastroduodenal por dois mecanismos independentes, ou seja, diretamente por efeito tóxico direto, ao nível do epitélio mucoso e sobre os mecanismos de defesa da mucosa gastroduodenal, resultando em aumento da permeabilidade celular, inibição do transporte iônico e da fosforilação oxidativa, e, sistematicamente, enfraquecendo os mecanismos de defesa através a inibição da cicloxigenase (Wallace, 2000).

A identificação de duas isoformas levou a idéia de que apenas a supressão da COX-2, poderia exercer efeitos antiinflamatórios sem causar irritação no estômago (Wallace, 2003). O que levou ao desenvolvimento dos inibidores de COX-2 altamente seletivos, que são uma nova classe de medicamentos que causa menos danos gástricos quando comparados aos inibidores não seletivos (Chan e Graham, 2004). Entretanto, há evidências que COX-2 também contribuem para a defesa da mucosa gástrica (Wallace, 2005).

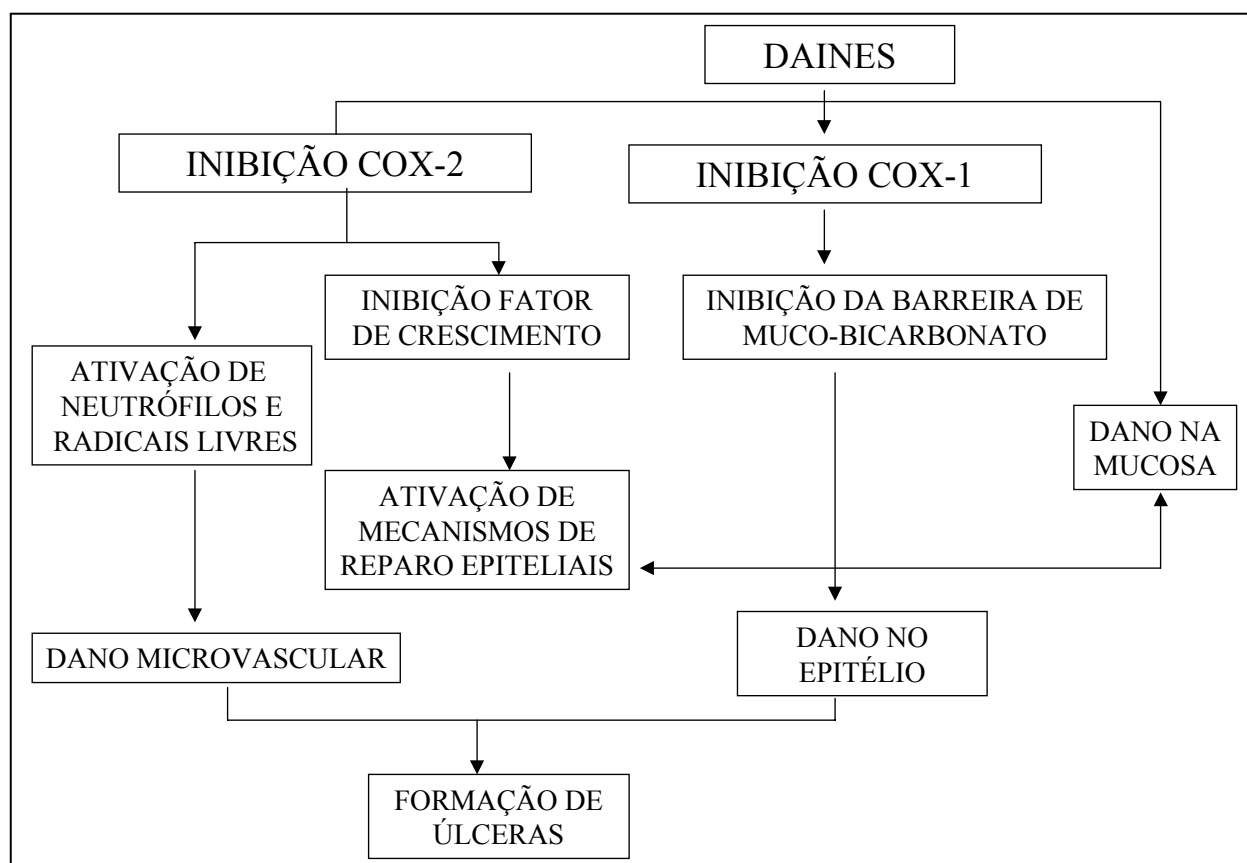


FIGURA 1- Mecanismo pelo qual DAINES causam úlceras, adaptado de Gudis e Sakamoto, 2005.

b) Modulação da secreção ácida

O estômago em condições normais, secreta ácido continuamente, numa média de 15% de sua capacidade secretora máxima sendo evidenciada num ciclo circadiano, com um pico máximo de secreção próximo à meia-noite e um pico mínimo ao amanhecer. A secreção basal de ácido clorídrico é estimulada pela ação da histamina, acetilcolina e gastrina, e inibida pelos bloqueadores da histamina e da acetilcolina. Após a ingestão de um alimento, o aumento da secreção ácida é observada antes do alimento atingir o estômago. O ato de mastigar ou mesmo de pensar num alimento – através do reflexo vagal – estimula principalmente as células parietais e atua secundariamente sobre as células G do antro gástrico, liberando pequenas quantidades de gastrina, o que por sua vez, irá provocar aumento da secreção ácida (Guyton, 2002).

A presença de alimentos no estômago causa distensão gástrica e estímulo do reflexo vasovagal, provocando aumentos da secreção ácida. Além disso, os produtos da digestão de proteínas desses alimentos atuam diretamente sobre as células G, liberando gastrina e, conseqüentemente, aumentando a secreção ácida gástrica (Aihara et al., 2003).

As glândulas oxínticas da mucosa gástrica do mamífero correspondem às unidades secretoras do estômago e são formadas por diferentes tipos celulares: células parietais, células principais, células secretoras de muco, células endócrinas (G e D) que secretam o ácido clorídrico, pepsinogênio, muco, gastrina e somatostatina respectivamente. Na célula parietal existem duas principais vias de sinalização: a via dependente do AMP cíclico e a via dependente do Ca^{2+} . A histamina utiliza a primeira via, enquanto a gastrina e a acetilcolina exercem seus efeitos por meio da última. A via dependente do AMP cíclico resulta na fosforilação de proteínas efetoras da célula parietal e a via dependente do Ca^{2+} leva a um aumento do cálcio citosólico. Ambas as vias ativam a H^+ , K^+ ATPase (Brunton, 2005). A

célula parietal também possui receptores inibitórios para EGF e PGE₂ (prostaglandina E₂), baixas concentrações de PGs do subtipo E₂ inibem a secreção ácida. Foi também demonstrado que receptores para EGF (fator de crescimento epidermal) inibem seletivamente a liberação de histamina em células de coelho (Hirchowitz et al.,1995).

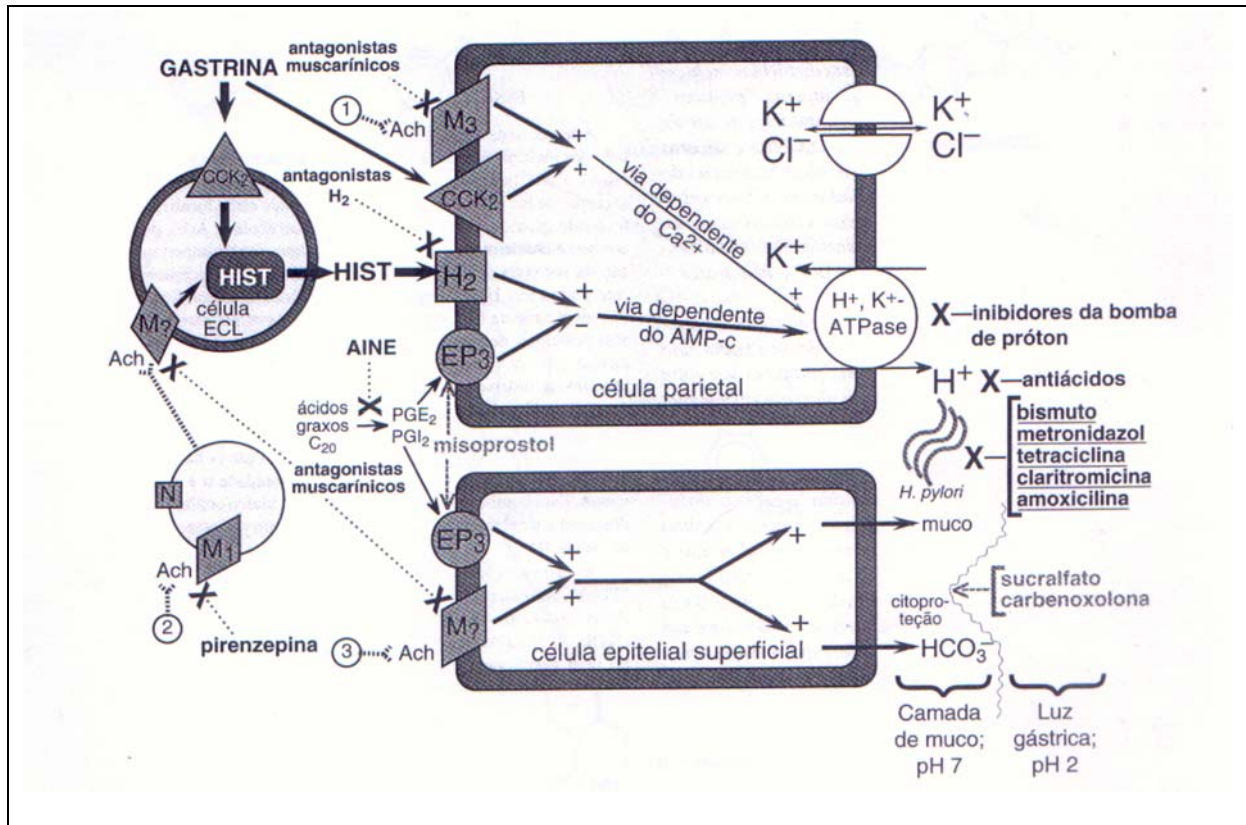


FIGURA 2- Regulação fisiológica e farmacológica das secreções gástricas: a base para o tratamento da doença ulcerosa péptica (Brunton, 2002 in: Goodman e Gilman, 2005).

c) Fatores protetores

A proteção pré-epitelial é feita pela barreira de muco-bicarbonato, secretada pelas células mucosas, mantendo a superfície epitelial próxima de um pH neutro. Em humanos a secreção de bicarbonato é um processo ativo e ativado pela estimulação vagal e distensão fúndica. Muitos mecanismos no nível epitelial celular contribuem para manter a barreira mucosa intacta. O fluxo sanguíneo é essencial em suprir os epitélios via nutrientes e oxigênio.

Prostaglandinas podem manter o fluxo sanguíneo da mucosa e prevenir o dano vascular epitelial causado por etanol (OH et al., 2005).

Muitos agentes têm se estabelecido como fatores protetores da mucosa. PGs possuem ações citoprotetoras, enquanto sucralfato, antiácidos contendo alumínio, carbenoxolona e bismuto e induzem a liberação de PGs na mucosa (Forssell, 2003).

A síntese de PGs depende da atividade da ciclooxigenase (COX), uma enzima responsável pela produção de prostanóides. Duas isoformas de COX foram identificadas nas células; uma enzima constitutiva designada como COX-1 e uma isoforma induzível como COX-2. COX-1 parece ser responsável pela produção de PG que é fisiologicamente importante em funções homeostáticas, como manter a integridade da mucosa e o fluxo sanguíneo (Brzozowski, 2005). COX-2 parece representar uma segunda linha de defesa, que é ativada durante a cicatrização da úlcera para compensar a perda temporária de COX-1. (Villegas, 2004). A COX-2 é expressa em células inflamatórias e fibroblastos na mucosa gástrica, e através da produção de vários fatores de crescimento incluindo fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e crescimento vascular endotelial (VEGF), têm um papel chave na reparação de tecidos (Gudis, 2005).

O óxido nítrico (NO) tem adquirido cada vez mais atividade; o óxido nítrico tem promovido aumentar o fluxo sanguíneo do local de estimulação da secreção de muco e inibir a aderência de neutrófilos (Chan e Leung, 2002). O NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina pela NO-sintase (Tsukimi e Okabe, 2000). Ele regula a secreção de muco, aumenta a motilidade gástrica e melhora a microcirculação (Tsukimi e Okabe, 2000). A citoproteção gástrica em decorrência de um agente agressor é mediada, em parte, pelo NO endógeno e pelas interações entre essas substâncias vasoativas, neuropeptídeos e prostaglandinas (Holzer, 1998).

O óxido nítrico tem um importante papel na barreira gástrica, entretanto a interação entre espécies reativas de oxigênio e NO tem sido pouco estudada (Kwiecen et al., 2002). Compostos sulfidrílicos estão envolvidos na manutenção da integridade gástrica, particularmente quando espécies reativas de oxigênio estão envolvidas na patofisiologia do dano (Kimura, 2001). O mecanismo de gastroproteção das sulfidrilas é similar ao das prostaglandinas endógenas. Compostos sulfidrílicos sequestram radicais livres e consequentemente previnem danos causados pela peroxidação lipídica (Lopez et al., 1996).

d) Tratamento Clínico

O tratamento de a úlcera péptica objetiva restabelecer o equilíbrio da mucosa gastroduodenal rompido, seja por aumento dos fatores agressivos – ácido clorídrico, pepsina, bile, medicamentos ulcerogênicos e *H. pylori* – seja por redução dos fatores defensivos locais – secreção de muco, bicarbonato e prostaglandinas – ou, ainda, por ambos os desvios.

A terapêutica ideal é aquela que:

Alivia a dor e induz cicatrização mais rápida da úlcera (terapêutica sintomática) e previne as recidivas, promovendo a cura definitiva da doença (terapêutica curativa) (Proclim, 2004).

A solução terapêutica para as úlceras pépticas, foi durante séculos a restrição alimentar, repouso, neutralização do suco gástrico com antiácidos e em último caso a intervenção cirúrgica (Weir, 1988).

A compreensão da fisiologia da secreção ácida gástrica contribui para o entendimento dos vários caminhos que promovem a inibição da secreção ácida. Farmacologicamente, podemos utilizar antiácidos, inibir a capacitação da acetilcolina por receptores muscarínicos, inibição da histamina pela ação de bloqueadores de H₂, inibição da gastrina por ação de um antagonista do receptor de gastrina, inibição da secreção gástrica por aumento das defesas mucosas principalmente por prostagandinas E₂ e inibição do passo final da secreção, que são os mais potentes inibidores, por exemplo, o omeprazol e lansoprazol (Mossner e Caca, 2005).

A estratégia utilizada hoje, com o reconhecimento da importância do *H.pylori*, consiste na utilização de um anti-secretor, usualmente um inibidor da bomba de prótons associado a um antibacteriano por um período de 7 a 10 dias (Malfertheiner, 2000).

Drogas inibidoras da secreção ácida têm sido largamente usadas. A introdução de antagonistas de receptor de histamina H₂ (cimetidina, ranitidina) em 1970 marcou uma nova era no tratamento de distúrbios relacionados ao ácido gástrico. Nos anos 80 os inibidores da bomba de prótons foram introduzidos no mercado, com resultados mais efetivos mais efetivos que possibilita a abolição da secreção ácida completamente. Muitos estudos sugerem que doses normais de antagonistas H₂ podem prevenir úlceras duodenais, mas que o efeito em úlceras gástricas é muito limitado (Hawkey, 2000). Os bloqueadores H₂ inibem a secreção do ácido clorídrico através da ligação com os receptores H₂ localizados na membrana basolateral das células parietais. A sua administração contínua parece promover um efeito mais estável da supressão ácida. Apesar de sua eficácia comprovada, estas drogas apresentam vários efeitos colaterais como hipotensão, arritmias cardíacas, interação medicamentosa com benzodiazepínicos, teofilina, lidocaína, fentanil, midazolam, anemia, granulocitopenia, trombocitopenia, alteração do nível de consciência, entre outros (Beejav e Wolf, 2000). Esses agentes têm relativamente curta duração de ação, seus efeitos sofrem interferência da secreção gástrica estimulada por alimentos, além disso, a tolerância pode ser

desenvolvida em poucos dias de uso de doses contínuas, um fenômeno clinicamente relevante em alguns pacientes (Andersson, 2005).

Bloqueadores da bomba de prótons têm se mostrado efetivos em prevenir o desenvolvimento de úlceras gástricas e duodenais em pacientes que utilizam DAINES, e também são eficazes para cicatrizar e prevenir as recidivas (Singh e Triadafilopoulos, 2005). São reconhecidos por serem superiores aos antagonistas H_2 . Essa superioridade é atribuída ao fato de inibir a H^+K^+ -ATPase independente da natureza dos estímulos. Esta droga é instável em pH baixo, como o do estômago e precisa estar protegido em cápsulas de absorção entérica, o que dificulta muitas vezes a administração (Andersson, 2005).

Os inibidores da bomba de próton são substâncias precursoras que são metabolizadas em uma sulfonamida ativa no meio extremamente ácido dos canalículos secretores das células parietais. Atuam inibindo especificamente a enzima H^+K^+ -ATPase nas células parietais, diminuindo a secreção ácida do estômago. Em adultos, têm mostrado uma maior eficácia em relação aos bloqueadores H_2 , porém em crianças a dose e a segurança ainda não estão bem estabelecidas (Beejav e Wolf, 2000). Atualmente, existem quatro tipos de inibidores da bomba de prótons: o omeprazol, lansoprazol, pantoprazol e rabeprazol, sendo que somente os dois primeiros estão disponíveis comercialmente no Brasil (Gurgueira e Maranhão, 2000). Dentre os efeitos colaterais relatados, destacam-se: diarreia, cefaléia e reações cutâneas (Fox, 2000).

O tratamento descontinuado e a suspensão abrupta dos medicamentos podem levar a recidivas graves de doença ulcerosa. Dados clínicos revelam aumento da secreção logo após a parada do tratamento com antagonistas de receptor H_2 ou com inibidores da bomba de prótons, como resultado de um mecanismo compensatório da elevação de gastrina, mas apenas poucos estudos se dedicam à consequências dessa hipersecreção rebote, sendo ainda necessários maiores esclarecimentos (Qvigstad e Waldum, 2004).

Outros fármacos, agentes citoprotetores, também foram desenvolvidos, em virtude do papel desempenhado pelas prostaglandinas no estômago; estes, além de inibirem a secreção ácida-gástrica, estimulam os mecanismos de proteção da mucosa, ou seja, a proteção de muco e bicarbonato, o que produz uma barreira física sobre a superfície da úlcera (Robert et al., 1981). Um análogo das prostaglandinas: misoprostol é teoricamente uma “reposição fisiológica”, mas seus efeitos prolongam-se além do estômago. Os efeitos adversos do misoprostol como seus benefícios são dose-dependentes, eles incluem diarreia e dor abdominal que comprometem sua eficácia e tolerância; além de alto custo (Hawkey, 2000; Beejav e Wolf, 2000, 2000). Outra droga citoprotetora é a carbenoxolona, que atua inibindo enzimas que inativam prostaglandinas e suprimindo a ativação de pepsinogênio (Brunton, 1996).

Apesar de todo o histórico, ainda não há uma droga que produza 100% de remissão das úlceras gastroduodenais com reduzido efeito colateral que não comprometa o paciente que geralmente faz uso deste tipo de medicamento cronicamente (Alper, 1993).

Borelli e Izzo (2000) apresentaram uma grande variedade de substâncias químicas isoladas de plantas que apresentam experimentalmente atividade antiulcerogênica indicando o importante potencial destes princípios ativos na descoberta de novas terapêuticas para as úlceras pépticas.

I.2- Plantas medicinais

A Utilização das plantas medicinais é uma das mais antigas práticas medicinais da humanidade, onde se constata que 25% dos fármacos prescritos em todo mundo são de origem vegetal. No início da década de 90, a organização mundial de saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população de países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos da saúde (Akerle, 1993).

Apesar do grande avanço da medicina alopática, existem obstáculos básicos na sua utilização pela população carente, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares, até a obtenção de exames e medicamentos (Veiga Junior et al., 2005). No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas e tóxicas, sendo o seu consumo mais propagado por usuários ou comerciantes (Veiga Junior et al., 2005).

Quando comparada com medicamentos alopáticos, a toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer trivial, mas isto não é verdadeiro, pois as plantas medicinais podem promover problemas sérios de saúde pública, quando se sabe que as pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas ainda são incipientes (Veiga Junior et al., 2005).

Atualmente, é consenso que a pesquisa envolvendo plantas medicinais é muito complexa, envolve diversas variáveis que somente um grande conhecimento acerca de todas as etapas deste tipo de pesquisa poderiam resultar em sucesso neste tipo de abordagem. Para tanto, Di Stasi (1998), sugere uma seleção criteriosa das espécies a serem estudadas, sempre levando em consideração a indicação popular de uso medicinal (etnofarmacologia) e principalmente a participação de uma equipe multidisciplinar que realize, em conjunto, um biomonitoramento químico e farmacológico das substâncias biologicamente ativas. Segundo

Souza-Brito e Souza-Brito. (1996) a pesquisa com plantas medicinais geralmente é cara e em países como o Brasil o investimento em pesquisa geralmente é pequeno e a pesquisa fica restrita a pequenos grupos. É um consenso entre as pessoas da área e segundo Elisabetsky e Wannmacher, (1993) que através da informação etnofarmacológica a chance de obter sucesso na pesquisa é maior.

A investigação etnofarmacológica no Brasil apresenta um grande desafio. A flora brasileira rica e diversificada é destruída progressivamente e a medicina do povo, uma mistura rica dos conhecimentos indígenas, africanos, e europeus baseados em plantas medicinais tropicais, é modificada constantemente através de cultura moderna (Souza-Brito e Souza-Brito, 1996).

As maiores porcentagens no uso de plantas são para resfriados (66 %) ou para doenças do trato digestivo ou intestinal (25%) e úlcera estomacal (36%) (Calixto, 2000) e segundo e Borrelli e Izzo. (2000) e Hiruma-Lima et al. (2001) existe uma variedade de produtos botânicos com atividade antiúlcera; que são fontes potenciais de novas drogas e tem mostrado resultados promissores no tratamento de úlceras gástricas.

I.3- As espécies estudadas

a) O gênero *Alchornea*

Espécies do gênero *Alchornea* foram citadas num levantamento realizado por E.S. Costa e C.A. Hiruma-Lima no estado do Tocantins, Brasil em dezembro de 2000.

Várias espécies são conhecidas popularmente como tapiá, tanheiro-de-folha-redonda, iporuru e dezenas de outras denominações, de acordo com suas localizações geográficas. Em geral, são árvores de 10 a 30 m de altura e ocorrem em vários estados brasileiros, incluindo o estado de São Paulo (Lorenzi, 1998).

Várias espécies do gênero *Alchornea* também têm seus usos medicinais explorados: *Alchornea cordata* é usada como abortivo (Luna,1984); *Alchornea cordifolia* usada para disenteria e como emenagoga, para amenorréia, como abortivo, para úlceras e infecções em geral (Le Grand,1989) e *Alchornea rugosa*, é utilizada como abortivo (Kelly,1985); Tona et al., (1998) isolou flavonóides, taninos, esteróides, terpenos, saponinas e alcalóides em *A. cordifolia* e Osabede, (2003) caracterizou os efeitos antiinflamatórios das folhas e frações desta mesma espécie.

Triterpenóides como taraxerona, friedelina, epifriedelinol, taraxerol, seco-3,4-friedelina e secos-3,4-taraxerona foram isolados do extrato clorofórmico de *Alchornea latifolia*. Estes dois últimos triterpenóides apresentam um anel aberto; demonstrando citotoxicidade *in vitro* em células cancerosas em humanos, bem como inibição da Topoisomerase II (Setzer et al., 2000). Atualmente nosso grupo caracterizou o efeito antiulcerogênico do extrato hidroalcoólico das folhas e casca de *Alchornea castaneaefolia* em modelos experimentais agudos e crônicos da úlcera gástrica em roedores (Hiruma-Lima et al., 2006).

b) *Alchornea glandulosa* Poepp. & Endl.

Possui a sinonímia botânica de *Alchornea iricurana* Casar e é conhecida popularmente como tapiá, tanheiro-de-folha redonda, tanheiro, maria-mole, iricurana, boleiro, araribá, bugé, tamanqueiro, tapiá-guaçu, tapiá-mirim, caixeta, canela-raposa. É encontrada nos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais até o Rio Grande do Sul; principalmente na Floresta Pluvial da Encosta Atlântica (Lorenzi, 1998).

Alchornea glandulosa é uma árvore de 10-20 m de altura, com tronco de 50 a 70 cm de diâmetro. É uma planta dióica, perenifólia, heliófita, seletiva higrófito, pioneira, característica de beira de rios e planícies aluviais da Floresta Pluvial Atlântica (Fig. 1). Ocorre também com menor frequência na floresta latifoliada da bacia do Paraná. É particularmente frequente nas formações secundárias como capoeiras e capoeirões. Ocorre também na mata primária, principalmente nas beiradas e clareiras. Floresce pelo menos duas vezes ao ano, durante os meses de maio-junho e outubro-novembro. Os frutos, por conseguinte, amadurecem em setembro até meados de outubro e dezembro-janeiro (Lorenzi, 1998).

Sua madeira é leve (densidade 0,40 g/cm³), mole, bastante porosa, resistente, pouco elástica, de baixa durabilidade quando em ambientes externos. Podendo ser empregada em carpintaria, para confecção de caixas de embalagens, tabuado para divisões internas, lenha, etc. A árvore, de copa densa, proporciona ótima sombra, podendo ser empregada no paisagismo rural. Como planta pioneira e rústica, não pode faltar nos plantios mistos destinados à recomposição de áreas degradadas de preservação permanente. A filotaxia é definida por folhas subcoriáceas, inteiras, simétricas e pilosas, com forma ovalada, 8-16 cm de comprimento e 6-12 cm de largura e pecíolo de 2-4 cm. O ápice foliar é cuspidado e com margem foliar serrada. Possuem três venações principais características saindo da base obtusa, sendo actinódromas (Lorenzi, 1998).

De *A. glandulosa* foram isolados os esteróides sitosterol e campesterol, além do terpeno loliolida, o alcalóide guanidínico N-1,N-2,N-3-trisopentenilguanidina e o tanino corilagina. Ensaio biológico para avaliação da atividade antimicrobiana mostrou resultados significativos para o extrato MeOH e para a fração alcaloidal. Atividade antifúngica moderada foi observada para o extrato CHCl₃. O extrato também possui também atividade antiproliferativa, e o extrato bruto de *A. glandulosa* apresentou efeito citostático, concentração-dependente, para linhagens de melanoma, mama e pulmão (Conegero et al., 2003).

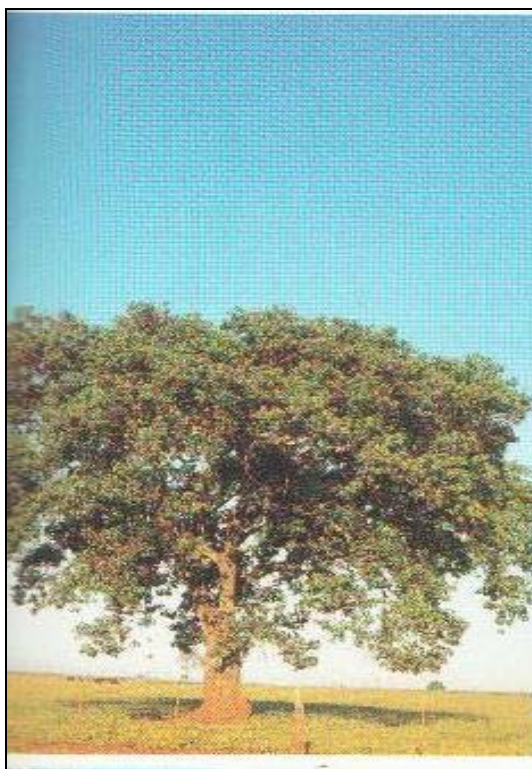


Figura 3: *Alchornea glandulosa* (Lorenzi, 1998).

c) *Alchornea triplinervia* (spreng.) M. Arg.

A espécie *Alchornea triplinervia* possui várias sinonímias botânicas, sendo elas *Andistema triplinervium* Spreng., *Alchornea nemoralis* Mart. e *Alchornea janeirensis* Casar. É conhecida popularmente como tanheiro, tapiá, boleiro, tanaeiro, tapiá-guaçu, tapiá-guaçu-branco, tapiá-mirim, tapiá-vermelho, caixeta, jangada, pau-jangada, algodoeiro, tapiaeiro, canela-raposa, tamanqueiro, pau-de-tamanco e pau-do-tanho. No Brasil, é encontrada da Bahia ao Rio Grande do Sul, na Floresta Pluvial da Encosta Atlântica. Menos comum nas demais florestas pluviais do interior, desde o nível do mar até 1000 m de altitude (Lorenzi, 1998).

É uma árvore de 15-30m de altura, com tronco de 40 a 100 cm de diâmetro, com copa ampla e densa (Fig. 2). Casca externa 19 mm, acinzentada, áspera com fissuras pequenas e pouco profundas, interna fibrosa, marrom-rosada. Alburno indistinto do cerne, bege e uniforme (EUPHORBIACEAE, www.ipef.br/identificacao/nativas/detalhes).

Sua madeira é leve (densidade 0,49 g/cm³), macia, mole, sem cheiro, de baixa resistência mecânica, fácil de trabalhar, de alburno e cerne indistintos, de baixa resistência ao ataque de insetos (cupins) e de rápido apodrecimento quando em condições externas e em contato com o solo. A madeira somente encontra aplicação em caixotaria leve, miolo de portas, cepas de tamanco, muletas e painéis. A árvore pode ser utilizada para reflorestamentos heterogêneos de áreas degradadas de preservação permanente (Lorenzi, 1998). É uma planta dióica, perenifólia, heliófita, pioneira e praticamente indiferente às condições físicas do solo. É característica da Floresta Pluvial Atlântica que sofreu interferência do homem, sendo pouco comum nas florestas clímaxes e abundante nas capoeiras. Produz anualmente moderada quantidade de sementes, amplamente disseminadas por pássaros (Lorenzi, 1998). Floresce durante os meses de outubro-novembro. Inflorescência em forma de panículo, com estrutura

de cacho. Apresentam 4 pétalas, tendo flores amarelas de cerca de 0,3 cm. Possui ráceros laxiflorais axilares, simples ou raramente compostas com até 20 cm de comprimento. As flores masculinas são curtas e pedunculadas e as femininas possuem 3 a 6 sépalas densamente pilosas. Os frutos deiscentes e carnosos amadurecem a partir de dezembro, estendendo-se até janeiro. São de coloração esverdeada com média de 0,8 cm de tamanho, com estrutura capsular bivalve, arredondada, formando sulcos e com estiletes persistentes. A semente (sempre duas) em formato de arilo é castanho-clara com 0,5 cm. A filotaxia é definida por folhas subcoriáceas, inteiras, palminérvias e pouco pilosas, com forma oblonga a elíptica, 3-6 cm de comprimento e 4-8 cm de largura e pecíolo de 2-4 cm. O ápice foliar é obtuso e com margem foliar serrada. Possuem três venações principais características saindo da base obtusa, sendo actinódromas e apresentamestípulas verdes-claras (EUPHORBIACEAE, disponível em www.ipef.br/identificacao/nativas/detalhes).

Há apenas um artigo descrevendo os dados fitoquímicos de *A. triplinervia* onde de suas folhas foi isolada a amentoflavona (extrato CHCl₃/MeOH 9:1) e do extrato MeOH foram obtidos a isocorilagina, ácido gálico e metil galato, todas as substâncias foram isoladas por CC em Sephadex LH-20 (Braca et al., 2002).

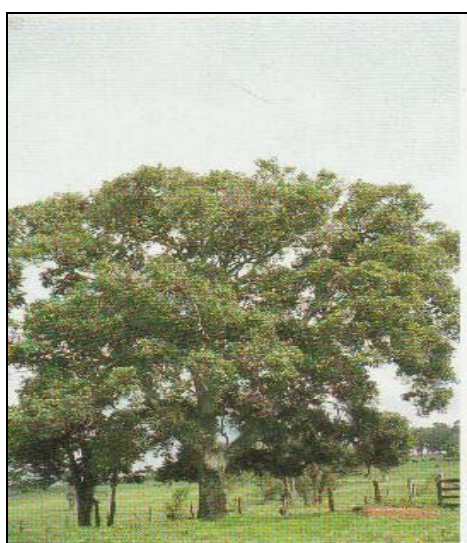


Figura 4: *Alchornea triplinervia* (Lorenzi, 1998)

II-OBJETIVOS:

A alta incidência de úlceras gástricas na população associado a crescente pesquisa de plantas medicinais, como fonte de substâncias com atividade terapêutica, estimularam o interesse acadêmico em estudar estas duas espécies do gênero *Alchornea*. Portanto, os objetivos deste trabalho:

- ✓ Avaliaras potenciais atividades antiulcerogênicas dos extratos metanólico e frações orgânicas de *Alchornea glandulosa* (Ag) e *Alchornea triplinervia* (At).
- ✓ Determinar os prováveis mecanismos das frações, envolvidos no efeito antiulcerogênico das espécies vegetais.

III- MATERIAL E MÉTODOS

III.1-ANIMAIS

Para os experimentos de indução de lesões gástricas experimentais, foram utilizados camundongos Swiss albinos machos (25-30g) e ratos machos Wistar (150 a 200g), provenientes do Biotério Central da UNESP-Botucatu, aclimatados às condições do biotério setorial (Departamento de Fisiologia, UNESP, Botucatu) por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, sob temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas controlados. Os animais foram alimentados com ração Guabi[®] destrusada e água *ad libitum*. Todos os experimentos obedeceram aos protocolos experimentais nº17, 18, 19, 20, 21 e 22/04-CEEA submetidos e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu.

III.2-ATIVIDADE GASTROPROTETORA

A) Lesões gástricas - Para avaliar a atividade antiulcerogênica foram realizados experimentos de indução de úlcera gástrica com base nos maiores agentes etiológicos da doença no homem, a saber: HCl/etanol, DAINes (piroxicam), etanol absoluto e ligadura de piloro. Cada modelo experimental apresentou os seus respectivos grupos controle positivo (droga antiulcerogênica, lansoprazol, cimetidina ou carbenoxolona) e negativo (salina ou Tween 80 a 8%) dependendo da especificidade de cada modelo. Os animais antes do tratamento, foram mantidos em gaiolas metabólicas para evitar coprofagia e com água *ad libitum*. O veículo usado foi Salina ou Tween 80 a 8% por via oral de acordo com a solubilização dos extratos, para os extratos metanólico e fração aquosa foi utilizado como veículo a salina e para a fração acetato de etila Tween 80 a 8%. Foram utilizados extratos avaliados nas doses de 250, 500 e 1000mg/Kg e as frações nas doses de 50, 100 e 200mg/Kg. Em todos os experimentos de indução de úlcera, as lesões ulcerativas foram classificadas de

acordo com a severidade, segundo Szelenyi e Thiemer (1978), em lesões de nível 1 (pontos hemorrágicos < 1mm), nível 2 (úlceras de 1 a 3 mm de extensão) e nível 3 (úlceras profundas >3mm de extensão). Para cada grupo de tratamento foi calculado um índice de lesões ulcerativas (I.L.U.) obtido através da equação:

$$\text{I.L.U.} = (\sum \text{lesões nível 1}) + (2 \times \sum \text{lesões nível 2}) + (3 \times \sum \text{lesões nível 3})$$

B) Indução de úlceras pelo uso do Etanol absoluto e etanol/HCl - Este método foi baseado nas metodologias descritas por Morimoto et al., (1991) e Mizui e Doteuchi (1983). Após 24 horas de jejum, os grupos experimentais foram submetidos aos tratamentos com veículo (10 mL/Kg), lansoprazol (30 mg/Kg) e com a droga-teste por via oral (doses variadas), 50 min. antes da indução de lesão gástrica por HCl/etanol (camundongos Swiss) ou 1h para indução por etanol absoluto (ratos Wistar). Todos os tratamentos foram feitos por via oral, em dose volume final de 10 mL/Kg e os agentes lesivos foram administrados em volume de 0,2 mL da solução de 0,3M HCl/etanol 60%, em camundongos, e 1mL de etanol, para ratos. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical 1 hora após a administração do agente lesivo, os estômagos foram retirados, o pH do suco gástrico foi determinado e os estômagos abertos ao longo da grande curvatura. Em seguida os estômagos foram dispostos em placas de vidro, escaneados e realizados os procedimentos de medida do I.L.U., como descrito anteriormente.

C) Indução de úlceras pelo uso de Piroxicam - O experimento foi realizado segundo a metodologia descrita por Puscas et al. (1997), com modificações. Foram utilizados camundongos Swiss, machos, pesando acima de 30g, submetidos a jejum por um período de 36 horas. As lesões gástricas foram induzidas pela administração subcutânea de piroxicam 30 mg/Kg. Os tratamentos com a droga-teste (doses variadas), cimetidina 100 mg/Kg e veículo

por via oral (10mL/Kg), foram realizados 30 minutos antes da administração dos agentes indutores, por via oral. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical 4 horas após o estímulo lesivo. Os estômagos foram removidos e abertos ao longo da maior curvatura, o pH do suco gástrico determinado e a contagem e classificação das lesões gástricas determinadas.

D) Úlceras induzidas pela Ligadura de piloro e avaliação dos parâmetros do suco gástrico - Foi adotado o modelo descrito por Shay (1945) com modificações, os parâmetros do suco gástrico (pH, volume e concentração de íons H^+) foram avaliados pelo efeito do(s) extrato(s) administrado pela via intraduodenal, no intuito de avaliar o efeito sistêmico do óleo essencial. Após 24 horas de jejum os camundongos sob anestesia, sofreram uma incisão longitudinal, logo abaixo da apófise xifóide para a amarradura de piloro. A administração da droga-teste, cimetidina 100mg/Kg e veículo todos em dose volume final de 10 mL/Kg, foi realizada logo após a amarradura do piloro. As incisões foram suturadas e quatro horas após a cirurgia os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e a incisão reaberta. Logo em seguida, foi realizada uma ligadura da cárdia (para preservação do conteúdo gástrico) e o estômago foi retirado. O conteúdo estomacal foi coletado e, em seguida foi determinado o volume do suco gástrico, o pH e a concentração de hidrogeniônica da secreção gástrica através de titulação com NaOH 0,01N em bureta digital modelo EM-burete, utilizando-se fenolftaleína como indicador. A concentração total de ácido foi expressa em mEq/mL/4h. e o pH foi determinado. Quando possível, as lesões gástricas foram avaliadas segundo o I.L.U., como descrito anteriormente.

E) Avaliação do envolvimento do Óxido Nítrico (NO) O método utilizado foi o descrito por Arrieta et al. (2003). Foram utilizados ratos Wistar machos (cerca de 200g), que

ficaram de jejum por 24h, com água *ad libitum*. Foram divididos em 6 grupos. Os ratos foram pré-tratados ou com L-NAME (N-nitro-L-arginina metil ester) 70 mg/Kg ou com veículo (10 mL/Kg), por via intraperitoneal. Trinta minutos depois receberam por via oral veículo (10 mL/Kg), controle positivo (carbenoxolona, 100 mg/Kg) ou com a droga-teste. Depois de 60 min todos os grupos foram tratados com 1 mL de etanol absoluto, via oral, para a indução de úlceras gástricas. Uma hora depois da administração do etanol os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos retirados para a determinação do I.L.U.

F) Avaliação da participação do grupamento Sulfidrila - Neste modelo foi utilizada a metodologia descrita por Arrieta et al., 2003. Ratos Wistar machos foram divididos em grupos. Após jejum de 24h (água *ad libitum*), os grupos foram pré-tratados com salina ou com a droga NEM (N-etilmaleimida, 10 mg/Kg), via intraperitoneal. Trinta minutos depois receberam os tratamentos, por via oral: veículo (10mL/Kg), carbenoxolona (100 mg/Kg) e com a droga-teste. Uma hora após essa administração, os grupos foram tratados oralmente com 1 mL de etanol absoluto, para indução de úlceras gástricas. Após 1h os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os estômagos retirados e abertos na curvatura maior. Foram colocados em placas de vidro para determinação do I.L.U., conforme descrito anteriormente.

G) Dosagem de prostaglandinas da mucosa gástrica de ratos (Curtis et al., 1995). Ratos foram divididos em grupos que jejuaram por 24 horas e foram tratados com as seguintes soluções: Tween 80 8%(veículo), indometacina (20mg/kg, s.c) usada como um controle positivo e , fração acetato de *Alchornea triplinervia* (100mg/kg p.o.). Foram administrados os tratamentos e 30 min depois indomethacina, esta foi dissolvida em uma solução 5% de bicarbonato e sódio. Trinta minutos após o tratamento, os animais são sacrificados e o abdome

exposto para a retirada do estômago, que foi aberto no sentido da maior curvatura. A mucosa s raspada com o auxílio de um bisturi, pesada e, então ressuspensa em 1 ml de tampão fosfato de sódio (10 mM; pH 7,4). O tecido foi finamente picado com o auxílio de tesoura e, então incubado a 37 °C por 20 min. A PGE₂ no tampão foi determinada por um kit de radioimunoensaio (Amersham) e todos os dados sobre a capacidade de síntese de PGE₂ serão expressos em pg/milograma de peso de tecido glandular. A absorbância foi lida em 450nm .

III.3- MOTILIDADE INTESTINAL

Este experimento seguiu a metodologia descrita no artigo de Baggio et al., (2002), com algumas modificações. Foram utilizados camundongos fêmeas Swiss, pesando cerca de 30g, submetidas a um jejum de 6h (água *ad libitum*). Primeiramente, foram realizados os tratamentos com: veículo; atropina 15mg/Kg (controle positivo) e com a droga-teste todos por via oral. Depois de 30 minutos o carvão ativado foi administrado em todos os grupos, também por via oral. Após 30 minutos foi feito o sacrifício dos animais, por deslocamento cervical. O intestino dos animais foi retirado e, com a ajuda de um peso fixado em sua porção inferior, foram colocados em uma régua vertical, para determinação do comprimento total do intestino e da distância percorrida pelo carvão ativado, ambos em cm. A porcentagem percorrida foi calculada e transformada em arc sen para análise estatística.

III.4- TOXICIDADE AGUDA E “SCREENING” HIPOCRÁTICO

Este experimento seguiu a metodologia descrita por (Souza-Brito, 1995). Foram utilizados camundongos machos Swiss e divididos em 2 grupos: um grupo tratado com o veículo (salina) e os demais tratados com a dose 5000 mg/Kg do extrato. Os tratamentos foram realizados oralmente e os parâmetros comportamentais, observados aos 30, 60, 90, 120,

240 e 360 minutos após a realização dos tratamentos, bem como o número de mortes. O peso corporal dos animais foi avaliado diariamente por 14 dias após o início dos experimentos. No décimo quarto dia, os animais foram sacrificados e os seguintes órgãos retirados: coração, fígado, pulmões e rins. Eles foram pesados para se realizar uma determinação analítica e comparativa dos órgãos em relação aos animais submetidos ao tratamento com salina indicando possíveis efeitos tóxicos agudo do extrato vegetal.

III.5- ATIVIDADE CICATRIZANTE:

O experimento foi realizado segundo metodologia de Takagi et al., (1969) e Okabe e Amagase (2005). Ratos foram submetidos a jejum de 24 horas, em seguida foram pesados e anestesiados para o procedimento de indução de úlcera gástrica. Foi feita uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide, a parede anterior do estômago foi exposta e um volume de 0,02 mL de ácido acético a 20% foi injetado na camada submucosa da junção do fundo com o antro, onde imediatamente formou-se a úlcera. Em seguida, realizou-se a sutura e os animais foram mantidos em caixas de contenção normais, com alimento e água *ad libitum*. A contar do dia seguinte desta operação e durante 14 dias, animais foram tratados com veículo (controle negativo), com Cimetidina (droga antagonista do receptor H_2) 100 mg/Kg (controle positivo) e foram tratados com a droga-teste, uma vez por dia. No 15º dia, todos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram seus estômagos retirados para avaliação da área de cicatrização.

A) Análise morfológica:

Os estômagos foram abertos no sentido da maior curvatura, de modo que permitiu a medição da área relativa à lesão de acordo com a fórmula $A = \pi Rr$ (onde R = raio maior da

lesão e r = raio menor da lesão). Avaliaram-se também os possíveis efeitos tóxicos através de análise macroscópica e pesagem de órgãos vitais como baço, coração, fígado, pulmões e rins.

Após cuidadosa fixação em placa de isopor com alfinetes, o material foi fixado em solução de ALFAC (formalina, álcool 80%, ácido acético), onde ficou imerso por 24 horas a 4 °C. As peças foram desidratadas e incluídas em paraplast. Posteriormente, os blocos de paraplast foram cortados em 7 µm de espessura em micrótomo de maneira semi-seriada. As lâminas obtidas segundo esse processo foram submetidas à coloração por ácido periódico de Schiff (P.A.S.) (Vacca, 1985) hematoxilina, hematoxilina-eosina e tricrômico de Masson (Behmer et al., 1976), para análises morfológica e morfométrica em microscopia de luz.

B) Imunohistoquímica:

Para análise imunohistoquímica foi utilizada uma lâmina representativa de cada tratamento que foi desparafinizada, re-hidratada e destinada a imunohistoquímica com método de revelação para peroxidase. O bloqueio de reação inespecífica foi feito com leite desnatado e soro normal de carneiro, posteriormente à recuperação antigênica conforme indicação da tabela 1 e as amostras foram incubadas com aos anticorpos específicos (ver tabela 1) em solução de bloqueio “overnight”. Posteriormente, as amostras foram lavadas em tampão fosfato (0.01 mol/L, pH 7.4) e incubadas em anticorpo secundário (Kit ABC Vector) e revelado com o Avidina-Biotina associado com 3-3'-diaminobenzina tetrahydrochloride (DAB, Sigma), e analisadas posteriormente no microscópio LEICA DM acoplado com o software de captura de imagens Leica QWin Standard Versão 3.1.0 Abril de 2004, Reino Unido.

Tabela 1: Anticorpos e diluições específicas para as reações imunohistoquímicas

Anticorpo	Código	Empresa	Titulação	Recuperação antigênica	Referência
PCNA	NCL-PCNA	Novo Castra	1:100	Citrato+ MW	Kitajima et al., 1993
HSP70	SC-1060	Santa Cruz Biotechnology	1:100	Não necessita	Guo et al., 2002
COX 2	160106	Cayman Chemical	1:200*	Citrato+ MW	Berenguer et al., 2002
Gastrina	SC-7783	Santa Cruz Biotechnology	1:20	Não necessita	Ku et al., 2005
Somatostatina	SC-7819	Santa Cruz Biotechnology	1:20	Não necessita	Ku et al., 2005

*= Recomendado pela empresa

Citrato+ MW= Tampão citrato 0,01 M com irradiação em forno de microondas.

PCNA – antígeno nuclear de células em proliferação, usado para determinação de células em divisão, principalmente na fase S do ciclo celular.

HSP70 - *HEAT SHOCK PROTEIN 70* – é uma proteína da família HSP presente nas células de mamíferos, com peso molecular aproximado de 70 kDa.

COX 2- é uma enzima induzida e expressa em lesões por algumas células do processo inflamatório ou agentes mitogênicos (Halter et al., 2001; De Maria et al., 2003; Motilva et al., 2005).

Gastrina e Somatostatina são hormônios que regulam a secreção, motilidade, absorção, fluxo sanguíneo e nutrição das células do sistema digestório (Mao et al., 2005).

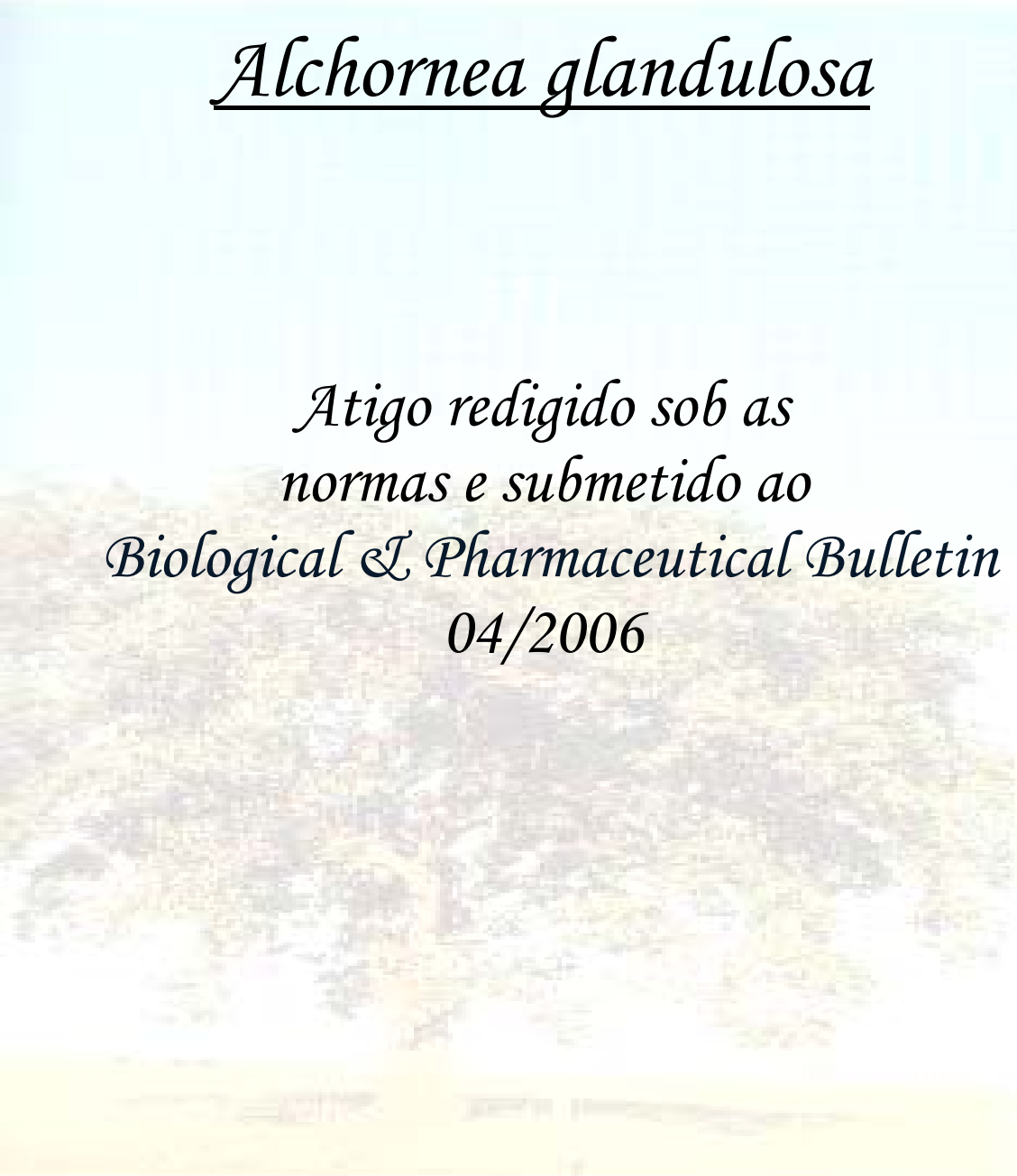
C) Análise morfométrica (Ishirara e Ito, 2002)

Essa análise foi realizada no analisador de imagens Leica Q-Win Standard Versão 3.1.0 (Reino Unido) no laboratório de imagens do Departamento de Morfologia. Foram feitas medidas lineares da luz até a muscular da mucosa na área de transição da lesão e na área normal.

ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os resultados foram expressos na forma de média $\pm$ erro-padrão) dos parâmetros obtidos. Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo teste de Dunnett ou Tukey, com nível de significância mínimo de $P < 0,05$. Em experimentos com dois grupos, o teste T de Student foi aplicado.

IV-RESULTADOS



Alchornea glandulosa

*Atigo redigido sob as
normas e submetido ao
Biological & Pharmaceutical Bulletin
04/2006*

Constituents and antiulcer effect of *Alchornea glandulosa*: Activation of proliferation cell in gastric mucosa during healing process

Tamara Regina Calvo,^a Zeila Pinheiro Lima,^b Janaina Scaramelo Silva,^b Kátia Verônica Rodrigues Ballesteros,^b Cláudia Helena Pellizzon,^c Clélia Akiko Hiruma-Lima,^b Jorge Tamashiro,^d Alba Regina Monteiro Souza Brito,^e Regina Kiomi Takahira,^f Wagner Vilegas.^(*), ^a

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, c.p. 355, CEP 14800-900, UNESP, Araraquara, SP, Brasil;^a *Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, c.p. 510, CEP 18618-000 UNESP, Botucatu, SP, Brasil;*^b *Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, c.p. 6109, CEP 13083-970, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil;*^c *Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, c.p. 510, CEP 18618-000 UNESP, Botucatu, SP, Brasil;*^d *Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, c.p. 6109, CEP 13083-970, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil;*^e *Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, c.p. 560, CEP 18618-000 UNESP, Botucatu, SP, Brasil.*^f

To whom correspondence should be addressed: Prof. Dr. W. Vilegas. Fax: +55-16-3332 7932. E-mail: vilegasw@iq.unesp.br.^(*)

Summary: *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae) is a plant used in folk medicine as antiulcer. Rats pretreated with methanolic extract obtained from the leaves of *A. glandulosa* (AG) showed a dose-dependent effect and significant reduction of gastric ulcers induced by absolute ethanol at the doses of 500 (57%) and 1000 mg/Kg (85%) in relation to control group. Pretreatment of mice with AG (500 and 1000 mg/Kg, p.o.) showed dose-dependent activity and significantly decreased the severity of lesions caused by HCl/ethanol and by non-steroidal anti-inflammatory drug-induced gastric lesions. Pretreatment with AG also induced antisecretory action by local and systemic route and significant decreased of the total gastric acid content of the animals. The gastroprotective effect of AG doesn't involve the participation of nitric oxide and increased the endogenous sulphhydryl compounds, which are defensive mechanisms of the gastrointestinal mucosa against aggressive factors. The ability of AG healing gastric ulcer was evaluated after 14 consecutive days of treatment. Results show that single oral administrations of AG (250mg/Kg/once day) presents a potent stimulation of gastric epithelial cell proliferation that contributed to the acceleration of gastric ulcer healing induced by acetic acid. In addition, no subacute toxicity (body weight gain, vital organs and serum biochemical parameters) was observed during all treatment with AG. Phytochemical investigation of AG led to the isolation of the myricetin-3-O- α -L-rhamnopyranoside, quercetin-3- α -L-arabinopyranoside, quercetin-3-O- β -D-galactopyranoside, quercetin, amentoflavone, methyl gallate, gallic acid and pterogynidine. We also established the phytochemical profile of AG, with the quantification of the total phenolic compounds. These compounds may contribute to the observed antiulcerogenic effect of *A. glandulosa*.

Keywords *Alchornea glandulosa*; PCNA; antiulcer activity; phenolic compounds.

Alchornea glandulosa Poepp. & Endl. (Euphorbiaceae) is a tree of 10-20 m popularly known as tapiá, tanheiro-de-folha redonda, tanheiro or canela-raposa. It is found in the South and Southwest regions of Brazil, mainly in the Atlantic pluvial forest.¹⁾ Ethnopharmacological survey indicated that species from the genus *Alchornea* are commonly used for the treatment of gastric diseases.²⁾ Despite the popular use of this species as a medicinal plant, there are no data about its pharmacological effects on the gastrointestinal system or its possible toxic property.

Literature reports that *A. glandulosa* contains sitosterol, stigmasterol, the terpenoid loliolide, the guanidine alkaloid *N*-1,*N*-2,*N*-3-triisopentenylguanidine, the tannin corilagin, gallic acid, ethyl gallate, the flavonoids quercetin-3-*O*- α -L-rhamnoside, kaempferol-3-*O*- α -L-rhamnoside and myricetin-3-*O*- α -L-rhamnoside.^{3,4)}

Concerning the pharmacological effects, crude extracts of *A. cordifolia* demonstrated antimicrobial, antiamoebic, antispasmodic and antidiarrheic activities.^{5, 6,7,8)} It was also detected activity against *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* in the methanolic extract of the leaves of *A. cordifolia*, which contains phenolic compounds and terpenoids.⁹⁾ The chloroformic fraction from the methanolic extract of the leaves of *A. sidifolia* showed the presence of triterpenoids and steroids with antifungic activity.¹⁰⁾ *A. cordifolia* presented trypanocidal activity and activity against *Plasmodium falciparum*.^{11,12)} The observed effect was correlated to the presence of ellagic acid.¹³⁾ Besides flavonoids with muscular relaxing activity, *A. latifolia* possesses pentacyclic triterpenoids with citotoxic activity against cancerous cells Hep-G2 and A-431 and presented potent inhibition of the topoisomerase II.¹⁴⁾ From *A. laxiflora* it was isolated sulphated quercetin derivatives with activity against Gram positive and Gram negative as well as against mushrooms.¹⁵⁾

The present study has been conducted to evaluate the antiulcer activity of the methanolic extract from the leaves of *Alchornea glandulosa* (AG) using different *in vivo* experimental models in rodents followed by its phytochemical investigation.

Results and Discussion

Peptic ulcers are illnesses that affect a considerable number of people in the world. After 1900, physicians realized that the incidence of peptic ulcer was more prevalent than previously supposed.¹⁶⁾ Stress, smoking, nutritional deficiencies and ingestion of nonsteroidal-antiinflammatory drugs grow the gastric ulcer incidences.¹⁷⁾ Products in the market for the treatment of gastric ulcers, including antacids, proton pump inhibitors, anticholinergics and histamine H₂-antagonists, can produce several adverse reactions.¹⁸⁾

Brazil has a large biodiversity still underexplored. Based on a previous survey, in this work we investigated the effect of extracts of *A. glandulosa* over gastric lesions induced by several agents.

Fractionation of the methanolic extract of *A. glandulosa* (AG) by GPC followed by purification by HPLC led to the isolation of the gallic acid **1**, methyl gallate **2**, the flavonoids myricetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside **3**, quercetin-3-*O*- β -D-galactopyranoside **4**, quercetin-3-*O*- α -L-arabinopyranoside **5**, quercetin **6**, the biflavonoid amentoflavone **7** and of the alkaloid pterogynidine **8**, identified by comparison of their spectroscopic data to those reported in the literature (Fig. 1).^{19,20,21,22)}

Figure 2 presents the chromatogram and UV spectra of a fraction containing mainly phenolic compounds from AG using High Performance Liquid Chromatography - Ultraviolet - Photodiode Array Detector (HPLC-UV-PDA). The identification of the peaks was performed using co-injection of the standards available from a collection of our laboratory and also by comparing with the ultraviolet spectra data obtained from literature.²³⁾ The

analysis of the retention time of the compounds compared to the respective standards and UV data (Fig. 2) suggested that peaks **1** ($16.69 \pm 0.09\%$) and **2** ($10.99 \pm 0.18\%$) are gallic acid and methyl gallate, respectively. Peaks **7** ($5.99 \pm 0.08\%$) and **9** ($7.34 \pm 0.04\%$) were amentoflavone and amentoflavone derivative, peaks **3** ($16.22 \pm 0.12\%$), **4** ($17.25 \pm 0.03\%$), **5** ($21.07 \pm 0.12\%$) and **6** ($3.25 \pm 0.13\%$) were myricetin 3-O- α -L-rhamnopyranoside, quercetin 3-O- β -D-galactopyranoside, quercetin 3-O- α -L-arabinopyranoside and quercetin respectively. The amount of the total phenolic compounds was 10% (98.81 ± 0.05 mg/g) in the methanolic extract. Peaks **8** and **10** correspond to pterogynidine and a guanidine alkaloid derivative.

As part of this pharmacological study, the acute toxicity in mice of the AG was first investigated. A single administration of the AG by the oral route up to a dose of 5000 mg/Kg did not produce any signs or symptom of acute toxicity in the treated animals. During the following 14 days after the administration of AG, no animal died and no significant changes in daily body or organ weight were observed until the end of this period (Table 1). In autopsy, no significant change or lesions were observed in the internal organs of each animal. These findings indicate that acute administration of AG (5000 mg/Kg, p.o) in mice is safe.

Ethnopharmacological information about the posology of *A. glandulosa* used in folk medicine is confused. Souza-Brito related that active principles from medicinal plants are generally found in low concentrations.²⁴⁾ Amounts higher than 1% are the exception. Since the maximum dose used to perform the acute toxicity assay was 5000 mg/Kg of AG, a five-fold lower dose (1000 mg/Kg) was selected as the maximum amount to evaluate the antiulcer activity of AG.

The intestinal motility is one of the factors that may affected the intensity of luminal absorption of drugs administered orally and probably regulated their bioavailability. Tsukimi *et al.*, observed that motility changes play a role in the development and prevention of gastric lesions.²⁵⁾ Under the conditions used in our experiments, pretreatment with different doses

AG was unable to change the propulsion of the charcoal meal ($P > 0.05$) when compared to atropine (Table 2).

The antiulcerogenic activity was assayed in distinct acute and subacute models of ulcerative gastric in mice and rats. Rats pretreated with AG showed a dose dependent effect with significant reduction of gastric lesions induced by absolute ethanol at the doses of 500 (57%) and 1000 mg/Kg (85%) (Table 3). These lesions were characterized by numerous hemorrhagic red bands of different sizes along the long axis of the glandular stomach. The pathogenesis of ethanol-induced gastric mucosal damage is still unknown but the formation of oxygen-derived free radicals and a neutrophil infiltration into the gastric mucosa are considered main reasons of mucosa damage.²⁶⁾ Plants containing substances like quercetin and gallic acid are also effective in preventing this kind of lesion, mainly because of their antioxidant properties.²⁷⁾ Kahraman *et al.*,²⁷⁾ reveals that quercetin inhibited the development of mucosal gastric ulcers induced by the administration of ethanol and products of the lipid peroxidation, protein carbonyl compounds, histamine levels and MPO (myeloperoxidase) activities were significantly decrease after treatment with quercetin.²⁸⁾

Hydrochloric acid is a necrotic agent that induces wide hemorrhage bands in gastric corpus 60 min after HCl administration.²⁹⁾ Pretreatment with AG 50 min before HCl/ethanol solution increased the severity of lesions in a dose-dependent manner by 64% (250 mg/Kg) and 46% (500 mg/Kg), in relation to mice treated with vehicle (Table 3). We also observed that the lowest dose of AG presented the highest activity.

Piroxicam is a preferential COX-1 inhibitor. Cyclooxygenase was constitutively expressed in the gastrointestinal tract in large amounts and has been suggested to maintain mucosal integrity through continuous generation of prostaglandins.³⁰⁾ We observed that pretreatment with AG showed a significant ($P < 0.01$) gastroprotection at doses of 250 (78%) and 500 mg/Kg (33%). Again, we observed a decrease of the gastroprotection when we used higher

doses of AG. Actually, pre-treatment with AG at the highest dose (1000 mg/Kg) presents more gastric damage than vehicle pre-treatment.

These results suggest that compounds present in AG may be involved with inflammation precursors. In fact, Gracioso *et al.*, described that increasing amounts of flavonoids may change their properties from antioxidant to pro-oxidant.³¹⁾ Repetto *et al.* reported that low concentrations of phenolic compounds stimulated the PGHS (prostaglandin H-synthase), whereas high concentration inhibited the production of PGHS.³²⁾ Thus, the diminution of the gastroprotective activity observed with increasing doses of AG probably was due the chemical profile of this species that induced modulation of endogenous PGs. Our data was in accordance to those obtained from Banerjee *et al.*, which has shown that amentoflavone and quercetin exerted suppression of PGE₂ biosynthesis via downregulation of COX-2/iNOS expression.³³⁾

Gastric juice obtained from pylorus-ligated mice was used to analyze the gastric biochemical parameters (Table 4). Animals pretreated with AG by both route (oral or intraduodenal) increased the gastric volume and decreased the total gastric acid content when compared with the control group. This result indicated that the antisecretory property was involved into the antiulcer activity of AG. This effect observed after treatment with AG indicated that compounds presents in AG, such as quercetin derivatives, may inhibit histamine release from mast cells in gastric tissues. Kimata *et al.*, reported that quercetin suppress Ca²⁺ influx and protein kinase activity.³⁴⁾ Furthermore, the increase of gastric volume observed after pre-treatment with AG indicates enhancement of the mucous-alkaline secretion.

Analysis of the crude methanolic extract and of the isolated substances from AG by TLC followed by revelation with DPPH and β -carotene solutions evidenced the presence of typical yellowish spots for all tested compounds, indicating their free radical scavenging effect, except for the alkaloid pterogynidine.

Szabo reported that SH compounds might scavenge free radicals and consequently prevent membrane damage brought about by lipid peroxidation.³⁵⁾ The role of endogenous SH (sulphydryl compounds) in mucosal protection has been demonstrated in ethanol-induced gastric injury, where the development of damage was accompanied by a lowering of mucosal SH compounds. The sulphydryl compounds bind to free radicals that form after tissue injury by noxious agents. These agents may also protect mucus, since mucus subunits are joined by disulfide bridges that, if reduced, render mucus water-soluble.³⁶⁾

We investigated the possible involvement of endogenous SHs in the gastroprotective effect of AG by pretreatment of the animals with N-ethylmaleimide (NEM), a blocker of SHs (Fig. 3). For ethanol-induced model, animal pre-treatment with NEM increased the severity of gastric lesions. Hence animals treated with AG (1000 mg/Kg) showed attenuation of the gastroprotection (11 ± 2.28 with saline vs. 58 ± 11.83 with NEM). This significant ($P < 0.001$) reduction of the gastroprotection observed by AG indicated the strong participation of endogenous SHs in the gastroprotection effects of this extract.

The next step was to check the probable involvement of NO on the AG gastroprotection. NO is a molecule implicated in mechanisms that control the integrity of the gastric epithelium, regulation of the gastric blood flow and stimulation of the gastric mucus secretion due to the activation of the enzyme guanylate cyclase.

Therefore, in order to investigate the role of endogenous NO in cytoprotection, we used the NOS inhibitor L-NAME to check the protective effect of AG on ethanol-induced gastric hemorrhagic lesions (Fig. 4). Oral administration of AG to animals pre-treated with L-NAME produced a raise in the gastric damage when compared with the L-NAME-pre-treated with saline. Therefore, the gastroprotective effect of AG observed by pre-treatment with saline (74%) was reduced when compared with the protective activity by pre-treatment with L-NAME (64%) however this difference was not significant ($P > 0.05$).

The ulcer produced by the injection of acetic acid into the rat stomach wall was assumed to be similar to the human chronic ulcer, since it is difficult to be treated and it takes a long time to be healed.³⁷⁾ Oral administration of AG for 14 consecutive days accelerated the healing of gastric mucosa in rats producing a 43% cure rate when compared to control group treated with vehicle (Table 5). Heal of the gastric ulcer was not observed by macroscopic analysis of injuries but it was evidenced by morphometric analyses. The comparative measure of the normal and regenerated areas of the gastric mucosa shows an increase of the transition area due to the treatment with both cimetidine and AG (250 mg/Kg). Subacute treatment with AG increased the regenerated area almost twice compared to the control group, thus indicating that AG stimulated proliferative factors that lead to healing. The organization of the glands is not observed in the mucosa of the stomach. However, glands apparently show mucous secretion, with similar appearance to those treated with cimetidine (Fig. 5).

PCNA is a highly conserved 36kDa nuclear polypeptide identified as the auxiliary protein of DNA polymerase delta.^{38,39,40)} PCNA is expressed throughout the cell cycle and its concentration is increased further in the S-phase of the cell cycle.⁴¹⁾ Szabo *et al.*, and Tarnawski *et al.*, have demonstrated the capacity of accelerating the ulcer healing process depends on many factor, like a PDGF, FGF, VEGF stimulation of angiogenesis and cell proliferation.^{42,43,44)} Kitajima *et al.*, demonstrated proliferative activity during healing of gastric ulcers by PCNA method. In the morphologic analysis of PCNA immunohistochemical, it can be noticed that the three treatments promote the proliferation of the cells.⁴⁵⁾ However, only in the cells treated with AG the proliferation occurred in the basal region of the glandule (Fig. 6F). Cimetidine significantly inhibited cell proliferation in three out of the five cell lines, which may indicate the dependence of proliferation of these cell lines on stimulation of the H₂ receptor.⁴⁶⁾

This possibly occurs because the stem cell re-organizes from the base of the gland, indicating the unidirectional character of the cell proliferation, which is different from the normal region, which has a two directional proliferation.⁴⁴⁾ Cell proliferation also denotes that AG induces the expression of the growth factor in the gastric mucosa, thus leading to the gastric ulcer healing activity.

The healing experiment induced by acetic acid in rats also supports the accompaniment of the evolution of the corporal weight of the animals submitted to the different treatments. This method also indicates the possible presence of subacute toxicity after a treatment during 14 days, when parameters such as body weight gain, relative weight of the vital organs and serum biochemical parameters are evaluated (Table 6). No animal mortality due to toxicity and no significant differences in body weight gain were observed at the end of the 14 days of treatment (data not shown). Moreover, the average weights of most vital organs and visceral conditions were normal and comparable to the controls (Table 6). The 14 days treatment with oral AG did not elicit changes in serum biochemical parameters related to renal (urea and creatinine) and hepatic toxicity (AST and ALT). Although these results did not suggest any significant adverse effects of *Alchornea glandulosa* in the used dose during 14 days, further studies will be carried out to determine the absence of chronic toxicity.

The AG did not show acute toxicity and exhibited antisecretory and gastroprotective activities. The observed effects probably involve the participation of NO as well as an increase of endogenous SHs, which are related to the protective mechanisms of the gastrointestinal mucosa against aggressive factors. Oral administration of the AG for 14 days accelerated the healing of gastric ulcer in rats by promoting epithelial cells proliferation and acceleration of gastric ulcer healing. Phytochemical evaluation carried out on the AG afforded quercetin and myricetin derivatives, the biflavonoid amentoflavone, gallic acid, methyl gallate

and the alkaloid pterogynidine. These compounds probably contribute to the antiulcerogenic effect of the polar extract of *A. glandulosa* leaves.

Experimental

Biological material. Leaves of *Alchornea glandulosa* Poepp & Endl were collected at Piracicaba city, São Paulo State, Brazil, in June 2003 and authenticated by Prof. Jorge Tamashiro. A voucher specimen (n° 132828) was deposited at the Herbarium of the Campinas University.

Apparatus. Compounds were identified by their 1D- and 2D-NMR (^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC and TOCSY) spectra in DMSO- d_6 using a Varian INOVA 500 spectrometer, operating at 500 MHz for ^1H and 150 MHz for ^{13}C . Chemical shifts were given as δ (ppm) using TMS as an internal standard. pH units were measured using a digital pH meter (PA 200, Marconi S.A, Brazil). The acid content was measured using a digital burette. (E.M., Hirschmann Technicolor, Germany). Serum biochemical parameters were measured using an automated biochemical analyzer (SBA-200, CELM, Brazil). Histological samples and morphometric analyses were performed using a Leica microscope associated with Leica Qwin Software (Leica-England).

Extraction and isolation. Leaves (500 g) of *Alchornea glandulosa* were air dried (7 days at 40 °C) and powdered. The powdered dried leaves were exhaustively extracted with chloroform and methanol successively at room temperature (3 times, 48 h each solvent). Extracts were concentrated in vacuum, yielding 21 g (4.2%) and 59 g (11.8%) of residues, respectively. An aliquot of the methanol extract from *A. glandulosa* (AG) (3 g) was further dissolved in 10 ml methanol, centrifuged and the supernatant was submitted to Sephadex LH-

20 (Pharmacia) column chromatography (100 x 5 cm) using methanol as eluent. Fractions of 8 ml were collected and combined after thin layer chromatography (TLC) analysis to yield 24 fractions. Silica gel SiF254 (Merck) plates were eluted with chloroform:methanol (8:2, v/v) and visualized using UV light (254 and 365 nm) and further sprayed with anisaldehyde/sulfuric acid solution.⁴⁷⁾

An aliquot of the methanol extract (30 mg) was dissolved in 5 ml water:methanol (8:2, v/v) and filtered in Sep-Pak cartridge (Sigma, C₁₈). The cartridge was washed with 5 ml water:methanol (1:1, v/v) and methanol, successively. Fractions were analyzed by TLC using silica gel plates on glass (SiF254, Merck) developed with a solvent mixture composed of chloroform:methanol:*n*-propanol:water (5:6:1:4, v/v/v/v lower phase). The spots on the TLC plates were observed under ultraviolet (UV) light (254 nm). The methanol fraction contained mainly phenolic compounds, especially flavonoids. The methanolic fraction was filtered in a Millex filter (0,45 µm) and analyzed using a Varian *ProStar* HPLC system equipped with an RP-18 column (250 x 4.60 mm i.d., 5 µm, Phenomenex Luna). The mobile phase was water (A) and acetonitrile (B), both with 0.05% trifluoroacetic acid, in linear gradient elution of 30 to 70% of B in 60 min at a flow-rate of 1.0 ml/min. The effluent was monitored using a *ProStar* 330 photodiode-array ultraviolet detection (UV-PDA) system at 210 nm.

The total phenolic compounds of AG were quantitatively determined with HPLC analysis. A stock solution (1 mg/ml) of rutin was prepared in methanol. The calibration curve was built with seven different concentrations (10, 20, 50, 100, 200, 300 and 500 µg/ml in rutin) and analyzed in duplicate. The peak areas were correlated with the concentrations according to the calibration curve.

Calibration curve using the external standard rutin was constructed for the determination of the total concentration of flavonoids. The calibration curve was linear over

the range of 10-500 µg/ml with a correlation coefficient of 0.9999. All data presented are mean $\pm$ standard deviation of four independent experiments ($n = 4$).

Animals. Male Swiss albino mice (25-35 g) and male Wistar albino rats (150-250 g) from the Central Animal House of the UNESP were used. The animals were fed a certified Nuvilab[®] (Nuvital) diet with free access to tap water under standard conditions of 12 h dark-12 h light, humidity ($60 \pm 1.0\%$) and temperature ($21 \pm 1.0\%$). Fasting was used prior to all assays because standard drugs and extract were always administered orally (by gavage) or by intraduodenal route using a saline solution (10 ml/kg) as the vehicle. Animals were kept in cages with raised floors of wide mesh to prevent coprophagy. All experiments were performed in the morning, and following the recommendations of the Canadian Council on Animal Care, The UNESP Institutional Animal Care and Use Committee, approved all of the employed protocols.⁴⁸⁾

Drugs and chemicals. Ethanol absolute, hydrochloric acid, acetic acid (Sinth, Brazil), N-omega-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), carbenoxolone, cimetidine, N-ethylmaleimide (NEM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), lansoprazole and piroxicam (Hexal, Brazil), PCNA mouse monoclonal antibody (Novo Castra NCL-PCNA) (1:100) and ABC (avidine and biotine complex) reagents (ABC kit – Vector) were used in this study. All drugs and reagents were prepared immediately before use, and the reagents used were of analytical grade.

Antioxidant activity. The antioxidant activity of the AG was evaluated by TLC under the conditions described above. Plates were revealed with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) reagent as well as β -carotene solution.⁴⁹⁾

Acute toxicity. The acute toxicity studies were performed in mice. In this assay, a single dose of the AG was orally administered to groups of ten animals after a 12 h fast. Another group of animals receiving the vehicle (saline) served as control. The signs and symptoms associated with the AG administration (5g/kg, p.o.) were observed at 0, 30, 60, 120, 180 and 240 min after and then once a day for the next 14 days. The mortality, measured body weight, and behaviour screening were recorded for 24 hours and for 14 days after the treatment. The macroscopic analyses and weight of vital organs such as liver, kidney, heart and lung were compared between the animals treated with AG and vehicle. The acute toxicological effect was estimated by the method described by Souza Brito.⁵⁰⁾

Intestinal motility. Swiss mice were fast for 6 h with water *ad libitum*. The experimental group was treated with AG at the doses of 250, 500 and 1000 mg/Kg; the control group was treated with saline (10 ml/kg) and the positive control with atropine (5mg/Kg). Thirty min after the treatments animals received suspension from active charcoal 10% in water. After 30 min animals were sacrificed and intestines removed. The total length of the intestine and the distance covered by the charcoal suspension was measured.⁵¹⁾

Antiulcerogenic activity.

Ethanol-induced ulcer: This experiment was performed as described by Morimoto *et al.*,⁵²⁾ Rats were divided in 5 groups of 4-5 animals fasted 24 h prior to receiving an oral dose of the vehicle, saline (10 ml/kg), lansoprazole (30 mg/Kg), AG (250, 500 and 1000 mg/Kg body wt.). After 60 min, all groups were orally treated with 1 ml of absolute ethanol for gastric-ulcer induction. Animals were killed 1 h after the administration of ethanol. The extent of the lesions was measured and the lesion index expressed as the sum of all lesions as described by Szelenyi *et al.*,⁵³⁾

HCl/ethanol-induced ulcer: The experiments were performed as described by Mizui *et al.*, with modification.⁵⁴⁾ Mice were divided into groups of 5-8 animals that were fasted 24 h prior to receiving an oral dose of the vehicle, saline (10 ml/kg), lansoprazole (30 mg/Kg), AG (250, 500 and 1000 mg/Kg). After 50 min, all groups were orally treated with 0.2 ml of a 0.3 mol/l HCl/60% ethanol solution (HCl/ethanol) for gastric-ulcer induction. Animals were killed 1 h after the administration of HCl/ethanol and the gastric damage was determined as described above.

NSAID gastric ulcers in mice: In this model gastric lesions were induced with piroxicam (30 mg/Kg, s.c.) administered to mice (n=5) after a 36 h fast. AG (250, 500 and 1000 mg/Kg), cimetidine (100 mg/Kg) and saline were orally administered 30 min before the induction of the gastric lesions. Animals were killed 4 h after treatment with the ulcerogenic agent. The stomachs were removed and gastric lesion determined as described above.⁵⁵⁾

Shay ulcer: Mice were randomly divided in three groups (n=7-8) that were fasted for 24 h with free access to water. Thirty min or immediately after oral administration of a single dose of AG (1000 mg/Kg), cimetidine (100 mg/Kg) as positive control or vehicle (saline), pylorus ligation was performed as described by Shay *et al.*⁵⁶⁾ The animals were killed 4 h later, the abdomen opened and another ligation placed around the esophagus close to the diaphragm. The stomach was removed, inspected internally; its content was drained into a graduated tube and centrifuged at 3000 rpm for 15 min. The supernatant volume and pH were recorded with a digital pH meter. The total acid content of gastric secretion was also determined by titration to pH 7.0 with 0.01 N NaOH using a digital burette.

Determination of Gastric Secretion: The assay was performed by the method of Shay *et al.*, with a few modifications.⁵⁶⁾ All groups of mice (n=5-9) fasted for 24 h, with free access to water. Immediately after pylorus ligation, AG (1000 mg/Kg), cimetidine (100 mg/Kg) as positive control, or the vehicle (saline 10 ml/kg) was administered intraduodenally. The

animals were killed 4 h later by cervical dislocation; the abdomen was opened and another ligature placed around the esophagus close to the diaphragm. The stomachs were removed and the gastric content collected to determine the total amount of gastric-juice acid (ml) and pH values. Distilled water was added and the resultant solution centrifuged at 3000 rpm for 10 min. Total acid in the gastric secretion was determined in the supernatant volume by titration to pH 7.0 with 0.01 N NaOH.

*Ethanol-induced gastric lesions in NEM-pretreated rats:*⁵⁷⁾ Rats were divided into groups with 4-5 animals that were fasted 24 h. They were previously treated intraperitoneally with NEM (N-ethylmaleimide 10 mg/Kg) or saline; and thirty minutes later received an oral dose of the vehicle (10 ml/kg), AG (1000 mg/Kg) or carbenoxolone (100 mg/Kg). After 60 min, all groups were orally treated with 1 ml of absolute ethanol for gastric-ulcer induction. Animals were killed 1 h after the administration of ethanol, and the stomachs excised and the gastric damage determined as described above.

Ethanol-induced gastric lesions in L-NAME-pretreated rats: Rats were divided into groups (7 animals) that were fasted 24 h. Animals were treated with L-NAME (N-nitro-L-arginine methyl ester-70 mg/Kg) or saline by i.p. route, and thirty minutes later received an oral dose of the vehicle (10 ml/kg), AG (1000 mg/Kg) or carbenoxolone (100 mg/Kg). After 60 min, all groups were orally treated with 1 ml of absolute ethanol for gastric-ulcer induction. Animals were killed 1 h after the administration of ethanol, and the stomachs excised and the gastric lesion was determined.⁵⁷⁾

Healing in acetic acid-induced gastric lesion: The experiments were performed according to the method described by Takagi *et al.*, with some modifications.³⁷⁾ Three groups of male Wistar rats fasted for 24 h were used in this experiment (n=6-8). Under anaesthesia, a laparotomy was done in all animals through a midline epigastric incision. After exposing the stomach, 0.05 ml (v/v) of a 30% acetic acid solution was injected into the subserosal layer in

the glandular part of the anterior wall. The stomach was bathed with saline (20 °C) to avoid adherence to the external surface of the ulcerated region. The abdomen was then closed and all the animals were fed normally. We selected the lower dose of AG (250 mg/Kg), cimetidine (100 mg/Kg) or vehicle (10 ml/kg) for the determination of the healing effects by the subacute treatment. All treatments were done orally once a day during 14 consecutive days beginning one day after surgery. Body weight was recorded daily throughout the experiments and the macroscopic analyses and weight of vital organs (liver, kidney, heart spleen and lung) were compared between the different treatments to evaluate the possible subacute toxicity induced by the treatments.

On the day after the last drug administration, the rats were killed and the stomachs were removed. The gastric lesions were evaluated by examining the inner gastric surface with a dissecting magnifying glass. The macroscopic ulcer area (mm²) and curative ratio (%) were subsequently determined as described by Takagi *et al.*³⁷⁾

Biochemical analysis: The blood of rats submitted to different treatments was collected immediately after the sacrifice and centrifuged (3000 rpm by 10 min). After centrifugation, the serum obtained was kept frozen at – 20 °C until the biochemical analyses. Serum biochemical parameters such as urea, creatinin, aspartate aminotransferase (AST) alanine aminotransferase (ALT) were measured by an automated biochemical analyzer .

Histology methods: The stomach of the rats submitted by to gastric ulcers in the acid acetic model with different treatments were pushed off and opened by the large curves and the lesion was localized. The lesion was sectioned, and fixed in ALFAC solution (alcohol, chloroform and acetic acid) for 24 h in 4 °C. Then the samples were routine processed for embedding in paraplast, and cut into 7 µm thick section. These sections were stained with hematoxylin and eosin and observed under a microscope.

Morphometric analyses: For the morphometric analyses a slice of stomach was examined under a microscope, using the method described by Ishihara *et al.*,⁵⁸⁾

Immunohistochemistry: PCNA - Proliferating cell nuclear antigen was using to determinate proliferating cells, for this we take the representative slices was deparaffinized, rehydrated and immunostained with the peroxidase anti-peroxidase method. High temperature antigen unmasking technique in 0.01 mol/l citrate buffer pH 6.0 in microwave oven, for two times at 5 min. Blocking of nonspecific reaction was performed with 1% normal goat serum and 3% not-fat milk, and PCNA mouse monoclonal antibody. After rising in phosphate buffered saline (0.01 mol/l PBS pH 7.4), the sections were incubated in secondary antiserum. They were then washed in PBS and incubate in ABC (avidine and biotine complex) reagents and incubate in peroxidase reaction (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride containing 0.01% H₂O₂ in PBS buffer). After immunostained, the sections were lightly counterstained with Mayer's hematoxylin. The slides were observed under light microscope.

Statistical analysis. Results were expressed as mean $\pm$ S.E.M. Statistical significance was determined by one-way analysis of variance followed by Dunnett's or Tukey's test, with the level of significance at $P < 0.05$.

Acknowledgements. We thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for grants to T.R.C. and J.S.S. and for fundings from Biota-Fapesp Program and to (Capes) for a grant to Z.P.L.

References

- 1) Lorenzi H., “Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil”, 3rd ed., Plantarum, São Paulo, 1998.
- 2) Osabede P. O., Okoye F. B. C., *J. Ethnopharmacol.*, **89**, 19—24 (2003).
- 3) Conegero L. S., Ide R. M., Nazari A. S., Sarragiotto M. H., *Química Nova*, **26**, 825—827 (2003).
- 4) Urrea-Bulla A., Suárez M., Moreno-Murillo B., *Fitoterapia*, **75**, 392—394 (2004).
- 5) Tona L., Kambu K., Mesia K., Cimanga K., Apers S., De Bruyne T., Pieters L., Totte J., Vlietinck A. J., *Phytomedicine*, **6**, 59—66 (1999).
- 6) Tona L., Kambu K., Ngimbi N., Mesia K., Penge O., Lusakibanza M., Cimanga K., De Bruyne T., Apers S., Totte J., Pieters L., Vlietinck A. J., *Phytomedicine*, **7**, 31—38 (2000).
- 7) Abo K. A., Ashidi J. S., *Afr. J. Med. Med. Sci.*, **28**, 167—169 (1999).
- 8) Ajali U., *Fitoterapia*, **71**, 436—438 (2000).
- 9) Ebi G. C., *Fitoterapia*, **72**, 69—72 (2001).
- 10) Barbo F. E., Meda C. I., Claudia M., Young M., Cordeiro I., Blatt C. T. T., *Biochem. Syst. Ecol.*, **30**, 605—607 (2002).
- 11) Adewunmi C. O., Agbedahunsi J. M., Adebajo A. C., Aladesanmi A. J., Murphy N., Wando J., *J. Ethnopharmacol.*, **77**, 19—24 (2001).
- 12) Mustofa M., Valentin A., Benoit-Vical F., Pelissier Y., Koné-Bamba D., Mallié M., *J. Ethnopharmacol.*, **73**, 145—151 (2000).
- 13) Banzouzi J. T., Prado R., Menan H., Valentin A., Roumestan C., Mallie M., Pelissier Y., Blache Y., *J. Ethnopharmacol.*, **81**, 399—401 (2002).
- 14) Setzer W. N., Shen X., Bates R. B., Burns J. R., McClure K. J., Zhang P., Moriarity D. M., Lawton R. O., *Fitoterapia*, **71**, 195—198 (2000).

- 15) Ogundipe O. O., Moody J. O., Houghton P. J., Odelola H. A., *J. Ethnopharmacol*, **74**, 275—280 (2001).
- 16) Grob G. N., *N J Med.*, **101**, 19—30 (2004).
- 17) Belaiche J., Burette A., De Vos M., Louis E., Huybrechts M., Deltenre M., *Acta Gastroenterol Belg.*, **65**, 65—73 (2002).
- 18) Yacyshyn B. R., Thomson A. B. R., *Digestion*, **66**, 67—78 (2002).
- 19) Harborne J. B., “The Flavonoids: Advances in Research Since 1986”, Chapman & Hall, New York, 1996.
- 20) Agrawal P. K., “Carbon 13 NMR of Flavonoids”, 1nd ed., Vol. XXXIX, Elsevier, Amsterdam, 1989.
- 21) Binutu O. A., Cordell G. A., *Pharm. Biol.*, **38**, 284—286 (2000).
- 22) Bolzani V. S., Gunatilaka A. A. L., Kingston D. G. I., *J. Nat. Prod.*, **58**, 1683—1688 (1995).
- 23) Mabry T. J., Markham K. R., Thomas M. B., “The Systematic Identification of Flavonoids”, Springer-Verlag, New York, 1970.
- 24) Souza-Brito A. R. M., *J. Ethnopharmacol*, **54**, 131—138 (1996).
- 25) Tsukimi Y., Okabe S., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 1—9 (2001).
- 26) Chow J. Y., Ma L., Cho C. H., *Eur. J. Pharmacol.*, **342**, 253—260 (1998).
- 27) Gonzalez E., Montenegro M. A., Nazareno M. A., Lopez M. B. A., *Arch. Latinoam. Nutr.*, **51**, 395—399 (2001).
- 28) Kahraman A., Erkasap N., Koken T., Serteser M., Aktepe F., Erkasa P., *Toxicology*, **183**, 133—142 (2003).
- 29) Sawaoka H., Tsuji S., Tsujii M., Gunavan E. S., Nakama A., Takei Y., Nagano K., Matsui H., Kawano S., Hori M., *J. Clin. Gastroenterol.*, **25**, S105—S110 (1997).
- 30) Halter F., Tarnawski A. S., Schmassmann A., Peskar B. M., *Gut*, **49**, 443—453 (2001).

- 31) Gracioso J. S., Vilegas W., Hiruma-Lima C. A., Souza-Brito A. R. M., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 470—491 (2002).
- 32) Repetto M. G., Llesuy S. F., *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **35**, 523—534 (2002).
- 33) Banerjee T., Van Der Vliet A., Ziboh A., *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **66**, 485—492 (2002).
- 34) Kimata M., Inagaki N., Nagai H., *Planta Med.*, **66**, 225—229 (2000).
- 35) Szabo S. M. G., “New Pharmacological of Ulcer Disease”, Elsevier, New York, 1987.
- 36) Avila J. R., De La Lastra C. A., Martin M. J., Motilva V., Luque I., Delgado D., Esteban J., Herrerias J., *Inflamm. Res.*, **45**, 83—88 (1996).
- 37) Takagi K., Okabe S., Saziki R., *Jap. J. Pharmacol.*, **19**, 418—426 (1969).
- 38) Bravo R., Flank R., Blundell P. A., MacDonald-Bravo H., *Nature*, **326**, 515—517 (1987).
- 39) Prelich G., Tan C., Kostura M., Mathews M. B., *Nature*, **326**, 517—520 (1987).
- 40) Nanji A. A., Tahan S. R., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **140**, 101—107 (1996).
- 41) Celis J. E., Celis A., *Embo J.*, **4**, 1187—1192 (1985).
- 42) Szabo S., Vincze A., *J Physiol Paris*, **94**, 77—81 (2000).
- 43) Tarnawski A., Szabo I. L., Husain S. S., Soreghan B., *J Physiol Paris*, **95**, 337—344 (2001).
- 44) Tatematsu M., Tsukamoto T., Inada K., *Cancer Sci.*, **94**, 135—141 (2003).
- 45) Kitajima T., Okuhira M., Tani K., Nakano T., Hiramatsu A., Mizuno T., Inoue K., *J. Clin. Gastroenterol.*, **17**, S116—S120 (1993).
- 46) Finn P. E., Purnell P., Pilkington G. J., *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **22**, 559 (1996).
- 47) Wagner H. M., Bladt S., Zgainski E. M., “Plant Drug Analysis”, Springer, Berlin, 1986.
- 48) Olfert E. D., Cross B. M., McWilliam A. A., “Guide to the Care and Use of Experimental Animals”, 2nd ed., Vol. I, Canadian Council on Animal Care, Ottawa, Ontario, 1993.
- 49) Potterat O., *Curr. Org. Chem.*, **1**, 415—440 (1997).

- 50) Souza-Brito A. R., “Manual de ensaios toxicológicos *in vitro*”, 1nd ed., Editora da UNICAMP, Campinas, São Paulo, 1994.
- 51) Stickney J. C., Northup D. W., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **101**, 582 (1959).
- 52) Morimoto Y., Shimohara K., Oshima S., Sukamoto T., *Jpn. J. Pharmacol.*, **57**, 495—505 (1991).
- 53) Szelenyi I., Thiemer K., *Arch. Toxicol.*, **41**, 99—105 (1978).
- 54) Mizui T., Doteuchi M., *Jap. J. Pharmacol.*, **33**, 939—945 (1983).
- 55) Puscas I., Puscas C., Coltau M., Pasça R., Torres J., Márquez M., Herrero E., Fillat O., Ortiz J. A., *Arzneimittelforschung*, **47**, 568—572 (1997).
- 56) Shay H., Komarov S. A., Fels S. S., Meranze D., Gruenstein M., Siplet H., *Gastroenterology*, **5**, 43—61 (1945).
- 57) Arrieta J., Benitez J., Flores E., Castillo C., Navarrete A., *Planta Med.*, **69**, 905—909 (2003).
- 58) Ishihara M., Ito M., *Eur. J. Pharmacol.*, **31**, 209—215 (2002).

Table 1: Evaluation of the acute toxicity of the methanolic extract of *Alchornea glandulosa*
(AG) (5 g/kg, p.o.) in mice.

Weight	Control	<u>AG</u>
Body (g)	41.00 ± 2.40	41.71 ± 3.07
Kidney (mg)	514.98 ± 32.08	582.95 ± 49.57
Liver (mg)	2187 ± 146.28	2211.82 ± 176.12
Heart (mg)	202.08 ± 12.70	203 ± 15.03
Spleen (mg)	183.60 ± 18.95	197.51 ± 12.46
Mortality	0/7	0/7

Results are mean ± S.E.M.; n=7. Student's test. No significant $P > 0.05$.

Table 2: Effects of the methanolic extract of *Alchornea glandulosa* (AG) on intestinal propulsion induced by charcoal activated in mice.

<i>Treatment</i> <i>(p.o.)</i>	<i>Dose</i> <i>(mg/Kg)</i>	<i>n</i>	<i>Distance moved by charcoal</i> <i>(arcsine)</i>
<u>Control</u>	10	7	57.85 ± 2.57
Atropine	5	6	40.16 ± 2.74*
	250	7	56.0 ± 2.47
AG	500	7	56.57 ± 4.29
	1000	7	60.57 ± 2.95

Results are mean ± S.E.M. Dunnet's test, represents significantly different from the control group. arcsine * $P < 0.01$ $F_{(4;29)} = 6.84$

Table 3: Effects of different doses of the methanolic extract of *Alchornea glandulosa* (AG) on models of gastric lesions induced in mice and rats.

Method	Treatment (p.o.)	Dose (mg/Kg)	n	U.L.I.	Inhibition (%)
Ethanol	Control	-	5	89.0 ± 6.70	-
(Rats)	Lansoprazole	30	5	35.40 ± 8.26*	60
	AG	250	4	79.25 ± 8.91	11
		500	4	37.75 ± 6.0*	57
		1000	4	13.0 ± 5.84*	85
HCl/Ethanol	Control	-	8	71.0 ± 10.03	-
(Mice)	Lansoprazole	30	6	30.0 ± 3.81**	58
	AG	250	5	25.80 ± 3.86**	64
		500	5	38.40 ± 5.58*	46
		1000	5	48.60 ± 9.88	32
NSAID	Control	-	5	50.80 ± 5.67	-
(Mice)	Cimetidine	100	5	12.80 ± 1.93**	75
	AG	250	5	11.20 ± 1.59**	78
		500	5	33.80 ± 3.38**	34
		1000	5	58.0 ± 2.34	-14

Results are mean ± S.E.M. **Ethanol:** ANOVA, Dunnett test * $P < 0.01$, $F_{(4,27)} = 8.63$;

HCl/ethanol: Dunnett test* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $F_{(4,24)} = 5.9$; $F_{(4,28)} = 7.54$; **NSAID:**

Dunnett ** $P < 0.01$, $F_{(4,20)} = 41.06$ for U.L.I.

Table 4: Effects of a single dose of the methanolic extract of *Alchornea glandulosa* (AG) given by oral (p.o.) or intraduodenal (i.d.) route on the parameters of gastric juice obtained from pylorus-ligated mice.

Treatment	Route	n	Dose (mg/Kg)	Total Acid (μ Eq/mL/4h)	pH	Gastric Volume (mL)
Control		7	-	7.46 ± 0.72	2.14 ± 0.26	0.66 ± 0.07
Cimetidine	i.d.	7	100	$4.91 \pm 0.80^*$	3.14 ± 0.34	$0.63 \pm 0.10^*$
<u>AG</u>		8	1000	$4.57 \pm 0.47^*$	2.0 ± 0.29	$1.10 \pm 0.07^*$
Control		8	-	6.86 ± 0.51	3.33 ± 0.37	0.63 ± 0.08
Cimetidine	p.o.	9	100	$4.28 \pm 0.45^{**}$	3.66 ± 0.28	0.56 ± 0.06
<u>AG</u>		5	1000	$4.45 \pm 0.35^{**}$	2.50 ± 0.18	$1.33 \pm 0.23^{**}$

Results are mean $\pm$ S.E.M. **i.d route:** ANOVA, Dunnett test $*P < 0.05$, $F_{(2,21)} = 4.84$ (Volume); $*P < 0.05$ $F_{(2,25)} = 5.79$ (Total Acid); $P > 0.05$ n.s. $F_{(2,22)} = 2.5$ (pH). **P.o. route:** ANOVA, Dunnett test $** P < 0.01$, $F_{(2,22)} = 4.93$ (Total Acid); $** P < 0.01$: $F_{(2,22)} = 12.73$ (Volume); $P > 0.05$ N.S. $F_{(2,22)} = 4.2$ (pH).

Table 5: Effects of the treatment by 14 consecutive days with extract of *Alchornea glandulosa* (250mg/Kg/day) on healing of ulcer produced by acetic acid solution into the stomachs of rats.

Macroscopic analyses						Histological analyses	
Treatment (p.o)	n	Dose (mg/Kg)	Lesion area Extern (mm ²)	Lesion area Intern (mm ²)	Curative ratio (%)	Normal (um)	Regeneration area (um)
Control	6	-	1.10 ± 0.10	0.44 ± 0.07	-	563.2 ± 34.35	566.07 ± 73.82
Cimetidine	7	100	1.01 ± 0.18	0.37 ± 0.04	16	461.75 ± 38.05	748.25 ± 117.53
<u>AG</u>	8	250	1.01 ± 0.05	0.25 ± 0.04	43	513.97 ± 16.78	931.07 ± 42.52**

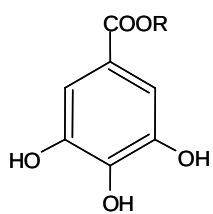
Results are mean ± S.E.M. ANOVA followed by Dunnett's test. ** $P < 0.01$ $F_{(2,15)} = 7.2$.

Table 6: Evaluation of the toxicity of methanolic extract (AG) obtained from leaves of *A. glandulosa* in rats. Effects on body organ weight, relative weight of the vital organs and serum biochemical parameters of a single dose (250 mg/Kg, p.o.) of AG administered during 14 consecutive days after ulcer formation.

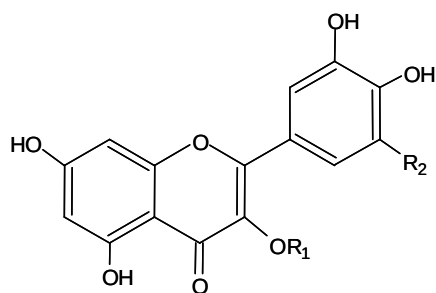
Treatment (p.o.)		Control	<u>Cimetidine</u>	<u>AG</u>
Weight (g)	Body	237.45 ± 6.67	250.72 ± 7.64	250.36 ± 7.52
	Kidney	1.81 ± 0.08	2.02 ± 0.07	2.04 ± 0.11
	Lungs	1.43 ± 0.04	1.57 ± 0.14	1.73 ± 0.25
	Liver	7.42 ± 0.17	8.18 ± 0.30	8.4 ± 0.48
	Heart	1.23 ± 0.06	1.18 ± 0.06	1.3 ± 0.07
	Spleen	0.69 ± 0.04	0.67 ± 0.04	0.62 ± 0.04
Biochemistry	Urea (mg/dl)	108.5 ± 2.91	115.6 ± 2.89	120 ± 6.16
	Creatinin (mg/dl)	1.86 ± 0.04	1.86 ± 0.09	1.75 ± 0.08
	AST(UI/L)	222.80 ± 7.10	267.00 ± 16.68	202.83 ± 25.38
	ALT(UI/L)	93.76 ± 5.01	87.5 ± 5.44	71.66 ± 7.16

Results are mean ± S.E.M. ANOVA followed by Dunnett's test. No significant $P>0.05$.

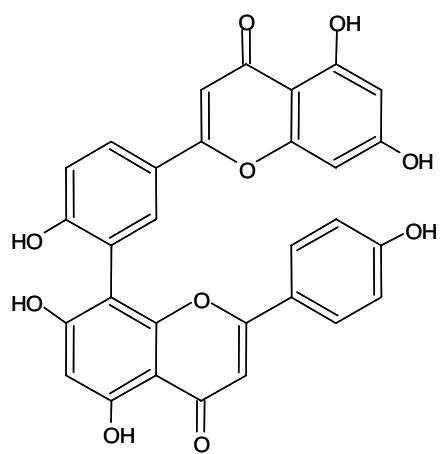
Fig. 1. Chemical structure of *Alchornea glandulosa* constituents.



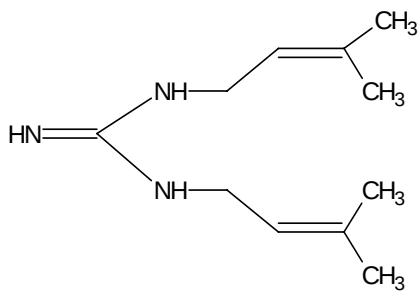
- R**
- (1) H
 - (2) CH₃



- | | R₁ | R₂ |
|-----|-----------------------|----------------------|
| (3) | α-L-rhamnopyranoside | OH |
| (4) | β-D-galactopyranoside | H |
| (5) | α-L-arabinopyranoside | H |
| (6) | OH | H |



(7)



(8)

Fig. 2. HPLC profile and UV spectra (210 nm) of the methanolic extract of *Alchornea glandulosa* (AG): gallic acid **1**, methyl gallate **2**, myricetin 3-*O*- α -L-rhamnopyranoside **3**, quercetin 3-*O*- β -D-galactopyranoside **4**, quercetin 3-*O*- α -L-arabinopyranoside **5**, quercetin **6**, amentoflavone **7**, guanidine alkaloid pterogynidine **8**, amentoflavone derivative **9** and guanidine alkaloid derivative **10**. Chromatographic conditions: see text.

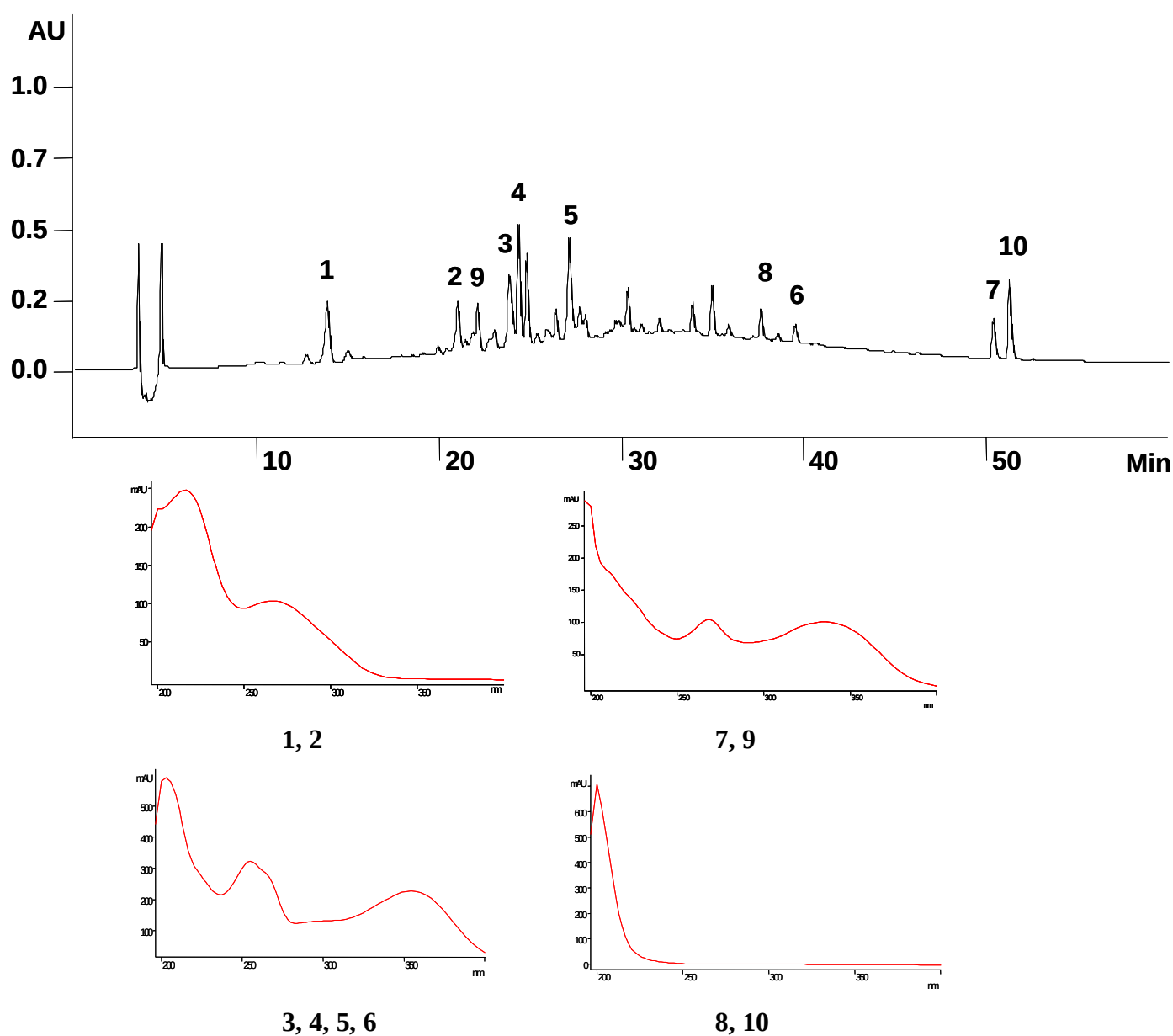
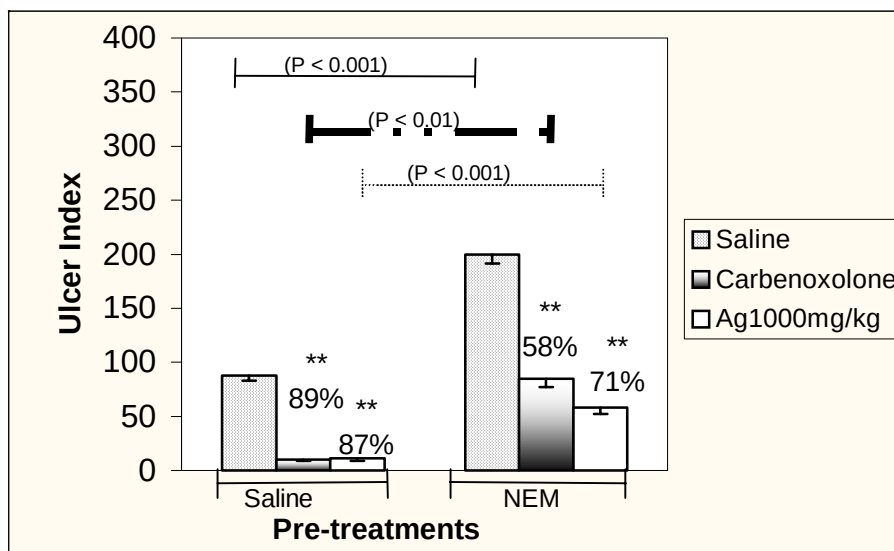
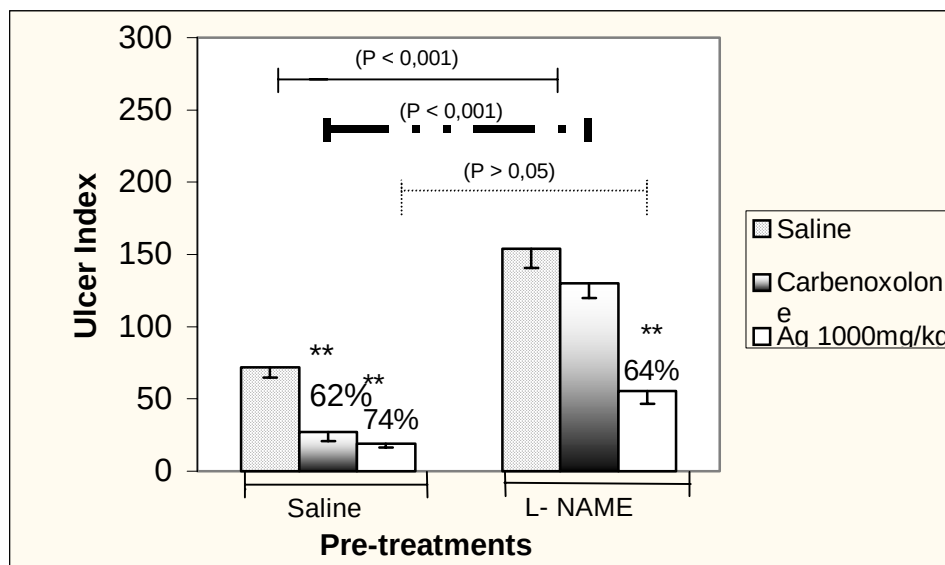


Fig. 3. Effects of methanolic extract of *Alchornea glandulosa* (AG) on gastric lesions induced by ethanol in different combinations of NEM (N-ethylmaleimide) on pretreated rats.



Results are mean $\pm$ S.E.M. ANOVA followed by Dunnett's test $**P < 0.01$ represents significant from the control group saline_saline $F_{(2,12)} = 185.4$; and NEM_saline $F_{(2,12)} = 91.78$.

Fig. 4. Effects of the methanolic extract of *Alchornea glandulosa* (AG) on gastric lesions induced by ethanol in different combinations of L-NAME (N-nitro-L-arginine methyl ester) on pretreated rats.



Results are mean $\pm$ S.E.M. ANOVA followed by Dunnett's test ** $P < 0.01$ represents significant from the control group saline_saline $F_{(2,18)} = 24.97$; and L-NAME_saline $F_{(2,17)} = 19.97$.

Fig. 5. Slides of stomach of rat treatment saline (A, D, G), cimetidine (B, E, H) and *Alchornea glandulosa* (C, F, I) stained with hematoxilyne and eosine. The head arrow indicates the lesion area. Note the difference of mucus inside the lumen (*).

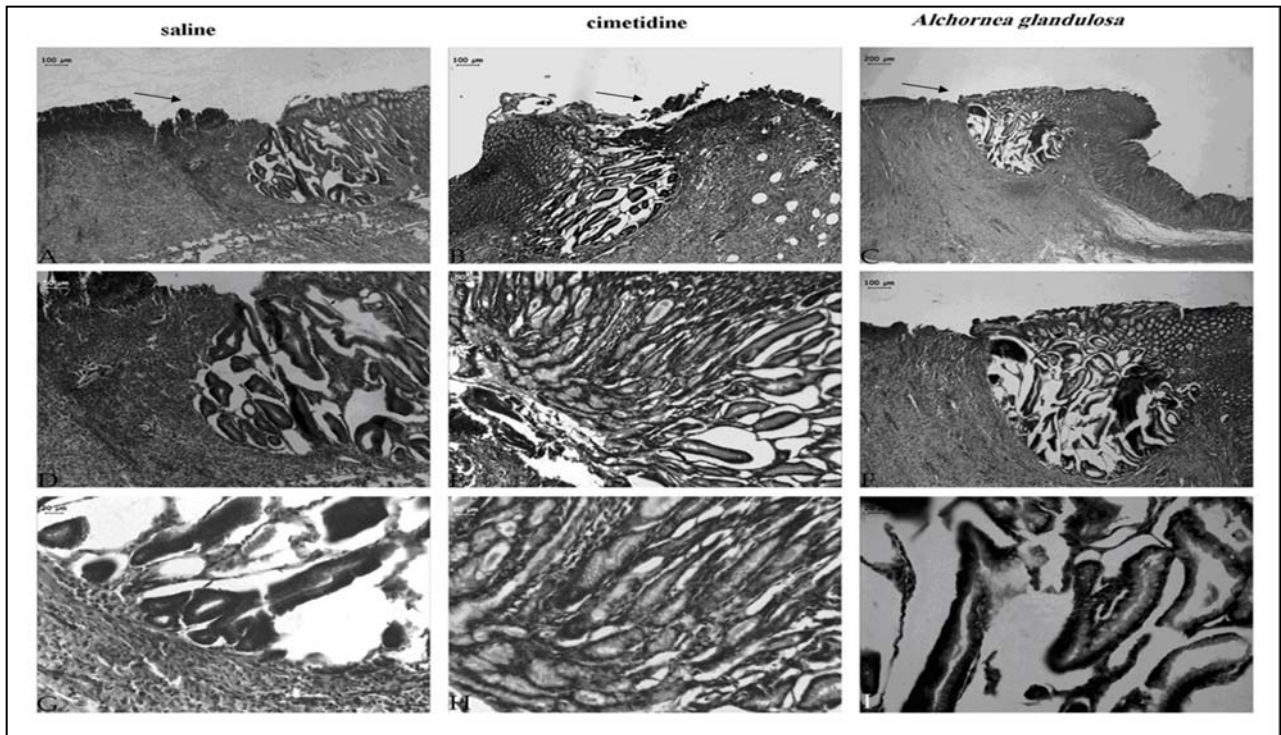
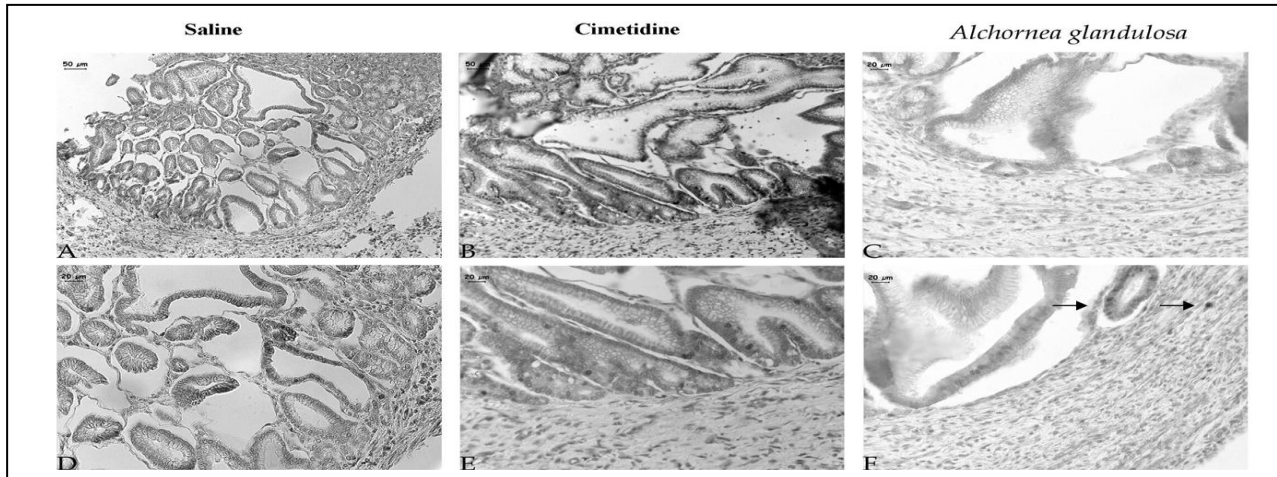


Fig. 6. Slides of stomach of rat treatment saline (A, D), cimetidine (B, E) and *Alchornea glandulosa* (C, F) immunohistochemistry to PCNA immunostained with peroxidase method. Note the organize in the glandule, and the nucleus PCNA positive in the *Alchornea glandulosa* (arrow).



Alchornea triplinervia

*Artigo redigido
Sob as normas
da revista Life Science.*



ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

Gastroprotective and Healing effects of Alchornea triplinervia on enhance the COX₂ and prostaglandin E₂ expression

Zeila Pinheiro Lima^a, Tamara Regina Calvo^b, Elisangela Farias Silva^c, Claudia Helena Pellizzon^d, Wagner Vilegas^b, Alba Regina Monteiro Souza Brito^c, Regina Kiomi Takahira^e, Clélia Akiko Hiruma-Lima^{a*}

^aDepartamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, c.p. 510, CEP 18618-000, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

^bDepartamento de Química Orgânica, Instituto de Química, c.p. 355, CEP 14800-900, UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

^cDepartamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, c.p. 6109, CEP 13083-970, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

^dDepartamento de Morfologia, Instituto de Biociências, c.p. 510, CEP 18618-000 UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

^eDepartamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, c.p. 560, CEP 18618-000 UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

* Corresponding author: Clélia Akiko Hiruma-Lima.

Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rubião Junior s/n, CP 510, CEP 18618-000, Botucatu, SP, Brasil. Phone - 00+5501438116077; fax - 00+551438116251; e-mail: hiruma@ibb.unesp.br

ABSTRACT

This study was designed to discover compounds with anti-ulcer activity and their mechanisms of action. A single administration of MeOH extract of *A. triplinervia* (At) to a dose of 5g/kg (p.o.) did not produce any signs or symptom of toxicity in the treated animals. The oral pre-treatment with At (250, 500 and 1000 mg/kg) in rats and mice with gastric lesions induced by ethanol (30, 85 and 89%) and HCl/ethanol (78, 86 and 89%) decreased the gastric lesions in relation to control group, respectively. In the NSAID-induced gastric lesions, the gastroprotection effects of At decreased with the increase of the dose. In mice pylorus-ligature, administration of At by oral route resulted in a decrease in the total acid and reduction of ulcer index. So the pretreatment with N-nitro-L-arginine methyl ester (an inhibitor of NO synthase), or N-ethylmaleimide (a blocker of SHs), not abolished the gastroprotection effects against ethanol-induced damage observed antiulcer effects probably not involve the participation of nitric oxide (NO) or endogenous sulphydryl compounds (SHs). The substances responsible for the protection action are concentrated in the ethyl acetate fraction (FA) that has showed more efficient (50%) than aqueous fraction (AQF) at dose of 100mg/kg (20%). FA exerts gastroprotection by increase prostaglandins levels. FA was also effective in promoting the healing process in chronic gastric ulcer induced by acetic acid in rats. FA shows how a potent stimulator of gastric epithelial cell proliferation that contributed to acceleration of gastric ulcer healing induced by acetic acid. In addition, no subacute toxicity was observed during all treatment. In imunohistochemical analysis we observed a large number of marked COX 2 cells main in the submucosa and the results shows that G cells declined while D cells increased. We also established the phytochemical profile of At, with the quantification of the total phenolic compounds. The FA contains flavonoids and these compounds may contribute to the observed antiulcerogenic effect of At.

Keywords: *Alchornea triplinervia*; antiulcer activity; prostaglandin E₂; COX₂.

INTRODUCTION

For more than a century, peptic ulcer disease has a major cause of morbid and mortality. The pathophysiology of peptic ulcer disease has centered on imbalance between aggressive and protective factors in the stomach (Chan and Leung, 2002). Despite the progress in conventional chemistry and pharmacology in producing effective drugs, the plant kingdom might provide a useful source of new anti-ulcer compounds for development as pharmaceutical entities or, alternatively, as simple dietary adjuncts to existing therapies (Borelli and Izzo 2000).

The selection of plants is made on the grounds of their traditional use, the chances for research success is greater (Elisabetsky and Wannmacher, 1993). An ethnopharmacological inventory made in the Cerrado formation of the Central region of Brazil showed a high number of medicinal plants used to treat gastric pain and gastritis (Silva et al., 2000). Based on this inventory we selected species of genus *Alchornea* to study its antiulcer property indicated by traditional use of *Alchornea triplinervia* (Spreng.) Muell. Arg. is known popularly as tapiá, caixeta, tapia-guaçu, tapiá-mirim, folha-de-bolo, tamanqueira and canela-samambaia.

In literature it has only one article of the *Alchornea triplinervia*, had been isolated of his leaves amentoflavone (extract CHCl₃/MeOH 9:1) and of the MeOH extract they had been gotten the isocorilagine, gallic acid and methil galate, all the substances had been isolated for CC in Sephadex LH-20 (Braca et al., 2002). Other species of the *Alchornea* genus had antiinflammatory activity such as *Alchornea cordifolia* (Manga et al., 2004). Ebi (2001) detected antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* in methanolic extract of *A. cordifolia* that contains phenolic compounds and terpenoids.

The present work was carried out to investigate the anti-ulcer activity and their mechanisms of action against acute and chronic experimental models of gastric ulcer in rodents and the phytochemical investigation of methanolic extract of *Alchornea triplinervia* leaves and their fractions.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Drugs and chemicals

The chemicals used and other solutions were all of analytical grade. All drugs and reagents were prepared immediately before use. The following drugs were used: ethanol absolute, hydrochloric acid, L-NAME (N-nitro-L-argininemethyl ester), cimetidine, N-ethylmaleimide (NEM) (Sigma Chemical Co.), lansoprazole and piroxicam (Hexal, Brazil), carbenoxolone (Sigma Chemical Co., U.S.A.) and Tween[®] 80. The chemicals used and other solutions were all of analytical grade. All drugs and reagents were prepared immediately before use. The methanolic extract and aqueous fraction were solved in saline 0.9% and ethyl acetate fraction in Tween 80 at 8%.

2.2. Plant material

Leaves of *Alchornea triplinervia* were collected at Botucatu, São Paulo State, Brazil, in August 2003 and the vegetal species is identified by Prof. Dr. Jorge Tamashiro from Institute of Biology of the University of Campinas, São Paulo State, Brazil. A voucher specimen (BOTU: 14873) was deposited at the Herbarium of the Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, Brazil.

2.3. Extraction and isolation of the compounds

The leaves (500 g) of *A. triplinervia* were air dried (7 days at 40 °C) and powdered. The powdered aerial parts were exhaustively extracted with chloroform and methanol successively at room temperature (3 times, 72 h for each solvent). MeOH extract (75 g, 15.0%). A portion (28 g) of the MeOH extract was partitioned among EtOAc/H₂O (1:1, v/v) leading to 7.5 g (27%) of the ethyl acetate fraction and 15 g (54%) of the aqueous fraction.

2.4. Analytical and quantitative measurement of total phenolic compounds by HPLC-UV-PDA

In the aqueous and ethyl acetate fractions the flavonoids concentration was determined as follows: An aliquot of each fraction (30 mg) was filtered in Sep-Pak cartridge (Sigma, C₁₈) and analyzed using a Varian *ProStar* HPLC system equipped with an RP-18 column (250 x 4.60 mm i.d., 5 µm, Phenomenex Luna). The mobile phase was water (A) and acetonitrile (B), both with 0.05% trifluoroacetic acid, in linear gradient elution of 30 to 70% of B in 60 min at a flow-rate of 1.0 mL/min. The effluent was monitored using a *ProStar* 330 photodiode-array ultraviolet detection (UV-PDA) system at 360 nm.

A stock solution (1 mg/mL) of rutin was prepared in methanol. The calibration curve was build with seven different concentrations (10, 20, 50, 100, 200, 300 and 500 µg/mL in rutin) and analyzed in duplicate. The peak areas were correlated with the concentrations according to the calibration curve.

Calibration curve using the external standard rutin was constructed for the determination of the total concentration of flavonoids. The calibration curve was linear over the range of 10-500 µg/mL with a correlation coefficient of 0.9999. All data presented are mean ± standard deviation of four independent experiments ($n = 4$).

2.5. Animals

Male Swiss albino mice (25-35 g) and male Wistar albino rats (150-250 g) from the Central Animal House of the UNESP were used. The animals were fed a certified Nuvilab[®] (Nuvital) diet with free access to tap water under standard conditions of 12 h dark-12 h light, humidity ($60 \pm 1.0\%$) and temperature ($21 \pm 1\%$). Fasting was used prior to all assays because standard drugs were always administered orally (by gavage) or by intraduodenal route using a saline solution (10 mL/kg) as the vehicle. Moreover, the animals were kept in cages with raised floors of wide mesh to prevent coprophagy. All experiments were performed in the morning, and following the recommendations of the Canadian Council on Animal Care (Olfert et al. 1993), The UNESP Institutional Animal Care and Use Committee, approved all of the employed protocols.

2.6. Acute toxicity

The acute toxicity studies were performed in mice. In this assay, a single dose of At were orally administered to groups of animals after a 12 h fast. Animals receiving the vehicle (saline) served as control. The signs and symptoms associated with the At administration (5g/kg, p.o.) were observed at 0, 30, 60, 120, 180 and 240 min after and then once a day for the next 14 days. At the end of the period the number of survivors was recorded. The acute toxicological effect was estimated by the method described by Souza Brito, 1995.

2.7. Antiulcerogenic activity

HCl/ethanol-induced ulcer: The experiment was done as described by Mizui and Doteuchi, 1983⁽¹⁰⁾. Mice were divided into groups at 7-9 animals that were fasted 24 h prior to receiving an oral dose of the vehicle, saline (10 mL/kg), lansoprazole (30 mg/kg), At (at the doses of 250, 500 and 1000 mg/kg body wt.). After 50 min, all groups were orally treated with 0.2 mL of a 0.3 M HCl/60% ethanol solution (HCl/ethanol) for gastric-ulcer induction.

Animals were killed 1 h after the administration of HCl/ethanol, and the stomachs excised. The extent of the lesions was measured and the lesion index expressed as the sum of all lesions as described by Szelenyi and Thieme, 1978.

Ethanol-induced ulcer: Rats were fasted 24 h prior to receiving an oral dose of the vehicle, saline (10 mL/kg), lansoprazole (30 mg/kg), At (at the doses of 250, 500 and 1000 mg/kg), FA (50, 100 and 200mg/kg) and FAQ (100mg/kg). After 60 min, all groups were orally treated with 1 mL of ethanol solution for gastric-ulcer induction. Animals were killed 1 h after the administration of ethanol, and the stomachs excised and gastric damage determined as described above. This experiment was done as described by Morimoto et al, 1991.

NSAID gastric ulcers in mice: In this model, described by Puscas et al, 1997 with modification, gastric lesions were induced with piroxicam (30 mg/kg, s.c.) administered to mice after a 36h fast. At (250, 500 and 1000 mg/kg), cimetidine (100 mg/kg) and saline were administered orally 30 min before the induction of gastric lesions. The animals were killed 4 h after treatment with the ulcerogenic agent. The stomachs were removed and gastric damage determined as described above.

Shay ulcer: Mice were randomly divided in groups that were fasted for 24 hours with free access to water. Thirty min after oral or immediately after intraduodenal administration of single dose of At (500 mg/kg), cimetidine (100 mg/kg) as positive control or vehicle (saline, 10 mL/kg), pylorus ligation was performed as described by Shay et al, 1945. Four hours later the animals were killed, the abdomen opened and another ligation placed around the esophagus close to the diaphragm. The stomach was removed, inspected internally, and its content drained into a graduated centrifuge tube and centrifuged at 3000 rpm for 15 min. The supernatant volume and pH were recorded with a digital pH meter (PA 200, Marconi S.A, Brazil). The total acid content of gastric secretion was also determined by titration to pH 7.0 with 0.01 N NaOH using a digital burette (E.M., Hirschmann Technicolor, and Germany).

Ethanol-induced gastric lesions in L-NAME-pretreated rats: This method was performed as described by Arrieta et al. (2003). The rats were divided into six groups with 7 rats that were fasted 24 h. The animals were treated with L-NAME (N-nitro-L-arginine methyl ester) 70 mg/kg or saline i.p., and thirty minutes later, received an oral dose of the vehicle (10 mL/kg), At (500 mg/kg), FA (100mg/kg) or carbenoxolone (100 mg/kg). After 60 min, all groups were orally treated with 1 mL of ethanol solution for gastric-ulcer induction. Animals were killed 1 h after the administration of ethanol, and the stomachs excised and gastric damage determined as described above.

Ethanol-induced gastric lesions in NEM-pretreated rats (Arrieta et al., 2003): Rats were divided into six groups that were fasted 24 h. They were previously treated intraperitoneally with NEM (N-ethylmaleimide) 10mg/kg or saline; and thirty minutes later, received an oral dose of the vehicle (10 mL/kg), At (500 mg/kg) or carbenoxolone (100 mg/kg). After 60 min, all groups were orally treated with 1 mL of ethanol solution for gastric-ulcer induction. Animals were killed 1 h after the administration of ethanol, and the stomachs excised and gastric damage determined as described above.

Prostaglandin synthesis determination: Rats were divided into groups that were fasted 24 h. Groups consisting of six rats received one of the following solutions: 8% Tween 80 solution (vehicle), indomethacin (20mg/kg, s.c) used as a positive control, and ethyl acetate fraction of *Alchornea triplinervia* (FA=100mg/kg p.o.). The combination of FA and indomethacin was assayed when FA administration was followed 30 min later by indomethacin treatment. Indomethacin was dissolved in 5% sodium bicarbonate solution. Thirty minutes after treatment, all the animals were killed by cervical dislocation and the abdomen was opened. A sample of the corpus (full thickness) was excised, weighed and suspended in 1ml of 1 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4. The tissue was finely minced with a scissor and then incubated at 37°C for 20 min. PGE₂ in the buffer was measured by the

enzyme immunoassay (Amersham). The absorbance was read at 450 nm as previously described by Curtis et al, 1995.

2.8 Healing in acetic acid-induced gastric lesion:

The experiments were done according to the method described by Takagi et al. (1969) with some modifications Okabe and Amagase (2005). Three groups of male Wistar rats fasted for 24 h were used in this experiment (n=6-8). Under anaesthesia, a laparotomy was done in all animals through a midline epigastric incision. After exposing the stomach, 0.05 mL (v/v) of a 30% acetic acid solution was injected into the subserosal layer in the glandular part of the anterior wall. The stomach was bathed with saline (20°C) to avoid adherence to the external surface of the ulcerated region. The abdomen was then closed and all the animals were fed normally. We selected the lower effective dose of ethyl acetate fraction of *Alchornea triplinervia* (F=100 mg/kg); cimetidine (100 mg/kg) or vehicle (10 mL/kg) for the determination of the healing effects by the subacute treatment. All treatments were done orally once a day during 14 consecutive days beginning one day after surgery. Body weight was recorded daily throughout the experiments and the macroscopic analyses and weight of vital organs (liver, kidney, heart spleen and lung) were compared between the different treatments to evaluate the possible subacute toxicity induced by the treatments.

On the day after the last drug administration, the rats were killed and the stomachs were removed. The gastric lesions were evaluated by examining the inner gastric surface with a dissecting magnifying glass. The macroscopic ulcer area (mm²) and curative ratio (%) were subsequently determined as described by Takagi et al. (1969).

Biochemistry analysis: The blood of rats submitted from different treatments was collected immediately after the sacrifice and was submitted to centrifugation (3000 rpm by 10min). After the centrifugation, the serum obtained was reserved in – 20° C until the

biochemical analyses. Automated biochemical analyzer (SBA-200, CELM, BRAZIL) measured serum biochemical parameters such as urea, creatinin, aspartate aminotransferase (AST) alanine aminotransferase (ALT).

Histology methods: The stomach of the rats submitted by different treatment of gastric ulcers in the acid acetic model with different treatments were pushed off and opened by the large curves and the lesion was localized. The lesion was sectioned, and fixed in ALFAC solution (alcohol, chloroform and acetic acid) for 24 h in 4° C. Then the samples were routine processed for embedding in paraplast, and cut into 7 µm thick section. hematoxylin and eosin and PAS (Behmer et al, 1976, Vacca, 1995). The samples were analysed with a Leica microscope associated with Leica Qwin Software (Leica-England).

Morphometric analyses: For the morphometric analyses slices of stomachs were examined in a Leica microscope associated with Leica Qwin Software (Leica-England), where we realized measure in area of regeneration mucosa, variation of method used by Ishihara and Ito (2002).

Immunohistochemistry: The representative slices was deparaffinized, rehydrated and immunostained with the peroxidase anti-peroxidase method. For COX₂ and PCNA- High temperature antigen unmasking technique in 0,01M citrate buffer pH6, 0 in microwave oven, for two times at 5 min. Blocking of nonspecific reaction was performed with 1% normal goat serum and 3% not-fat milk. After each reaction was performed with normal goat serum prior to incubation with the specific antiserum (Table 1). After rising in phosphate buffered saline (0,01 mol/L PBS pH 7,4), the sections were incubated in secondary antiserum. They were then washed in PBS and incubate in ABC (avidine and biotine complex) reagents (ABC kit – Vector) and incubate in peroxidase reaction (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride containing 0,01% H₂O₂ in PBS buffer. After immunostained, the sections were lightly counterstained with Mayer's hematoxylin. The slides were observed under Leica light

microscope. For positive control we use the region of stem cell in mucosa stomach and for negative control the primary and secondary antibody were omitted.

Table 1: Antiserum used in this study

Antiserum	Code	Source	Dilution
PCNA	NCL-PCNA	Novo Castra	1:100
Somatostatin	SC-7819	Caymann chemical	1:20
Gastrin	SC-7783	Santa Cruz	1:20
COX ₂	160106	Santa Cruz	1:200

All antiserum were produce in rabbits. PCNA - Proliferating Cell Nuclear Antigen, COX₂ - Cyclooxygenase 2 polyclonal antibody.

2.9- Statistical analysis

Results were expressed as mean $\pm$ S.E.M. Statistical significance was determined by one-way analysis of variance followed by Dunnett's, Tukey's test or Student's test, with the level of significance at $P < 0.05$.

3 -RESULTS AND DISCUSSION

The balance between the therapeutic versus the toxicological effects of is an important parameter in assessing its applicability as an antiulcer or any pharmacological agent (Ekwall and Ekwall, 1988). At first we investigated the acute toxicity in mice, a single administration methanolic extract of *Alchornea triplinervia* (At) by the oral route to a dose of 5 g/kg did not produce any signs or symptom of toxicity in the treated animals and in the following 14 days after the administration. In autopsy, no significant change was observed in the vital organs of

each animal and no significant changes in daily body gain weight (Figure 1) or organ weight at the end of this period were observed when compared with group treated with vehicle (Table 2).

Since there is no acute toxicity was observed using the At, we continued our studies evaluating the effect of At administered to rodents using different standard experimental models of induced gastric ulcer. In order to establish a general profile of the antiulcerogenic activity of extract, we performed the dose-response curve using three oral doses of 250, 500 and 1000 mg/kg (p.o.) to select the dose that produce the best effect.

Ethanol can stimulate the gastric and oral secretion of gastrin and release of histamine via a reflex both way involving sensory terminals in the gastric and oral mucosa (Tarnawski et al., 1983). The results obtained with ethanol and HCl-ethanol models get similar results with 85% and 89% of gastroprotection at the doses of 500 and 1000 mg/kg of At (Figure 2).

COX₁ (cyclooxygenase-1) inhibition resulting in gastric prostaglandin suppression and it is commonly postulated mechanism of gastro duodenal damage (Peng and Duggan, 2005). Deficiency of endogenous PGs is widely accepted as a major factor in the pathogenesis of gastric lesions caused by NSAIDs. PGs, especially PGE₂, and their analogues inhibit the formation of gastric mucosal necrosis induced by necrotizing agents. Prostaglandins (PGs) are involved in the regulation of a variety of gastrointestinal functions, including blood flow, acid, mucus and HCO₃ secretion (Wolfe et al, 2000). This protective action of PGs against the direct injuries of gastric necrotizing agents is apparently unrelated to their antisecretory properties and has generally been called cytoprotection (Peskar and Maricic, 1998).

However, in the NSAID-induced gastric lesions the animals treated with different doses of At exhibited an unexpected result, i.e., the cytoprotection decreased with the increase of the dose. Animals pretreated with the highest dose did not present cytoprotection (Figure 3). At this model, the At showed absence of gastroprotective effect ($P > 0.05$) at doses of 250

mg/kg and 500 mg/kg, while the dose of 1000 mg/kg induced significant increasing of gastric lesion ($P<0.01$). It is highly probable that At contains different active substance(s), i.e., the substance(s) that protected the gastric mucosa against the damage induced by ethanol and HCl/ethanol is/are different from this/those that presented cytoprotection in the NSAID-induced gastric lesions. In the last case, the substance that habitually presents this kind of pharmacological behavior could be flavonoids; the increase of the flavonoid dose changes the antioxidant activity to a pro-oxidant activity increasing the gastric damage (Gracioso et al., 2002). The literature indicated that other species of the *Alchornea* genera had antiinflammatory activity (Manga et al., 2004). Thus, this result indicates a possible mechanism of action of this plant that was due by chemical composition of this plant that modulation of endogenous prostaglandins. Our results are in concordance with Reppeto and Llesuy (2002) that shown that phenols compounds have a dual effect on prostaglandin biosynthesis, modulating prostaglandin H synthase (PGHS), with low concentrations stimulant and high concentration inhibit PGHS.

Since the most promising result were obtained until this moment, we continued our studies using only a single dose (500 mg/kg) in the next assays, with the purpose of investigating the probable antiulcerogenic mechanisms involved with the action promoted by this extract. It is well known that pylorus ligation causes gastric hypersecretion, but the reasons are not completely explained yet. Brodie (1966) describes that due to the surgery stomach becomes larger, the pressure on sensitive receptors in the antral gastric mucosa increases and activates the vagus-vagal reflex, causing increase of the gastric secretion. Besides, neutrophil migration in the mucosa following pyloric ligation suggests that these cells might be involved in gastric mucosal injury, possibly by releasing free radicals that cause lipid peroxidation and damage in cell membrane (Rastogi et al., 1998). Gastric juice obtained from pylorus-ligated mice was used to analyze the gastric biochemical parameters

(Table 2). Animals pretreated with At by oral route presented decreased ulcerative index and the total gastric acid value. The intraduodenal administration of the At did not change any biochemical parameter of the gastric juice but decreased ulcerative index. Therefore, this result indicated that At presents antisecretory property only when this extract was given by oral route.

Ethanol-induced gastric damage is also associated with a significant decrease in mucosal sulphydryls level such as GSH (glutathione), and pre-treatment with SH-blockers prevents gastroprotection of SH-containing compounds (Szabo et al., 1981). Gastric mucosal SHs including GSH act as antioxidant and are important for maintenance of mucosal integrity in the stomach (Lopez et al, 1996). Pre-treatment with a SH-blocker NEM, not reduced the mucosal protection observed by treatment with At. These findings suggest that an increase endogenous SHs is not involved in the gastroprotective effect of At as shown in the Figure 4.

Vascular changes in gastric mucosa appear to be the most pronounced feature of absolute ethanol-induced injury, maintenance of mucosal vasculature and normal blood flow may be the major mechanism of cytoprotection. It has been demonstrated that the gastric mucosa produces endogenous NO derived from L- arginine and NO participates in gastric defense mechanisms by regulating the gastric defense mechanisms by regulating the gastric mucosal blood flow and gastric mucus secretion (Szalassi et al., 1998). As shown in the Figure 5, a NO synthase inhibitor (L-NAME) also did not attenuate the gastroprotection observed by At, suggesting the endogenous NO not participate in the protect effect of At.

The gastroprotective effect of At was also investigated using two fractions (aqueous and ethyl acetate) obtained from methanolic extract. The pre-treatment with fractions were evaluated against the ethanol gastric lesion because this model presents the best results with extract and with the dose of 100mg/kg in accordance with Schmeda-Hirschmann, 2005 that says the doses in the range 100-300mg/kg is a multiple of traditional doses. The substances

responsible for the protection action are concentrated in the ethyl acetate fraction (FA) that has showed more efficient than aqueous fraction at dose of 100mg/kg. Promising results can be observed from the pre-treatment with ethyl acetate fraction, since it exerted protective effect higher than those obtained with methanolic extract using lower dose (Table 3) and obtained with cimetidine (100 mg/kg) or lansoprazole (30 mg/kg), standard antiulcer drugs in the market.

We determined spectrophotometrically the total flavonoids concentration in the leaves from *A. triplinervia* based on rutin as standard. Figures 7 and 8 presents the chromatogram and UV spectra of a fraction containing mainly phenolic compounds from the leaves of At using High Performance Liquid Chromatography - Ultraviolet - Photodiode Array Detector (HPLC-UV-PDA). The flavonoids content expressed in mg/g were 19.73 % (197.3 ± 0.19 mg/g) in the ethyl acetate fraction and 1.3 % (13.1 ± 0.04 mg/g) in the aqueous fraction from At.

Several flavonoids has been shown to display gastroprotective activity (Schmeda-Hirschmann, 2005). Although the highest amount of flavonoids presents in the ethyl acetate fraction, we observed that pre-treatment with L-NAME did not change the cytoprotection induced by ethyl acetate fraction. Oral administration of ethyl acetate fraction (100mg/kg) to L-NAME (70mg/kg, i.p.) pre-treated animals produced a reduction in the gastric hemorrhagic lesions when compared with the L-NAME-pre-treated control value (Figure 6). The gastroprotection effect of the acetate fraction observed by pre-treatment with L-NAME (52%) was similar to the protective activity observed by pre-treatment with saline (42%). This result indicates that pre-treatment with L-NAME did not alter the acetate fraction-induced cytoprotection of ethanol-induced gastric lesions and hence excludes the role of endogenous NO in mediating the protective effect of ethyl acetate fraction from *Alchornea triplinervia*.

To confirm the involvement of ethyl acetate fraction of At in the PGE₂ synthesis, data were obtained for detection of PGE₂ production using EIA by gastric tissue. Prostaglandins play an important role in modulating gastric mucosal integrity and in regulating gastric acid secretion, but little is known regarding regulation of prostaglandin synthesis by the stomach (Curtis, 1995). Arakawa et al. (1998) suggest that PGs accelerate ulcer healing possibly via angiogenesis, epithelial cell proliferation, and production of growth factors such hepatocyte growth factor and transforming growth factor beta, reconstruction of extracellular matrices, and suppression of inflammatory cell infiltration, in addition to gastroprotective mechanisms. The treatment with ethyl acetate fraction of At induced an increase on PGE₂ production was significantly higher than the basal and control levels. The pre-treatment with indomethacin, inhibitor of cyclooxygenase enzyme, was efficient to inhibit this increase on PGE₂ production induced by ethyl acetate fraction of At. These results show that ethyl acetate fraction of At causes increase in PGE₂ production by activation of cyclooxygenase enzyme (table 4). Hiruma-Lima et al., (2006) clearly indicate the involvement of PGE₂ in the gastroprotective mechanism of the *Alchornea castaneaefolia*.

In the next step, we carried out the histological investigation of the healing effect of FA (100 mg/kg) in ulcers induced by acetic acid, since this fraction was effective in the model of ethanol.

In the past, were only a few acute gastric ulcer models routinely used in the laboratory, such as pylorus-ligation ulcers (Shay ulcers) and stress-induced ulcers. From a pathological point of view, however, these ulcer models were inappropriate for the study of human gastric ulcers, which penetrate the muscular layer of glandular area and occasionally relapse after healing (Okabe and Amagase, 2005). Researchers gradually began to recognize the potential of the method, as there was no alternative way to both study the healing process of ulcers and screen anti-ulcer drugs (Okabe, 1972).

The body weight taken daily before treatments indicated no toxicity sign in the animals treated with FA (100mg/kg), cimetidine and vehicle during 14 days (Figure 9). At the end of the experiment, the relative weight of the vital organs was observed (heart, lung, liver, kidneys and spleen). None of the groups presented significant difference from control group, in relation to the organs weight, suggesting no significant adverse effects in the used dose (Table 6). The treatment during 14 day with FA (100mg/kg/day) did not elicit changes in the evaluated of some serum biochemical parameters related to renal (urea and creatinine) and hepatic toxicities (AST and ALT) (Table 8).

This healing effect of FA on gastric ulcer was not observed by macroscopic analysis of injuries but some differences were doesn't evidence by morphometric analyses (Table 6 and Figure 10). Histologically, an ulcer consists of two major structures; a distinct ulcer margin formed by the adjacent non-necrotic mucosal-the epithelial component, and the granulation tissue at ulcer base- the connective tissue component, mucosal of the ulcer margins forms a characteristic “ healing zone” (Tarnawski, 2005). The increased gastric mucus production using FA was verified via an increase in PAS-positive mucus (Figure 15) and it is an indicative of a gastroprotection a number of factors appear to influence ulcer healing; but mucus and bicarbonate secretion may be important in the ulcer healing process. Since the mucus/bicarbonate layer protects newly formed cells from acid and peptic injury (Tarnawski et al., 2001).

The comparative measure of the normal and regeneration areas had shown the increased of the transition area for the three groups (Table 8). In the sections of animals treated with FA we observed a large proliferation of granulation tissue and a cell proliferation by the PCNA analyze, that consists in an important component of the ulcer healing process because it supplies connective tissue cells (synthesizing extracellular matrix for restoring the lamina

propria) and microvessels for the restoration of the microvasculature with ulcer scar (Tarnawski, 2005).

Szabo and Vincze (2000) and Tarnawski et al. (2001) have demonstrated the capacity of accelerate the ulcer healing process depends of the many factor like a PDGF (platelet derived growth factor), EGF (epidermal growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), stimulation of angiogenesis and cell proliferation. Kitajima et al. (1993) demonstrated the proliferation activity during healing of gastric ulcers by PCNA method. In the morphologic analysis of the submitted blades with PCNA where it can be noticed that the 3 treatments promote the proliferation of the cells; but in stomach submitted with FA was observed PCNA immunohistochemical positive in the lesion area in the base of glands (Figure 11), this possible occurs because the stem cell re-organize for base of gland, indication the unidirectional for the cell proliferation, differ of normal region that have a two direction proliferation (Helander and Hi, 2005).

Gastrin is a hormone secreted by G cells, while somatostatin is secreted by D cells. Gastrin, somatostatin and other hormones regulate the function of gastrointestinal tract such as secretion, movement, absorption, circulation and nutrition of cells (Peng Sun et al, 2002). We used the immunohistochemical method to identify the G and D cells, the results show that G cells declined while D cells increased (Figure 12). Gastrin is an important hormone that plays a central role in the regulation of gastric stimulating acid secretion. The acid inhibition of gastrin is mainly mediated by the release of somatostatin from D-cells when intragastric pH is low (Mccoll et al, 2000). Our results are in accordance with Hiruma-Lima et al., (2006) showing that pretreatment of rats with *Alchornea castaneifolia* marked decrease in the serum gastrin level when compared to the negative control, and, the serum level of somatostatin hormone in rats pretreated increased almost 3 times when compared to the negative control, reaching the same serum level of those rats treated with lansoprazole.

HSP 70 in both isoforms (inducible-HSP 72 or constitutive-HSP 73) exerts a cytoprotective role by interference with stress-induced apoptosis. HSPs may contribute to mucosal protection and ulcer healing by regulating the activity of enzymes such as cyclooxygenase (COX) and nitric oxide synthase (NOS) (Rokutan et al., 2000). HSP70 expression in the ulcer margin was gradually increased with ulcer healing (Tsukimi, 2001). The immunohistochemistry analyses of sections were incubated with specific antibody for HSP70 and animals treated with vehicle or cimetidine presents the marked cells for HSP 70 were situated in submucosa layer. The sections of animals treated with FA was evidenced a large number of marked cells in mucosa and submucosa layers indicated the strong influence of HSPs in healing process induced by FA (Figure 13).

In the stomach, the highest grade of COX₂ expression was observed in the apical lamina propria of the fundus adjacent to the junctional ridge (Haworth, 2005). COX₂ are important for epithelial cell proliferation, migration re-epithelization and reconstruction of gastric glands (Tarnawski et al, 2004). COX₂ not only plays important regulative roles in gastric mucosal defense mechanism but also is pivotal in the process of gastric ulcer healing and produces prostaglandins, which exerts anti-inflammatory actions (Poonam, 2005). The sections of animals treated with FA (Figure 13) demonstrated a large number of COX₂ cells main in the submucosa (Figure 14). These data indicate that FA activates COX₂ and enhances prostaglandin generation such as previously demonstrated in Table 5. Poonam (2005) says that drugs that can lead to an elevation in the expression of COX₂ remain more sucessful in ulcer healing while its inhibition produces a downward effect.

5-CONCLUSION

In conclusion, all these results taken together suggest that methanolic extract from the leaves of *Alchornea triplinervia* did not show acute toxicity exhibited antisecretory property and gastroprotective activity. The observed effects probably not involved the participation of NO or endogenous SHs and the ethyl acetate fraction showed more efficient gastroprotective effect than methanolic extract with lower dose and protecting the gastric mucosal by an increase of PGE₂. The oral administration ethyl acetate fraction (FA) for 14 days accelerated the healing of gastric ulcer in rats by promotes epithelial cells proliferation and acceleration of gastric ulcer healing. In imunohistochemical analysis we observed a large number of COX₂ cells main in the submucosa and the results shows that G cells declined while D cells increased.

ACKNOWLEDGEMENTS

We grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and FUNDUNESP (Fundação para o Desenvolvimento da UNESP) for grants to T.R.C. and J.S.S. and for fundings from Biota-Fapesp Program and to Capes for a grant to Z.P.L.

6-REFERENCES

- Arakawa T, Higuchi K, Fukuda T, Fujiwara y, Kobayashi K, Kuroki T. 1998. Prostaglandins in the stomach: an update. Journal. Clinical. Gastroenterological ; 27 Suppl 1:S1-11
- Arrieta, J., Benitez, J., Flores, E., Castillo, C., Navarrete, A. 2003 Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of

- prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. *Planta Medica* 69 (10), 905-909.
- Behmer, O.A.; Tolosa, E.M.C., Freitas Neto, A.G., 1976. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. EDART, Editora da Universidade de São Paulo, p241.
- Borrelli, F., Izzo, A. A. 2000. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytotherapy Research* 14, 581-591 .
- Braca, A., Mendez, J., Menichini, F., Morelli, I. 2002. Constituents of *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 30, 1109-1111.
- Bravo, R., Flank, R., Blundell, P. A., and MacDonald-Bravo, H. 1987. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . *Nature* 326.
- Brodie BB, Costa E, Dlabac A, Neff NH, Smookler HH. 1966. Application of steady state kinetics to the estimation of synthesis rate and turnover time of tissue catecholamines. *Journal Pharmacological Experimental Therapy*. Dec;154(3):493-8.
- Chan, F.K.L., Leung, W.K. 2002. Peptic-ulcer disease. *Lancet* 360, 933-941
- Chai J, Baatar D, Tarnawski A. 2004 Serum response factor promotes re-epithelialization and muscular structure restoration during gastric ulcer healing. *Gastroenterology*. Jun; 126(7): 1809-18.
- Curtis GH, MacNaughton WK, Gall DG, Wallace JL. 1995. Intraluminal pH modulates gastric prostaglandin synthesis. *Canadian Journal of Physiology Pharmacology*. 73(1):130-4.
- Ekwall, B., Ekwall, K. 1988. Comments on the use of diverse cell systems in toxicity testing. *ATLA* 15, 193-200.
- Ebi, G.C. 2001. Antimicrobial activities of *Alchornea cordifolia*. *Fitoterapia*. 72 (1), 69-72.

- Elisabetsky, E., Wannmacher, L. 1993. The status of ethnopharmacology in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 38, 137-143.
- Gracioso, J. S., Vilegas, W., Hiruma-Lima, C. A., Souza-Brito, A. R. M. 2002. Effects of tea from *Turnera ulmifolia* L. on mouse gastric mucosa support the *Turneraceae* as a new source of antiulcerogenic. *Drugs Biological Pharmaceutical Bulletin*. 25 (4), 470-491.
- Haworth R, Oakley K, McCormack N, Pilling A. 2005 Differential expression of COX₁ and COX₂ in the gastrointestinal tract of the rat. *Toxicological Pathology*.; 33 (2) :239-45.
- Hansson Ha, Hong L, Helander Hf. 1990.Changes in gastric EGF, EGF receptors and acidity during healing of gastric ulcer in the rat. *Acta Physiol Scand*. Feb;138(2):241-2.
- Helander HF, Li H. Cell proliferation in the gastric epithelium of the ulcer rat. *Scand J Gastroenterol*.2005 Dec;40(12):1386-93
- Hiruma-Lima CA, Calvo TR, Rodrigues CM, Andrade FD, Vilegas W, Brito AR. 2005. Antiulcerogenic activity of *Alchornea castaneaefolia*: Effects on somatostatin, gastrin and prostaglandin. 24. *J Ethnopharmacol*.
- Ishihara, M., Ito, M., 2002. Influence of aging on gastric ulcer healing activities of cimetidine and omeprazole. *European Journal of Pharmacology* 31, 209-215.
- Kitajima T, Okuhira M, Tani K, Nakano T, Hiramatsu A, Mizuno T, Inoue K. 1993. Cell proliferation kinetics in acetic acid-induced gastric ulcer evaluated by immunohistochemical staining of proliferating cell nuclear antigen. *Journal of Clin Gastroenterol*. ; 17 Suppl 1:S116-20.
- Lopez, A., Motilva, V., Alarcón de la Lastra, C., Martin, M. J., La Casa, C. 1996. The role of gastric mucosal sulphydryls in the ulcer-protecting effects of cisapride. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 48, 37-40.
- Lorenzi, H., 1998. Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, 3rd ed. Plantarum, São Paulo.

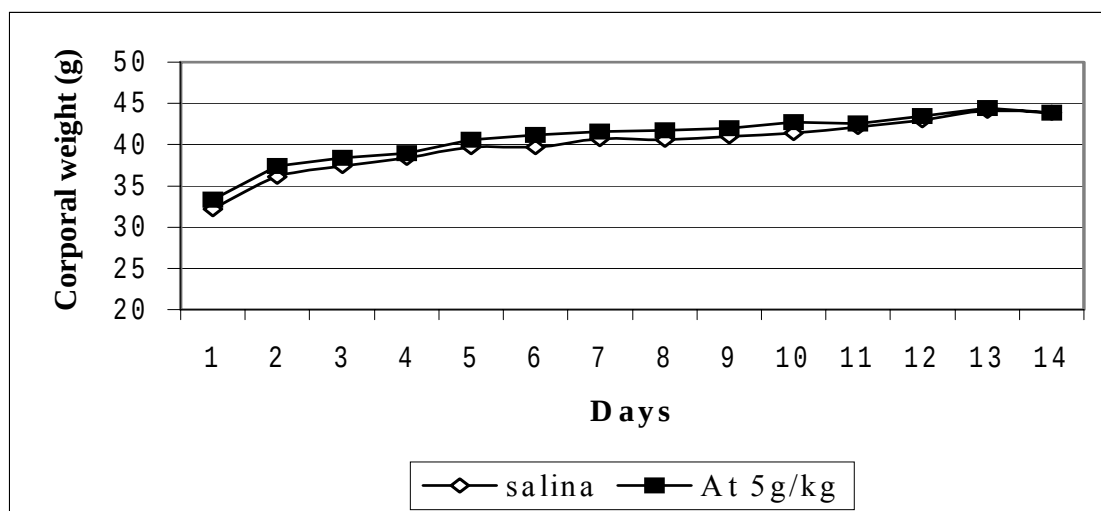
- Manga, M. H., Brkic, D., Marie, D. E. P., Quetin-Leclercq. 2004. In vivo anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumacher & Thonn.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 92, 209-214.
- Mccoll Ke, Kidd J, Gillen D. 2000. Gastric cancer in patients with benign dyspepsia. *Gut*. Nov;47(5):741.
- Mizui, T., Douteuchi, M. 1983. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. *Japanese Journal of Pharmacology* 33, 934-945.
- Morimoto, Y., Shimohara, K., Oshima, S., Sukamoto, T., 1991. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal.
- Olfert, E. D., Cross, B. M., McWilliam, A. A. 1993. *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*: Canadian Council on Animal Care Co., Ontario, 1-213.
- Okabe S, Amagase K. 2005. An overview of acetic acid ulcer models-the history and state of the art of peptic ulcer research. *Biological Pharmaceutical Bulletin*. Aug;28(8):1321-41.
- Okabe S, Pfeiffer Cj. 1972. Chronicity of acetic acid ulcer in the rat stomach. *Am J Dig Dis*. Jul;17(7):619-29.
- Peng, S., Duggan, A. (2005). Gastrointestinal adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Expert Opinion on Drug Safety* 4 (2), 157-169.
- Peskar BM, Maricic N. Role of prostaglandins in gastroprotection. 1998. *Digestive Diseases*. Sci.;43 9 Suppl:23S-29S. Review.
- Poonam D, Vinay Cs, Gautam P. 2005. Cyclo-oxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in experimental chronic gastric ulcer healing. *European Journal of Pharmacology*. Sep 20;519(3):277-84.
- Puscas, I., Puscas, C., Coltau, M., Pașca, R., Torres, J., Márquez, M., Herrero, E., Fillat, O., Ortiz, J. A. 1997. Comparative study of the safety and efficacy of ebrotidine versus

- ranitidine and placebo in the prevention of piroxicam-induced gastroduodenal lesions. *Arzneimittelforschung* 47 (4A), 568-572 .
- Rastogi L, Patnaik G.k., Dikshit, M. 1998. Free radicals and antioxidant status following pylorus ligation induced gastric mucosal injury in rats. *Pharmacological research*. V.38,n2.
- Repetto, M. G., Llesuy, S. F. 2002. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35, 523-534.
- Schmeda-Hirschmann G, Yesilada E. 2005. Traditional medicine and gastroprotective crude drugs. *Journal of Ethnopharmacology*. Aug 22;100(1-2):61-6.
- Shay, H., Komarov, S. A., Fels, S. S., Meranze, D., Gruenstein, M., Siplet, H. 1945. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterology* 5, 43-61.
- Silva, E. M., Hiruma-Lima, C. A., Lólis, S. F. 2000. Etnobotânica no município de Porto Nacional. Symposium of Brazilian Medicinal Plants, Cuiabá, Abstract, p.106
- Souza-Brito, A. R. M. Manual de Ensaio Toxicológicos in vivo. 1995. Editora da Unicamp, Campinas, São Paulo, 15-22.
- Szabo, S., Trier J. S, Frankel P. W. 1981. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. *Science* 214, 200-202.
- Szabo S, Vincze A. 2000. Growth factors in ulcer healing: lessons from recent studies. *Journal Physiology Paris*. Mar-Apr;94(2):77-81
- Szabo, S., Pihan, G., Dupuy, D. 1987. The biochemical pharmacology of sulphhydryls compounds in gastric injury and protection. In: Szabo,S.,Mózsik, G. *New Pharmacological of Ulcer Disease*. Elsevier, New York, 424-446.
- Szallasi, A., Biro, T., Modarres, S., Garlaschelli, L., Petersen, M., Klusch, A., Vidari, G., Jonassohn, M., De Rosa, S., Sterner, O., Blumberg, P. M., Krause, J. E. 1998. Dialdehyde

- sesquiterpenes and other terpenoids as vanilloids. *European Journal of Pharmacology* 356 (1), 81-89.
- Szelenyi, I., Thiemer, K. 1978. Distention ulcer as a model for testing of drugs for ulcerogenic side effects. *Archives of Toxicology* 41, 99-105.
- Takagi, K., Okabe, S., Saziki, R., 1969. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. *Japanese Journal Pharmacology* 19, 418-426.
- Tarnawski, A., Hollander, D., Stachura, J., Krause, W. J. 1983. Arachidonic acid protection of gastric mucosa against alcohol injury: sequential analysis of morphologic and functional changes. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 102, 340-351.
- Tarnawski A., Szabo I.L., Husain S.S. and Soreghan B. 2001. Regeneration of gastric mucosa during ulcer healing is triggered by growth factors and signal transduction pathways. *Journal Physiology Paris* 95, 337-344.
- Tsukimi, Y., Okabe, S. 2001. Recent advances in gastrointestinal pathophysiology: Role of heat shock proteins in mucosal defense and ulcer healing. *Biological Pharmaceutical Bulletin* 24, 1-9.
- Urrea-Bulla, A., Suárez, M., Moreno-Murillo, B., 2004. Biological activity of phenolic compounds from *Alchornea glandulosa*. *Fitoterapia* 75, 392-394.
- Vacca, L.L. *Laboratory Manual of Histochemistry*. 1985. Raven Press, New York, p.578.
- Wolfe, M. M., Sachs G., 2000. *Gastroenterology*, 118, p.9-31.

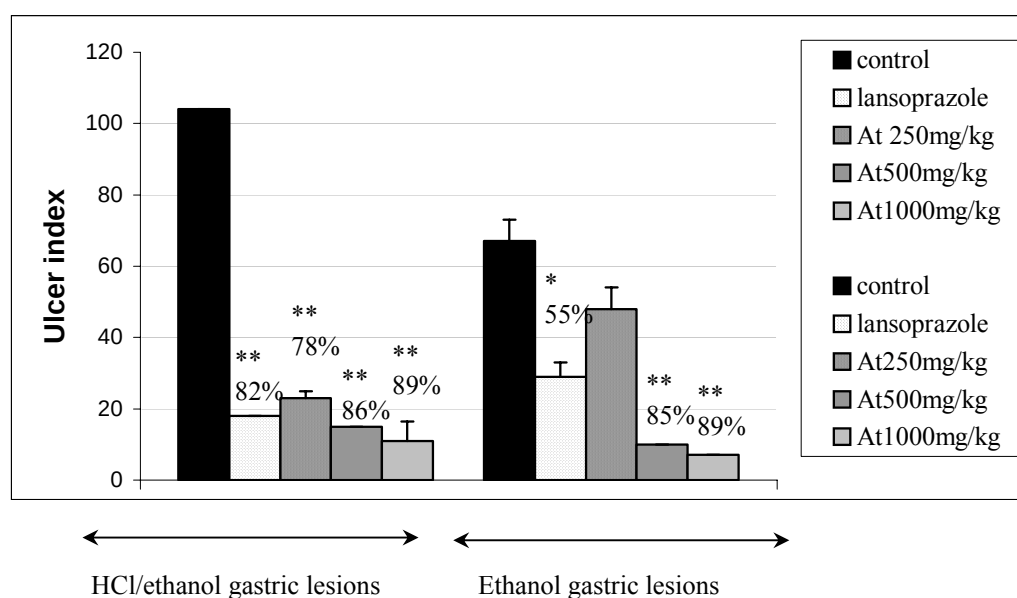
TABLES AND FIGURES

Figure 1. Body gain weight after acute treatment with *Alchornea triplinervia* extract (At) in mice.



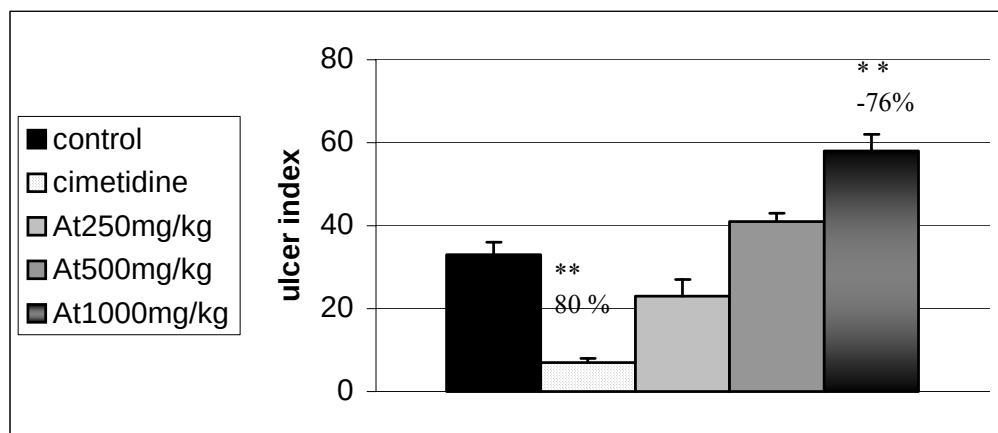
Results are mean $\pm$ S.E.M.; n=7 Student's test. No significant $p>0.05$.

Figure 2. Effects of lansoprazole and the methanolic extract of leaves of *A. triplinervia* (At) on ethanol and HCl/ethanol induced gastric lesions in mice.



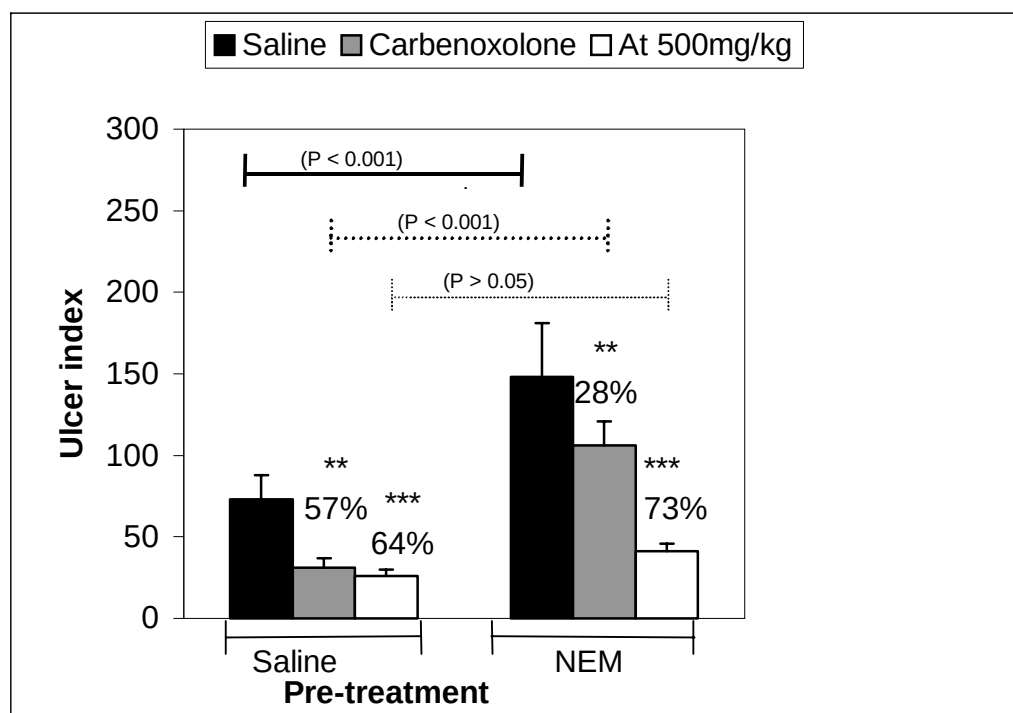
Results are mean $\pm$ SEM; HCl-ethanol Anova Dunnett ** $p<0.01$, $F_{(4;31)} = 138.55$; . Ethanol: Anova Dunnett * $p<0.05$ / ** $p<0.01$, $F_{(4;34)} = 28.56$.

Figure 3. Effects of cimetidine and the methanolic extract of leaves of *A. triplinervia* (At) on gastric lesions in mice induce by NSAID's.



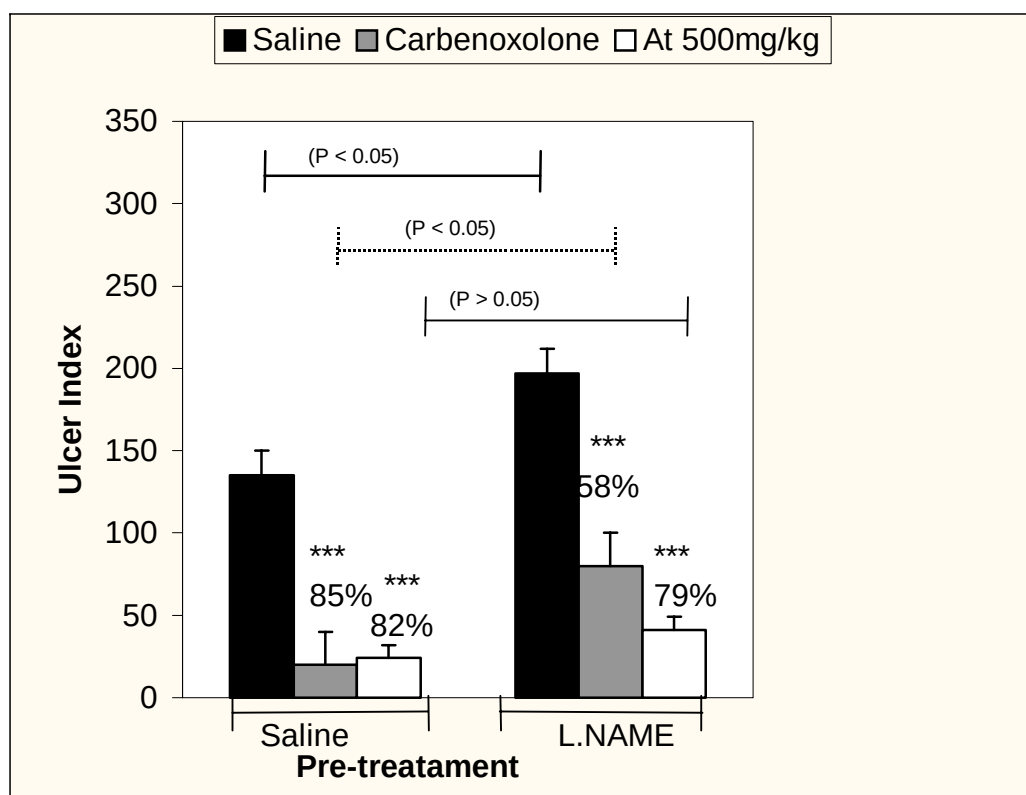
Results are mean $\pm$ S.E.M. ANOVA Dunnett's test ** $p < 0.01$, $F_{(4;34)} = 27.17$.

Figure 4. Effects of carbenoxolone and the methanolic extract of leaves of *A. triplinervia* (At) on ethanol gastric lesions in rats pre-treated with NEM.



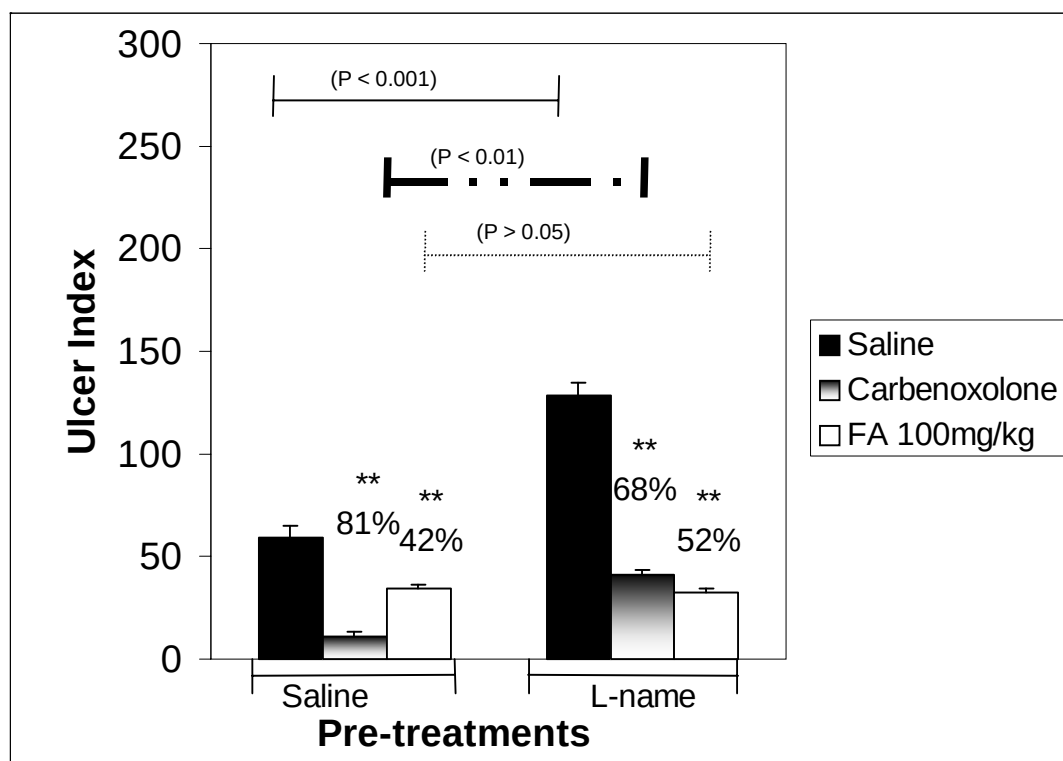
Results are mean $\pm$ S.E.M. ANOVA. Anova Turkey test U.L.I.; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.001$, $F_{(5;37)} = 41.37$.

Figure 5. Effects of carbenoxolone and the methanolic extract of leaves of *A. triplinervia* (At) on ethanol gastric lesions in rats pre-treated with L-NAME



Results are mean $\pm$ S.E.M. ANOVA Turkey test U.L.I *** $p < 0.001$, $F_{(5,35)} = 28.09$

Figure 6. Effects of cimetidine and the ethyl acetate fraction of *A. triplinervia* (FA) on ethanol gastric lesions in rats.



Results are mean $\pm$ S.E.M. Anova Turkey test U.L.I.; ** $p < 0,01$, $F_{(5;32)} = 77.95$.

Figure 7. HPLC profile of the ethyl acetate fraction *Alchornea triplinervia* (At). Chromatographic conditions: RP-18, 250 x 4,6 mm d.i. x 5 μ m, [H₂O (TFA 0,05%)/ACN (TFA 0,05%)] 30-70 % in 60 min, 1,0 mL/min, λ 360 nm.

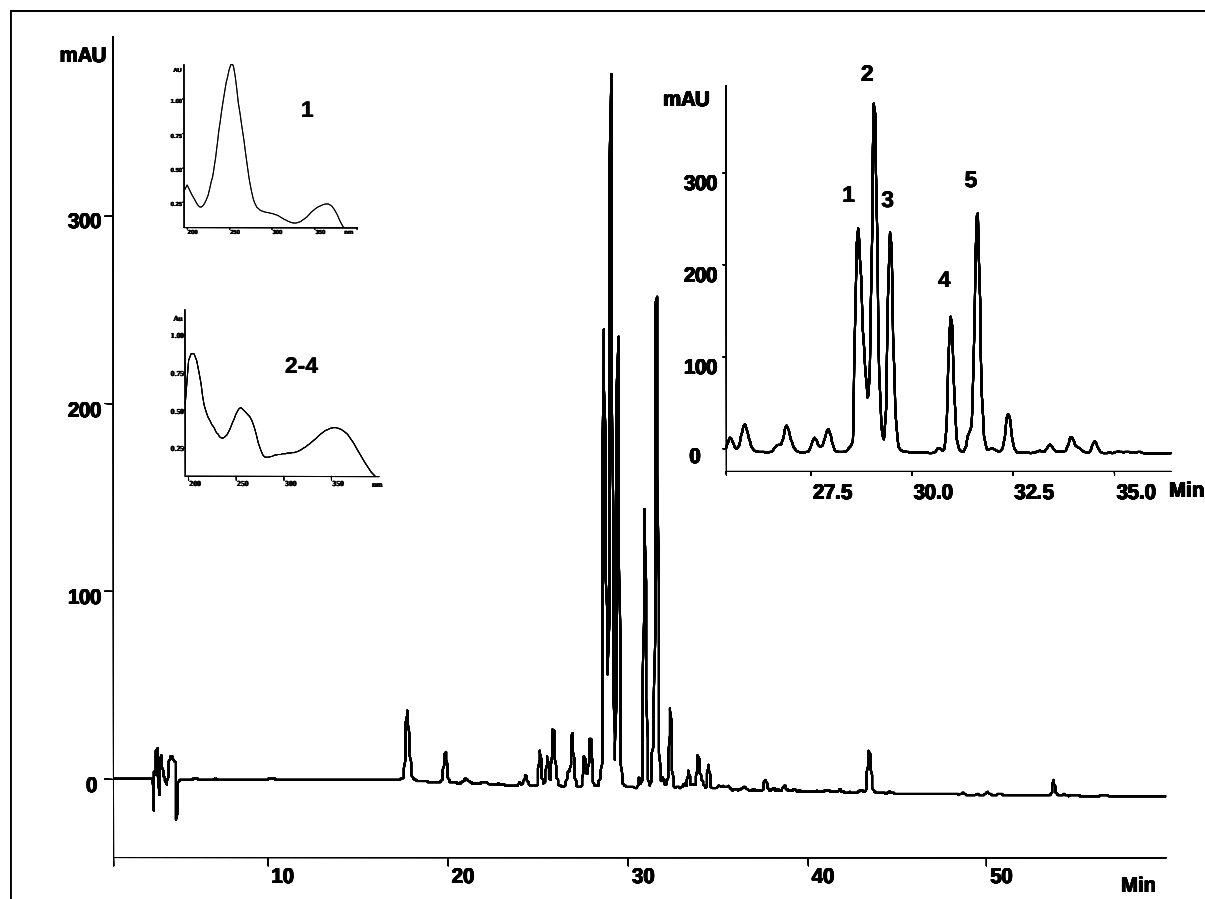


Figure 8. HPLC profile of the aqueous fraction of *Alchornea triplinervia* (At). Chromatographic conditions: RP-18, 250 x 4,6 mm d.i. x 5 μ m, [H₂O (TFA 0,05%)/ACN (TFA 0,05%)] 30-70 % in 60 min, 1,0 mL/min, λ 360 nm.

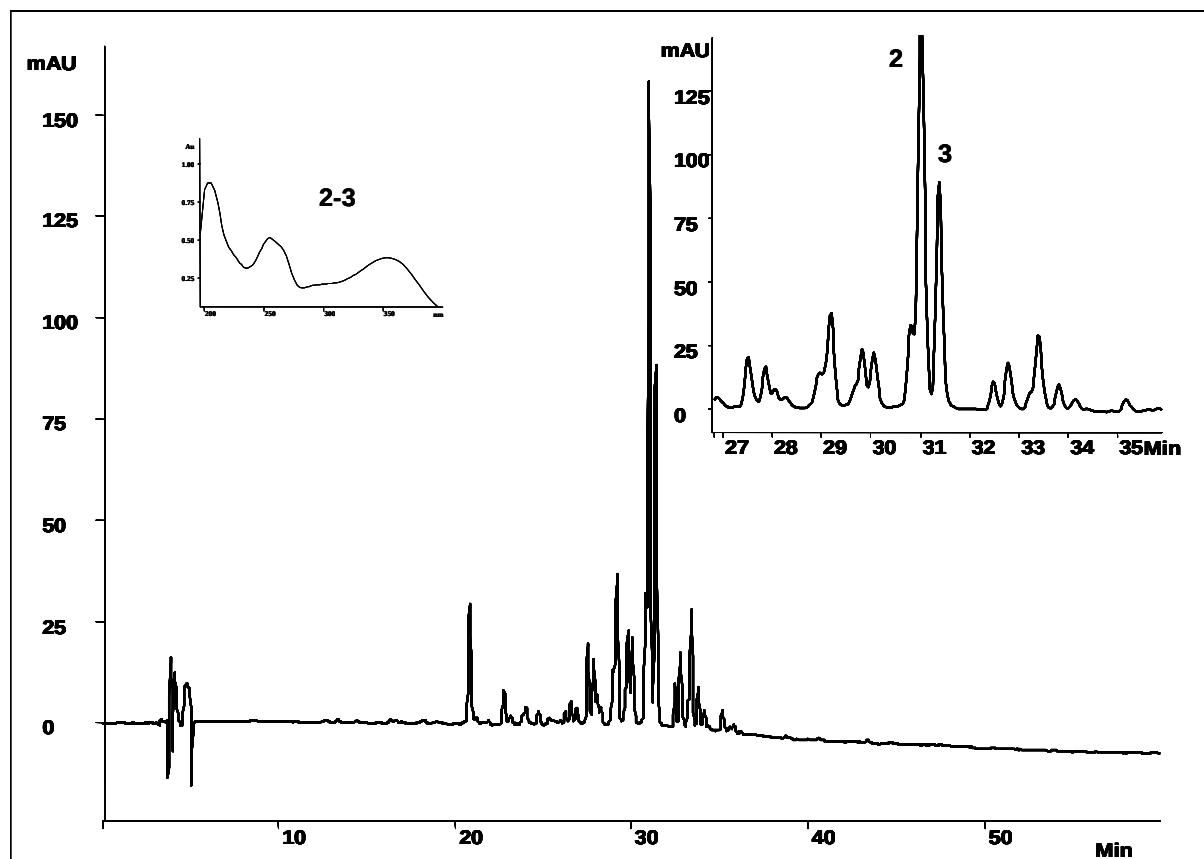


Figure 9: Effects on body organ weight and mortality of a single dose (100 mg/kg, p.o.)/day of ethyl acetate fraction of *Alchornea triplinervia* leaves (FA) administered during 14 consecutive days after ulcer formation. Results are mean $\pm$ SEM.

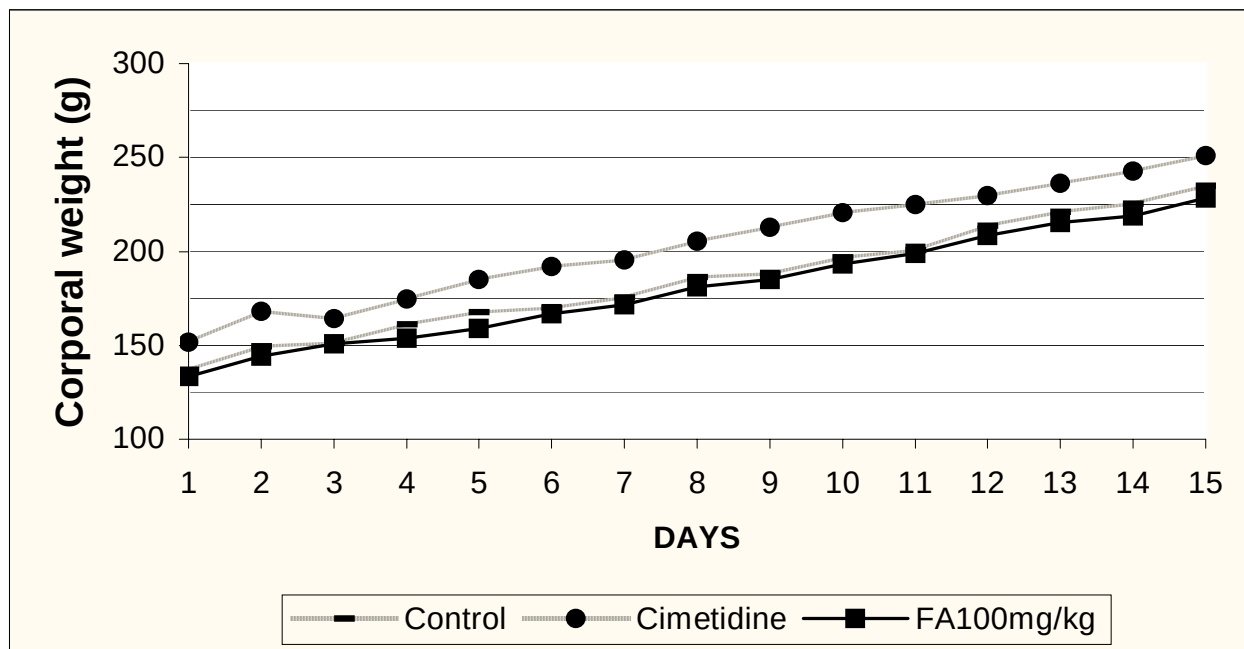


Table 2: Evaluation of the acute toxicity of methanolic extract of *Alchornea triplinervia* (At) in mice.

Weight (g)	Control	<i>At</i> 5g/kg
Corporal	43.86 ± 3.08	43.00 ± 5.96
Kidney	5.87 ± 0.0 26	5.43 ± 0.03
Lungs	2.72 ± 0.08	2.96 ± 0.02
Liver	23.93 ± 0.65	242.9 ± 1.19
Heart	1.90. ± 0.10	2.17 ± 0.02
Spleen	1.87 ± 0.11	1.62 ± 0.24
Mortality	0/7	0/7

Results are mean ± S.E.M.; n=7 Student's test. No significant $p > 0.05$.

Table 3: Effects of cimetidine and a single dose of methanolic extract leaves of *A. triplinervia* (At) administered orally (p.o.) or intraduodenally (id) on gastric juice parameters in pylorus-ligature-induced gastric lesions in mice.

Treatment		N	Dose mg/k g	Total acid (μ Eq/mL/4h)	pH	Gastric Volume (mL)	U.L.I
Control	i.d	9	-	32.11 $\pm$ 1.18	2.50 $\pm$ 0.34	0.98 $\pm$ 0.07	49.72 $\pm$ 4.86
Cimetidine		8	100	18.77 $\pm$ 2.22**	3.90 $\pm$ 0.43*	0.82 $\pm$ 0.06	12.50 $\pm$ 1.95**
<u>At</u>		8	500	29.72 $\pm$ 1.98	1.70 $\pm$ 0.26	1.12 $\pm$ 0.03	19.80 $\pm$ 1.63**
<u>Control</u>	oral	7	-	46.57 $\pm$ 3.50	3.00 $\pm$ 0.26	0.90 $\pm$ 0.09	46.57 $\pm$ 3.52
<u>Cimetidine</u>		8	100	16.87 $\pm$ 2.25**	2.50 $\pm$ 0.19	1.09 $\pm$ 0.08	22.14 $\pm$ 3.32**
<u>At</u>		8	500	4.00 $\pm$ 0.50**	3.30 $\pm$ 0.37	1.05 $\pm$ 0.11	9.25 $\pm$ 1.16**

Results are mean $\pm$ SEM; . **i.d route** ANOVA, Dunnett test ** $p < 0.01$ for a $[H^+]$ $F_{(2,22)} = 15.37$; Dunnett test $p > 0.05$ gastric volume: $F_{(2,22)} = 13.95$ for pH: * $p < 0.05$ $F_{(2,22)} = 9.99$; for U.L.I ** $p < 0.01$ $F_{(2,22)} = 39.01$. **p.o route**: ANOVA, Dunnett test ** $p < 0.01$ for a $[H^+]$ $F_{(2,23)} = 93.11$; Dunnett test $p > 0.05$ gastric volume: $F_{(2,20)} = 0.94$, for pH: * $p < 0.05$ $F_{(2,20)} = 2.03$; for U.L.I ** $p < 0.01$ $F_{(2,20)} = 47.47$.

Table 4- Effects of aqueous and ethyl acetate fractions (FA) obtained from methanolic extract of *A. triplinervia* on gastric lesion induced by ethanol in rats.

Treatments	Dose	N	pH	U.L.I	%
(p.o.)	(mg/kg)			(mm)	protection
Control	10ml/kg	6	4.66 ± 0.76	100.66 ± 11.9	----
Lanzoprazole	30	6	7.33 ± 0.20**	21.33 ± 5.65**	79
Ethyl acetate	50	6	6.4 ± 0.40	88.40 ± 18.44	12
Fraction	100	5	5.16 ± 0.54	50.50 ± 2.50**	50
(FA)	200	5	5.33 ± 0.42	11.83 ± 2.79**	88
Control	10ml/kg	6	6.00 ± 0.25	92.83 ± 16.17	-
Lanzoprazol	30	6	6.15 ± 0.35	31.34 ± 5.00**	60
Aqueous	100	5	5.40 ± 0.23	71.80 ± 10.12	22
Fraction (FAQ)					

Results are mean ± S.E.M; Anova Dunnett's **p<0,01, $F_{(4,24)}=17.88$ for U.L.I. e $F_{(4,24)}=4.5$ for pH. ANOVA **p<0,01 $F_{(3,15)}=5.06$.

Table 5. Effect of ethyl acetate fraction from *Alchornea triplinervia* extract (FA) on PGE₂ levels in gastric mucosal from rats.

Treatments	Dose	N	[PGE ₂] ng/ g tissue
Control (p.o)	10ml/kg	6	1.86 ± 0.34
Control (p.o) + Indomethacin (s.c)	10ml/kg + 30 mg/kg	6	1.36 ± 0.20
FA (p.o)	100 mg/kg	6	6.50 ± 0.90*
FA (p.o) + Indomethacin (s.c)	100 mg/kg + 30 mg/kg	6	4.30 ± 0.60

Results are mean ± S.E.M; Anova Dunnett's, *p<0,05 F_(3,19) =17.76.

Table 6 - Effects of the treatment by 14 consecutive days with ethyl acetate fraction of *Alchornea triplinervia* (FA) 100mg/kg and cimetidine on healing of ulcer produced by acetic acid solution into the stomachs of rats. The ulceration was score on the 15th day after surgery.

Treatment (p.o)	N	Dose (mg/kg)	Lesion Extern area AE (mm ²)	Lesion Intern area AI (mm ²)
Control	4	-	62.00 ± 20.80	21.25 ± 4.08
Cimetidine	4	100	110.25 ± 18.39	31.50 ± 7.28
FA	5	100	71.80 ± 13.39	21.00 ± 2.58

Results are mean ± SEM p>0.05 AE F_(2,11) =2.06; AI F_(2,11) =1.42.

Table 7- Evaluation of the subacute toxicity. Effects on body organ weight, relative weight of the vital organs and serum biochemical parameters of a single dose of ethyl acetate fraction (FA) of *Alchornea triplinervia* leaves (100 mg/kg, p.o.) Administered during 14 consecutive days after ulcer formation.

Weight (g)	Control 10ml/kg	Cimetidine	<u>FA</u>
Corporal	235.05 ± 9.65	250.82 ± 10.22	228.48 ± 10.90
Kidney	1.69 ± 0.09	1.85 ± 0.06	1.72 ± 0.06
Lungs	1.54 ± 0.10	1.47 ± 0.04	1.52 ± 0.12
Liver	6.24 ± 0.86	6.86 ± 0.70	6.07±0.75
Heart	0.91 ± 0.05	1.00 ±0.06	0.94±0.04
Spleen	0.65 ± 0.08	0.73 ± 0.08	0.64 ± 0.04
Mortality	0/5	0/5	0/5

Results are mean ± SEM; n=5 Dunnet's test.
No significant p>0.05.

Table 8- Effects on epithelia height of a single dose (100 mg/kg, p.o.) of ethyl acetate fraction of *Alchornea triplinervia* leaves (FA) administered during 14 consecutive days after ulcer formation.

Epithelia height	Normal	Area of regeneration
Control	437.64± 60.96	859.98 ± 53.56
Cimetidine	464.06±39.94	858.87±62.30
FA	545.61±71.86	740.99±34.70

Results are mean ± SEM; area normal no significant p>0.05 $F_{(2,11)} = 2.79$

Dunnet's test.

Table 9 - Effects on serum biochemical parameters of a single dose (100 mg/kg, p.o.) of ethyl acetate fraction of *Alchornea triplinervia* leaves (FA) administered during 14 consecutive days after ulcer formation.

Serum biochemical parameters	Control	Cimetidine	FA
ALT (UI/L)	150.00± 8.60	112.82 ± 23.82	115.20 ± 3.90
AST (UI/L)	222.55± 11.23	244.57 ± 20.99	264.66 ± 18.03
Urea (mg/dl)	45.29 ± 1.75	41.83 ± 1.10	48.16 ± 4.03
Creatinin (mg/dl)	0.88 ± 0.04	0.63 ± 0.04	0.72 ± 0.06

Results are mean ± S.E.M. ANOVA followed by Dunnett's test. No significant $p > 0.05$. AST $p > 0.05$, $F_{(2,16)} = 0.17$; ALT $p > 0.05$, $F_{(2,14)} = 3.20$; Uréia $p > 0.05$, $F_{(2,17)} = 0.31$; Creatinina $p > 0.05$, $F_{(2,17)} = 1.28$.

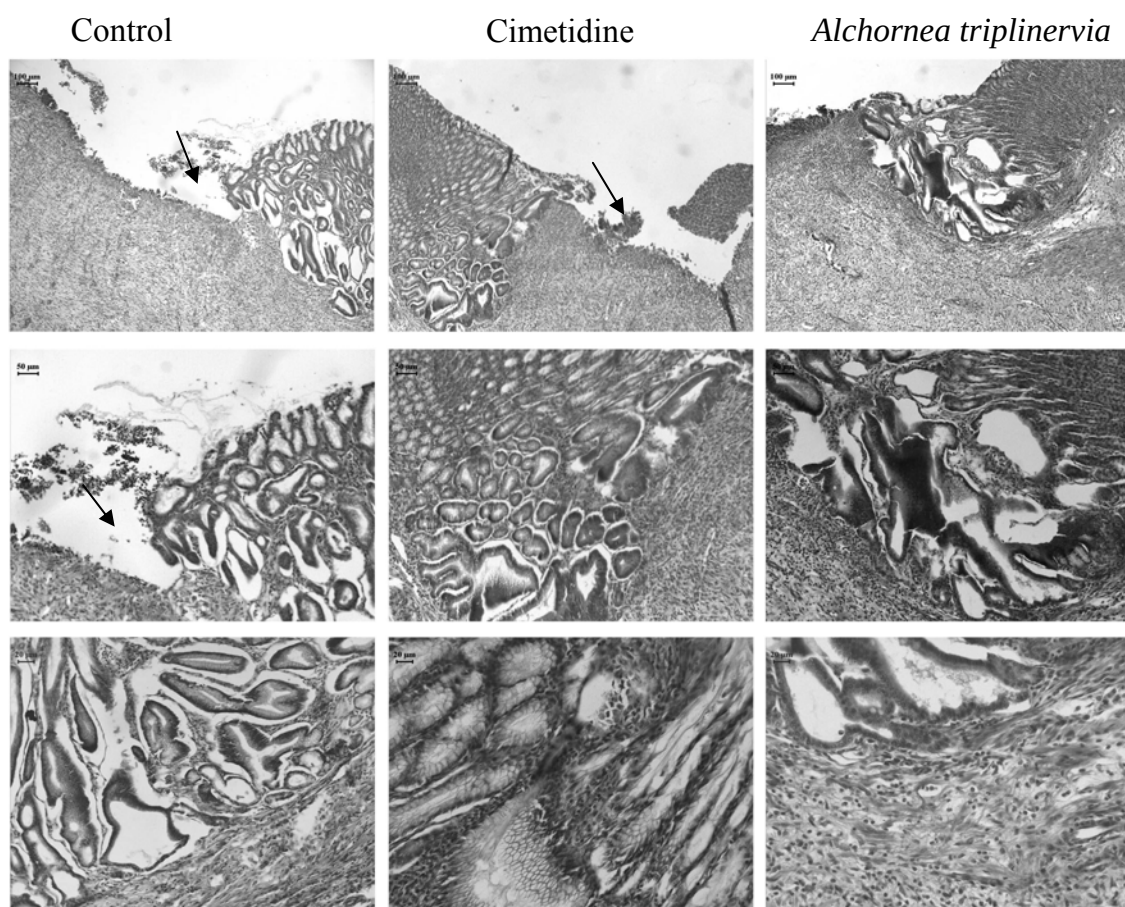
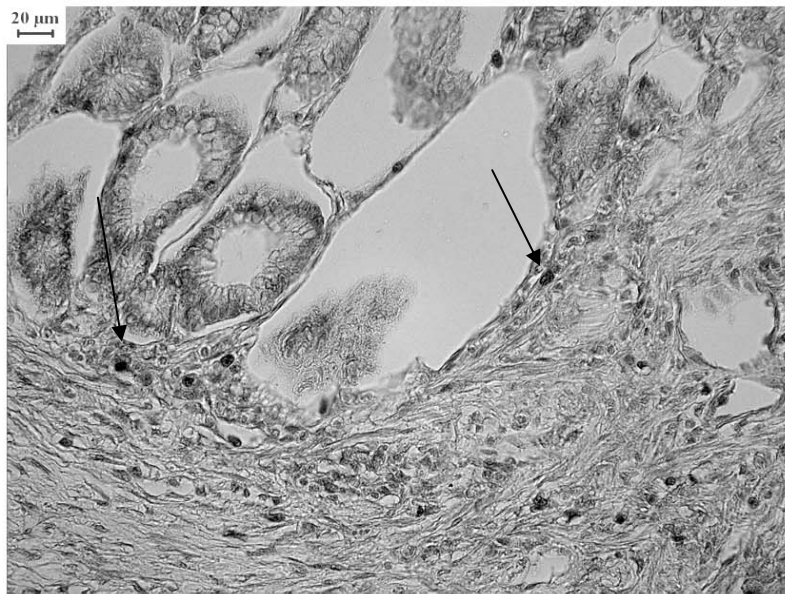
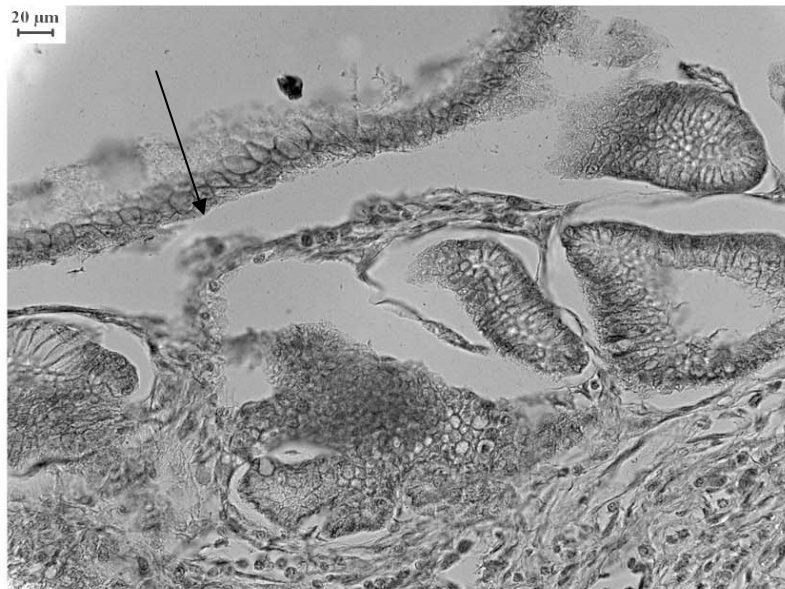
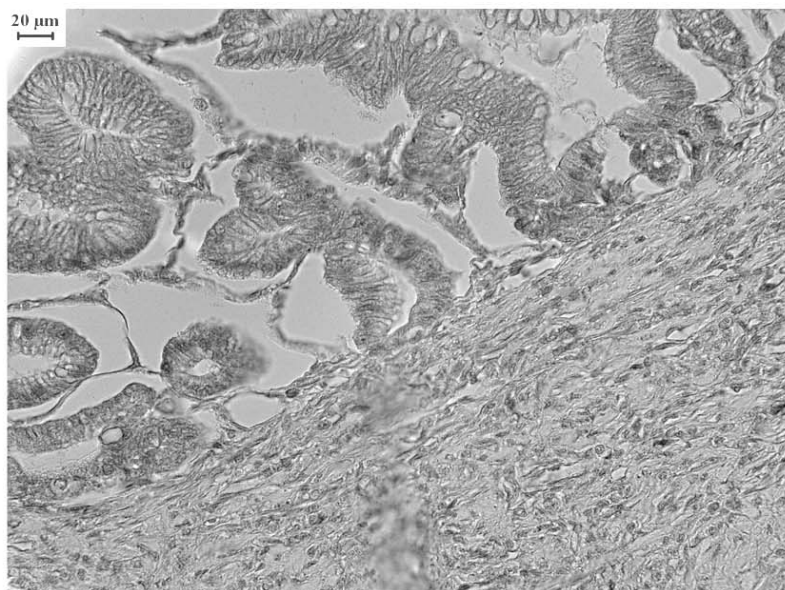


Figure 10: Histological analyses of stomach of rat treatment Tween 80 at 8% (10 mL/kg), cimetidine (100 mg/kg) and acetate fraction of *Alchornea triplinervia* (100 mg/kg) stained with hematoxilyne and eosine. The head arrow indicates the lesion area.



Gastrine

Somatostatin

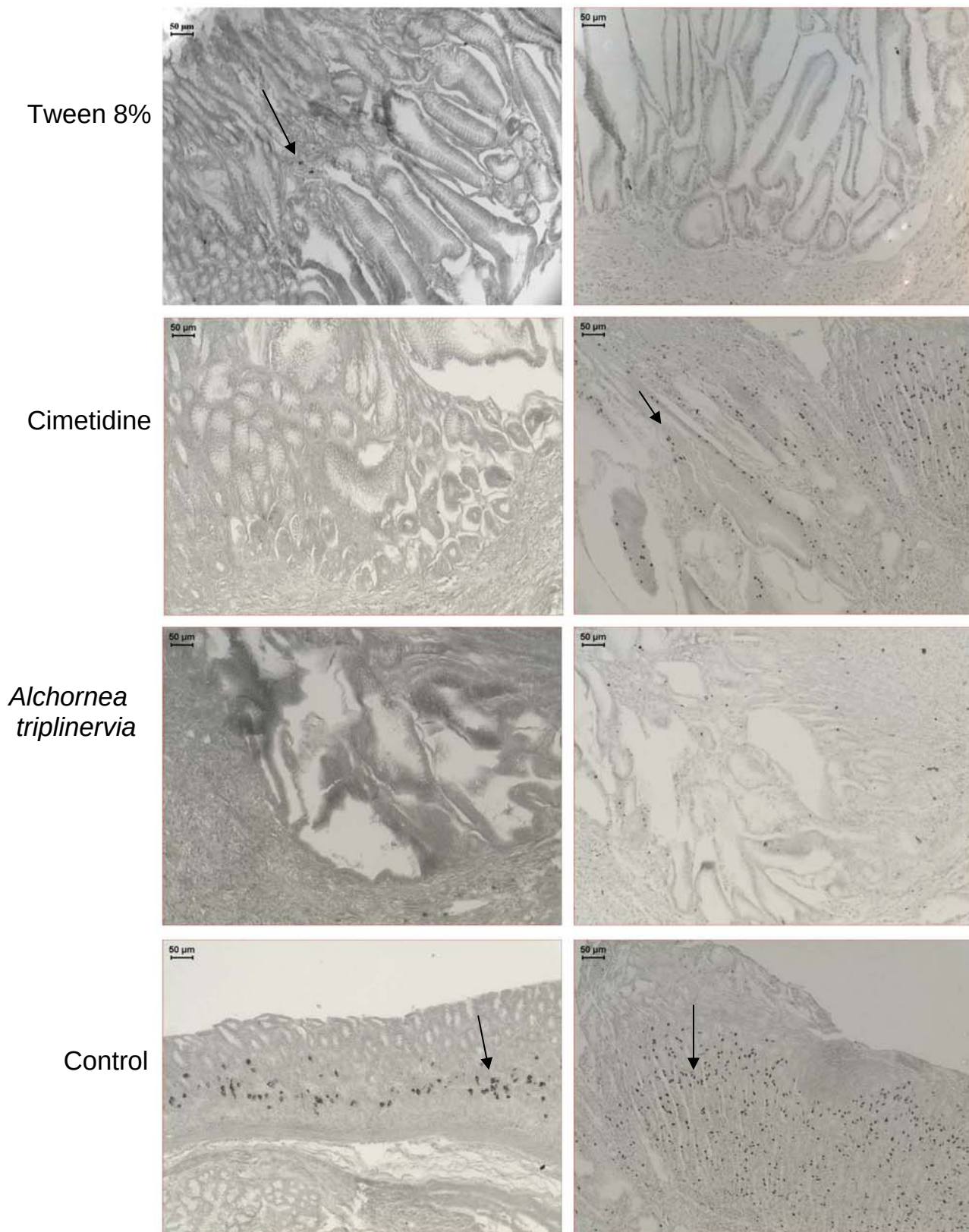


Figure 12: Histological analyses of stomach of rat Tween 80 8% (10 mL/kg), cimetidine (100 mg/kg) and acetate fraction of *Alchornea triplinervia* (100 mg/kg) and area without lesion, immunohistochemistry to gastrin, somatostatin immunostained with peroxidase method. Arrow to indicate nucleus or immunolabel.

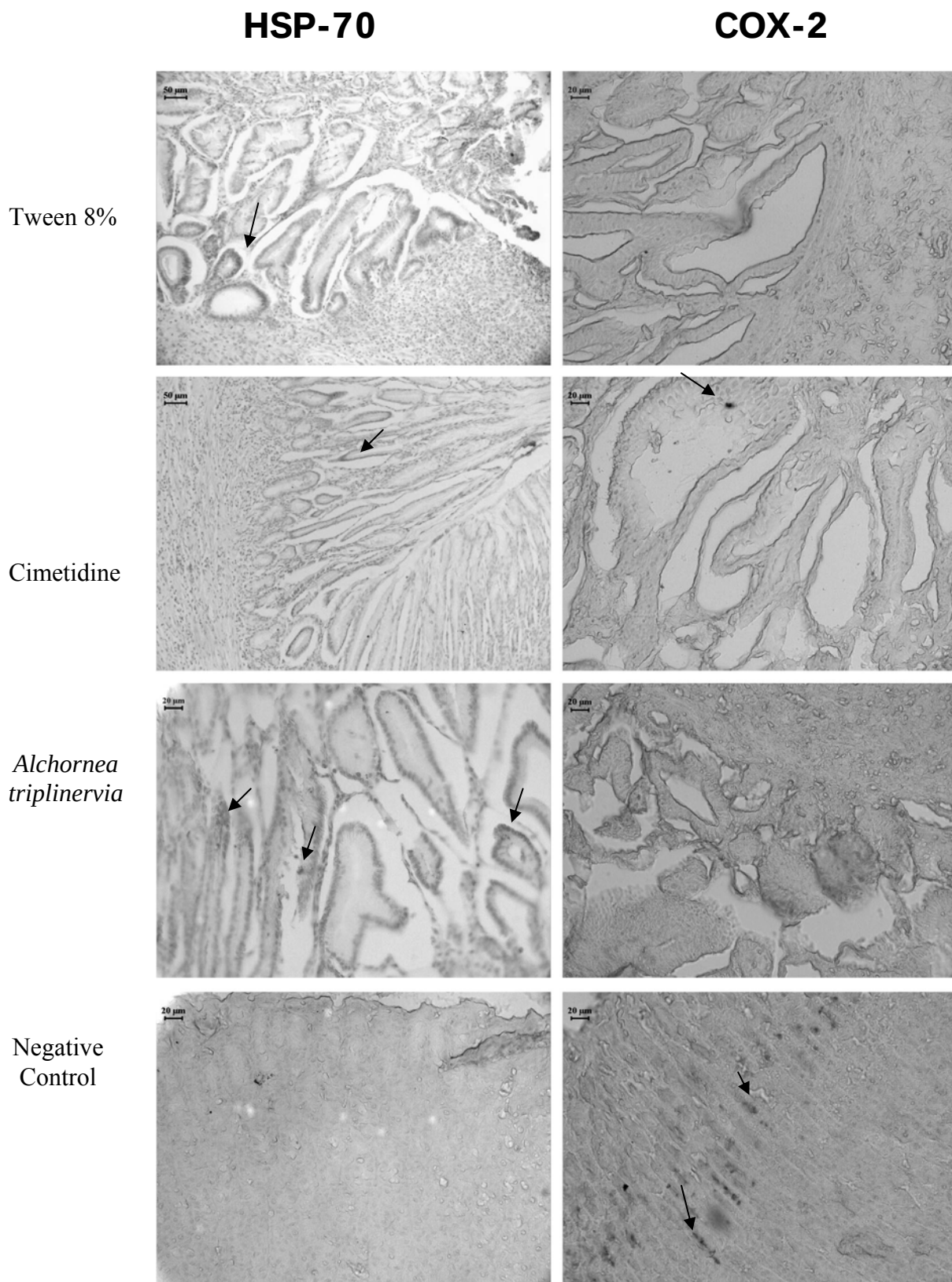


Figure 13: Histological analyses of stomach of rat Tween 80 at 8% (10 mL/kg), cimetidine (100 mg/kg) and acetate fraction of *Alchornea triplinervia* (100 mg/kg) and area without lesion, immunohistochemistry to HSP and COX2 immunostained with peroxidase method. The head arrow indicates the cells COX2 ad HSP positive.

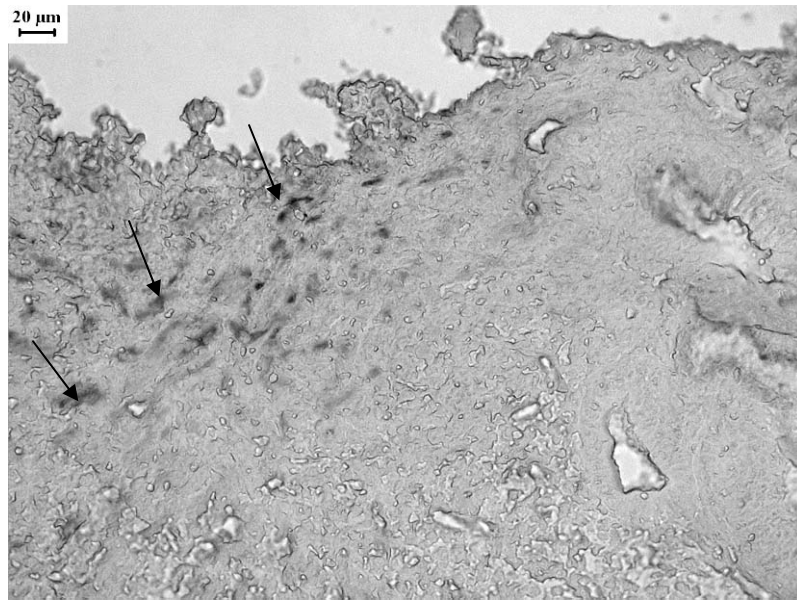
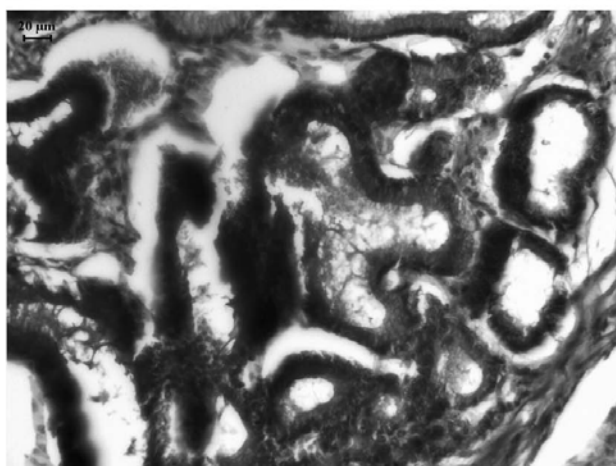


Figure 14: Histological analyses of stomach of rat treatment acetate fraction of *Alchornea triplinervia* (100 mg/kg) .The head arrow indicates immunolabel COX-2 in submucosa.

Tween 8%



Cimetidine



Alchornea triplinervia

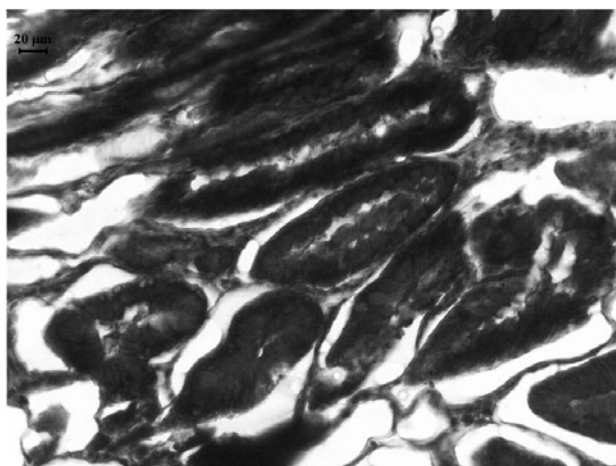


Figure 15: Histological analyses of stomach of rat Tween 80 8% (10 mL/kg), cimetidine (100 mg/kg) and acetate fraction of *Alchornea triplinervia* (100 mg/kg) i to PAS method.

RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS

<i>Planta</i>	<i>Alchornea glandulosa</i>	<i>Alchornea triplinervia</i>
<i>Parte</i>	Folhas	Folhas
<i>Extrato</i>	MeOH	MeOH
<i>Toxicidade Aguda</i>	-	-
<i>Etanol</i>	*500mg/kg =57% *1000mg/kg=85%	**500mg/kg=85% ** 1000mg/kg=89%
<i>Hcl-Etanol</i>	**250mg/kg=64%	**250mg/kg =78% **500mg/kg=86% ** 1000mg/kg=89%
<i>DAINE</i>	**250mg/kg =78% **500mg/kg=34%	** 1000mg/kg=-76%
<i>Piloro Oral</i>	1000mg/kg *V↑, pH-,*↓ [H+]	500mg/kg V -, pH-, **↓ [H+] -
<i>Piloro intraduodenal</i>	1000mg/kg **V ↑+,pH-,**↓ [H+]-	500mg/kg V -,pH-, [H+] -
<i>Óxido Nítrico</i>	1000mg/kg -	500mg/kg -
<i>Sulfidril</i>	1000mg/kg +	500mg/kg -
<i>Motilidade</i>	-	-
<i>Cicatrização</i>	250mg/kg +	100mg/kg +
<i>Bioquímicos séricos</i>	Uréia-, creatinina- AST-, ALT-	Uréia-, creatinina- AST-, ALT
<i>Imunohistoquímica</i>	PCNA+	PCNA+, COX + HSP+ GAST-, SOMAT+

Porcentagem de proteção:*= P<0.05, **= P,0.01. Única dose testada:+ apresentou atividade, - não possui atividade. Para piloro V (volume) H+ (concentração de íons H+).

PCNA=antígeno nuclear de células em proliferação; COX=COX2; HSP70= Heat shock protein 70; GAST=gastrina; SOMAT=Somatostatina.

IV- DISCUSSÃO

O processo de seleção é certamente de extrema importância para o sucesso do estudo farmacológico de plantas medicinais. Vários métodos têm sido descritos e empregados para a seleção de plantas, todavia a literatura mostra com certa frequência que os resultados mais satisfatórios são geralmente obtidos quando a seleção é feita com base nos estudos etnofarmacológicos e posteriormente por taxonomia química (Yunes e Calixto, 2001). A quimiotaxonomia foi utilizada neste trabalho e mostrou que plantas do mesmo gênero têm propriedades farmacológicas semelhantes. Os resultados obtidos com *Alchornea triplinervia* (At) e *Alchornea glandulosa* (Ag) levando-se em consideração diferentes doses e frações utilizadas, se mostraram bastantes semelhantes aos obtidos com *Alchornea castanaefolia* (Hiruma-Lima et al., 2006).

Primeiramente, foi realizado o ensaio de toxicidade aguda; que foi analisado de acordo com Souza-Brito (1995), forneceu informações dos riscos resultantes de uma exposição a curta duração pela via escolhida; no caso a via oral. A administração da dose de 5000 mg/Kg de ambos os extratos não promoveu mortalidade, nem alteração do peso corporal e dos órgãos vitais, nenhum animal morreu, durante os 14 dias de observação. Portanto, os extratos de ambas as plantas estudadas não apresentaram efeito tóxico agudo aparente. Estes resultados são considerados importantes, pois demonstraram segurança na utilização dos extratos vegetais para a realização dos ensaios biológicos em que a dose máxima utilizada de 1000mg/Kg é cinco vezes menor do que aquela utilizada no ensaio de toxicidade.

Após a verificação da ausência de toxicidade dos extratos polares de Ag e At foram realizados os primeiros testes para avaliação do efeito gastroprotetor em modelos de úlcera gástrica em ratos e camundongos.

Os modelos de indução de úlceras por HCl/Etanol e Etanol absoluto provocam as lesões de maneira multifatorial e formam lesões necróticas na mucosa. A patogênese das úlceras induzidas por etanol ainda é desconhecida, estas lesões são caracterizadas por

múltiplas bandas hemorrágicas de diferentes tamanhos, mas a formação de radicais livres e a infiltração de neutrófilos são consideradas promotores destes danos na mucosa gástrica (Chow et al.,1998). Os resultados do experimento de indução de úlcera por HCl/Etanol e etanol absoluto indicam uma similaridade de efeito entre At e Ag. Para At no modelo de indução de úlceras por HCl/etanol, houve redução da lesão ulcerativa (I.L.U.) em todas as doses utilizadas ($P<0.01$). As doses de 250, 500 e 1000mg/Kg reduziram as lesões em 77%, 86% e 90%, respectivamente em relação aos animais submetidos ao tratamento com o veículo. Para o modelo de etanol At também promoveu redução das lesões gástricas nas três doses utilizadas sendo que na dose de 250 mg/Kg ($P<0.05$) houve redução de 28% das lesões e nas doses de 500 e 1000mg/Kg ($P<0.01$) observou-se 85 e 89% de redução das lesões, respectivamente.

No modelo de lesão gástrica induzida por etanol os ratos pré-tratados com Ag apresentaram uma redução significativa em relação aos animais tratados com salina nas doses de 500 (57%) e 1000mg/Kg (85%). O efeito observado foi dose-dependente e o pré-tratamento com Ag 50 min antes da administração da solução de HCl/etanol diminuiu significativamente as lesões em 64, 40 e 32% em relação ao veículo nas doses de 250, 500 e 1000mg/Kg respectivamente. Este experimento resultou em uma curva dose-resposta inversa, sendo que a dose de 250mg/Kg de Ag foi a mais eficaz. Estes resultados são indicadores de um possível mecanismo de ação da planta. Segundo Sawaoka et al., (1997) as lesões gástricas se desenvolvem 60min depois da administração do HCl, onde esta provoca uma significativa diminuição na PG em animais no primeiro período e é revertida após 7 horas (Villegas et al., 2004). Em vista dos resultados obtidos considera-se que a atividade gastroprotetora de Ag observada na menor dose seja devida a este extrato, provavelmente ser um modulador de PGs endógenas.

O modelo de úlcera induzida por DAINEs nos sugere provável envolvimento com precursores da inflamação. Piroxicam é um inibidor preferencialmente da COX-1. Esta enzima se expressa em grandes quantidades no trato gastrointestinal e sugere-se que esta mantenha a integridade da mucosa (Halter et al., 1995). As prostaglandinas possuem efeitos na síntese de muco e bicarbonato, na regulação da secreção ácida e do fluxo sangüíneo da mucosa gástrica. A redução dos níveis de prostaglandina compromete a barreira mucosa que é composta de muco e bicarbonato e facilita a formação de lesões causadas pelas secreções gástricas (ácida e enzimática) (Halter et al., 2001).

Nenhuma dose do extrato de At foi efetiva em reduzir as lesões gástricas induzidas por este agente, o extrato não só não protegeu nas doses de 250 e 500mg/Kg como At aumentou significativamente (76%) as lesões gástricas nas doses de 1000mg/Kg. Já o extrato de Ag reduziu as lesões nas doses de 250 (78%) e 500 mg/Kg (33%). As substâncias que habitualmente apresenta este tipo de comportamento farmacológico observado em At são os flavonóides; que com o aumento da dose promovem uma mudança da sua atividade antioxidante para uma atividade pró-oxidante (Gracioso et al., 2002). Reppeto et al., (2002) diz que compostos fenólicos têm efeito dualístico na síntese de prostaglandina, modulando a prostaglandina sintetase, em baixas concentrações ou estimulando e em altas concentrações por inibição da prostaglandina sintetase. Nossos resultados estão de acordo com os encontrados na literatura de plantas do mesmo gênero *Alchornea*, como *A. cordifolia* já teve suas propriedades antiinflamatórias descritas por Manga et al.,(2004) o que reforça nossas suposições a respeito do extrato principalmente de At ser detentor de propriedades antiinflamatórias e modular a síntese de PGs.

Nos experimentos seguintes foram investigados os possíveis mecanismos de ação dos extratos de At e Ag avaliando o papel do óxido nítrico e dos compostos sulfidríla na gastroproteção. Avaliou-se também os parâmetros de suco gástrico de animais tratados oral ou

sistematicamente com os extratos. Para a caracterização do mecanismo de ação dos extratos , foi utilizado uma única dose caracterizada como a dose mais efetiva de cada extrato sendo a de 1g/Kg para Ag e 500mg/Kg para At.

A inibição da síntese de prostaglandinas é provavelmente o maior mecanismo ulcerogênico dos DAINEs, mas não é apenas o único fator. O papel do óxido nítrico tem ganhado importância e como as PGs, o óxido nítrico promove o aumento do fluxo sanguíneo, estimula a secreção de muco e inibe a aderência de neutrófilos (Chan e Leung, 2002). Estudos indicam que o NO está envolvido na preservação da mucosa em modelos experimentais de úlcera por promover vasodilatação, redução da peroxidação lipídica e também por uma ação antiinflamatória nos tecidos (Cho, 2001). Para investigar o envolvimento de NO, L-Name (inibidor de NO sintase) foi administrado em ratos antes do tratamento oral com etanol. Para At, não houve diferença entre os animais pré-tratados com salina e tratados com At (porcentagem de proteção, 85%) e pré-tratados com L-Name e tratados com At (porcentagem de proteção, 70%) ($p>0.05$). Estes resultados indicam portanto que a influência do NO no mecanismo de ação do extrato de At é pequena. Já os animais pré-tratados com L-NAME e tratados com Ag mostraram uma pequena atenuação ($p>0.05$, não significativa) da gastroproteção de 76% para 64% em animais pré-tratados com L-NAME sugerindo também pouca participação do NO no mecanismo de gastroproteção de Ag.

O possível envolvimento de sulfidrilas endógenas nos efeitos gastroprotetores foi também investigado em animais que foram pré-tratados com N-etilmalimida (NEM), um bloqueador de sulfidrilas endógenas. Os animais tratados com Ag (1000 mg/Kg) mostraram atenuação da ação gastroprotetora em relação aos animais pré-tratados com salina (87% vs. 34% com NEM). Esta significativa atenuação ($p<0.01$) indica que SHs; compostos que sequestram radicais livres e conseqüentemente previnem danos na membrana causados por peroxidação lipídica (Szabo et al.,1987) podem estar envolvidos no mecanismo de

gastroproteção de Ag. Para At não houve diferença significativa ($p>0.05$) entre os grupos pré-tratados com salina e tratados com o extrato de At e o grupo pré-tratado com NEM e o pré-tratado com extrato de At que apresentou 64% vs. 73% de proteção gástrica.

O suco gástrico obtido da ligadura do piloro é utilizado para analisar os parâmetros bioquímicos. Neste modelo, ocorre um aumento na concentração de HCl e, conseqüentemente, de pepsina (Rastogi et al., 1998). Isto ocorre em decorrência de um aumento da pressão sobre receptores sensíveis localizados na região antral, ativando o reflexo vago-vagal (Baggio et al., 2002). Embora ocorra este aumento da concentração ácida no estômago, esse fator agressor nem sempre é suficiente para a causa do surgimento das úlceras gástricas, sugerindo o envolvimento de outros fatores (Rastogi et al., 1998). Por isso, são analisados também outros parâmetros do suco gástrico como concentração de H^+ e volume. A administração das drogas-teste se deve ao fator de possibilitar a observar dos efeitos locais (pela via oral) ou sistêmicos (pela via intraduodenal) de sua administração. Por ambas as vias: oral e intraduodenal o houve um aumento do volume de secreção gástrica acumulado por 4 horas e do total de conteúdo ácido nos animais pré-tratados com Ag diminuiu significativamente quando comparado com o grupo controle. Para At os parâmetros como concentração de H^+ , volume gástrico e pH, administração intraduodenal do extrato não demonstrando portanto o pequeno efeito sistêmico do extrato. Mas houve proteção no índice de lesão ulcerativa em relação à salina. A ligadura do piloro com administração oral dos extratos promoveu diminuição no conteúdo de total ácido indicando, portanto forte efeito anti-secretor de ambos os extratos. Estes dados indicam que também além das propriedades anti-secretórias envolvidas no mecanismo de ação de Ag e At, o aumento de volume do suco gástrico e ambos representa o aumento de secreção mucosa alcalina, estimulada por PGs endógenas (Tsukumi et al., 2001).

Em vista dos resultados obtidos até o presente, optou-se por avaliar as frações orgânicas destas espécies e escolhemos *Alchornea triplinervia* que tem um rendimento um pouco maior. O rendimento da fração acetato de etila de *A. triplinervia* é de 27,6% e rendimento fração acetato de etila de *A. glandulosa* é de 20%.

Foram avaliadas as frações aquosa (FAQ) e acetato (FA) obtidas do extrato metanólico de *A. triplinervia*. A fração aquosa reduziu os índices de lesão em apenas 20% enquanto a fração acetato reduziu os índices de lesão em 50% na mesma dose. A fração acetato foi avaliada nas doses de 50, 100 e 200mg/Kg para confirmação da curva dose-resposta e se obteve proteção de 12, 50 e 88%. Com base nos resultados obtidos optou-se por continuar os demais experimentos com a dose de 100mg/Kg; para efeito comparativo a mesma dose da droga-padrão cimetidina.

Com a FA na dose de 100mg/Kg foi realizado o experimento para quantificação da quantidade de prostaglandinas da mucosa gástrica. Neste experimento, os animais tratados com FA promoveram um aumento na quantidade de PGE₂ em relação ao controle. Já os animais tratados com FA associado a indometacina não tiveram a quantidade de PGE₂ reduzida em relação aos tratados apenas com FA. Este resultado pode ser considerado, pois a expressão de COX-2 na manutenção da homeostase ainda é controversa. Por exemplo, uma indução significativa de COX-2 em estômagos de ratos foi detectada uma hora após administração de aspirina ou indometacina (Davies et al., 1997). Com estes resultados confirmamos nossa hipótese do envolvimento com precursores inflamatórios na ação de *A. triplinervia*. Estes resultados obtidos com a fração são promissores, pois já é conhecido que COX-2 é um importante mediador de defesa mucosa, por contribuir para a diminuição da inflamação no trato gastrointestinal e tem um importante papel na cicatrização de úlceras (Wallace e Devchand, 2005).

O modelo de úlcera induzida por ácido acético é o modelo no qual a úlcera mais se aproxima da humana (Takaki et al., 1969), já que o tratamento é feito após a lesão ter sido instalada. Neste modelo, o efeito cicatrizante das lesões gástricas é caracterizado enquanto que nos modelos anteriormente avaliados, observa-se a ação gastroprotetora dos extratos. Nestes últimos modelos, danos no epitélio gástrico geralmente ocorrem, mas úlceras (que penetrem mais profundo na camada muscular) são mais difíceis de desenvolver em todos os modelos. Quando as lesões penetram na submucosa e muscular, a reconstituição pode levar várias semanas e envolvem formação de tecido de granulação na base da úlcera, formação de vasos sanguíneos (angiogênese) e restabelecimento da arquitetura das glândulas (Mizuno et al., 1997).

Para o mesmo modelo experimental de indução de úlceras por ácido acético a dose utilizada de FA foi de 100mg/Kg, devido a curva dos efeitos no modelo de etanol. O mesmo modelo também foi realizado com a dose de 250mg/Kg para o extrato de Ag, desde que esta dose é eficaz nos modelos de úlceras anteriormente testados. O modelo de ácido acético não pode ser considerado como um modelo de toxicidade propriamente dita, já que os animais estão com a mucosa gástrica lesionada e podem sofrer efeitos decorrentes da cirurgia. Mas a avaliação diária do peso corporal dos animais tratados tanto com Ag como com FA não indicou qualquer alteração significativa que indique algum sinal de toxicidade pelo tratamento durante 14 dias. Durante o sacrifício dos animais os principais órgãos foram retirados; observados quanto as alterações macroscópicas, pesados e comparados aos controles e também não foram observadas alterações significativas nem constatada nenhuma alteração com relação ao peso dos órgãos. O sangue dos animais foi coletado e analisou-se também parâmetros bioquímicos de uréia, creatinina, AST, ALT e todos os valores se mostraram normais e não diferiram dos controles. Com estes resultados podemos inferir que os tratamentos se mostraram seguros com até 14 dias de administração contínua. Estes dados

são considerados importantes já que o uso milenar de plantas medicinais mostrou, ao longo dos anos, que determinadas plantas apresentam substâncias potencialmente perigosas. Do ponto de vista científico, pesquisas mostraram que muitas delas possuem substâncias potencialmente agressivas e, por esta razão, devem ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos (Veiga Junior et al., 2005).

A área da lesão foi determinada inicialmente com paquímetro assim que os animais foram sacrificados e não houve diferença significativa na área da lesão dos animais tratados com relação aos controles para nenhum dos tratamentos com Ag ou FA. Para Ag houve uma redução da área interna da lesão em 43% dos animais tratados em relação aos controles. Os animais tratados com FA mostraram valores da área de lesão bem próximos aos controles. Porém, na análise histológica das lesões nota-se bastantes semelhanças entre os tratamentos com Ag e FA, com relação a grande quantidade de células em proliferação. Fatores de crescimento podem estimular importantes elementos celulares de cicatrização das úlceras, como angiogêneses, formação de tecido de granulação e reepitelização, mas sua especificidade e potencia são variáveis (Szabo e Vincze, 2000). A organização das glândulas não é observada na mucosa do estômago, mas estas apresentam um certo grau de muco no interior das glândulas, similarmente aos animais tratados com cimetidina. A coloração de PAS que evidencia glicoproteínas, demonstrou o aumento de muco para os animais tratados com FA em relação aos controles.

Vários fatores estão envolvidos na cicatrização, em particular, contração da área ulcerada, reepitelização da base da úlcera e formação de tecido de granulação em toda a área, apresentando o principal passo na cicatrização (Okabe e Agamase, 2005). As medidas das áreas de regeneração e da mucosa normal foram feitas por medidas lineares da luz até a muscular da mucosa. Nos animais tratados com Ag nota-se um aumento da área de regeneração (um), porém os tratamentos com FA não apresentaram diferença significativa

entre os grupos tratados com o veículo. Foi observado um aumento da área de transição para os 3 grupos. Sabe-se que o maior estímulo para a proliferação celular, divisão, migração e re-epitelização são promovidos pelos os fatores de crescimento, estes podem ser estimulados por citocinas, óxido nítrico e prostaglandinas da série E (Ferrara, 2005).

Para complementar os resultados obtidos até o presente, análises imunohistoquímicas foram realizadas. O uso de técnicas de imunohistoquímica possibilitam a visualização de células específicas nos tecidos com a vantagem de preservar a orientação espacial das células (Wong e Wright, 2005).

Com o extrato de Ag foi feita a marcação de proliferação celular por PCNA. Optamos por realizar as outras análises com anticorpos para HSP, COX-2, gastrina e somatostatina com FA que é uma amostra mais purificada.

O PCNA é um polipeptídeo nuclear de 36kDa altamente conservado identificado como proteína auxiliar da DNA polimerase delta (Bravo et al., 1987; Prelich et al., 1988; Nanji e Tahan, 1996). Ele é expresso principalmente durante a fase S do ciclo celular, portanto, em células em divisão (Celis e Celis, 1985). Finn et al., (1996) demonstrou que a cimetidina inibiu significativamente a proliferação de três em cinco linhas de células, podendo indicar uma dependência da proliferação dessas linhas na ativação de receptores H_2 . Os resultados obtidos neste trabalho para PCNA mostraram grande quantidade de células em divisão, o que reforça a hipótese de celularização aumentada tanto para At quanto FA principalmente na base das glândulas, diferindo do padrão que encontramos na cimetidina. Tanto Ag como FA promovem uma aceleração no processo de cicatrização pela proliferação celular da mucosa gástrica.

HSPs estão relacionadas com proliferação, migração e diferenciação de queratinócitos na pele, no trato digestivo são induzidas por vários tratamentos principalmente por estresse, sugerindo que HSP estão relacionadas à proteção mucosa. Baseado nisso, sugere-se que as

proteínas HSP 70 são expressas nas células em proliferação e estão envolvidas na regeneração da mucosa na última fase da cicatrização. Nas lâminas incubadas com anticorpos HSP-70 a expressão de HSP 70 nos grupos tratados com FA está aumentado em relação aos controles, com poucas células HSP 70 positivas. Tal resultado pode ser explicado por Tsukimi et al., (2001), que descreveram que o nível de HSP 70 expresso na mucosa normal é pequeno, entretanto durante a cicatrização da úlcera a HSP 70 é expressa na base dela.

O antro gástrico tem um papel importante em manter a integridade do trato gastrointestinal pela secreção endógena do hormônio gastrina. É bem conhecido que gastrina tem um efeito trófico sobre as células da mucosa gastrointestinal, incluindo a superfície epitelial. Nas lâminas marcadas imunohistoquimicamente com gastrina, foi observado poucas células G marcadas. Isso se deve não somente só pela localização das células de gastrina, mas também pela possível regulação já que notamos aumento do número de célula marcadas com relação ao controle negativo.

Ciclooxigenase-2 (COX-2) é uma enzima chave na biosíntese de PGs e é um mediador de reações patofisiológicas como inflamação. A expressão de COX-2 é aumentada em úlceras experimentais onde a síntese de PGE2 é estimulada. PGs aceleram a cicatrização, a produção de fatores de crescimento, e a reconstrução da matriz extracelular (Peskar et al., 2001). Nas lâminas incubadas com anticorpos para COX-2 nota-se aumento das células marcadas no tratamento com FA; o que está de acordo com nossos resultados anteriores onde já foi demonstrado o aumento de PGE2.

Resultados obtidos com a imunohistoquímica de gastrina, somatostatina e COX-2 estão de acordo com Hiruma-Lima et al., 2006 que avaliou a ação de com *Alchornea castaneafolia*, outra espécie do mesmo gênero *Alchornea*, só que nesta foram avaliados níveis séricos em experimentos agudos. Aqui podemos concluir que o principal mecanismo de ação de *Alchornea triplinervia* é dependente de COX-2 o que denota resultados

promissores, de acordo com Poonam et al., (2005) que diz que drogas que levam a elevação da expressão de COX-2 têm mais chances de sucesso na cicatrização de úlceras em comparação com as que produzem um efeito contrário.

V-CONCLUSÃO

Em conclusão a este estudo, até o momento, é possível atribuir:

- ✓ Ausência de efeito tóxico agudo dos extratos metanólicos de *Alchornea glandulosa* e *Alchornea triplinervia*.
- ✓ Presença de substâncias potencialmente antiulcerogênicas em ambos extratos.
- ✓ A fração acetato de etila de *Alchornea triplinervia* se mostra mais ativa que as frações aquosas, concentrando possivelmente as substâncias ativas.
- ✓ O mecanismo de ação da fração acetato de etila de *Alchornea triplinervia* se dá através do aumento de PGE₂, o que foi confirmado também na análise imunohistoquímica.

VI- REFERÊNCIAS

AIHARA, T.; et al., Impaired gastric secretion and lack of trophic responses to hypergastrinemia in M3 muscarinic receptor knockout mice. **Gastroenterology**, v.125,n.6: p.1774-1784, 2003.

AKERELE O. Nature's medicinal bounty: don't throw it away. **World Health Forum**, v.14,n.4; p.390-395, 1993.

ALPER, J. Ulcers as an infectious disease – **Science**, v.260, n.9; p.156-160, 1993.

ANDERSSON, K.; CARLSSON, E. Potassium competitive acid blockade: a new therapeutic a strategy in acid-related diseases. **Pharmacol. Ther.**, v.108 p.294-307, 2005.

ARRIETA, J.; BENITEZ, J.; FLORES, et al., Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. **Planta Med.**, v. 69,n.10; p.905-909, 2003.

BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; RIECK, L.; et al.,. Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC in rats. **Pharmacol. Res.**, v.47, n.1; p.93-98, 2003.

BEEJAY, U.; WOLFE, M.M.; Acute gastrointestinal bleeding in the intensive care unit. **Gastroenterol Clin North Am.**, v. 29, n.2; p.309-335, 2000.

BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Edart, 1976., p.241.

BERENGUER, et al., Chronic gastric ulcer healing in rats subjected to selective and non-selective cyclooxygenase-2 inhibitors. **Eur. J. Pharmacol.**, v.442, p.125-135, 2002.

BIELANSKI, W. Epidemiological study on *Helicobacter pylori* infection and extragastrroduodenal disorders in polish population. **J.Physiol Pharmacol.**, v.50, p.723-743, 1990.

BORELLI, F.; IZZO, A. A. The plant kingdom as a source of anti ulcer remedies. **Phytother. Res.**, v.14, p. 581-591, 2000.

BRACA, A.; MENDEZ, J.; MENICHINI, F.; et al., Constituents of *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 30, p. 1109-1111, 2002.

BRAVO, R.; FLANK, R.; BLUNDELL, P.A. et al., Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . **Nature**, v.326, 1987.

BRUNTON, L.L. Fármacos para controle da acidez gástrica e tratamento das úlceras pépticas. In: HARDMAN, J.G. et al, Goodman and Gilman - **As bases farmacológicas da terapêutica, Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill**, 2002.p.663-674.

BRZOZOWSKI, T. Experimental production of peptic ulcer, gastric damage and cancer models and their use in pathophysiological studies and pharmacological treatment – polish achievements. **J. Physiol. Pharmacol.**, s4, s3; p.99-126, 2003.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz J Med Biol Res.**, V.33,n.2;p.179-189, 2000.

CELIS, J.E.; CELIS, A. Individual nuclei in polykaryons can control cyclin distribution and DNA synthesis. **EMBO J.**, v.4 n.5, p.1187-92, 1985.

CHAN, F.K.L.; GRAHAM, D.Y. Review articles: Prevention of non-steroidal anti-inflammatory drug gastrointestinal complications- review and recommendations based on risk assessment. **Aliment. Pharmacol.Ther.**, v.19: p.1051-1061, 2004.

CHAN, F.K.L.; LEUNG, W.K. Peptic-ulcer disease. **Lancet**, v. 360, p. 933-941. 2002.

CHO, C.H. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders. **J. Physiol.**, v. 95, p.253-256, 2001.

CHOW, J.Y.; M.A. L.; CHO, C.H. Effect of cigarette smoke on ethanol-induced gastric mucosal lesions: the role of nitric oxide and neutrophils. **Eur J Pharmacol.** v.26; n.342: p.253-260, 1998.

CONEGERO, L. S.; IDE, R. M.; NAZARI, A. S.; et al., Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). **Química Nova**, v.26, n. 6, p. 825-827, 2003.

COELHO L.G.V. Úlcera péptica gastroduodenal. In: Dani R, Gastroenterologia essencial. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1988. p.132-146.

CURTIS, G.H.; MACNAUGHTON, W.K.; GALL D.G.; Intraluminal pH modulates gastric prostaglandin synthesis. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 73, n.1, p.130-134.1995.

DAYAL, Y.; DELLELIS, R.A. Trato gastrointestinal _ Úlceras pépticas. In: COTRAM, R.S;KUMAR, V;ROBINS, S.L.(eds)- 4ed. **Patologia Estrutural e Funcional**. Guanabara Koogan,1991, Rio de Janeiro, p.698-701.

DAVIES, N. M.; SHARKEY, K. A.; ASFAHA, S.; et al., . Aspirin causes rapid up-regulation of cyclo-oxygenase-2 expression in the stomach of rats. **Aliment Pharmacol.Ther.**, v.11, p.1101-1108. 1997.

DE MARIA, A.N.; WEIR, M.R. Coxibs-beyond the GI tract: renal and cardiovascular issues. **J. Pain Sympton Manage**, v.25, S41-49, 2003.

DI STASI L. C. (org.) **Plantas medicinais: Arte e Ciência – Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Editora Unesp, 1996.

EL-OMAR, E.M.; PENMAN, I.D.; ARDILL J.E. et al., *Helicobacter pylori* infection and abnormalities of acid secretion in patients with duodenal ulcer disease. **Gastroenterology**, n.109, n.3, p.681-691, 1995.

ELISABETSKY, E.; WANNMACHER, L.; The status of ethnopharmacology in Brazil. **J Ethnopharmacol.**, v.38 (2-3): p.137-143. 1993.

EUPHORBIACEAE. Disponível em: <www.ipef.br/identificacao/nativas/detalhes> Acesso em: 13 out. 2005.

FERRARA, N. The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis.in: Claus, M; Schapner, W(eds.). **Mechanisms od angiogenesis**, v. 94: p.209-231. 2004.

FINN, P.E.; PURNELL, P.; PILKINGTON, G.J.; Effect of histamine and the H₂ antagonist cimetidine on the growth and migration of human neoplastic glia. **Neuropath. Applied Neurobiol.**, v.22 n.6,p. 559, 1996.

FORSSEL, H. Gastric mucosal defenses mechanisms. A brief review. **Gastroenterology**. p. 23-28, 2003.

FOX VL. Gastrointestinal bleeding in infancy and childhood. **Gastroenterol. Clin. North.Am.** v.29, n.1, p.37-65, 2000.

GRACIOSO, J. S.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A.; et al., Effects of tea from *Turnera ulmifolia* L. on mouse gastric mucosa support the turneraceae as a new source of antiulcerogenic Drugs. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 25, n.4, p. 470-491, 2002.

GROB, N. G. Peptic ulcer in twenty-century of America. **New Jersey Medicine.**, v.101, 2004.

GUDIS, K.; SAKAMOTO, C. The role of cyclooxygenase in gastric mucosal protection. **Dig. Dis. Sci.**, v.50, suppl. 1, p. 16-23, 2005.

GUO, J.S; CHO, C.H.; LAM-LUI, E.S.; et al., Antiangiogenic effect of a highly selective cyclooxygenase-2 inhibitory on gastric ulcer healing in rats. **Toxicol. Appl. Phamacol.**, v.183, p.41-45, 2002.

GURGUEIRA, G.L; MARANHÃO, R.F.A. **Hemorragias digestivas**. In: CARVALHO E.S, CARVALHO W.B EDS. **Terapêutica e Prática Pediátrica** 2^a ed. São Paulo: Atheneu.2000. p.353-364.

GUYTON, A. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, p. 623-647, 2002.

HALTER, F.; SCHMASSMANN, A.; TARNAWASKI, A. Healing of experimental gastric ulcers. Interference by gastric ulcer. **Dig. Dis. Sci.**, v.40, p. 2481-2486; 1995.

HALTER, F.; TARNAWASKI, A.S.; SCHMASSMANN, A.; et al., Cyclooxygenase-2, implications on maintenance of gastric mucosal integrity an ulcer healing: controversial issues and perspectives. **Gut.**, v.49, p. 443-59, 2001.

HASSAN BOUSBAA. Premio nobel 2005 em fisiologia e Medicina - “Menos uma dor de estômago” disponível em: <http://www.cespu.pt/iscsnoticias/> Acesso em 5 de fev. de 2006.

HAWKEY, C.J.; CHRISTOPHER, J. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. **Gastroenterology**, v.119, p.521-535, 2000.

HIRUMA-LIMA, CA.; GRACIOSO, J.S.; TOMA, W., et al., Gastroprotective effect of aparistman, a diterpene isolated from *Aparisthmium cordatum*, on experimental gastric ulcer models in rats and mice. **Phytomedicine**, v.8, p.94-100, 2001.

HIRUMA-LIMA CA, CALVO TR, RODRIGUES CM., et al., Antiulcerogenic activity of *Alchornea castaneaefolia*: Effects on somatostatin, gastrin and prostaglandin. **J Ethnopharmacol.**, v.8, n.104, p. 215-24, 2006.

HOLZER, P. Neural emergency system in the stomach. **Gastroenterology**, V. 114, p.823-839, 1998.

ISHIHARA, M.; ITO, M. Influence of aging on gastric ulcer healing activities of cimetidine and omeprazole. **Eur. J. Pharmacol.**, v.444, p. 209-215, 2002.

KELLY,D.L; DICKINSON,T.A. Local names for vascular plants in John Crow Mountains, Jamaica. **Econ Bot.**, v.39: 3, p. 346-362, 1985.

KIMURA, M.; GOTO, S.; IHARA, Y.; et al., Impairment of glutathione metabolism in human gastric epithelial cells treated with vacuolating cytotoxin from *Helicobacter pylori*. **Microb.pathol.**,v.31, p.29-36. 2001.

KITAJIMA, T.; OKUHIRA, M.; TANI, K.; et al., Cell proliferation kinetics in acetic acid-induced gastric ulcer evaluated by immunohistochemical staining of proliferating cell nuclear antigen. **J. Clin. Gastroenterol.**, v.17, p.116-20,1995.

KONTUREK, P.C.; BRZOWSKI, T.; SLIWOSWSKI, Z.; et al., Involvement of nitric oxide and prostaglandin in gastroprotection induced by bacterial lipopolysaccharide. **Scand. J. Gastroenterol.**, v.33, p.691-700. 1998.

KU, S.K.; LEE, H.S.; BYUN, J.S, et al., Changes of the gastric endocrine cells in teh C57BL/6 mouse after implatiation of murine lung carcinoma: An immunohistochemical quantitative study. **World J. Gastroenterol.** ,v.11, n.9, p. 1317-1323,2005

KWIECEN,T.; BRZOZOWSKI,P.C.H.; KONTUREK, S.J.; et al., The role of reactive oxygen species in action of nitric-oxid donors on stress-induced gastric mucosal lesions. **J. of Physiol. and Pharmacol.**, v.53,n.4, p.761-773,2002.

LE GRAND, A; WONDERGEM, P.A.; Antiinfective phytotherapy of savannah forests of Senegal (East Africa). **J.Ethnopharmacol.**, v. 212: p.109-125,1987.

LEWIS,D. A; HANSON, P.J. Anti-ulcer drugs of plant origin. **In_peptic ulcer**. Ed. C.J. Pfeiffer. Musksgaard, Copenhagen. p.92-97, 1991.

LOPEZ, A.; MOTILVA,C.; ALARCON DE LA LASTRA et al., The role of gastric mucosal sulphhydrys in the ulcer-protecting effect of cisapride. **J.pharmacol.**, v.48:p.37-40,1996.

LORENZI, H. Euphorbiaceae. In: **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed.São Paulo: Plantarum. 1998. 2. ed., p. 97-98.

LUNA, LE. The Healing practices of a peruvian shaman. **J.Ethnopharmacol.**, v.112: p.123-133,1984.

MAJUMDAR, S.R; SOUMERAI, S.B; FARRAYE F.A; et al., Chronic acid-related disorders are common and underinvestigated. **Am. J. Gastroenterol.**, v.11, p. 2409-2414, 2003.

MALFERTHEINER, P.; LEOPOLDER, A, PEITZU. Cure of *Helicobacter pylori* associated ulcer disease through eradication. **Baillieres Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.** v.14, p.119-132, 2000.

MANGA, M.H.; et al., In vivo anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumacher & Thonn.) Mull. Arg.(Euphorbiaceae). **J. Ethnopharmacol.** ,v.92, p.209-214, 2004.

MIZUNO, H.; et al., Induction of cyclooxygenase-2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by specific antagonist delays healing in mice. **Gastroenterology**,v.112: p.387-397, 1997.

MIZUI, T.; DOUTEUCHI M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. **Jpn. J. Pharmacol.**,v.33, p.939-945,1983.

MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; et al., Effects of the new anti-ulcer agent kb-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. **Jpn. J. Pharmacol.**, v.57:p.495-505, 1991.

MOSSNER, J.; CACA, K. Developments in the inhibition of gastric acid secretion. **Eur. J. of Clin. Investig.**,v.35; p.469-475, 2005.

MOTILVA,V.; et al., Cox Expression and PGE2 and PGD2 production in experimental acute and chronic gastric lesions. **Inter. Immunopharmacol.**, v. 5, p. 369-379, 2005.

NANJI A.A.; TAHAN, S.R. Association between endothelial cell proliferation and patlogic changes in experimental alcoholic liver disease. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**,v. 140, n.1. p.101-107, 1996.

OH T.Y; et al., Increased susceptibility of ethanol-treated gastric mucosa to naproxen and its inhibition by DA-9601, an *Artemisia asiatica* extract. **World J Gastroenterol.**, v.2 1 ; n. 11 (47), p. 7450-7456, 2005.

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.**, v. 28, n.8, p. 1321-1341, 2005.

OSADEBE, P.O.; OKOYE, F.B.; Anti-inflammatory effects of crude methanolic extract and fractions of *Alchornea cordifolia* leaves. **J. Ethnopharmacol.** ,v.89, p.19-24. 2003.

PESKAR; B.M, et al., Role of cyclooxygenase-2 in gastric mucosal defense. **Life Sci.** , v. 9; n.69 (25-26) ,p.2993-3003. 2001.

PESKAR, B.M.; MARICIC, N.; Role of prostaglandins in gastroprotection. **Dig. Dis. Sci.**; v.43, n. 9 (Suppl)p.23S-29S. 1998.

POONAM, D.; VINAY, C.S.; GAUTAM. P. Cyclo-oxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in experimental chronic gastric ulcer healing. **European J. Pharmacol.** v.519,p.277-84, 2005.

PRELICH, G.; TAN, C.; KOSTURA, M.; et al., Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase- δ auxiliary protein. **Nature**, v.326, p.517–520. 1987.

PROCLIM – Programa de Atualização em Clínica Médica, Ciclo 1 Módulo 3, Editorial Médica Panamericana, 2004.

PUSCAS I.; PUSCAS C.; COLTAU M, et al., Comparative study of the safety and efficacy of ebrotidine versus ranitidine and placebo in the prevention of piroxicam-induced gastroduodenal lesions. **Arzneimittelforschung.**, v.47, p.568-72,1997.

QVIGSTAD, G.; WALDUM, H.; Rebound hypersecretion after inhibition of gastric acid secretion. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, 94, p. 202-208, 2004.

RASTOGI, L.; PATNAIK, G.K.; DIKSHIT, M. Free radicals and antioxidant following pylorus ligation induced gastric mucosal injury in rats. **Pharmacol. Res.** v.38, n. 2, 1998.

ROBERT, A. Prostaglandins and the gastrointestinal tract, in: JHONSON, L.R.; CRISTENSEN, J.; GROSSMAN, M.I.; JACOBSON, E.D.; SHUKTZ, S.G. (eds). **Physiol. of the Gastrointestinal tract**, New York: 1981. raven press, , p.1407-1434.

SAWAOKA, H.; TSUJI, S.; TSUJII,M.; et al., Expression of cyclooxygenase-2 gene in gastric epithelium. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 25, p.105-110, 1997.

SHAY, H. A simple for the uniform production of gastric ulceration in rat. **Gastroenterol.**,v.5, p.43-61, 1945.

SETZER, W.N.; SHEN, X.; BATES, R.B.; et al., A phytochemical investigation of *Alchornea latifolia*. **Fitoterapia.**, v.71, n.2,p.195-8, 2000

SINGH, G.; TRADAFILOPOULOS, G. Aproprate choice of proton pump inhibitor therapy in the prevention and managementof NSAID-related gastrointestinal damage. Review. **J.Clin.Pract.**, v.10,p.1210-1217, 2005.

SILVA, E.M; HIRUMA-LIMA, C.A.; LÓLIS, S.F. Etnobotânica no município de Porto Nacional. Symposium of Brazilian Medicinal Plants, Cuiabá, Abstract, 106p, 2000.

SOUZA BRITO, A.R.M. **Manual De Ensaio Toxicológicos In Vivo**. Ed. Unicamp, Campinas (Brazil), p.122, 1995.

SOUZA-BRITO, A. R. M.; SOUZA-BRITO, A. A. Medicinal Plant Research in Brazil: Data from Regional and National Meetings. In: BALICK, M. J.; ELISABETSKY, E.; LAIRD, S. A. **Medicinal Resources of the Tropical Forest**. New York: Columbia University Press.1996. p. 387-401.

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

SZABO, S.; PIHAN, G.; DUPUY, D. The biochemical pharmacology of sulphydryls compounds in gastric injury and protection. In: SZABO,S., MÓZSIK, G. **New Pharmacological of Ulcer Disease**.New York:Elsevier, 1987, p.424-446.

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

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

TONA, L.; KAMBU, K.; NGIMBI, N.; et al.,. Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v.61, p.57-65.,1998.

TSUKIMI,Y.; OKABE,S.; Recents advances in gastrointestinal pathophysiology: role the heat shock proteins in mucosal defense and ulcer healing. **Biol. Pharm. Bull.**, v.24,p.1-9, 2001.

WALLACE J. Humane endpoints and cancer research. **ILAR J.**,v.,41,p. 87-93, 2000.

WALLACE, J.L and FIORUCCI, S. A magic bullet for mucosal protection...and aspirin is the trigger! **Trends. Pharmacol. Sci.**, v.24, n.7, 2003.

WALLACE, J.L. Recent advances in gastric ulcer therapeutics. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v.5,p.573-577, 2005.

WALLACE, J.L.; DEVCHAND, P.R. Emerging roles for cyclooxygenase-2 in gastrointestinal mucosal defense. **Br. J. of Pharmacol.**, v.145, p.275-282, 2005.

WEIR D.G.; Peptic ulceration. **Br Med J (Clin Res Ed)**., v. 296, p.195-200,1988.

WONG, N.A; WRIGHT, N.A. Cell proliferation in gastrointestinal mucosa. **J. Clin. Pathol.**,v.52, p.321-333, 1999.

VACCA, L.L. **Laboratory Manual of Histochemistry**. New York: Raven Press, 1985. p.578.

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

VILLEGAS, I.; LA CASA,C.; LA LASTRA, A .; et al., Mucosal damage induced by preferncial COX-1 and COX-2 inhibitors: Role of prostaglandins and inflammatory response. **Life Sci.** , v.74, p.873-884, 2004.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Argos, Chapecó: Argos, 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS. Nbr 6023: informação e documentação – Referências- elaboração. Rio de Janeiro, 2002.24p.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 2003. 306p.

Trabalhos apresentados em congresso:

- ✓ Ação antiulcerogênica e tóxica das flores da *Mangifera indica* L.(XII Simpósio de Plantas Medicinais - 11/2002) .
- ✓ *Mangifera indica* L. (flores): Efeitos antiulcerogênicos (Fesbe 9/2003).
- ✓ Avaliação da atividade antiulcerogênica do óleo essencial de *Citrus limon* burn. (Rutaceae) (Simpósio de óleos essenciais –11/2003).
- ✓ Efeitos tóxicos e atividade antiulcerogênica das folhas da *Mangifera indica* L .(Jornada paulista de plantas medicinais-11/2003).
- ✓ Investigação química do extrato hidroalcoólico de *Mangifera indica* L. (jornada paulista de plantas medicinais-11/2003).
- ✓ Análise morfológica da ação do extrato hidroalcoólico de flores de *Mangifera indica* (manga) em lesões estomacais (V Congresso De Anatomia Del Cono Sur, 11/2003).
- ✓ *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae): a Brazilian “Cerrado” medicinal plant source of antiulcer compounds (Silae-Itália setembro de 2004).
- ✓ Efeitos antiulcerogênicos da *Alchornea glandulosa* SBFTE-(outubro de 2004).
- ✓ Antiulcerogenic effects of aqueous decoction from mango flowers (*mangifera indica* l.) in rodents- outubro de 2004. Reunião de integração da morfologia panamericana (outubro de 2004).
- ✓ Avaliação da ação antiulcerogênica e da toxicidade do extrato metanólico das partes aéreas de *Byrsonima crassa* nied.(FESBE 2005).
- ✓ Investigação do mecanismo de ação envolvido na atividade antiúlcera de *Alchornea glandulosa*.(FESBE 2005).

- ✓ Avaliação da atividade cicatrizante do extrato metanólico de *Byrsonima fagifolia*.(FESBE 2005).
- ✓ Effect of mouriri pusa extract,“ cerrado” plant in the cicatrization process of gastric ulcers experimental.(XX Congresso brasileiro de microscopia e microanálise, 2005).

Trabalhos publicados:

CAN THE AQUEOUS DECOCTION OF MANGO FLOWERS BE USED AS AN ANTIULCER AGENT? Zeila P. Lima; Clélia A. Hiruma-Lima; Cláudia H. Pellizzon; Alba R.M. Souza Brito; Pablo N. Solis; Armando Cáceres; Wagner Vilegas. Journal of Ethnopharmacology in press.

Constituents and antiulcer effect of *Alchornea glandulosa*: Activation of proliferation cell in gastric mucosa during healing process. Tamara Regina Calvo, Zeila Pinheiro Lima, Janaina Scaramelo Silva, Kátia Verônica Rodrigues Ballesteros, Cláudia Helena Pellizzon, Clélia Akiko Hiruma-Lima, Jorge Tamashiro, Alba Regina Monteiro Souza Brito, Regina Kiomi Takahira, Wagner Vilegas. Submetido ao chemical and pharmaceutical bulletin em 09/2005.