

HÉLIO KUSHIMA



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA DOS
EXTRATOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *Davilla elliptica* St. Hil.
E *Davilla nitida* (Vahl) Kubitzki (DILLENACEAE)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de Concentração: Farmacologia

ORIENTADORA: PROFA. DRA. CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. WAGNER VILEGAS

Botucatu –SP
2006

Kushima, Hélio.

Avaliação da atividade antiulcerogênica dos extratos e frações das folhas de *Davilla elliptica* St. Hil. E *Davilla nitida* (Vahl) Kubitzki (DILLENiaceae) / Hélio Kushima. – 2006.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2006.

Orientadora: Clélia Akiko Hiruma-Lima

Co-orientador: Wagner Vilegas

Assunto CAPES: 21000000

1. Farmacologia 2. Plantas medicinais (Cerrado) - Controle biológico

CDD 581.634

Palavras-chave: *Davilla elliptica*; *Davilla nitida*; Dilleniaceae; Gastroproteção; Plantas medicinais.

Auxílio financeiro



Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São

Paulo

Agradecimentos

À **Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima**, por ter me acolhido como seu aluno, mesmo sabendo que sou confuso e esquecido. E por ter se empenhado em orientar e auxiliar nos momentos críticos do meu mestrado.

Ao **Prof. Dr. Wagner Vilegas** seus alunos **Clenilson** e **Daniel**, do Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química da UNESP de Araraquara-SP, pelo envio dos extratos e frações, e também pela caracterização fitoquímica.

À **Profa. Dra. Cláudia Helena Pellizzon**, do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu-SP pelo auxílio na realização das etapas referentes aos estudos morfológicos, assim como aos seus alunos de iniciação, **Paulo (Rita)**, **Ariane (Sponja)** e o **Guilherme (Da Puta)**, pelas instruções e por auxiliarem em partes importantes no projeto.

À **Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza-Brito**, do Departamento de Fisiologia e Bioquímica, Instituto de Biociências da Unicamp, Campinas-SP, por disponibilizar o laboratório. E aos alunos de seu laboratório, **Victor**, **Maíra**, **Anderson**, **Fabi**, **Ana**, **Elis**, **Érica**, **Débora**, **Cibele**, (muitos alunos, com certeza esqueci alguém) pelo auxílio prestado e pela atenção despendida comigo.

À **Profa. Dra. Lúcia Regina Machado da Rocha** por sempre me chamar atenção para coisas importante, como comer, dormir, entregar relatórios no prazo e também por disponibilizar o laboratório para uso

À **Profa. Dra. Regina Kiomi Takahira**, do laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP de Botucatu-SP, por disponibilizar o uso dos equipamentos para as análises de toxicidade.

À **FAPESP**, pelo auxílio financeiro sem o qual não teria desenvolvido o projeto (proc. n° 04/06207-7).

A todos do laboratório, os moleques (**Fábio-Nervoso, Thiago-Mingo, Victor-Cebóla, Roney**) e as meninas (**Raquel-Pocotó, Enxente, Melada, Zeila, Paty, Caty, foram muitas que passaram pelo laboratório**) pelo coleguismo e auxílio no desenvolvimento do projeto.

Aos colegas de pós-graduação principalmente ao **Léo, Érica, Aline, Carol, Deborah**, que sempre prestaram auxílio com relação a dúvidas acadêmicas e não me deixavam perdido em meio a todos.

A todos os docentes de diferentes departamentos do Instituto de Biociências que prestaram auxílio em diferentes pontos do mestrado, mas como são muitos docentes não tenho condição de lembrar de todos.

Aos funcionários dos departamentos de farmacologia e de fisiologia (Lú, Cris, Tardivo, Paulão, Luis, Aninha) pelo auxílio no projeto pelas diferentes ações realizadas (informações, cópias, gelo e materiais diversos para experimento).

Aos funcionários da seção de pós-graduação (Sérgio, Luciene, Maria Helena), por atenderem meus pedidos e solucionarem problemas para mim.

E claro, a todos meus amigos que moraram comigo nas repúblicas “Juntinho no Escurinho” e “Kitanai”, mas também da “Coronel Cachaça”, como tem muitos nomes não tenho condição de escrever o nome de todos, mas mando um grande abraço pra todo mundo.

E um efusivo abraço de agradecimento ao Funga e a Kero, que me ajudaram pra caramba me dando apoio na minha via profissional e pessoal.

Eu sei que esqueci de muitas pessoas que foram importantes na minha vida profissional e pessoal durante o mestrado, porém eu não tenho culpa de ter a memória fraca. A parte de Agradecimentos está sendo a última porção da dissertação a ser digitada, é muito natural não conter todas as pessoas. Àqueles que eu não citei não

fiquem decepcionados e peço desculpas. E agradeço de coração a todos que me ajudaram.

Prólogo

O projeto de mestrado possibilitou a formação específica em farmacologia, com os estudos direcionados para a caracterização de atividade farmacológica de produtos naturais, sendo o objeto alvo dos estudos as úlceras pépticas. Durante a execução do projeto de mestrado, várias outras atividades foram realizadas, no intuito de enriquecer a formação profissional do aluno.

Dentre estas atividades estão:

Apresentação de trabalhos em Eventos Científicos

- Kushima, H.; Rinaldo, D.; Hiruma-Lima, C. A.; Vilegas, W.; Rocha, L. R. M. Avaliação farmacológica de *Davilla elliptica* em modelos de indução de lesão gástrica, apresentado durante a *XX Reunião Anual de Federação de Biologia Experimental-FeSBE*, realizada na cidade Águas de Lindóia –SP, no período de 24 a 27 de agosto de 2005.
- Kushima, H.; Rodrigues, C. M.; Hiruma-Lima, C. A.; Vilegas, W.; Rocha, L. R. M. Avaliação da atividade antiúlcera de *Davilla nitida* (Dilleniaceae) em modelos agudos de indução de lesão gástrica, apresentado durante a *XX Reunião Anual de Federação de Biologia Experimental-FeSBE*, realizada na cidade Águas de Lindóia –SP, no período de 24 a 27 de agosto de 2005.
- Kushima, H.; Hiruma-Lima, C. A.; Coelho-Ferreira, M.; Santos, M.A.C.; Lamarão, C. Efeitos de duas plantas Amazônica: *Pradosia huberi* (Ducke) Ducke e *Himatanthus sucuuba* (Spruce ex Müll. Arg.) Woodson, apresentado no XXXVI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, realizado em Águas de Lindóia- SP, de 17 a 20 de outubro de 2004.
- Hiruma-Lima C.A.; Kushima H.; Rocha L.R.M.; Cola M.; Brito A.R.M. S.; Rinaldo D.; Santos L.C.; Vilegas W. Evaluation of the gastroprotective activity

- of *Davilla elliptica*: a brazilian “Cerrado medicinal plant, apresentado no XIII Congresso Italo-Latino Americano de Etnomedicina, realizado em Salerno, Espanha, de 22 a 25 de setembro de 2004.

Disciplinas cursadas

- Tópicos de atualização em Ciências (3 créditos, 45 horas-aula).
- Testes estatísticos aplicados à farmacologia (4 créditos, 60 horas-aula).
- Plantas medicinais (3 créditos, 45 horas-aula).
- Bioquímica aplicada (3 créditos, 45 horas-aula).
- Farmacologia do trato digestório (2 créditos, 30 horas-aula).
- Classificação de receptores farmacológicos (3 créditos, 45 horas-aula).
- Produtos naturais: validação de novos fármacos (4 créditos, 60 horas-aula)

Realização estágio, cursos e participação em Eventos Científicos

- Participação como ouvinte *V Simpósio e V Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp* e do mini-curso “*A riqueza farmacológica da biodiversidade*”, realizado na cidade Águas de Lindóia – SP, no período de 15 a 18 de novembro de 2005.
- Mini-curso “*Bioterismo e Ciclo circadiano em ensaios biológicos*” ministrado durante o *V Workshop de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – “Pós-Graduação = Garantia de Emprego?”*, realizado no Instituto de Biociências, UNESP-Botucatu, no período de 04 a 06 de novembro de 2005.
- Participação como ouvinte do *XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE* e o curso de “*Organização neural do sistema de temporização circadiano*”, realizado na cidade de Águas de Lindóia – SP, no período de 24 a 27 de agosto de 2005.

- Aula ministrada durante o *II Curso de extensão de fisiologia animal*, realizado no Instituto de Biociências da UNESP- Campus de Botucatu, no período de 18 a 29 de julho de 2005, no total de 8 horas-aula. Aula ministrada durante o *I Curso de extensão de fisiologia animal*, realizado no Instituto de Biociências da UNESP- Campus de Botucatu, no total de 8 horas-aula, no período de 10 a 21 de janeiro de 2005.
- Estágio docência, junto a disciplina de “Fisiologia”, carga horária total de 150 horas, do curso de Nutrição, Instituto de Biociências da UNESP- Campus de Botucatu, no período de 14 a 20 de novembro de 2004.
- Participação como ouvinte do curso “*Segurança química e m laboratórios didáticos e de pesquisa*” (16 horas), realizado anfiteatro Casa da Arte da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Campus de Botucatu, nos dias 26 de agosto, 02,09 e 16 de setembro de 2004.
- Participação como ouvinte do *IV Workshop de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: “Conhecimento Científico: porque e para quem?”* e do mini-curso “Mecanismos gerais da resposta adaptativa ao estresse: habituação, sensibilização e sistema óxido nítrico (6 horas), realizado no Instituto de Biociências da UNESP- Campus de Botucatu, no período de 4 a 6 de novembro de 2004.
- Participação como ouvinte do *VI workshop de plantas medicinais* e do mini-curso “Isolamento de produtos naturais” (6 horas) realizado no Instituto de Biociências da UNESP- Campus de Botucatu, nos dias 25 e 26 de julho de 2004.

Artigos submetidos em periódicos especializados

- Rodrigues, C. M.; Rinaldo, D.; Sannoiya, M.; Santo, L. C.; Kushima, H.; Hiruma-Lima, C. A.; Souza Brito, A. R. M.; Montoro, P.; Pizza, C.; Piacente, S.; Vilegas, W. Isolation and high-performance liquid chromatographic analyses of

- flavonoids and phenolic compounds from *Davilla nitida* Vahl (Dilleniaceae).
Journal of Chromatography A, submetido.
- Rinaldo D.; Silva M.A.; Rodrigues C.M.; Sannomiya M.; Santos, L.C.; Kushima H.; Hiruma-Lima C.A.; Souza-Brito A.R.M.; Vilegas W. FAST PREPARATIVE SEPARATION OF FLAVONOIDS FROM THE AERIAL PARTS OF *Davilla elliptica* ST. HILL. BY HIGH-SPEED COUNTER-CURRENT CHROMATOGRAPHY. *Química Nova*, *In press*, 2006.
- Hiruma-Lima C.A.; Andrade F.D.P.; Kushima H.; Pellizzon C.H.; Silveira G.G.; Vasconcelos P.C.P.; Villegas W.; Souza-Brito A.R.M. Evaluation of the antiulcer activity of *Qualea grandiflora* Mart.: a Brazilian "Cerrado" medicinal plant. *Journal of Ethnopharmacology*, *In press*, 2005.
- Kushima H.; Hiruma-Lima C.A.; Santo M.A.; Viana E.; Coelho-Ferreira M.; Souza-Brito A.R.M. Gastroprotective activity of *Pradosia huberi* on experimentally induced gastric lesions in rodents: role of endogenous sulphhydryls and nitric oxide. *Journal of Ethnopharmacology*, 101, 61-67, 2005.

ÍNDICE

I.	INTRODUÇÃO	1
	I.1. PLANTAS MEDICINAIS	1
	I.2. AS ÚLCERAS PÉPTICAS	2
	I.3. AS PLANTAS UTILIZADAS	4
II	OBJETIVOS	6
III	MATERIAIS E MÉTODOS	7
	III.1. ANIMAIS	7
	III.2. PLANTAS	7
	III.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DOS EXTRATOS	9
	III.3.1. Toxicidade aguda e “Screening” hipocrático	9
	III.3.2. Atividade Gastroprotetora	9
	A. Lesões gástricas	9
	B. Modelo de indução de úlcera por HCl/etanol	10
	C. Indução de úlcera por etanol absoluto	11
	D. Indução de úlcera por droga antiinflamatória não estereoidal (DAINE)	11
	E. Estresse por contenção e frio	11
	III.3.3. Mecanismo de Ação Antiulcerogênica dos Extratos	12
	A. Úlceras induzidas pela ligadura de piloro e avaliação dos parâmetros do suco gástrico	12
	B. Determinação do papel dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção	13
	C. Determinação do papel do Óxido Nítrico (NO) na gastroproteção	13
	D. Determinação da motilidade intestinal	14
	E. Avaliação da atividade cicatrizante	14
	1) Análises Morfológicas	15
	a) Avaliação macroscópica	15
	b) Microscopia de luz	15
	c) Morfometria	16
	d) Imunohistoquímica	17
	e) IMicroscopia eletrônica	17
	2) Avaliação da atividade tóxica subaguda dos extratos	17
	III.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DAS FRAÇÕES DE <i>D. elliptica</i> E <i>D. nitida</i>	18
	III.4.1. Atividade Gastroprotetora e Mecanismos de Ação	18
	A. Dose empregada nos experimentos com frações	18
	B. Indução de úlcera por etanol absoluto	18
	C. Determinação do papel do óxido nítrico (NO) na gastroproteção	19

	D. Determinação do papel dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção	19
	E. Úlceras induzidas pela ligadura de piloro e avaliação dos parâmetros do suco gástrico	20
	F. Determinação dos níveis de prostaglandina E ₂ basal da mucosa gástrica	20
	III.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
IV.	RESULTADOS	22
	IV.1. <i>Davilla elliptica</i>	22
	IV.1.1. Atividade biológica do extrato etanólico de <i>D. elliptica</i> (DeEtOH)	22
	A. “Screening” hipocrático e toxicidade aguda	22
	B- Modelo de indução de úlcera por HCl/Etanol	23
	C. Modelo de indução de úlcera por Etanol absoluto	24
	D. Modelo de indução de úlcera por droga antiinflamatória não-esteroidal (Piroxicam)	25
	E. Estresse por contenção e frio	25
	F. Úlceras induzidas pela ligadura de piloro e avaliação dos parâmetros do suco gástrico	26
	G. Determinação do papel dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção	28
	H. Determinação do papel do Óxido Nítrico (NO) na gastroproteção	29
	I. Determinação da motilidade intestinal	30
	J. Avaliação das atividades cicatrizantes e tóxica de DeEtOH	30
	IV.1.2. Atividade farmacológica das frações enriquecidas de <i>D. elliptica</i>	38
	A. Indução de úlcera por etanol absoluto	38
	B. Determinação do papel do óxido nítrico (NO) na gastroproteção	48
	C. Determinação do papel dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção	50
	D. Úlceras induzidas pela ligadura de piloro e avaliação dos parâmetros do suco gástrico	51
	E. Determinação dos níveis de prostaglandina E ₂ basal da mucosa gástrica	51
	IV.2. <i>Davilla nitida</i>	54
	IV.2.1. Atividade biológica do extrato metanólico de <i>D. nitida</i> (DnMeOH)	54
	A. “Screening” hipocrático e toxicidade aguda	54
	B. Modelo de indução de úlcera por HCl/etanol	55
	C. Modelo de indução de úlcera por Etanol absoluto	56

D. Modelo de indução de úlcera por droga antiinflamatória não-esteroidal (Piroxicam)	57
E. Úlceras induzidas pela ligadura de piloro e avaliação dos parâmetros do suco gástrico	57
F. Determinação do papel dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção	59
G. Determinação do papel do Óxido Nítrico (NO) na gastroproteção	59
H. Determinação da motilidade intestinal	60
I. Avaliação das atividades cicatrizantes e tóxicas de DnMeOH	61
IV.2.2. Atividade farmacológica das frações enriquecidas de <i>D. nitida</i>	66
A. Indução de úlcera por etanol absoluto	66
IV.3. RESUMO DOS RESULTADOS	77
V. DISCUSSÃO	82
VI. CONCLUSÃO	96
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
VIII. ANEXO	

RESUMO

A partir da indicação popular de *Davilla elliptica* (lixieirinha), para gastrites e distúrbios do trato gastrintestinal, foram realizados experimentos para avaliação da atividade gastroprotetora e cicatrizante dos extratos de etanólico de *D. elliptica* e metanólico de *D. nitida* (cipó de fogo). A seleção da espécie *D. nitida* baseou-se nos estudos quimiotaxonomicos, pois esta não apresenta, até o presente, indicação popular no combate a úlceras gástricas. Após a comprovação dos efeitos gastroprotetores de ambas espécies em modelos experimentais de indução de lesões gástricas por etanol acidificado, etanol absoluto, Piroxicam, estresse (contenção e frio) ($p < 0.05$) os estudos passaram a ser realizados no intuito de se caracterizar os mecanismos envolvidos em tais atividades. A atividade gastroprotetora do extrato etanólico de *D. elliptica* indicou ter relação com os grupamentos sulfidrílicos ($p < 0.05$), porém não se evidenciaram relações de efeito antissecretor, óxido nítrico e motilidade intestinal ($p > 0.05$), enquanto o extrato metanólico *D. nitida* não forneceu dados do envolvimento de nenhum desses parâmetros analisados. A partir dos fracionamentos, foram obtidas três frações diferentes, sendo denominadas frações de flavonoides, taninos e aquosa. Com a realização do experimento inicial de lesão gástrica induzida por etanol absoluto, comprovou-se atividade gastroprotetora somente com o uso de duas frações de *D. elliptica* (aquosa e taninos) ($p < 0.05$). Experimentos subseqüentes demonstraram que os taninos de *D. elliptica* apresentam uma atividade gastroprotetora relacionada a uma ação um possível envolvimento do óxido nítrico e ciclooxigenase 2 como promotores da gastroproteção.

Abstract

Starting from the popular indication of *Davilla elliptica* (lixerinha), for gastritis and gastrointestinal disturbances treatment, experiments were accomplished for gastroprotective activity and healing evaluation of the *D. elliptica* ethanolic extract and *D. nitida* methanolic extract (cipó-fogo). The *D. nitida* selection based on quimiotaxonomic studies, because it doesn't have, until the present, popular indication for peptic ulcer treatment. After gastroprotective effects proof from both species in experimental models of gastric lesions induction by acidified ethanol, absolute ethanol, Piroxicam, stress (contention and cold) ($p < 0.05$) the studies passed to be accomplished with intention to characterize the mechanisms involved in that activities. The gastroprotective activity of *D. elliptica* ethanolic extract has indicated relationship with the sulphhydrylic compounds ($p < 0.05$), however relationships to antisecretory effect, nitric oxide and intestinal mobility didn't evidence ($p > 0.05$), while the *D. nitida* methanolic extract didn't supply involvement data with none analyzed parameters. Starting from fractionation, three different fractions were obtained, designated flavonoids, tannins and aqueous fractions. Through initial gastric lesion experiment induced by absolute ethanol, it was proven gastroprotective activity only with two *D. elliptica* fractions (aqueous and tannins) of all used ($p < 0.05$). Posterior experiments demonstrated that the tannins of *D. elliptica* present a gastroprotective activity related to a possible action involving nitric oxide and cyclooxygenase 2 as gastroprotection promoters.

I. INTRODUÇÃO

I.1. PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas medicinais é milenar e difundido por todo o mundo, seja no uso em rituais mágicos/religiosos (Firenzouli *et al.*, 2005) ou como medicamento (Li & Ohizumi, 2004). O emprego empírico de produtos naturais era e continua sendo, uma das formas usuais de se buscar cura e alívio para moléstias, ferimentos e males de conceituação popular, que sempre acompanharam o homem.

Com a revolução industrial, deu-se o desenvolvimento da química orgânica e de produtos sintéticos para tratamentos farmacológicos (Rates, 2001). A fácil aceitação e a preferência pela drogas sintéticas se deve, em parte, a acessibilidade, eficácia e segurança desses produtos. Hoje o emprego de plantas medicinais, como medicamento, ainda é de grande importância em todo o mundo (Kinghorn, 2002), apesar de muitas vezes ser ineficiente. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, 80% da população mundial faz uso de plantas medicinais, sendo a maioria de países em desenvolvimento (Gurib-Fakim, 2006). Dentre os fatores que definem o emprego popular das plantas nos cuidados com a saúde, está o alto preço dos medicamentos industrializados (Rates, 2001).

Em termos históricos, a pesquisa de plantas medicinais tomou impulso após o isolamento da morfina no século 19 (Balunas *et al.*, 2005). Plantas e seus derivados são as maiores fontes de drogas, movimentando cerca de 30% do mercado farmacêutico (Kirkpatrick *et al.*, 2002). De acordo com Newman *et al.* (2003), entre os anos de 1981 e 2002, de 877 novas moléculas introduzidas no mercado, em torno de 49% eram substâncias isoladas de produtos naturais, semi-sintéticos, derivados de produtos naturais ou então moléculas sintetizadas tomando como modelo estruturas de origem

natural. Além disso, das drogas descobertas em estudos com produtos naturais, 25% pertencem ao grupo das plantas superiores (Gurib-Fakim, 2006).

A possibilidade de se encontrar novas moléculas a partir de produtos naturais é imensurável (GürBüz *et al.*, 2003). Porém, o estudo de novos compostos a partir de espécies vegetais é oneroso. Para que uma nova droga seja lançada ao mercado, gasta-se em torno de 100 a 360 milhões de dólares e no mínimo 10 anos de trabalho. Estima-se que a probabilidade de sucesso para a obtenção de novos compostos seja de 1 molécula ativa para cada 10.000 moléculas estudadas. Esses dados são referentes ao panorama de países desenvolvidos que selecionam plantas de maneira randômica aumentando os custos e o tempo gasto para se conseguir novas drogas. Mas o estudo de plantas medicinais não se restringe apenas a procura de novas moléculas, pois essas plantas podem ser empregadas em diferentes formulações, como em infusões, tinturas, extratos, frações ou no desenvolvimento de fitoterápicos (Rates, 2001).

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

I.2. AS ÚLCERAS PÉPTICAS

As úlceras pépticas são lesões na mucosa gástrica e duodenal provocadas por um desequilíbrio entre os fatores protetores (muco, bicarbonato, fluxo sanguíneo adequado, NO, prostaglandina, dentre outros) e lesivos (pepsina, ácido clorídrico, H_2O_2 , OH^- , O_2^- ,

dentre outros). Estas lesões podem ser desencadeadas e agravadas pelo estresse, consumo excessivo de álcool, tabagismo, uso de drogas antiinflamatórias do tipo não-esteroidais (DAINEs) e pela presença de *Helicobacter pylori* no trato gastrointestinal (Wallace & Granger, 1996; Maity *et al.*, 2003).

Hoje a grande maioria das pesquisas científicas envolvendo úlceras pépticas, direciona-se principalmente para o estudo de *H. pylori* ou aponta esta infecção bacteriana e as DAINes como os maiores responsáveis pela incidência desta moléstia (Watanabe & Chiba, 2002). *H. pylori* está presente em quase 50% da população mundial e as DAINes são as drogas de maior uso; porém, nem todos os indivíduos infectados pela bactéria ou que se utilizam de drogas antiinflamatórias manifestam gastrites ou desenvolvem úlceras pépticas (Go, 1997; Bauer & Marker-Hermann, 2003; Perua, 2004). Fatores como estresse, alcoolismo, fumo também são importantes no desenvolvimento desta moléstia (Suzuki *et al.*, 1998; Maity *et al.*, 2003; Spirt, 2004). Assim, se pode dizer que a etiologia da doença não apresenta definição frente à tamanha diversidade de relações possíveis para o seu surgimento.

A úlcera péptica foi considerada a maior causa de morbidade e mortalidade por mais de um século (Chan & Leung, 2002). Ela ainda é considerada um grande fator sério de morbidade, havendo alto índice de morte em casos extremos, como em úlceras hemorrágicas promovidas pelo estresse (Sontaj, 1997; Spirt, 2004). Nos Estados Unidos, aproximadamente 4 milhões de pessoas apresentam úlceras pépticas, sendo que a cada ano 350 mil novos casos são relatados, 100 mil pacientes são hospitalizados e pelo menos 3000 pessoas morrem em decorrência dessa enfermidade (Cotram, 1999).

A importância clínica das úlceras pépticas levou ao desenvolvimento de drogas capazes de aliviar os sintomas e até mesmo possibilitar a cura. Drogas tais como as pertencentes à família de antagonistas de receptores H₂ (cimetidina) ou de inibidores de bomba protônica (lansoprazol) são efetivas e muito utilizadas no tratamento dos

sintomas; porém, o uso prolongado dessas drogas pode levar a efeitos adversos como risco de câncer (La Vechia & Tavani, 2002; Raghunath *et al.*, 2005). Isso demonstra a necessidade de mais estudos para a compreensão desta doença, assim como a busca por métodos e drogas capazes de promover a sua remissão.

Schmeda-Hirschmann & Yesilada (2005) recentemente apresentaram a grande variedade de substâncias químicas isoladas, mistura de ervas e extratos de plantas cujas atividades terapêuticas foram comprovadas em modelos experimentais de indução de úlcera, o que indica, portanto, o importante potencial das plantas e de seus princípios ativos na descoberta de novas terapêuticas para as úlceras pépticas.

I.3. AS PLANTAS UTILIZADAS

As plantas estudadas neste trabalho pertencem à família Dilleniaceae, que é composta por 11 gêneros (*Acrotrema*, *Curatella*, *Davilla*, *Didesmandra*, *Dillenia*, *Doliocarpus*, *Hibertia*, *Pachynema*, *Pinzona*, *Schumacheria* e *Tetracera*) sendo formada por cerca de 400 espécies (Biodiversity, 2004). São representadas por plantas arbóreas, arbustivas e lianas, que apresentam folhas alternas inteiras, penínérveas, sem estípulas e no geral com sílica impregnada nas células epidérmicas tornando-as ásperas ao toque (Barroso *et al.*, 1978 apud Oliveira & Castro, 2003).

A espécie *Davilla elliptica* St. Hil. é uma planta arbustiva de até três metros de altura, encontrada freqüentemente no Cerrado, Campo Cerrado, Cerradão e Campo Cerrado sobre encosta (Silva *et al.* 2001). Conhecida popularmente como sambaibinha, muricizinho, lixeirinha, lixeira e lixinha, apresenta como indicações medicinais o uso da infusão da planta em banhos para tratar de hematomas; as raízes servem para o tratamento de hemorróidas, possui ainda efeito adstringente, tônico e laxativo sob a forma de infusão. É utilizada no tratamento de hérnias (cataplasma) e como

anticoncepcional. O infuso das folhas é utilizado no combate a diarreia e úlceras gástricas (Pott & Pott, 1994; Silva *et al.* 2001; Rodrigues & Carvalho, 2001) e o banho com suas folhas frescas é indicado em caso de linfatismo, inchações e orquites (Rodrigues & Carvalho, 2001). Até o presente não existem estudos farmacológicos relatados para esta espécie.

Estudos fitoquímicos preliminares com a espécie *D. elliptica* tem relatado a presença de compostos fenólicos, saponinas, cumarinas, terpenos, alcalóides, esteróides e flavonóides em sua constituição (Calvo, *et al.* 2002).

Davilla nitida (Vahl) Kubitzki conhecida popularmente como sambaibinha, cipó-de-fogo e lixeirinha de rama é um arbusto trepador encontrado no Cerrado e pode atingir quatro metros de altura. Até o presente não existem trabalhos envolvendo esta planta quanto as suas propriedades farmacológicas e composição fitoquímica.

Estudos fitoquímicos indicam que outra espécie do mesmo gênero, a *Davilla rugosa* Poreit, apresenta em sua constituição flavonóides, saponinas e mucilagens (Matheucci, 1996). As atividades farmacológicas já relatadas para *D. rugosa* incluem atividade antiúlcera do caule e estimulante da atividade motora dos ramos sendo que todas as atividades foram atribuídas as frações mais polares (Guaraldo *et al.* 2000; 2001). A potencialidade de *D. nitida* apresentar ações farmacológicas, em vista de uma correlação taxonômica sustentada pelos compostos encontrados em membros do mesmo gênero, foi decisiva na sua escolha como alvo de estudo deste trabalho.

II. OBJETIVOS

1-Avaliar as atividades gastroprotetoras dos extratos e frações de *Davilla elliptica* e *Davilla nitida*

2-Characterizar os efeitos citoprotetor, cicatrizante e/ou antissecretor dos extratos e frações de ambas as espécies.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. ANIMAIS

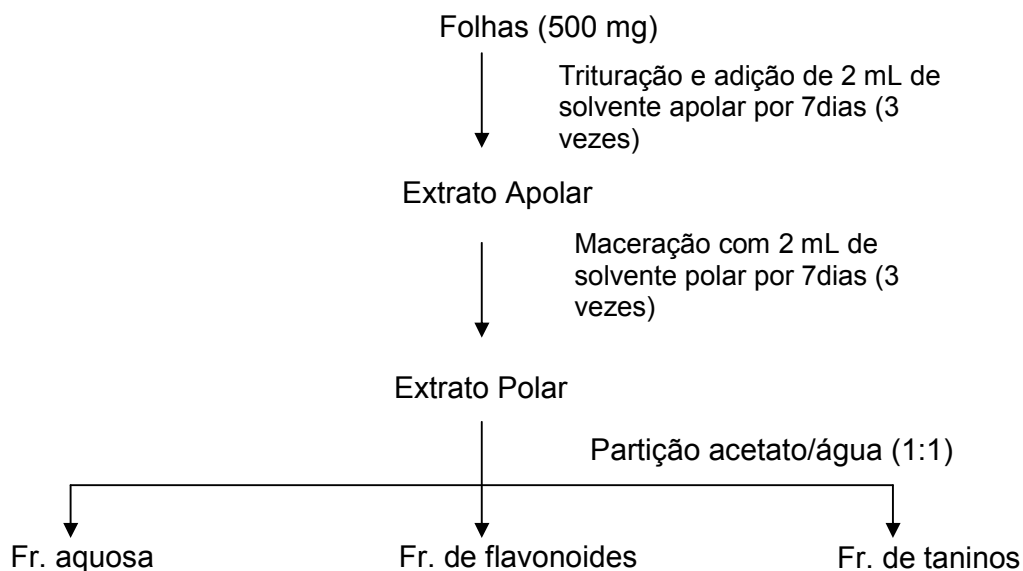
Foram utilizados camundongos Swiss albinos machos (25-40g) e ratos machos Wistar (150-200g), para os experimentos de lesões gástricas e determinação dos mecanismos de ação antiulcerogênica, provenientes do Biotério Central da UNESP-Botucatu, aclimatados às condições do biotério setorial por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, sob temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas controlado. Os animais foram alimentados com ração Guabi[®] e água *ad libitum*. Todos os experimentos obedeceram a protocolos experimentais (nº 017, 018, 019, 020, 021 e 022/04-CEEA; nº 018 e 019/05-CEEA) aprovados, previamente pela Comissão de Ética na Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu. O número de animais por grupo experimental variou de 5 a 21.

III.2. PLANTAS

As folhas de *Davilla elliptica* e *Davilla nitida* foram coletadas, respectivamente, em Monte do Carmo e Palmas, estado do Tocantins, pela Profa. Dra. Clélia A. Hiruma-Lima, da UNESP, Campus de Botucatu - SP. A identificação botânica ficou a cargo da Profa. Solange Lolis e as exsicatas depositadas no Herbário da Universidade Federal do Tocantins sob os números 4583 (*D. elliptica*) e 3849 (*D. nitida*).

As folhas de *D. elliptica* e *D. nitida* foram devidamente secas e trituradas em moinho de faca. Os extratos e frações de ambas espécies foram obtidos a partir do seguinte esquema de extração (figura 1).

Figura 1 – Figura esquemática da técnica de extração para obtenção dos extratos e frações de *Davilla elliptica* e *Davilla nitida*



Os solventes utilizados na extração, assim como, os rendimentos dos extratos e frações podem ser evidenciados na tabela 1.

Tabela 1 - Efeito do extrato etanólico de *D. elliptica* sobre o processo de cicatrização em lesões causadas por ácido acético

<i>Davilla elliptica</i>		<i>Davilla nitida</i>	
Solventes	Rendimentos dos extratos	Solventes	Rendimentos dos extratos
EtOH	18,69%	MeOH	11,7%
CH ₂ Cl ₂	1,80%	CHCl ₃	1,11%
Frações	Rendimentos	Frações	Rendimentos
Aquosa	10%	Aquosa	17%
Flavonoides	10%	Flavonoides	26%
Taninos	80%	Taninos	57%

A partir dos rendimentos das frações pode-se constatar que os constituintes majoritários de ambas espécies são os taninos, havendo muito mais taninos na constituição de *D. elliptica*.

III.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DOS EXTRATOS

III.3.1 Toxicidade aguda e “Screening” hipocrático.

Estudos foram realizados a fim de se constatar possíveis efeitos tóxicos agudos dos extratos que podem estar relacionados a alterações de comportamento, a ocorrência de mortes e de modificações macroscópicas de órgãos vitais como fígado, rins, coração, baço e pulmão.

Foram utilizados camundongos Swiss machos, divididos aleatoriamente em grupos para os respectivos tratamentos: salina (controle) e extratos de DeEtOH e DnMeOH na dose única submáxima de 5000 mg/kg. Os tratamentos foram realizados pela via oral (p.o.) e os parâmetros comportamentais observados, foram aqueles descritos por Malone & Robichaud (1962) e Souza Brito (1994), sendo as análises feitas aos 30, 60, 120, 240 e 360 minutos após a administração dos extratos (anexo1). Os parâmetros de toxicidade aguda foram monitorados através do registro do número de mortes de animais por grupo. Como parâmetro adicional de toxicidade, o peso dos animais foi monitorado durante 14 dias após o início do experimento e ao final deste período todos os animais foram sacrificados para análise dos órgãos vitais. Estes foram devidamente pesados, no intuito de se avaliar possíveis alterações morfológicas detectadas macroscopicamente.

III.3.2 Atividade Gastroprotetora

A. Lesões gástricas

Para avaliar a atividade antiulcerogênica dos extratos e direcionar os estudos de fracionamento, foram realizados experimentos de indução de úlcera gástrica com base em fatores etiológicos da doença no homem como estresse, drogas antiinflamatórias não esteroidais e o álcool. Cada modelo experimental apresenta os seus respectivos grupos controle positivo (cimetidina, lansoprazol ou carbenoxolona) e negativo (salina) dependendo da especificidade de cada modelo. Os animais, antes de cada tratamento, foram mantidos em gaiola especial (para evitar coprofagia), sem maravalha e com água *ad libitum*. Em todos os experimentos de indução de úlcera, as lesões ulcerativas foram medidas e classificadas de acordo com a severidade (Szelenyi & Thiemer, 1978) em lesões 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:

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

B. Modelo de indução de úlcera por HCl/Etanol

Este método foi baseado no modelo de Mizui & Doteuchi (1983), com modificações. Após 24 horas de jejum, os grupos experimentais, compostos por camundongos Swiss machos, foram tratados com os respectivos extratos 50 min. antes da indução de lesão gástrica por etanol acidificado. Grupos de animais receberam lansoprazol 30 mg/kg (controle positivo), salina (controle negativo) e os extratos nas doses 100, 250 e 500 mg/kg. Todos os tratamentos foram feitos por via oral, em dose volume final de 10 mL/kg e a ulcerogênese foi induzida pela administração de 0,2 mL da solução lesiva de 0,3M HCl/etanol 60%. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical 1 hora após a administração do agente lesivo, os estômagos retirados, o pH do suco gástrico determinado e os estômagos abertos ao longo da grande

curvatura para então serem prensados em placas de vidro, escaneados e realizados os procedimentos de medida e classificação das lesões gástricas pelo I.L.U.

C. Indução de úlcera por Etanol absoluto

Baseado no modelo descrito por Morimoto *et al.* (1991), ratos Wistar machos foram divididos aleatoriamente em grupos para seus respectivos tratamentos (salina, lansoprazol 30 mg/kg e extratos nas doses de 100, 250 e 500 mg/kg). Cada tratamento foi administrado por via oral em dose volume de 10 mL/kg. Decorridos 60 minutos, 1mL do agente lesivo (etanol 99,5%) foi aplicado em todos os animais. Transcorrido 1 hora deste tratamento, todos os animais foram sacrificados e os estômagos foram analisados de acordo com os procedimentos descritos previamente.

D. Indução de úlcera por Droga Antiinflamatória Não Esteroidal (DAINE)

O experimento foi realizado segundo a metodologia descrita por Rainsford (1987), com modificações. Foram utilizados camundongos Swiss, machos de 30g, submetidos a jejum por um período de 36 horas. As lesões gástricas foram induzidas pela administração de Piroxicam na dose de 30mg/kg, por via subcutânea. Os tratamentos (p.o.) com os extratos nas doses de 100, 250 e 500 mg/kg, cimetidina 100 mg/kg (controle positivo) e salina (controle negativo) foram realizados 30 minutos antes da administração dos agentes indutores. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical 4 horas após o estímulo lesivo para a retirada dos estômagos e posterior quantificação das lesões gástricas (I.L.U.).

E. Estresse por contenção e frio

A metodologia utilizada foi a descrita por Levine (1971) com modificações. Após 36 horas de jejum, os camundongos foram tratados com o extrato (100, 250 e 500

mg/kg), cimetidina 100 mg/kg (controle positivo) e salina (controle negativo), por via oral (10 ml/Kg), 30 minutos antes do estímulo indutor das lesões gástricas por estresse. O estresse foi produzido através da imobilização das patas dianteiras e traseiras do animal e sua contenção através de contensores de PVC com 11 cm de comprimento x 3,8 cm de diâmetro. Estes contensores foram imediatamente dispostos em geladeira (4°C), por um período de 4 horas. Após este tempo os animais foram mortos por deslocamento cervical, os estômagos retirados e abertos no sentido da maior curvatura para a contagem e classificação das lesões gástricas, como descrito anteriormente.

III.3.3. Mecanismos de ação antiulcerogênica dos extratos

A. Úlceras induzidas pela Ligadura de piloro e avaliação dos parâmetros do suco gástrico.

Foi adotado o modelo descrito por Shay (1945) com modificações, onde os parâmetros do suco gástrico foram avaliados sob o efeito dos extratos administrados oral ou intraduodenalmente no intuito de avaliar o efeito local ou sistêmico dos extratos. Após 24 horas de jejum os camundongos, sob anestesia, sofreram uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide para a amarradura do piloro. A administração das amostras vegetais (500 mg/kg), cimetidina 100 mg/kg (controle positivo) ou salina (controle negativo), foi realizada logo após a amarradura, por via intraduodenal ou 30min. antes nos tratamentos por via oral. A dose única dos extratos (500 mg/kg) foi utilizada com base nos resultados obtidos nos experimentos anteriores, por ser considerada a mais efetiva em indução de proteção.

Logo após a ligadura do piloro, suturou-se as incisões e 4 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) para a retirada do estômago. O conteúdo estomacal foi coletado e, em seguida,

determinado o volume do suco gástrico, o pH e a concentração de íons hidrogênio na secreção gástrica através de titulação com NaOH 0,01N em bureta digital modelo EM, através da fenolftaleína como indicador. A concentração total de ácido foi expressa em mEq/ml/4h e o pH determinado por fitas de pH (Merck®, Alemanha). Quando possível, as lesões gástricas foram avaliadas segundo o cálculo do I.L.U.

B. Determinação do papel dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção (Matsuda *et al.* 1999).

Ratos Wistar machos permaneceram em jejum por 24 horas. Os animais foram separados em 6 grupos, onde 3 grupos sofreram administração de uma injeção intraperitoneal de NEM (N-ethylmaleimida), enquanto os 3 restantes receberam salina pela mesma via. A droga NEM apresenta a propriedade de quelar as pontes de dissulfeto, responsáveis pela manutenção da conformação barreira mucosa. Cada animal, dos grupos correspondentes, recebeu um volume de 10mL/kg numa dose de 10mg/kg de NEM. Decorridos 30 minutos, cada grupo experimental recebeu (p.o.) seu tratamento correspondente (salina, carbenoxolona 100 mg/kg e extratos 500 mg/kg). Depois de 60 minutos, os animais receberam um volume fixo de 1mL de etanol absoluto (p.o), sendo sacrificados após 1 hora deste último tratamento. Os estômagos foram retirados e abertos pela grande curva, para então suas lesões serem medidas e o I.L.U. calculado.

C. Determinação do papel do Óxido Nítrico (NO) na gastroproteção (Arrieta *et al.* 2003).

Ratos Wistar machos em jejum por 24 horas, foram divididos em 6 grupos, onde 3 receberam injeção intraperitoneal de L-NAME (N-nitro-L-arginina metil ester), inibidor da NO-sintase, enquanto os outros 3 grupos receberam salina pela mesma via. Após 30

minutos, os grupos sofreram administração oral dos respectivos tratamentos (salina, carbenoxolona 100 mg/kg e extratos 500 mg/kg). Após 60 minutos, os animais foram tratados pela via oral com 1mL de etanol absoluto 99,5%. Os animais foram sacrificados após 1 hora, os estômagos removidos e abertos na grande curvatura de maneira a permitir a contagem e avaliação das lesões para se calcular o índice de lesão ulcerativa.

D. Determinação da motilidade intestinal.

Seguindo o método descrito por Baggio *et al.* (2003), camundongos Swiss macho, em jejum de 6h e divididos em 5 grupos, receberam seus respectivos tratamentos orais: salina, atropina 5 mg/kg e extratos (100, 250 e 500 mg/kg). Após trinta minutos, todos os animais receberam carvão ativado 10% p.o. num volume de 10mL/kg. Os animais foram sacrificados 30 min. após o último tratamento. O passo seguinte foi retirar todo o intestino delgado juntamente com o estômago, para medir o comprimento total do intestino e a distância percorrida pelo carvão ativado. Os dados obtidos foram transformados em uma relação de distância percorrida e comprimento total do intestino para análise estatística.

E. Avaliação das atividades cicatrizante (Okabe & Amagase, 2005)

Os animais foram aleatoriamente divididos em 3 grupos, pesados e anestesiados com éter para a realização de uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide. A parede anterior do estômago foi exposta e um volume de 0,05 ml de ácido acético a 30%, injetado na camada submucosa da junção do fundo com o antro. Imediatamente em contato com o ácido, houve a formação da lesão hemorrágica profunda. Logo em

seguida, realizou-se a sutura e os animais retornaram ao biotério em caixas de contenção normais, com alimento e água *ad libitum* para sua completa recuperação. Os animais foram tratados durante 14 dias com salina, cimetidina 100 mg/kg e os extratos na dose de 250 mg/kg. Após o tratamento de 14 dias, todos os animais foram sacrificados e tiveram os estômagos retirados, para avaliação macroscópica da área de cicatrização, realização das análises morfológicas e de toxicidade.

1) Análises Morfológicas

a) Avaliação macroscópica

Os estômagos dos animais submetidos aos tratamentos, após sua retirada, foram abertos pela curvatura maior e as lesões foram medidas no maior e menor diâmetro para posterior cálculo da área. A área foi calculada com base na fórmula a seguir: $A = \pi Rr$; onde A = área total calculada; R = Raio maior; r = raio menor da lesão.

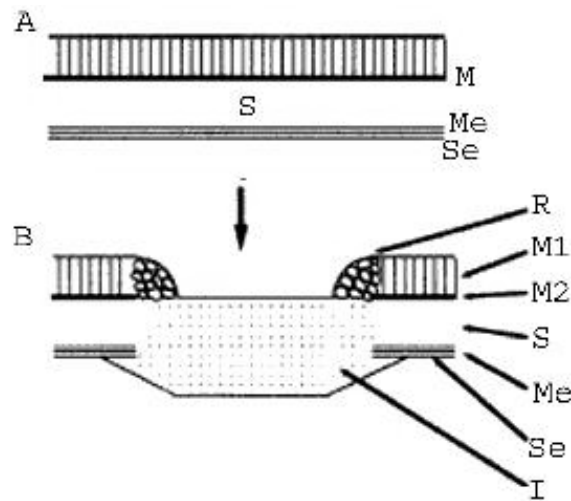
b) Microscopia de luz

O material destinado à microscopia de luz foi fixado em solução de ALFAC (formalina 30%; álcool 80%; ácido acético), após distender cuidadosamente a amostra em uma placa de isopor e fixada com alfinetes, por 24 horas, a temperatura ambiente. As peças foram desidratadas e incluídas em paraplax. Posteriormente, os blocos foram cortados em 10 µm de espessura em micrótomo de maneira semi-seriada, onde foi coletado todo corte múltiplo de cinco até aproximadamente 20% do volume da peça. As lâminas cortadas por esse método semi-seriado foram submetidas à coloração de hematoxilina e eosina (H&E) (Behmer *et al.*, 1976) e PAS (Periodic Acid of Schiff; Vacca, 1985), sendo destinadas para a execução de análises morfológica e morfométrica.

c) Morfometria

A análise morfométrica foi feita no analisador de imagens Leica Q-Win Standard Versão 3.1.0 (Reino Unido) acoplado ao microscópio Leica DM existente no laboratório de análises de imagens do Setor de Histologia do Departamento de Morfologia, sob a orientação da Profa. Dra. Claudia Helena Pellizzon. As medidas das áreas de regeneração e da mucosa normal foram feitas por medidas lineares da luz até a muscular da mucosa (figura 2), seguindo a metodologia descrita por Ishiara & Ito (2002), com modificações. Além das medidas semi-automáticas, descritas acima, foram também realizadas contagens das células positivamente marcadas para as diversas reação imunohistoquímicas em número de campos fixos.

Figura 2: Esquema representativo da região do estômago, onde foi realizado o experimento.



A. Representação da região não lesada onde: **M**= Mucosa, composta de epitélio de revestimento e suas glândulas, lâmina própria e a muscular da mucosa; **S**= Submucosa; **Me**= Muscular externa; **Se**= Serosa. **B.** Região lesada, onde a seta indica a submucosa exposta. **R**= Área de regeneração; **M1**= Epitélio de revestimento mais glândulas e lâmina própria; **M2**= Muscular da mucosa; **S**= Submucosa; **Me**= Muscular externa; **Se**= Serosa; **I**= Invasão de células do tecido conjuntivo (modificado de Ishihara & Ito, 2002).

d) *Imunohistoquímica*

Como mais um indicativo de mecanismo de ação e avaliação de efeito cicatrizante do extrato, lâminas histológicas foram preparadas para a realização de marcação específicas de células em processo de proliferação celular com o anticorpo NCL-PCNA (Nova Castra®), marcador de células em fase S (síntese) da interfase, que necessita de recuperação antigênica através de microondas e tampão citrato 0.01M (Kitajima *et al.*, 1995).

e) *Microscopia eletrônica*

Amostras representativas dos estômagos foram fixados em glutaraldeído 3% overnight a 4 °C, e processado rotineiramente no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu, onde os cortes ultrafinos foram analisados no microscópio eletrônico de transmissão, modelo CM-10 - Philips, levando-se em consideração alterações ultraestruturais em decorrência da administração dos extratos.

2) Avaliação da atividade tóxica subaguda dos extratos

Como parâmetros adicionais de atividade biológica, foram avaliados os possíveis efeitos tóxicos subagudos dos extratos sobre os animais submetidos ao tratamento diariamente com os extratos durante 14 dias. Os parâmetros analisados foram peso corporal e da análise macroscópica dos órgãos vitais: coração, pulmões, fígado, baço e rins. Além disso, o sangue dos animais foi coletado para análise de alterações de parâmetros bioquímicos e enzimáticos, que compreendem a avaliação dos níveis séricos de γ -GT (gama glutamiltransferase), uréia, creatinina, AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase), quantificados utilizando-se o analisador bioquímico automático SBA-200 e kits cinéticos e colorimétricos CELM®, Brasil, disponibilizado

para uso pelo laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus de Botucatu, sob orientação da Profa. Dra. Regina.Kiomi Takahira.

III.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DAS FRAÇÕES DE *D. elliptica* E *D. nitida*

III.4.1. Atividade gastroprotetora e mecanismos de ação

A. Doses empregadas nos experimentos com frações

As doses das frações de 25, 50 e 100 mg/kg de foram determinadas a partir da uma relação com aquelas empregadas nos controles positivos (30 mg/kg para o lansoprazol, 100 mg/kg para cimetidina ou carbenoxolona). Uma vez que as drogas padrão são substâncias puras, o uso de doses similares a desses controles e a comprovação de atividade gastroprotetora pelo uso das frações (mistura de várias substâncias), indicariam sua potencia, havendo um direcionamento dos estudos para a elucidação dos mecanismos ação envolvidos com tal atividade.

B. Indução de úlcera por Etanol absoluto (Morimoto *et al.*, 1991)

Este modelo foi realizado como descrito anteriormente. Após o sacrifício dos animais, os estômagos foram removidos para a medida das lesões. Parte das amostras foram imersas em solução fixadora (ALFAC) para a inclusão em parafina e confecção de lâminas histológicas. Diferentes protocolos de coloração e imunohistoquímicos foram realizados no intuito de se caracterizar mecanismo de ação de ambas as plantas, sendo eles:

- Hematoxilina-Eosina – cora estruturas basófilas e acidófilas (Behmer *et al.*, 1976);

- PAS (Periodic Acid of Schiff)– cora especificamente muco (Vacca, 1985);
- HSP 70 (Heat Shock Protein) - anticorpo SC1060, Santa Cruz Biotechnology® (Guo *et al.*, 2002);
- COX 2 (Ciclooxigenase 2) – anticorpo 160106, Cayman Chemical® (Berenguer *et al.*, 2002)
- SOD (Superóxido Dismutase) – anticorpo SC 8637, recuperação antigênica com uso de microondas (Miranda *et al.*, 2000).

C. Determinação do papel do Óxido Nítrico (NO) na gastroproteção (Arrieta *et al.* 2003).

Foi utilizado o mesmo protocolo descrito anteriormente, onde os alvos de investigação foram as frações enriquecidas na dose única de 100 mg/kg. Após o sacrifício dos animais os estômagos foram removidos e abertos na grande curvatura de maneira a permitir a contagem e avaliação das lesões para se calcular o índice de lesão ulcerativa.

D. Determinação do papel dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção (Matsuda *et al.* 1999).

Seguindo a descrição do modelo experimental dada anteriormente, tendo como alterações, o uso de frações na dose única de 100 mg/kg, buscou-se a relação dos grupamentos sulfidrílicos com a atividade gastroprotetora das frações. Após o sacrifício dos animais os estômagos foram retirados e abertos pela grande curva, para então suas lesões serem medidas e o I.L.U. calculado.

E. Úlceras induzidas pela Ligadura de piloro e avaliação dos parâmetros do suco gástrico.

Através do mesmo modelo experimental de Shay (1945) descrito anteriormente no estudo como os extratos, estudou-se a atividade das frações (na dose 100 mg/kg) sobre o suco gástrico.

F. Determinação dos níveis de prostaglandina E₂ basal da mucosa gástrica

Após 18 horas de jejum, ratos Wistar machos foram divididos em 4 grupos, onde 2 receberam injeção subcutânea de indometacina (30 mg/kg), enquanto os outros 2 grupos receberam salina pela mesma via. Trinta minutos depois, os grupos sofreram administração oral dos respectivos tratamentos (salina e frações 100 mg/kg). Passados 30 minutos os animais foram sacrificados e seus estômagos retirados para o preparo do material. A porção do corpo estomacal foi raspada para a retirada da mucosa gástrica, em seguida pesada e suspensa em 1mL de tampão fosfato de sódio (10 mM) de pH 7.4. O tecido foi homogeneizado com o uso de um Polytron[®] PT-10-35 (Kinematica AG-Switzerland) e incubado em banho-maria, a 37°C por 20 minutos. A prostaglandina E₂ contida no tampão foi mensurada com o uso de um kit imunoenzimático (RPN222-Amersham) e a leitura realizada em leitor de ELISA.

III.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão ou mediana e intervalos interquartis (Q₁ e Q₃) dos parâmetros avaliados. Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste de Dunnet ou Kruskal-Wallis e teste posterior de Dunn, quando o número de grupos era maior que 2. Na análise entre dois grupos, recorreu-se ao uso do teste “t” de Student ou Mann-

Whithney. As análises estatísticas utilizadas obedeceram a classificação (paramétricos ou não-paramétrico) de acordo com cada experimento executado, onde a significância mínima considerada foi de $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS

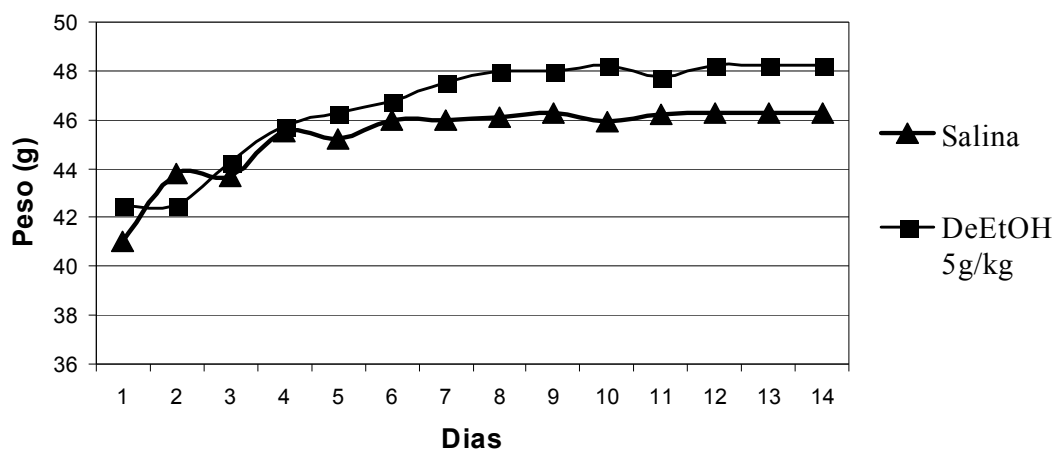
IV.1. *Davilla elliptica*

IV.1.1. Atividade biológica do extrato etanólico de *D. elliptica* (DeEtOH)

A. “Screening” hipocrático e toxicidade aguda

A administração da dose de 5000 mg/kg de DeEtOH não provocou alterações nos parâmetros comportamentais analisados (dados não apresentados) quando comparados aos obtidos com o grupo de animais tratados com salina. O monitoramento diário dos pesos dos animais não indicou variação significativa em relação ao grupo controle negativo (figura 3) e também não ocorreram mortes durante o período de observação.

Figura 3 – Evolução do peso corporal (g) de camundongos tratados com dose única do extrato etanólico de *D. elliptica* (DeEtOH)(5g/kg)



Outro parâmetro analisado foi o peso relativo dos órgãos, obtidos da razão entre o peso do órgão e peso total do animal que foi transformada em Arcoseno para fins de adequação estatística. Após a realização do teste “t” de Student, verificou-se a não existência de diferença significativa ($p > 0.05$) entre os grupos (tabela 2).

Tabela 2 - Efeito da administração aguda do extrato etanólico de *D. elliptica* (DeEtOH) sobre os órgãos dos animais

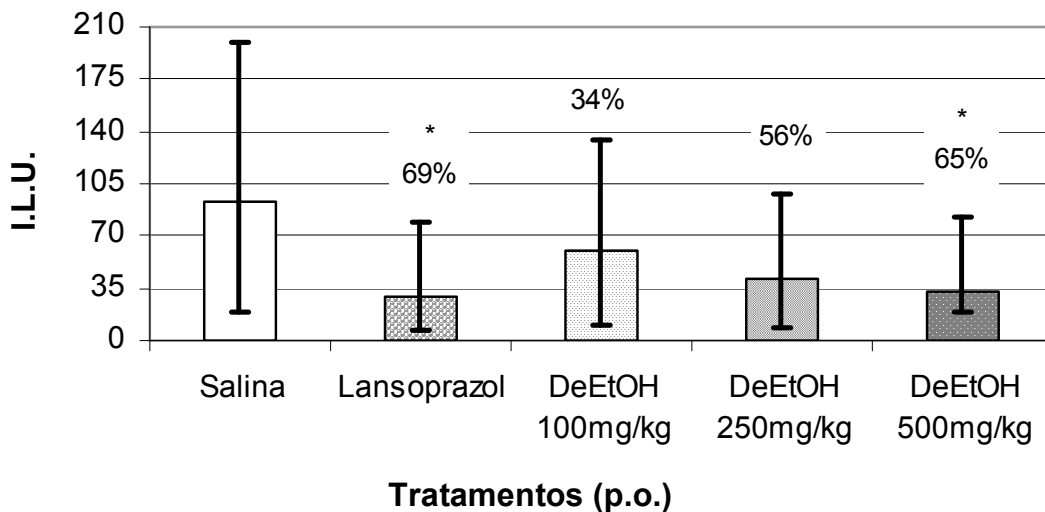
Tratamentos (p.o.)	N	Fígado	Coração	Pulmão	Rins	Mortalidade
Salina	06	12,28 ± 0,24	4,13 ± 0,10	4,58 ± 0,15	6,41 ± 0,21	0
DeEtOH 5g/kg	07	12,34 ± 0,35	4,00 ± 0,10	4,56 ± 0,07	6,42 ± 0,17	0

Dados da razão dos órgãos e peso corpóreo expressos em média (arcoseno) ± erro padrão da média.

B- Modelo de indução de úlcera por HCl/Etanol

DeEtOH apresentou significativo efeito gastroprotetor com a maior dose utilizada do extrato (500 mg/kg), obtendo-se 65% de proteção, em relação ao grupo controle negativo, muito próximo do resultado obtido com o lansoprazol (69%). As menores doses do extrato também apresentaram redução das lesões, porém não expressaram efeito de importância estatística (figura 4).

Figura 4 – Ação do extrato etanólico de *D. elliptica* (DeEtOH) em modelo de indução de úlcera por HCl/Etanol em camundongos

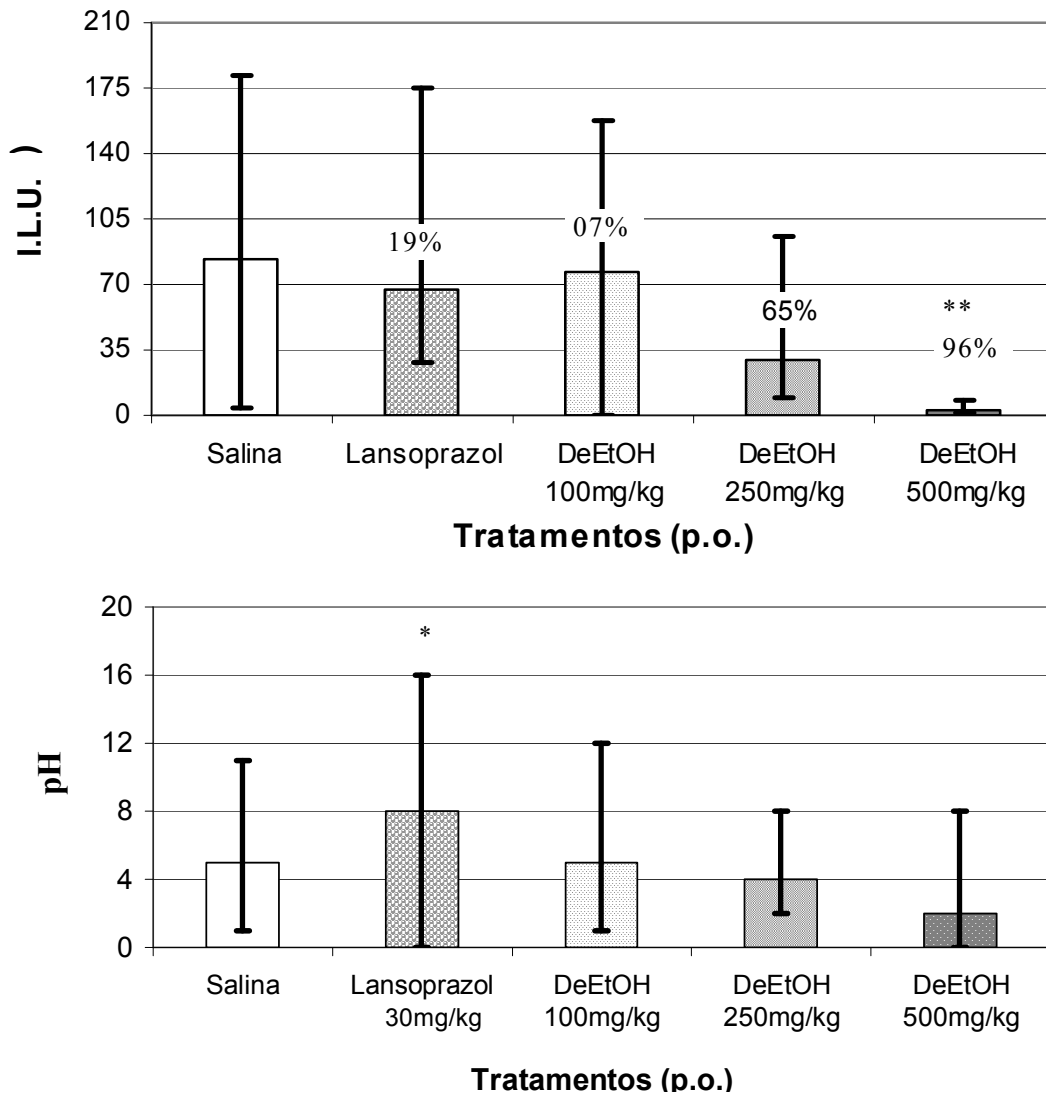


Medianas e intervalo Q_1 e Q_3 dos índices de lesões ulcerativas dos grupos experimentais (n=6-7). Os números de porcentagem indicam a proteção em relação à salina. * $p < 0,05$ (Kruskall, Dunn).

C. Modelo de indução de úlcera por Etanol absoluto

A dose de 500 mg/kg de DeEtOH apresentou o melhor efeito gastroprotetor, com promoção de 96% de proteção em relação ao grupo tratado com salina, porém em decorrência da severidade do agente lesivo, os animais tratados com lansoprazol não apresentaram o efeito gastroprotetor esperado ($p > 0.05$), mas sua atividade antissecreatória pode ser comprovada pela observação do aumento do pH (figura 5), que foi observada somente neste grupo.

Figura 5 - Efeito do extrato etanólico *D. elliptica* no modelo de indução de úlcera por etanol absoluto em ratos



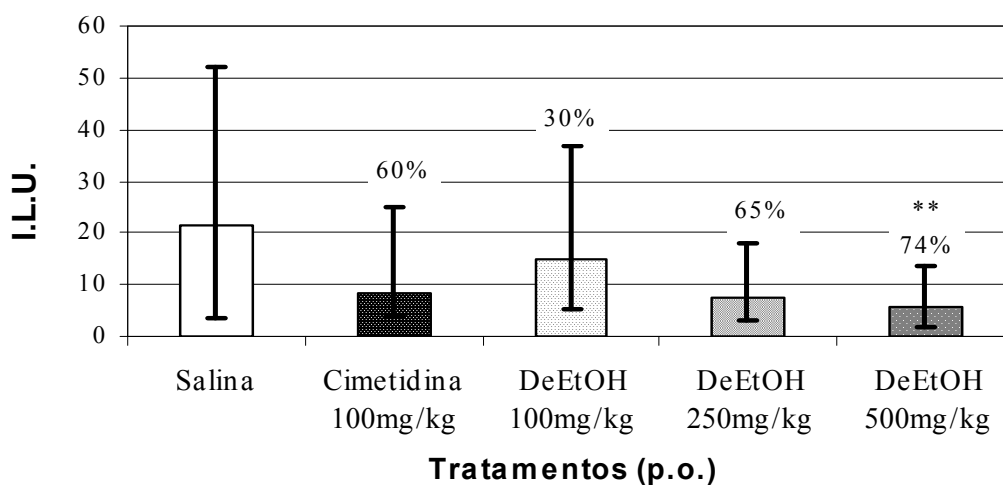
Medianas e intervalo Q_1 e Q_3 dos índices de lesões ulcerativas e pH dos grupos experimentais ($n=5-6$). Os números de porcentagem indicam a proteção em relação a salina. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ (Kruskall -Wallis, Dunn)

D. Modelo de indução de úlcera por droga antiinflamatória não-esteroidal

(Piroxicam)

O extrato novamente apresentou efeito gastroprotetor, em relação ao grupo controle negativo, na maior dose (500 mg/kg) e pode-se observar uma tendência de redução da quantidade das lesões gástricas (figura 6) de maneira dose-dependente.

Figura 6 - Efeito do extrato etanólico de *D. elliptica* (DeEtOH) em modelo de indução de úlcera por droga antiinflamatória não

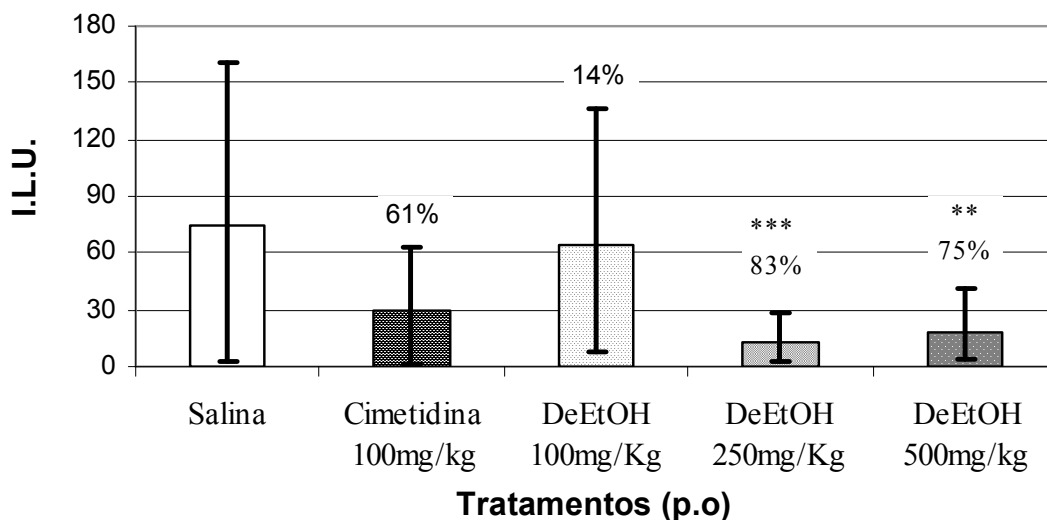


Medianas e intervalo Q_1 e Q_3 dos índices de lesões ulcerativas dos grupos experimentais (n=8). Os números de porcentagem indicam a proteção em relação à salina. ** $p < 0.01$ (Kruskall -Wallis, Dunn)

E. Estresse por contenção e frio

DeEtOH apresentou ação gastroprotetora, em relação aos animais do grupo controle negativo, nas doses de 250 e 500 mg/kg, com proteção da mucosa gástrica de 83% e 75%, respectivamente, frente as lesões induzidas pelo estresse (figura 7).

Figura 7 - Efeito do extrato etanólico de *D. elliptica* (DeEtOH) em úlcera causada pelo estresse por imobilização e frio em camundongos

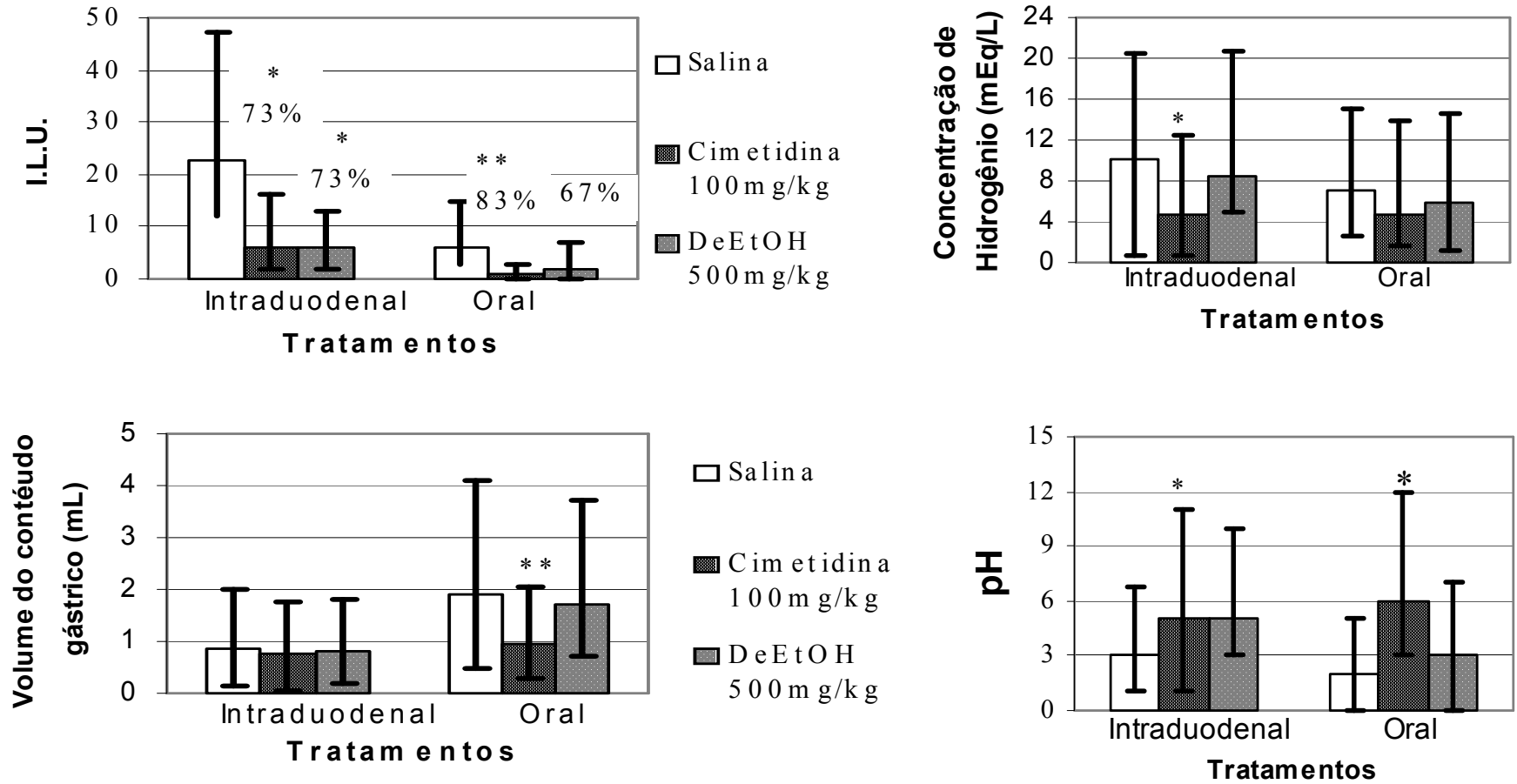


Medianas e intervalo Q_1 e Q_3 dos índices de lesões ulcerativas dos grupos experimentais (n=4-11). Os números de porcentagem indicam a proteção em relação à salina. ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.005$ (Kruskall - Wallis, Dunn).

F. Úlceras induzidas pela ligadura de piloro e avaliação dos parâmetros do suco gástrico

Neste modelo, DeEtOH foi capaz de inibir em 73% ($p < 0.05$) as lesões gástricas induzidas pelo acúmulo de suco gástrico em animais submetido a ligadura de piloro quando administrado intraduodenalmente, mas o mesmo efeito não foi observado com a administração oral do DeEtOH ($p > 0.05$). Os demais parâmetros analisados (concentração de íons hidrogênio, volume de suco gástrico e pH) não foram alterados pela administração oral quanto duodenal do extrato (figura 8).

Figura 8 – Efeito da administração oral ou intraduodenal do extrato etanólico de *D. elliptica* no modelo de ligadura de piloro em camundongos

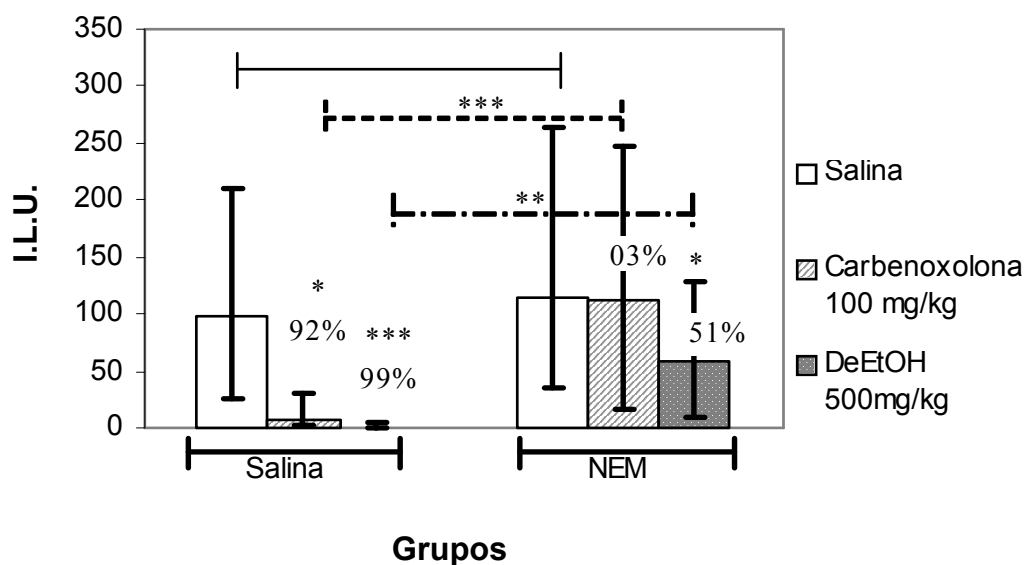


Medianas e intervalo Q1 e Q3 dos índices de lesões ulcerativas, concentração de hidrogênio, volume de suco gástrico e pH dos grupos experimentais (n=9-10). * p < 0.05 e ** p < 0.01 (Kruskall -Wallis, Dunn).

G. Determinação do papel dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção

A administração da droga NEM intraperitonealmente (i.p.) provocou aumento expressivo das lesões gástricas em comparação aos grupos pré-tratados com salina pela mesma via. É possível verificar essa diferenciação em termos estatísticos pelas barras transversas traçadas no gráfico (figura 9) de maneira a comparar os pré-tratamentos com NEM e salina (i.p.). Em ambos os casos, o tratamento com DeEtOH apresentou uma proteção significativa ($p < 0.05$), ao promover 99% de redução das lesões no tratamento com salina (i.p.) e de 51% nos animais pré-tratados com NEM. Porém a depleção dos grupamentos sulfidrílicos reduziu de forma significativa o efeito gastroprotetor pelo tratamento com DeEtOH.

Figura 9 - Efeito do extrato etanólico de *D. elliptica* (DeEtOH) frente ao depletor de grupamentos sulfidrílicos endógenos (NEM) em modelo de úlcera por Etanol

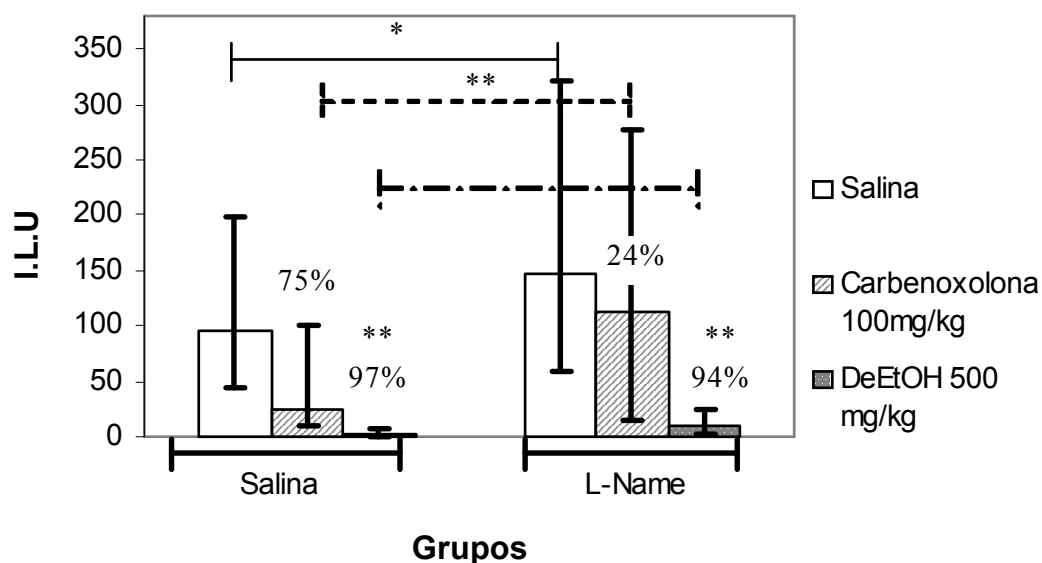


Medianas e intervalos Q_1 e Q_3 dos índices de lesões ulcerativas dos grupos experimentais ($n=6-7$), com as respectivas porcentagens de proteção, * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ (Kruskall - Wallis, Dunn). As barras transversais comparam as diferenças entre os pré-tratamentos com salina e NEM, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ (Mann-Withney).

H. Determinação do papel do Óxido Nítrico (NO) na gastroproteção

A droga L-NAME foi capaz de aumentar os índices de lesão gástricos em ambos grupos controles (positivo e negativo), em relação aos grupos pré-tratados com salina. Mas a aplicação do inibidor de NO não exerceu alterações significante nos animais que receberam DeEtOH pela via oral, pois estes apresentaram significativa gastroproteção (94%) em relação ao seu respectivo grupo controle, enquanto os animais pré-tratados com salina apresentaram 97% de proteção (figura 10).

Figura 10 - Efeito do extrato etanólico de *D. elliptica* (DeEtOH) frente ao inibidor de NO endógeno (L-NAME) em modelo de úlcera por Etanol

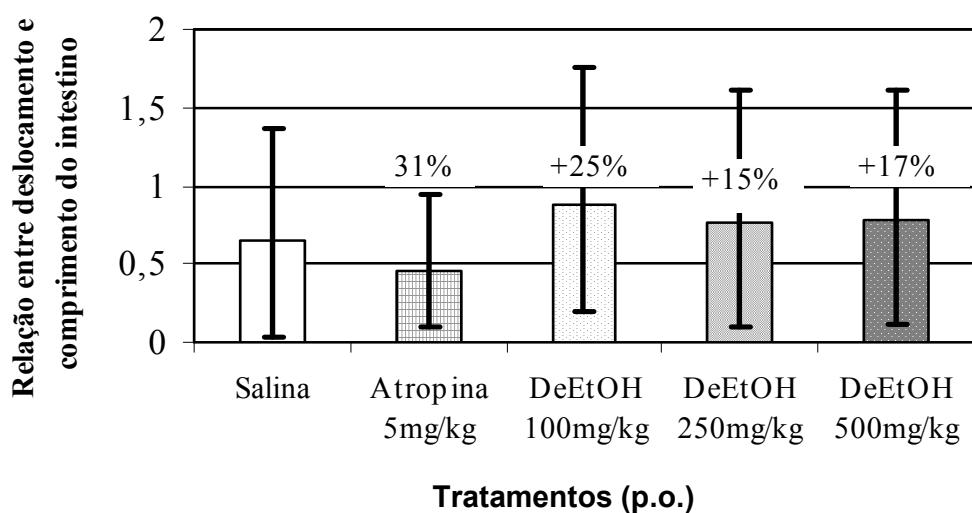


Medianas e intervalos Q_1 e Q_3 dos índices de lesões ulcerativas dos grupos experimentais ($n=7$), com as respectivas porcentagens de proteção, ** $p < 0.01$ (Kruskall -Wallis, Dunn). As barras transversais comparam as diferenças entre os pré-tratamentos com salina e L-Name, * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ (Mann-Withney).

I. Determinação da motilidade intestinal

Neste modelo não foi possível observar modificações significativas do trânsito intestinal dos animais tratados com diferentes doses de DeEtOH, mas em todas as doses foi possível constatar um leve aumento da motilidade, porém não de maneira a se observar uma curva dose-efeito (figura 11).

Figura 11 – Efeito do extrato etanólico de *D. elliptica* (DeEtOH) sobre a motilidade intestinal de camundongos



Medianas e intervalos Q_1 e Q_3 da razão entre distância percorrida e tamanho total do intestino dos grupos experimentais (n=7). $p > 0.05$ (Kruskall -Wallis, Dunn).

J -Avaliação das atividades cicatrizante e tóxica de DeEtOH

A atividade cicatrizante do extrato DeEtOH (250 mg/kg) foi avaliada 14 dias após a indução da lesão com ácido acético. DeEtOH foi capaz de diminuir o tamanho das lesões (borda externa) em comparação ao grupo de animais tratados com salina e mostrou-se mais efetiva que a cimetidina 100 mg/kg na cicatrização das lesões (tabela 3).

Tabela 3 - Efeito do extrato etanólico de *D.elliptica* sobre o processo de cicatrização em lesões causadas por ácido acético em ratos

Tratamentos	Doses mg	N	Borda interna	% de cicatrização	Borda externa	% de cicatrização
Salina	10mL/kg	06	0,74 ± 0,09	--	2,50 ± 0,29	--
Cimetidina	100	07	0,62 ± 0,09	16	2,08 ± 0,37	16
DeEtOH	250	08	0,58 ± 0,08	21	1,35 ± 0,13*	46

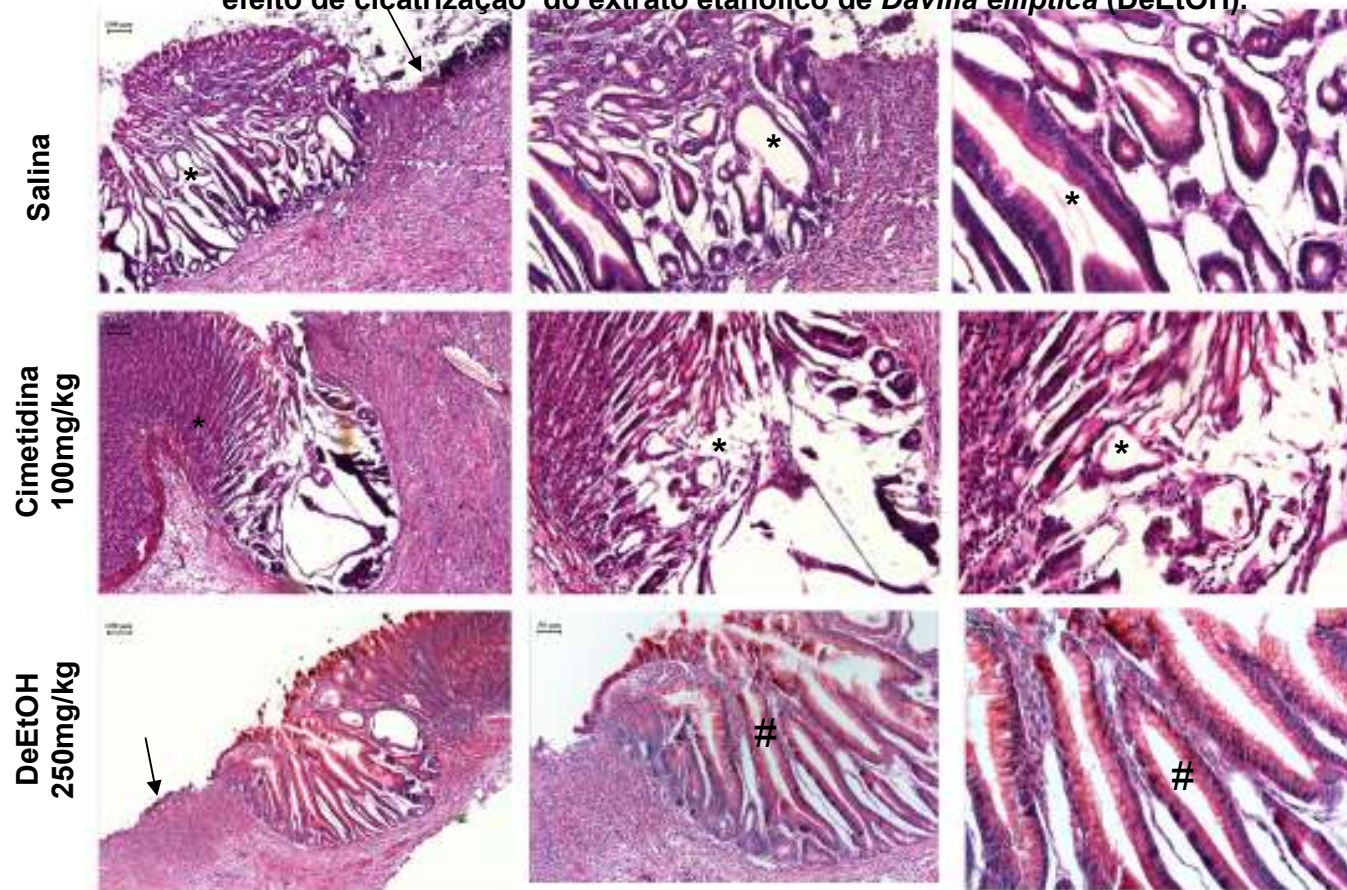
Dados de média ± erro padrão da média das áreas de lesão (cm²) dos diferentes tratamentos.

* p < 0.05, Anova, Dunnet.

A partir da análise das lâminas de H&E é possível notar que o tratamento com DeEtOH 250mg/kg promove um alongamento das glândulas mucosas localizadas na região de regeneração, enquanto os tratamentos com salina e cimetidina 100mg/kg não se observa tal organização (figura 12).

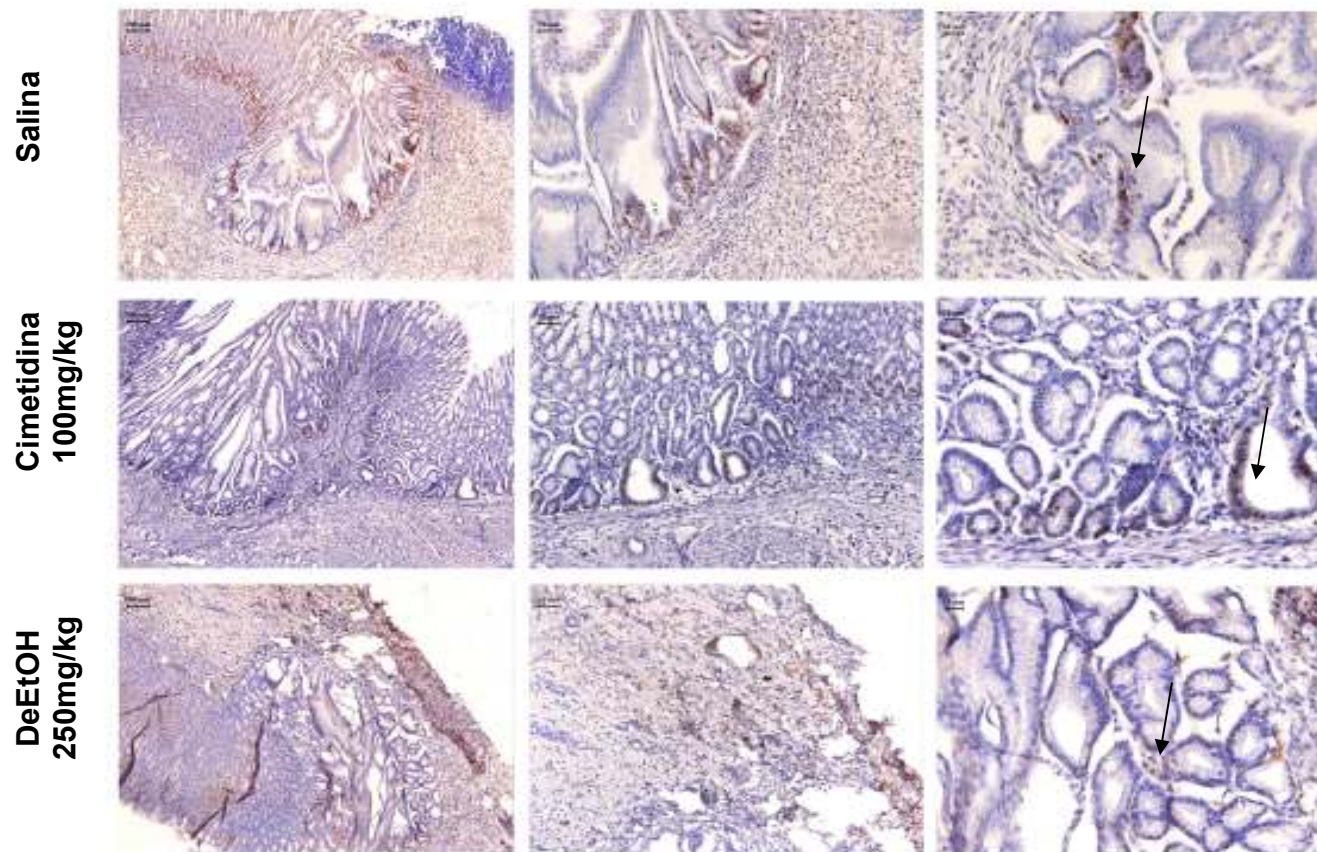
As lâminas marcadas com o anticorpo de PCNA (marcador específico de proliferação celular), não demonstraram alteração de intensidade da coloração com a administração de DeEtOH (figura 13). As análises das lâminas coradas com PAS (cora especificamente muco), não esboçaram um aumento diferencial da produção de muco em relação à salina (figura 14). Mas ao microscópico eletrônico de transmissão, a liberação de muco pelas glândulas mucosas torna-se mais evidenciada quando comparado aos animais submetidos aos tratamentos com a salina (figura 15).

Figura 12 – Cortes histológicos de lesões estomacais produzidas por ácido acético corados com H&E do efeito de cicatrização do extrato etanólico de *Davilla elliptica* (DeEtOH).



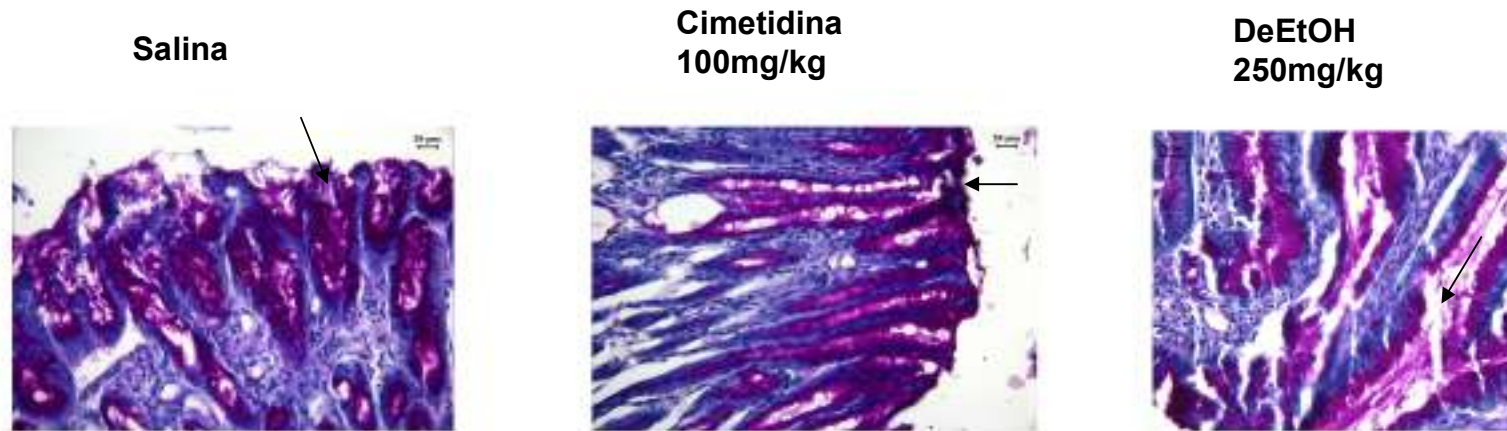
As setas indicam a submucosa exposta. Observar em # a organização linear das glândulas tubulosas, e * a organização pouco linear das mesmas glândulas.

Figura 13- Análise histológica de estômagos de rato tratados com salina (10ml/Kg), cimetidina (100 mg/Kg) e *Davilla elliptica* (DeEtOH) 250mg/Kg, por 14 dias, em imunohistoquímica por PCNA



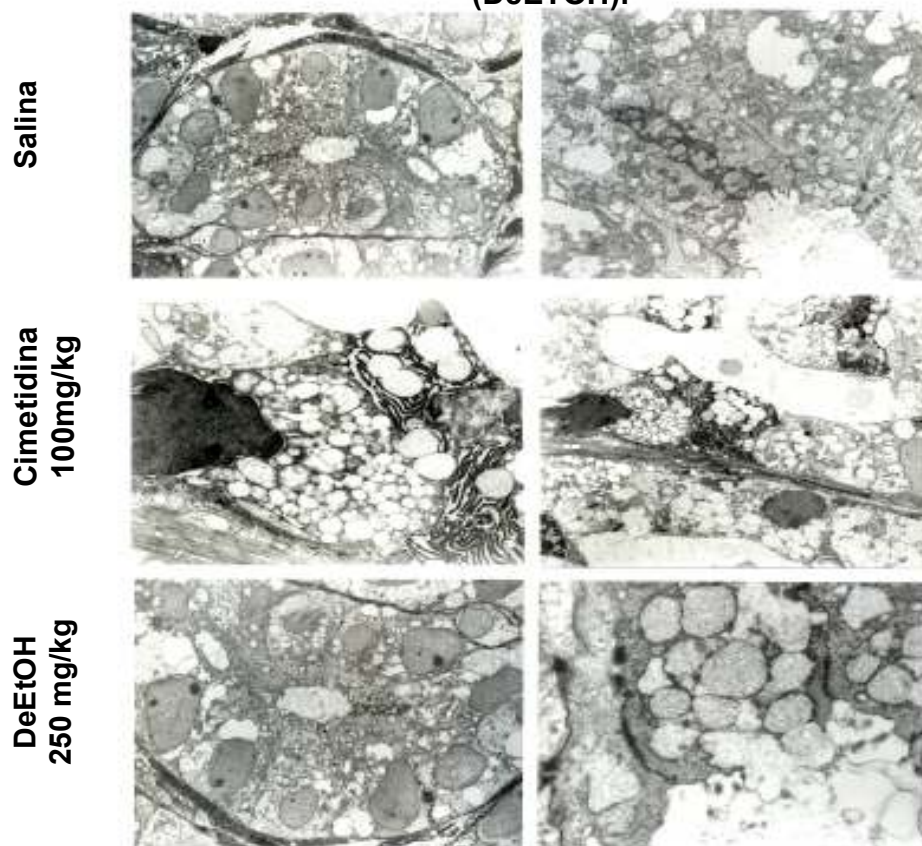
Notar que na região de re-organização da mucosa não se observa muitas células PCNA positivas (cor marrom, indicadas pelas setas) em todos os grupos.

Figura 14 – Efeito do extrato etanólico de *D. elliptica* (DeEtOH) em lâminas histológicas coradas com PAS, durante 14 dias tratamento sobre produção de mucos em experimento lesão gástrica induzida por ácido acético.



As setas indicam a presença de glândulas contendo muco.

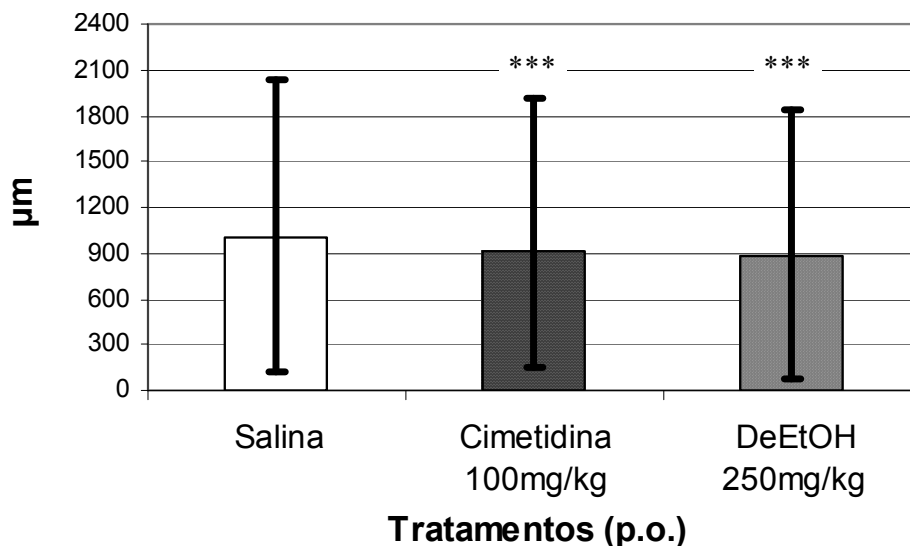
Figura 15 – Eletromicrografia de amostras de estômagos submetido a indução de úlcera por ácido acético e tratado por 14 dias com Salina, Cimetidina e extrato etanólico de *Davilla elliptica* (DeEtOH).



“n” indica núcleo, asterisco (*) à luz da glândula estomacal e a seta grânulos de secreção sendo liberado para luz.

A esses dados aliam-se as medidas morfométricas do epitélio da mucosa gástrica, que indicam uma redução significativa da altura do epitélio de regeneração nos animais tratados com cimetidina 100mg/kg e DeEtOH 250mg/kg em relação ao controle negativo (figura 16).

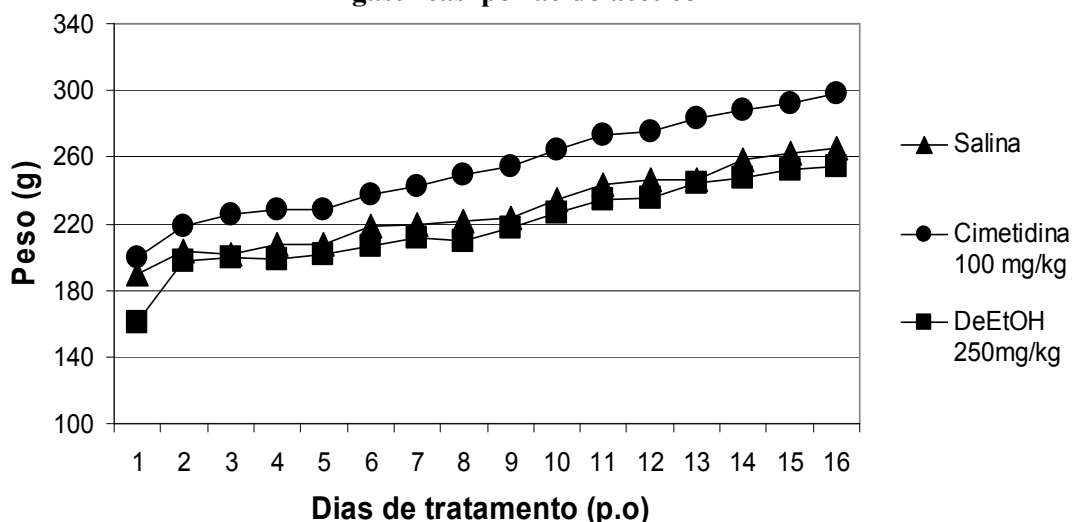
Figura 16 – Efeito do extrato etanólico de *D. elliptica* (DeEtOH) sobre parâmetro morfométrico (altura) da região de regeneração em lesões gástricas causadas por ácido acético em ratos



Medianas e intervalos Q_1 e Q_3 da altura da região de regeneração dos diferentes tratamentos (n= 6-8).
*** $p < 0.005$ (Kruskall -Wallis, Dunn).

diário do peso corporal (figura 17), da relação peso órgão/corpo (tabela 4) e da análise dos parâmetros séricos (tabela 5) não indicaram efeitos tóxicos subagudos pela administração de DeEtOH 250mg/kg durante 14 dias.

Figura 17- Evolução do peso corporal de ratos frente ao tratamento diário com *D. elliptica* durante 14 dias em experimento de indução de lesões gástricas por ácido acético



Médias dos pesos diários dos grupos experimentais (n=6-8). $p > 0.05$ (Anova, Dunnet).

Tabela 4- Efeito da administração subaguda do extrato etanólico de *D. elliptica* (DeEtOH) sobre os órgãos vitais em ratos submetidos ao modelo de indução lesões gástricas por ácido acético

Tratamentos (p.o)	N	Fígado	Coração	Pulmões	Rins	Baço	Mortalidade
Salina	0 6	11,85 ± 0,12	3,76 ± 0,08	4,64 ± 0,14	5,38 ± 0,07	3,89 ± 0,19	0
Cimetidina 100mg/kg	0 7	11,53 ± 0,23	3,64 ± 0,07	4,33 ± 0,15	5,14 ± 0,1	3,25 ± 0,16	0
DeEtOH 250mg/kg	0 8	11,35 ± 0,16	3,63 ± 0,04	4,88 ± 0,2	5,11 ± 0,06	3,14 ± 0,11	0

Dados da razão dos órgãos e peso corpóreo expressos em média (arcoseno) ± erro padrão da média.

Tabela 5- Efeito da administração subaguda do extrato etanólico de *D. elliptica* sobre parâmetros bioquímicos de toxicidade em ratos submetidos ao modelo de indução de lesões gástricas por ácido acético

Tratamentos (p.o)	AST U/L	ALT U/L	γ -GT U/L	Creatinina mg/dL	Uréia mg/dl
Salina	239 (186-273)	57,3 (51,3-67,3)	14,9 (12,8-19,5)	2,45 (2,37-2,57)	160 (146-175)
Cimetidina	191 (188-227)	50,8 (48,7-62,6)	15 (12,1-22,1)	2,40 (2,30-2,55)	160 (159-174)
DeEtOH 250mg/kg	223 (194-248)	65,5 (58-70,8)	12,5 (10,6-19,5)	2,40 (2,15-2,75)	150 (139-164)

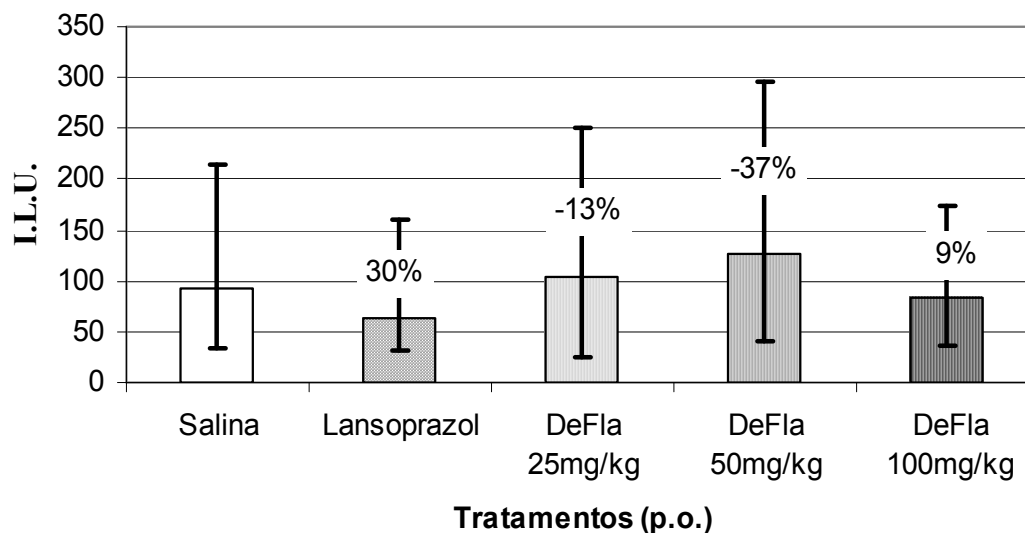
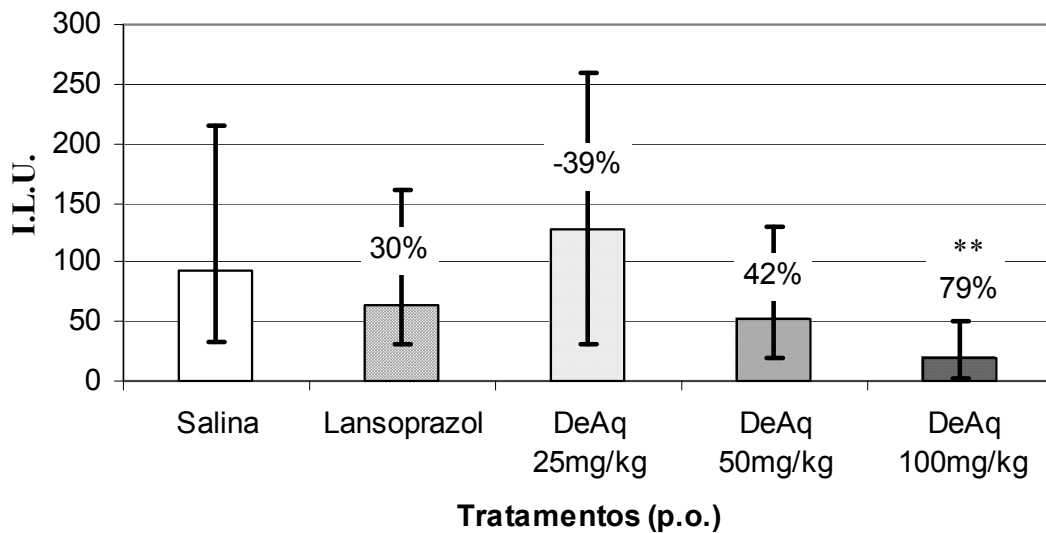
Medianas e intervalos Q_1 e Q_3 dos parâmetros bioquímicos obtidos dos diferentes grupos experimentais (n=6-8) após 14 dias de tratamento diário. $p > 0.05$ (Kruskall -Wallis, Dunn).

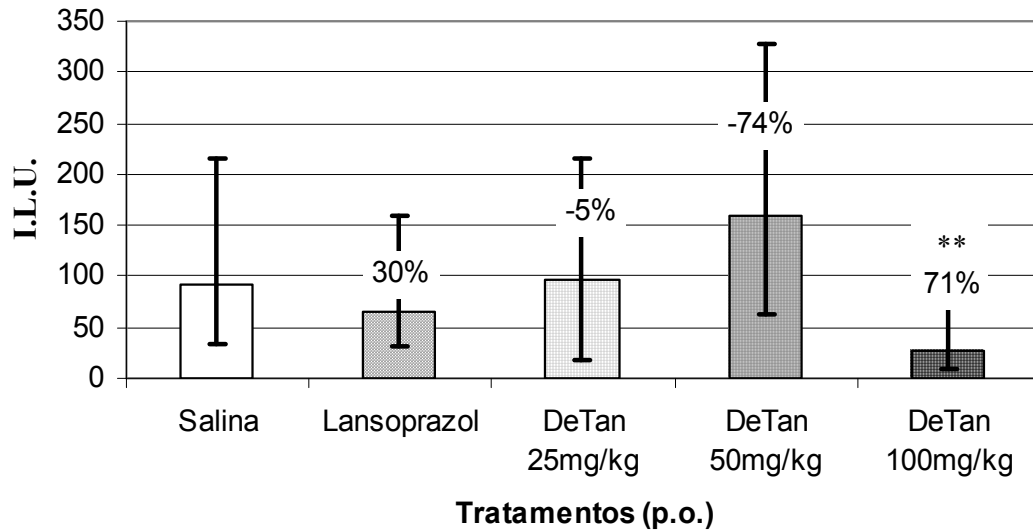
IV.1.2. Atividade farmacológica das frações enriquecidas de *Davilla elliptica*

A- Indução de úlcera por Etanol absoluto (Morimoto *et al.*, 1991)

Neste experimento foi constatada a atividade gastroprotetora das frações de DeAq e DeTan somente na maior dose utilizada neste experimento (100mg/kg). DeFla não apresentou atividade gastroprotetora neste modelo em nenhuma das doses avaliadas (figura 13).

Figura 18- Efeito das frações aquosa (DeAq), de flavonoides (DeFla) e taninos (DeTan) de *D. elliptica* em úlceras induzidas por etanol absoluto

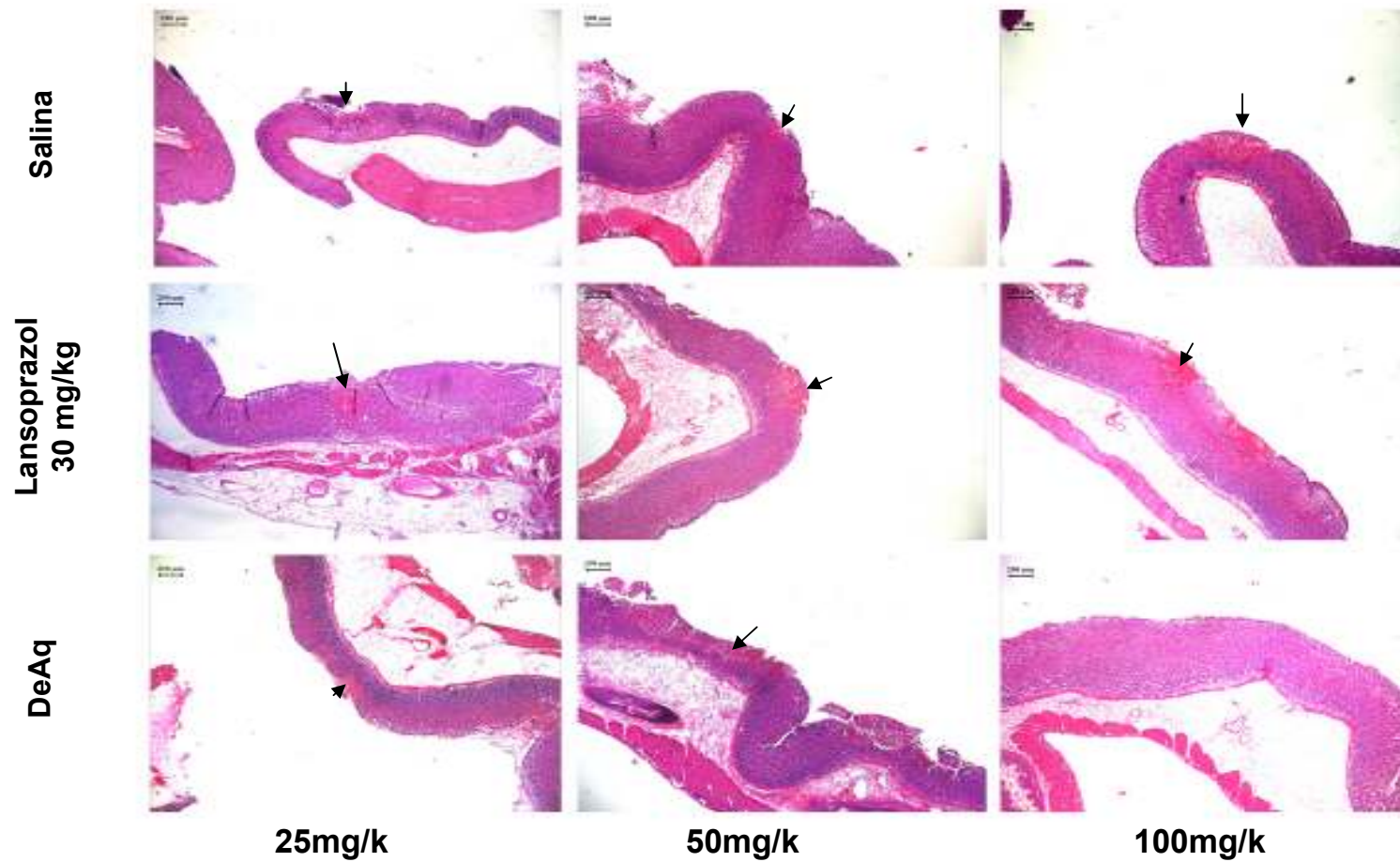




Medianas e intervalo Q_1 e Q_3 dos índices de lesões ulcerativas dos grupos experimentais (n=5 -21). Os números de porcentagem indicam a proteção em relação à salina. ** $p < 0.01$ (Kruskall -Wallis, Dunn).

A análise das lâminas histológicas da região da mucosa gástrica coradas de H&E, obtidas a partir do modelo de indução de lesões por etanol absoluto, demonstrou haver lesões, muitas vezes acompanhadas de hemorragia e inflamação da mucosa, principalmente nas menores doses das frações e nos grupos tratados com salina. Observa-se nas imagens das três frações (figura 19), que na dose de 100mg/kg não há lesões como nas demais doses, mostrando um efeito na conservação da integridade da mucosa. As lâminas coradas com PAS indicam uma produção/liberação pronunciada de muco pelas frações DeTan e DeFla (figura 20).

**Figura 19 -Cortes histológicos de estômagos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol tratado com frações em diferentes concentrações de *Davilla elliptica* corados com H&E.
As setas indicam pontos hemorrágicos.**



DeFla



DeTan

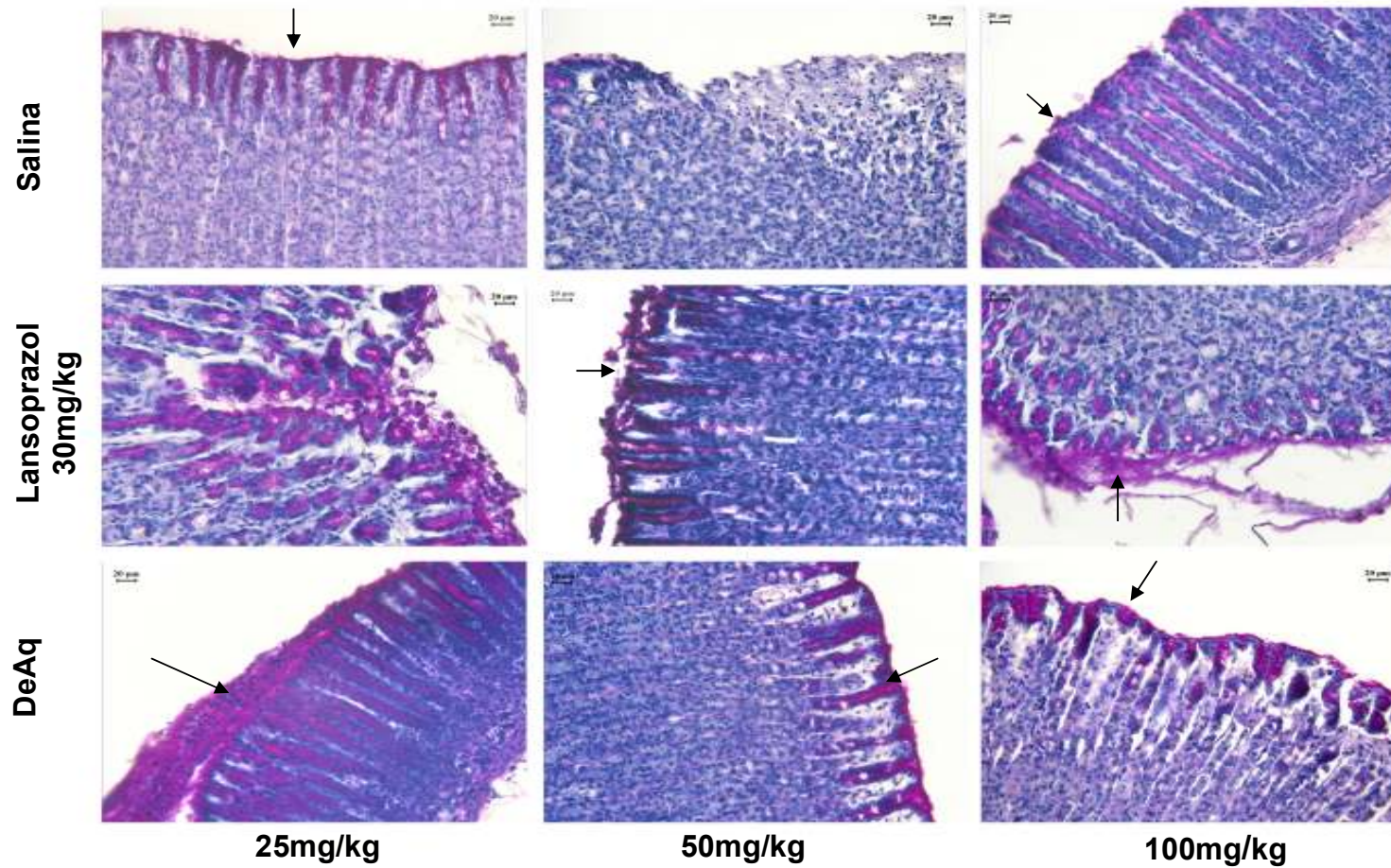


25mg/kg

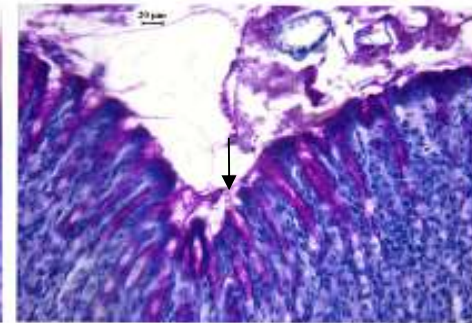
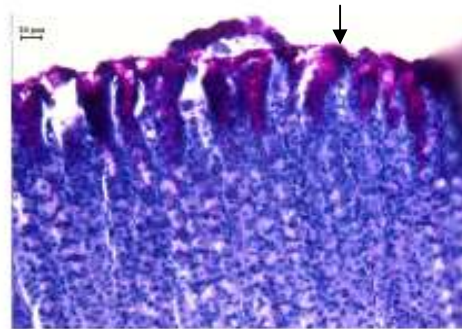
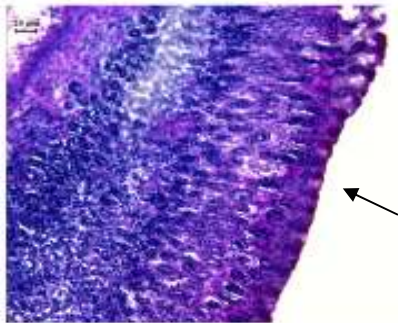
50mg/kg

100mg/kg

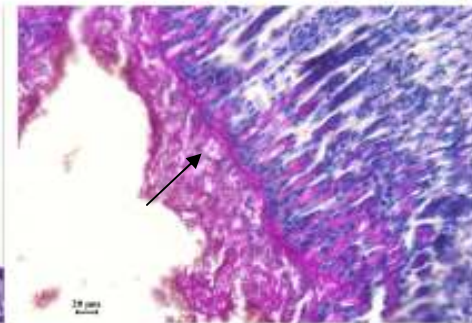
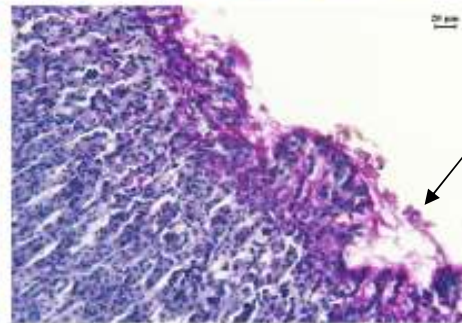
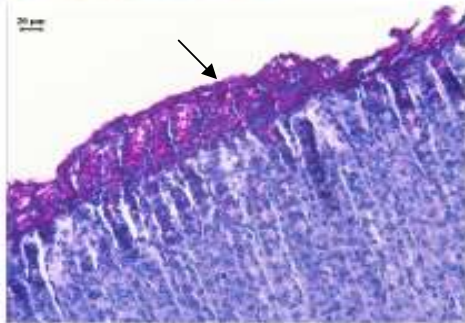
Figura 20 - Cortes histológicos de estômagos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol tratado com frações em diferentes concentrações de *Davilla elliptica* corados com PAS. As setas indicam secreção de muco.



DeFla



DeTan



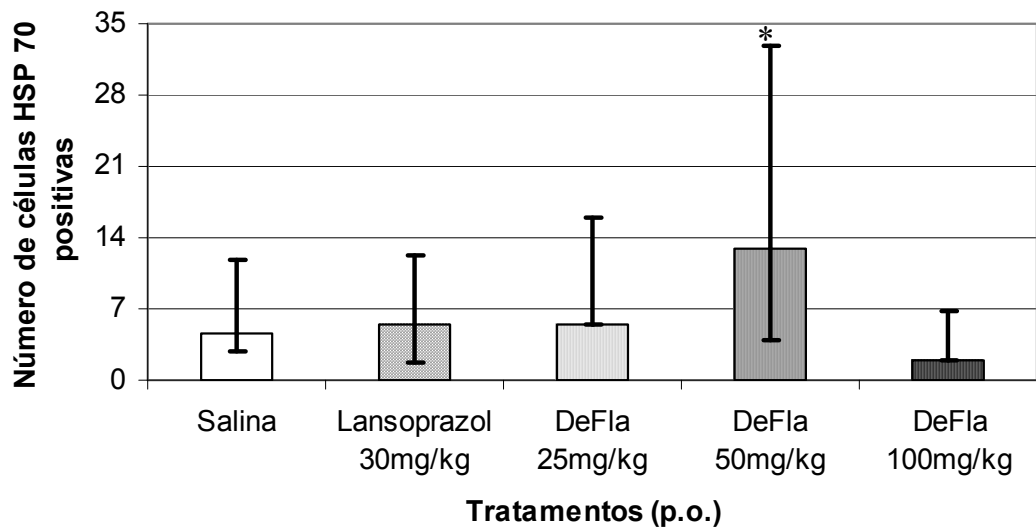
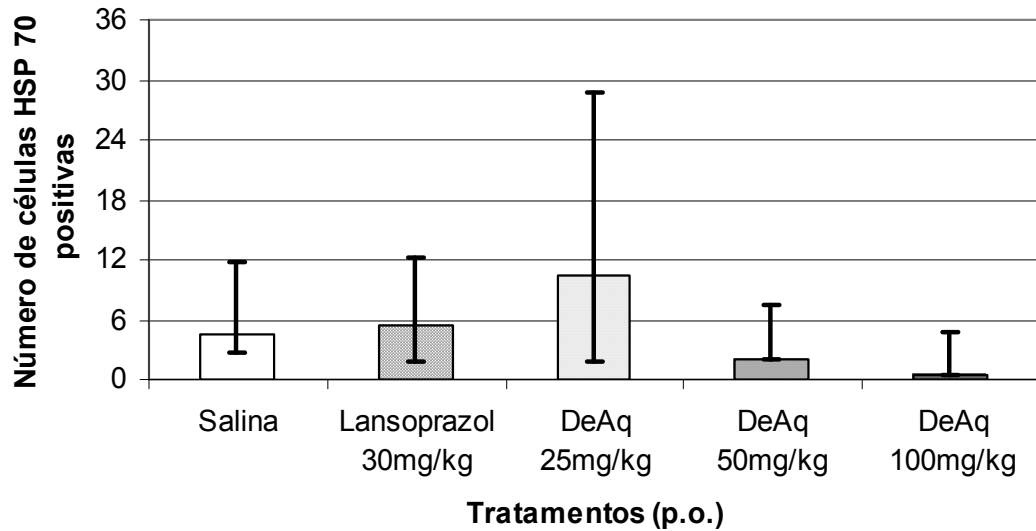
25mg/kg

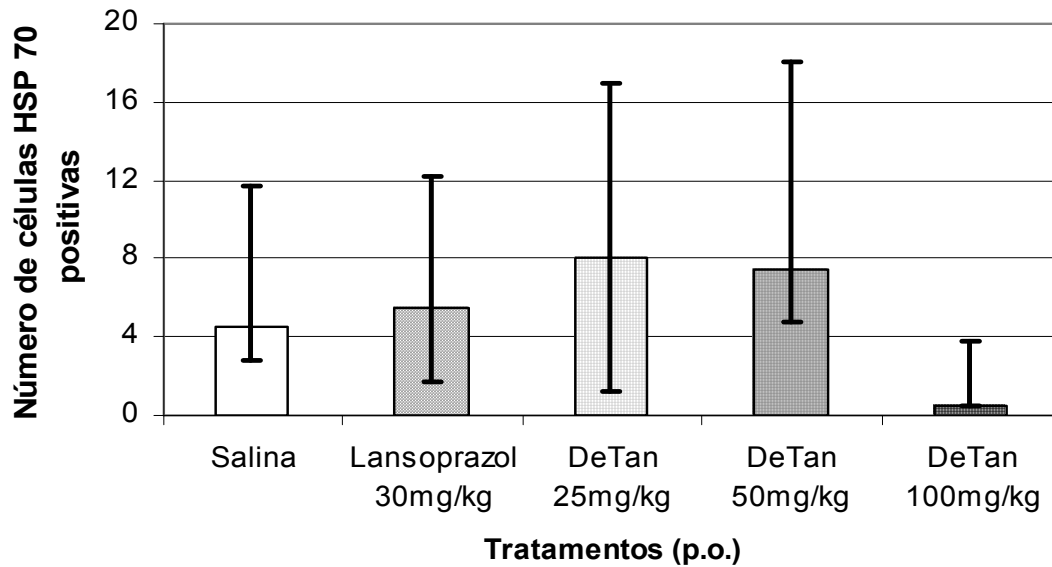
50mg/kg

100mg/kg

A contagem manual de células marcadas com o anticorpo de HSP 70 demonstrou haver um aumento de sua expressão nas menores doses, sendo reduzidas na dose de 100mg/kg nas três frações analisadas (figura 21).

Figura 21- Efeito das frações aquosa (DeAq), de flavonóides (DeFla) e taninos (DeTan) de *D. elliptica* sobre a expressão de HSP 70 em modelo de indução de úlceras por etanol absoluto

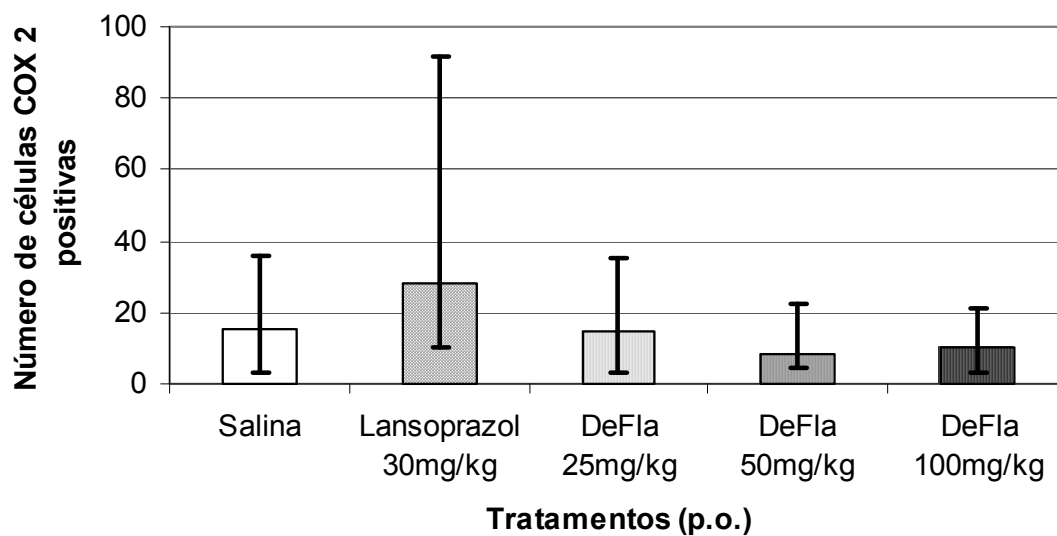
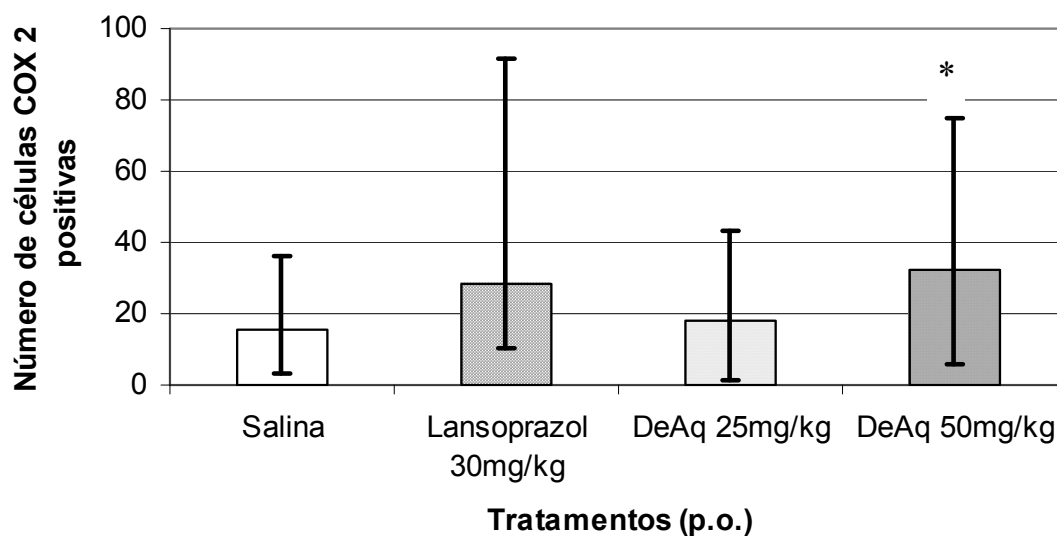


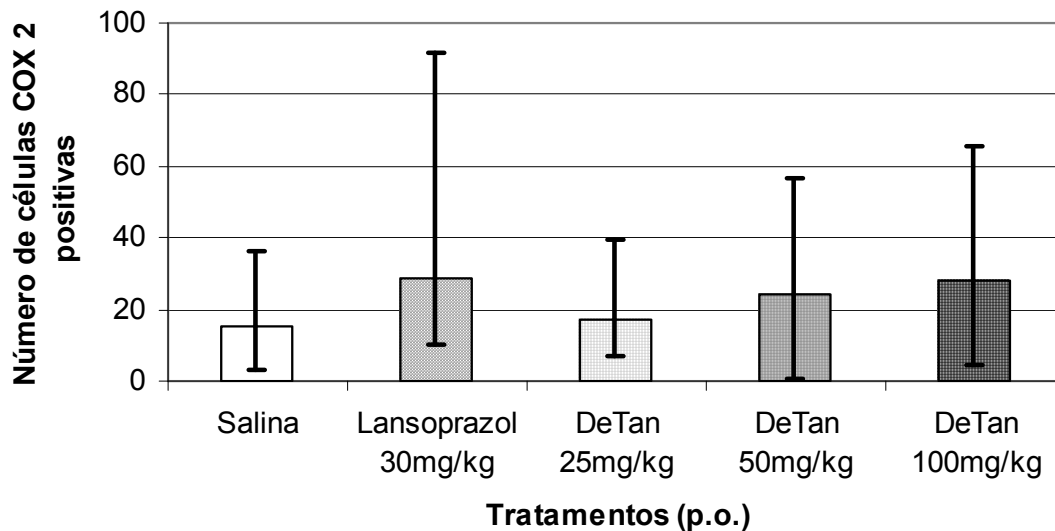


Medianas e intervalo Q_1 e Q_3 do número de células marcadas com o anticorpo de HSP 70 nos diferentes grupos (n=5 -21). * $p < 0.01$ (Kruskall -Wallis, Dunn).

Para avaliar a participação da ciclooxygenase 2 (COX 2) na gastroproteção, as células marcadas com o anticorpo foram contadas manualmente. Os resultados indicam uma significativa presença de células que expressam COX 2 na mucosa de animais tratados com a fração DeAq 50m/kg. Observa-se também um aumento gradativo da expressão de COX 2 nos tratamentos com a fração de tanino (dose-dependente), enquanto a fração de flavonóides não esboçou atividade referente a ativação de COX 2 (figura 22).

Figura 22- Efeito das frações aquosa (DeAq), de flavonóides (DeFla) e taninos (DeTan) de *D. elliptica* sobre a expressão de COX 2 em modelo de indução de úlceras por etanol absoluto

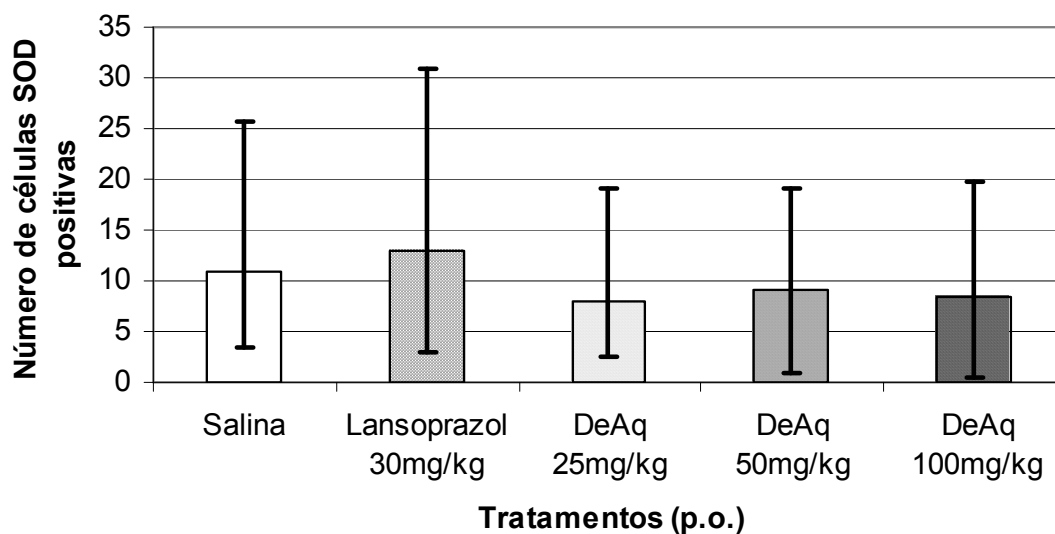


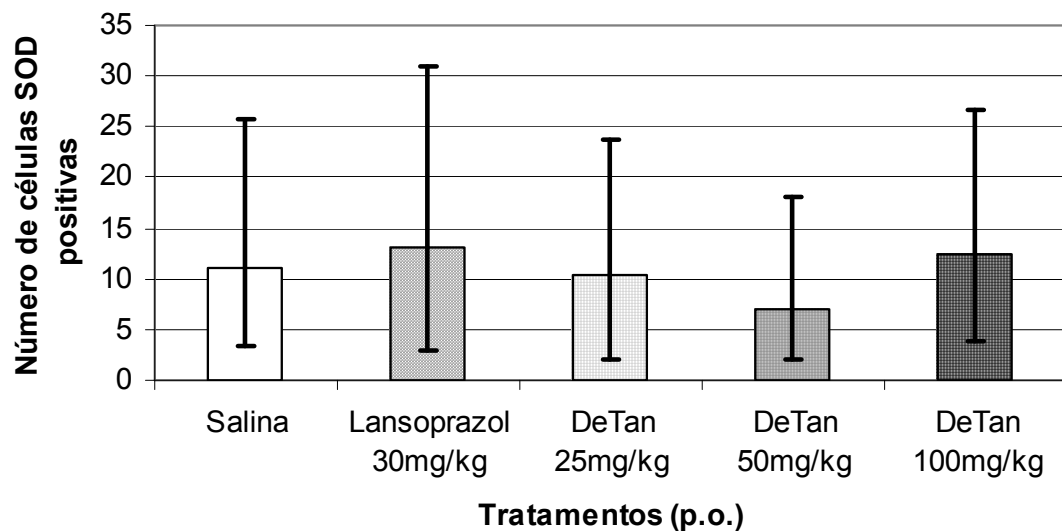
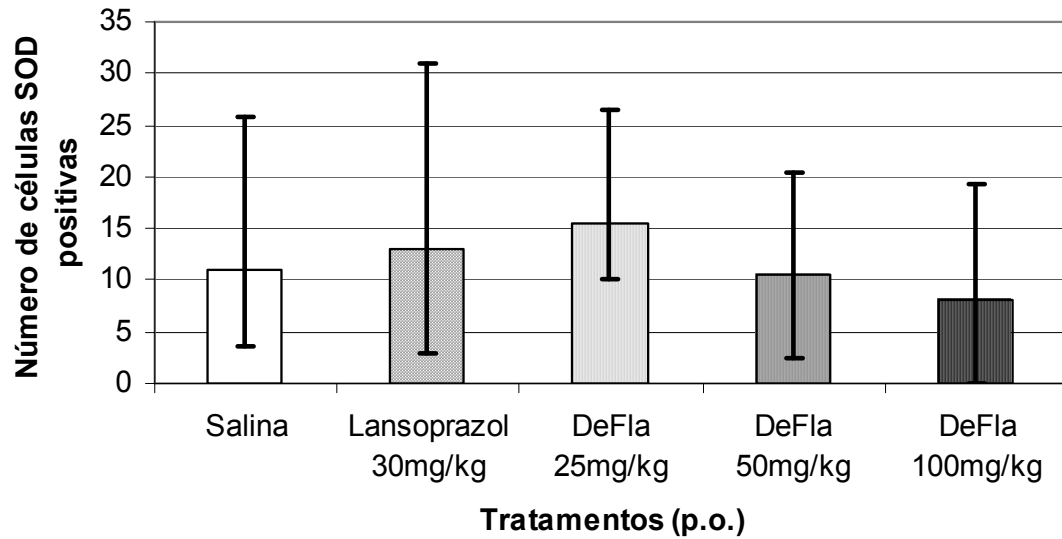


Medianas e intervalo Q₁ e Q₃ do número de células marcadas com o anticorpo de COX 2 nos diferentes grupos (n=5 -21). * p < 0.05 (Kruskall -Wallis, Dunn).

A contagem de células marcadas positivamente com o anticorpo das superóxido dismutase (SOD) na região da mucosa gástrica de ratos submetidos aos pré-tratamentos com as frações não demonstrou resultados expressivos com nenhuma das três frações (figura 23).

Figura 23- Efeito das frações aquosa (DeAq), de flavonoides (DeFla) e taninos (DeTan) de *D. elliptica* sobre SOD em modelo de indução de úlceras por etanol





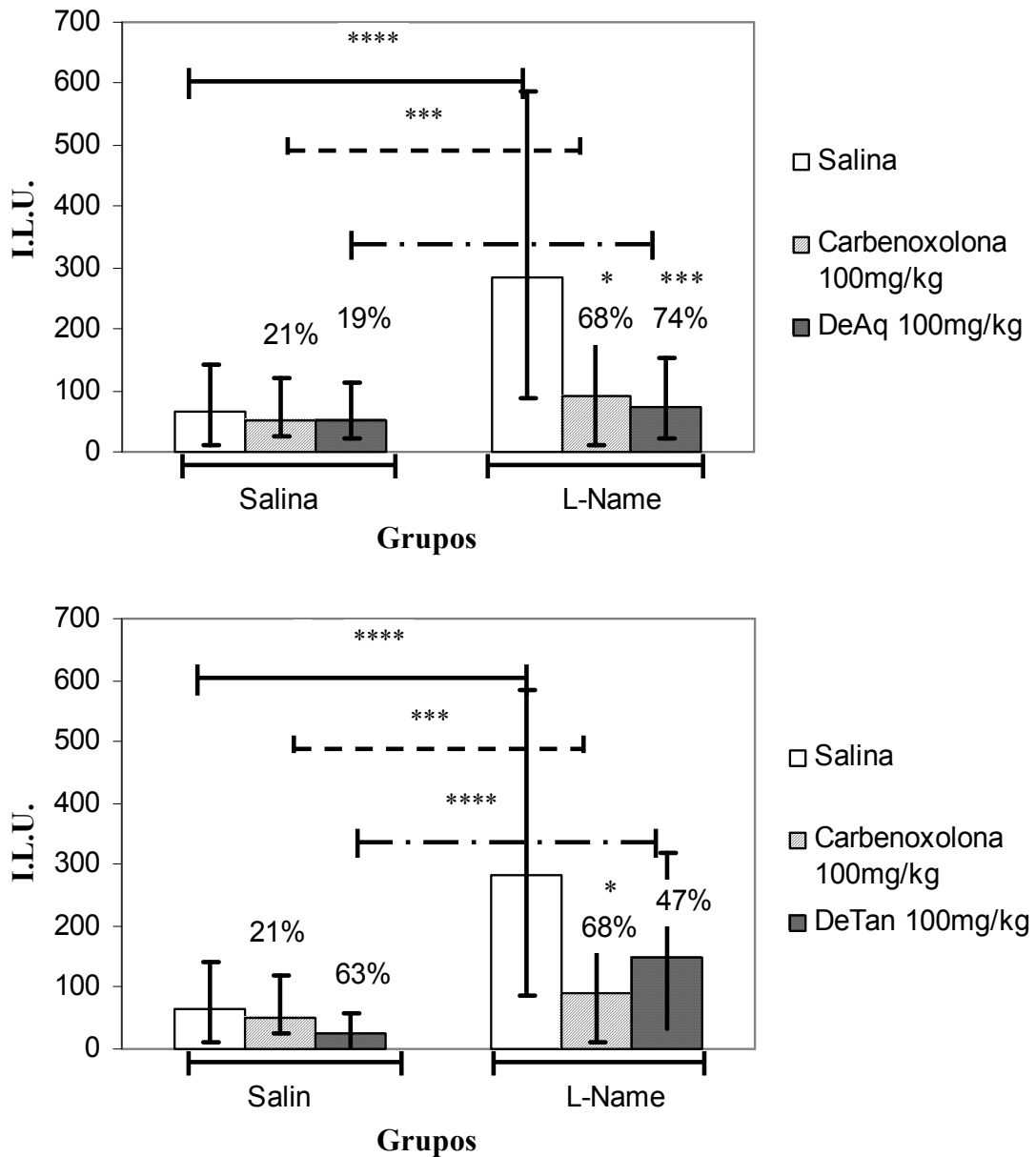
Medianas e intervalo Q_1 e Q_3 do número de células marcadas com o anticorpo de SOD nos diferentes grupos (n=5 -21). $p > 0.05$ (Kruskall -Wallis, Dunn).

B - Determinação do papel do Óxido Nítrico (NO) na gastroproteção das frações aquosa (DeAq) e de tanino (DeTan) de *D. elliptica*.

O grupo de animais tratados com a fração DeAq apresentou uma proteção significativa de 74% em relação à salina, ambos pré-tratados com L-Name, frente à mucosa submetida a lesão gástrica induzida por etanol. O pré-tratamento com DeTan

não promoveu o mesmo resultado que DeAq onde se observa um aumento dos níveis de lesão quando o grupo foi pré-tratado com L-Name (figura 24).

Figura 24 - Efeito das frações aquosa (DeAq) e de taninos (DeTan) de *D. elliptica* frente ao bloqueador de NO em modelo de úlcera por Etanol



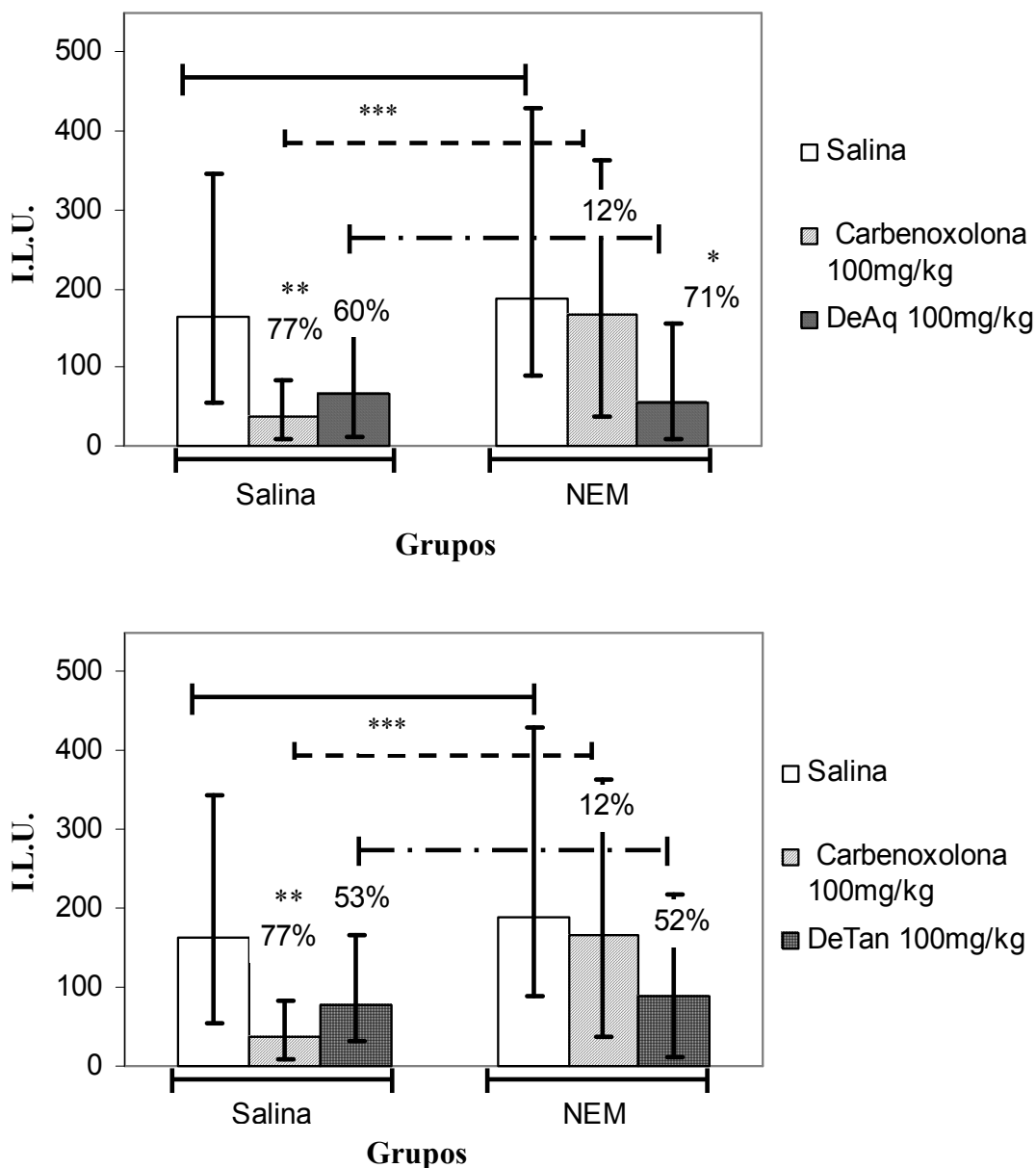
Medianas e intervalos Q_1 e Q_3 dos índices de lesões ulcerativas dos grupos experimentais (n=6-7), com as respectivas porcentagens de proteção, * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$ (Kruskall -Wallis, Dunn). As barras transversais comparam as diferenças entre os pré-tratamentos com salina e L-Name, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.001$ (Mann-Withney).

C - Determinação do papel dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção

exercida pelas frações aquosa (DeAq) e de tanino (DeTan) de *D. elliptica*

A inibição dos grupamentos sulfidrílicos endógenos não alterou a ação das frações, que mantiveram uma relação de proteção muito próxima aos animais cujo pré-tratamento foi salina (figura 25).

Figura 25 - Efeito das frações aquosa (DeAq) e de taninos (DeTan) de *D. elliptica* frente ao depletor de sulfidrilas endógena (NEM) em modelo de úlcera por Etanol



Medianas e intervalos Q_1 e Q_3 dos índices de lesões ulcerativas dos grupos experimentais ($n=5-7$), com as respectivas porcentagens de proteção, * $p < 0.01$ (Kruskal -Wallis, Dunn). As barras transversais comparam as diferenças entre os pré-tratamentos com salina e NEM, *** $p < 0.005$, (Mann-Withney).

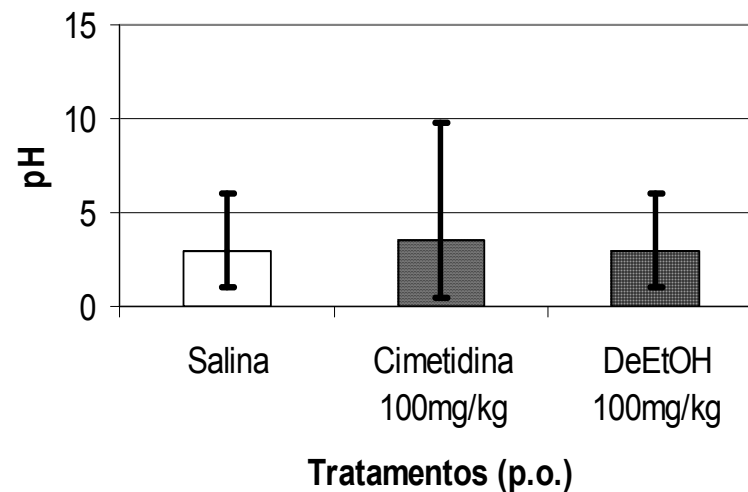
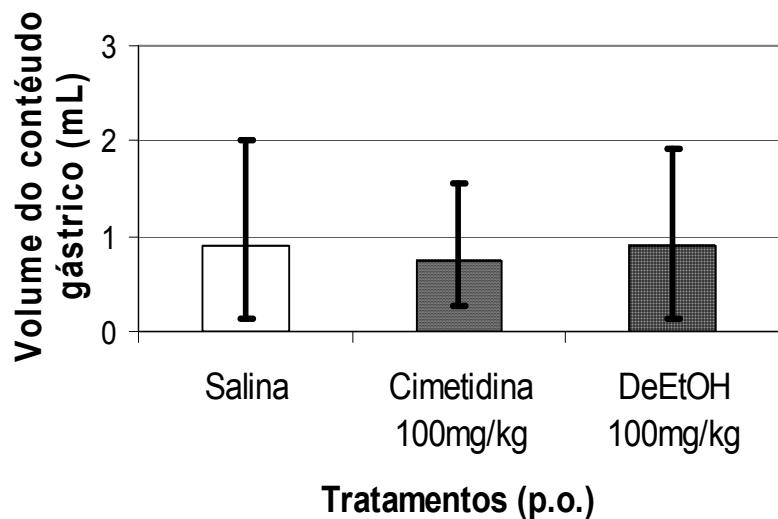
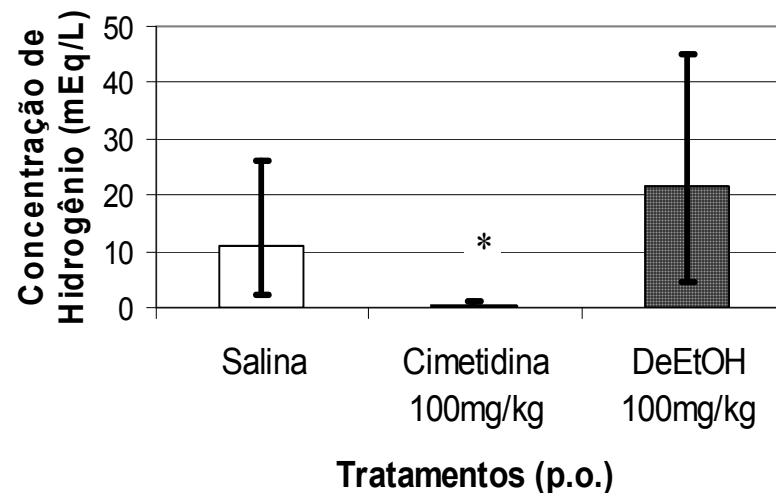
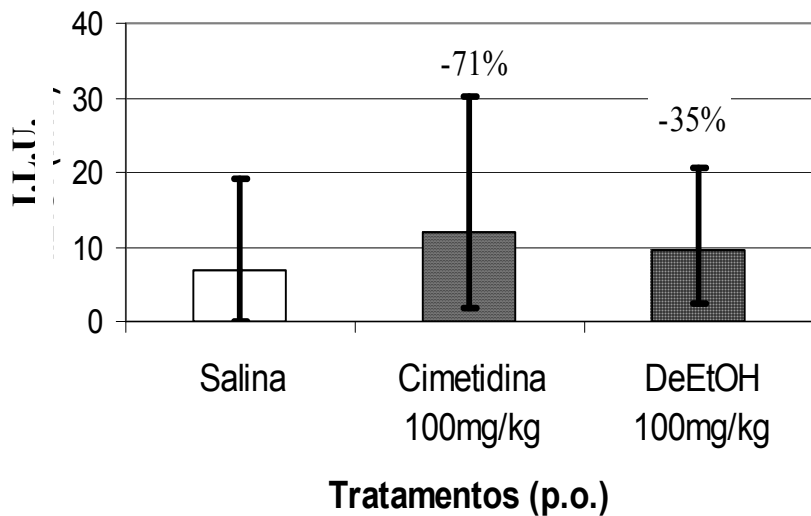
D - Úlceras induzidas pela Ligadura de piloro e avaliação dos parâmetros do suco gástrico.

Como parte da investigação de mecanismo de ação, foram avaliadas possíveis alterações dos parâmetros do suco gástrico em virtude da administração da fração DeTan. Porém, não se constatou atividades relacionados ao pH, concentração de íons hidrogênio e volume do suco gástrico. A atividade gastroprotetora também não foi confirmada neste experimento (figura 26).

E. Determinação dos níveis de prostaglandina E₂ basal da mucosa gástrica

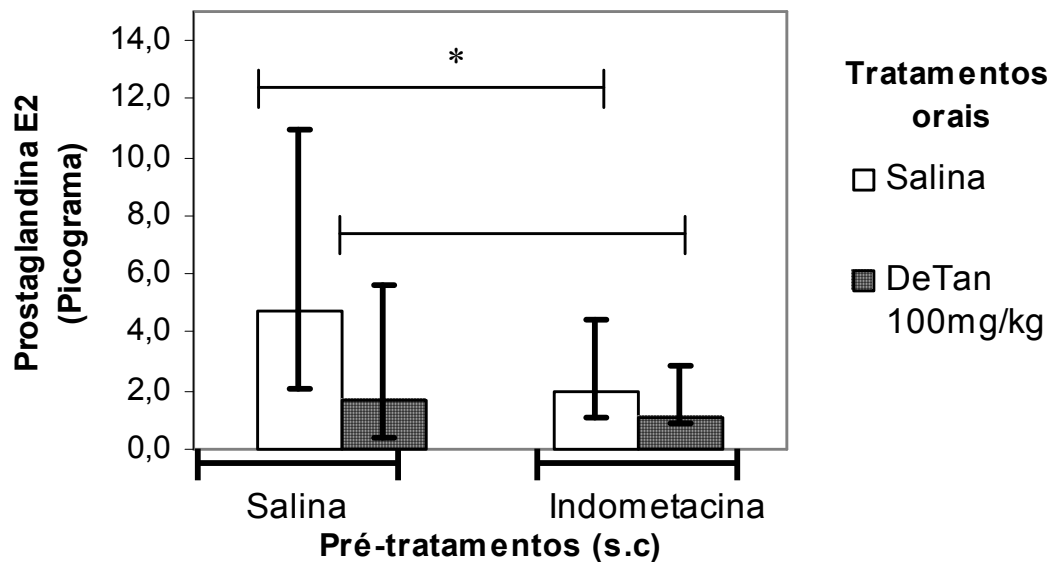
A quantidade de prostaglandina obtida a partir do raspado de mucosa gástrica após a administração de DeTan, mostrou-se relativamente reduzida, porém sem distinção (em termos estatístico) quando comparada ao grupo previamente tratados com salina. A inibição da síntese de prostaglandina pela indometacina, não promoveu uma diferença entre os tratamentos com DeTan, devido a baixa quantidade apresentada mesmo na ausência do inibidor (figura 27).

Figura 26 – Efeito da administração intraduodenal da fração de taninos (DeTan) de *D. elliptica* no modelo de ligadura de piloro em camundongos



Medianas e intervalo Q1 e Q3 dos índices de lesão ulcerativa, concentração de hidrogênio, volume de suco gástrico e pH dos grupos experimentais (n=9-10). * p < 0.05 (Kruskall -Wallis, Dunn).

Figura 27 - Efeito de taninos (DeTan) de *D. elliptica* sobre a produção de prostaglandina na mucosa gástrica em ratos



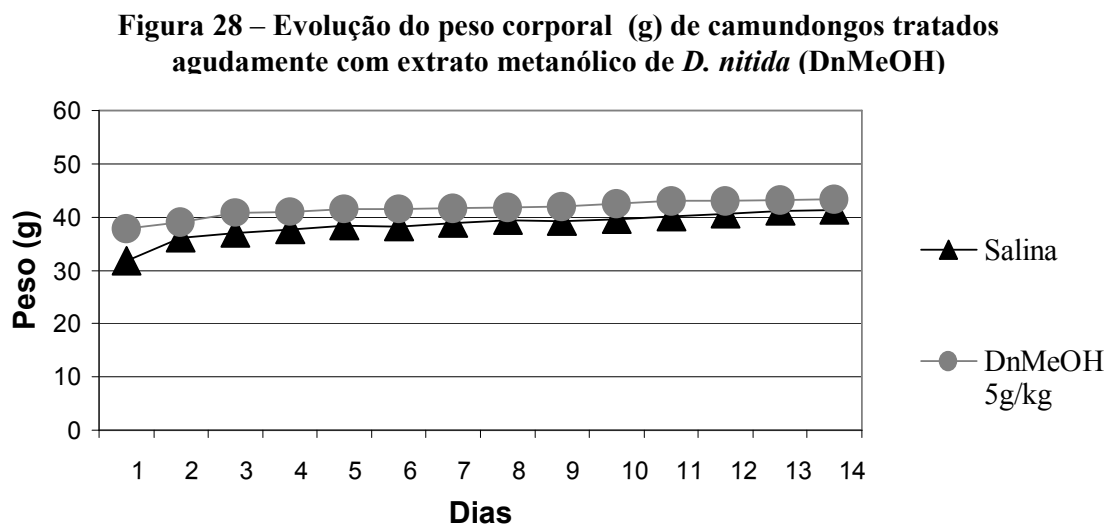
Medianas e intervalos Q_1 e Q_3 da quantidade de prostaglandina na mucosa dos grupos experimentais ($n=5-6$), $p > 0.05$ (Mann-Withney). As barras transversais comparam as diferenças entre os tratamentos subcutâneos, $*p < 0.05$ (Mann-Withney).

IV.2. *Davilla nitida*

IV.2.1. Atividade biológica do extrato metanólico de *D. nitida* (DnMeOH)

A. “Screening” hipocrático e toxicidade aguda

A administração da dose 5000mg/kg de DnMeOH não provocou alterações perceptíveis nos parâmetros comportamentais analisados (dados não apresentados). O acompanhamento dos pesos dos animais durante 14 dias após o tratamento, não indicou alteração da evolução dos pesos corporais dos animais avaliados (figura 28). Após a morte dos animais, os órgãos (coração, fígado, pulmões, rins e baço) foram retirados para análise comparativa com o peso final de cada animal. A razão entre peso de cada órgão e peso corporal foi calculada e indicou a ausência de diferença significativa entre os animais tratados com o veículo e aqueles com DnMeOH (tabela 6).



Varição de peso (g) dos animais monitorados (n=6 - 7) durante 14 dias. Expressam as médias de peso para cada dia. $p > 0.05$ (“t” de Student).

Tabela 6 - Efeito da administração aguda do extrato metanólico de *D. nitida* (DnMeOH) sobre os órgãos de camundongos após 14 dias do tratamento

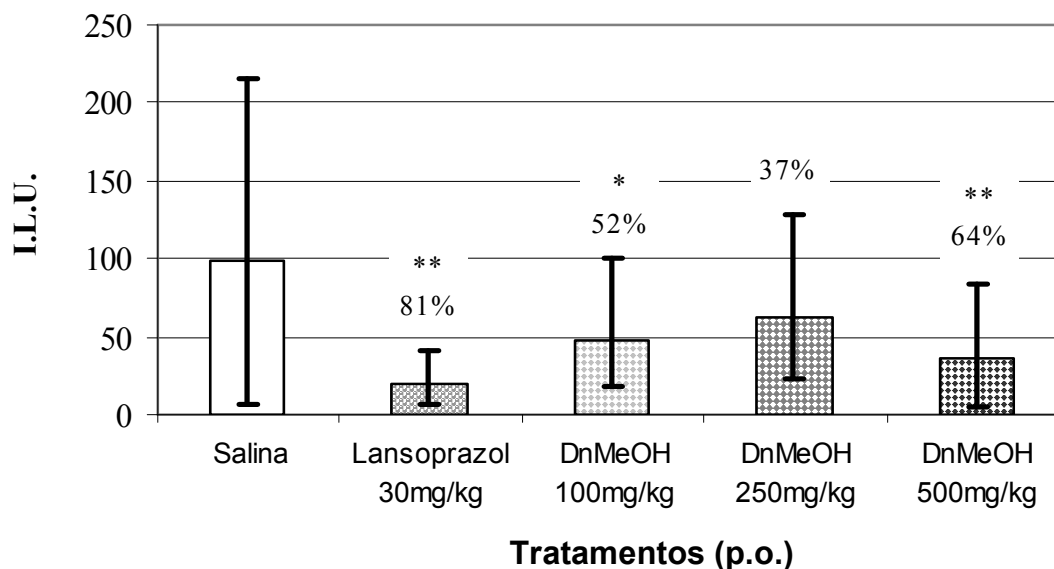
Tratamentos (p.o.)	N	Fígado	Coração	Pulmão	Rins	Baço	Mortalidade
Salina	06	13,23 ± 0,23	4,11 ± 0,14	4,95 ± 0,39	6,32 ± 0,18	3,7 ± 0,19	0
DnMeOH 5g/kg	07	12,87 ± 0,23	4,19 ± 0,23	4,44 ± 0,08	6,50 ± 0,12	3,44 ± 0,18	0

Dados da razão dos órgãos e peso corpóreo expressos em média (arcoseno) ± erro padrão da média.

B. Modelo de indução de úlcera por HCl/etanol.

As doses de 100 e 500 mg/kg de DnMeOH apresentaram ação efetiva na redução das lesões gástricas quando comparadas aos animais tratados com salina, assim como o controle positivo (lansoprazol). Porém, não foi possível observar o mesmo efeito com a dose intermediária de 250 mg/kg (figura 29).

Figura 29 – Ação do extrato metanólico de *D. nitida* (DnMeOH) em modelo de indução de úlcera por HCl/Etanol em camundongos

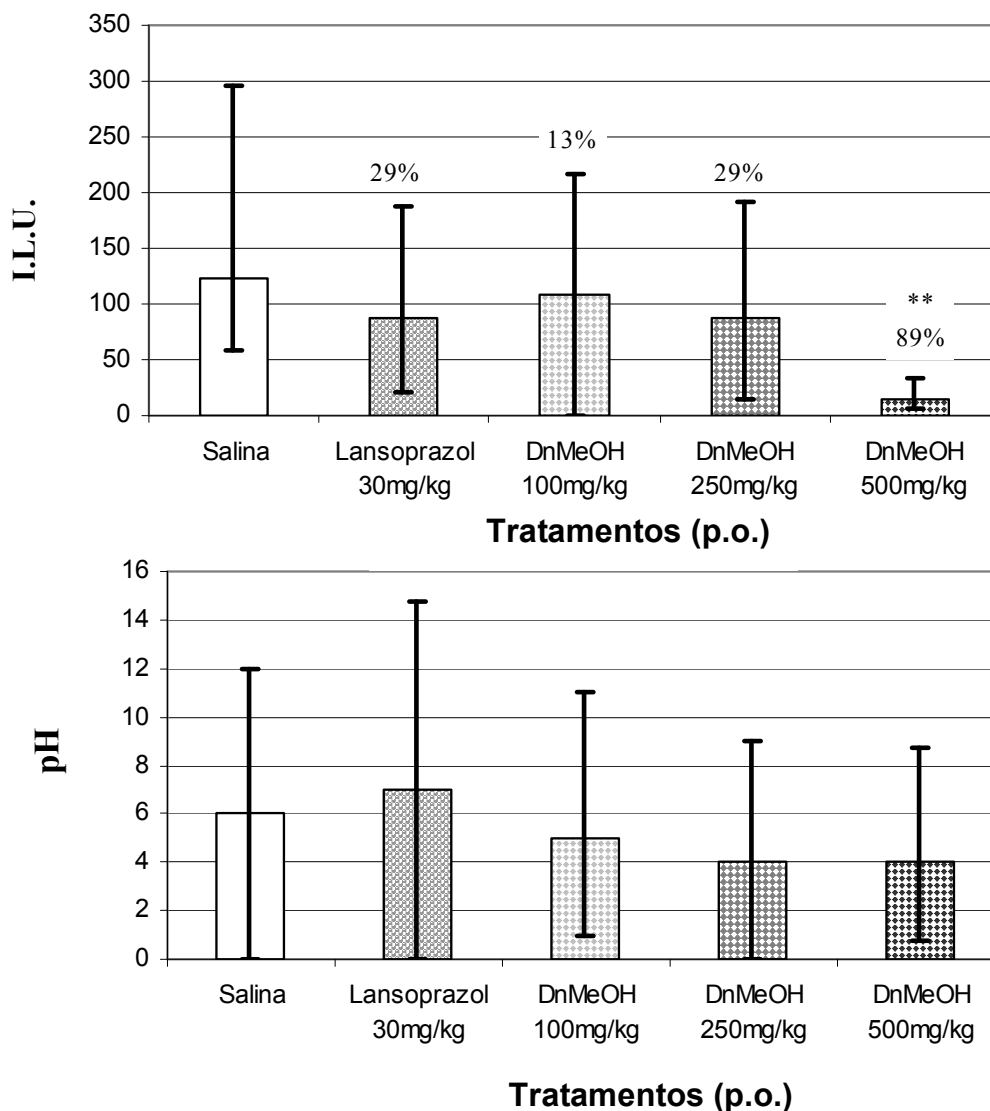


Medianas e intervalos Q_1 e Q_3 dos índices de lesões ulcerativas dos grupos experimentais (n=8 - 9). Os números de porcentagem indicam a proteção em relação à salina. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Kruskall, Dunn).

C. Modelo de indução de úlcera por Etanol absoluto.

DnMeOH apresentou ação efetiva na redução de lesão gástrica na maior dose (500 mg/kg), obtendo-se 89% de proteção em comparação aos grupos tratados como veículo (figura 30). O tratamento com lansoprazol também não apresentou efeito protetor esperado, mas sua atividade é comprovada pelo aumento do pH do suco gástrico.

Figura 30 - Efeito do extrato metanólico *D. nitida* no modelo de indução de úlcera por etanol absoluto em ratos

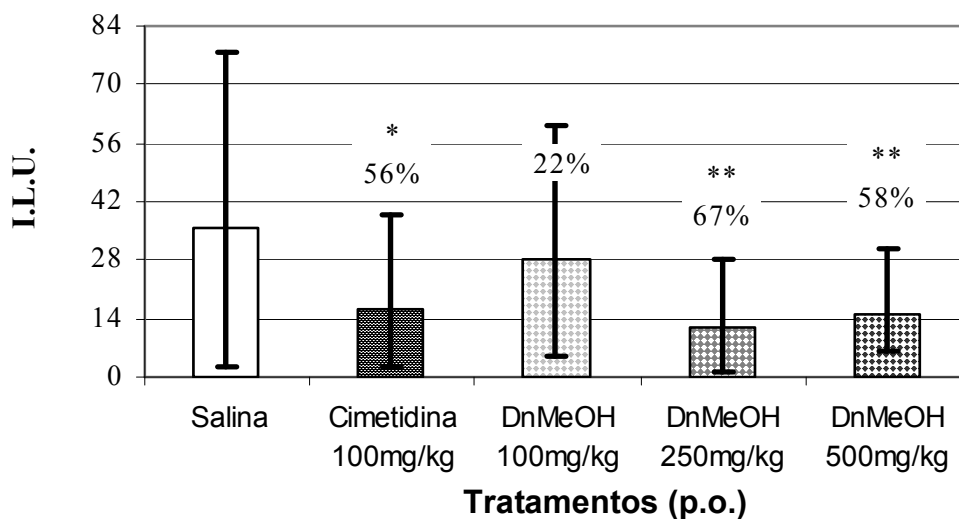


Medianas e intervalos Q_1 e Q_3 dos índices de lesões ulcerativas e pH dos grupos experimentais (n=5 - 6). Os números de porcentagem indicam a proteção em relação a salina. ** $p < 0.01$ (Kruskall -Wallis, Dunn)

D. Modelo de indução de úlcera por droga antiinflamatória não esteroidal (Piroxicam)

É possível observar na figura 31 uma redução das lesões nos animais tratados com DnMeOH em relação aos animais tratados com o veículo. As doses que apresentaram efeito expressivo foram as de 250 (67%) e 500 mg/kg (58%).

Figura 31 - Efeito do extrato metanólico de *D. nitida* (DnMeOH) em modelo de indução de úlcera por Piroxicam

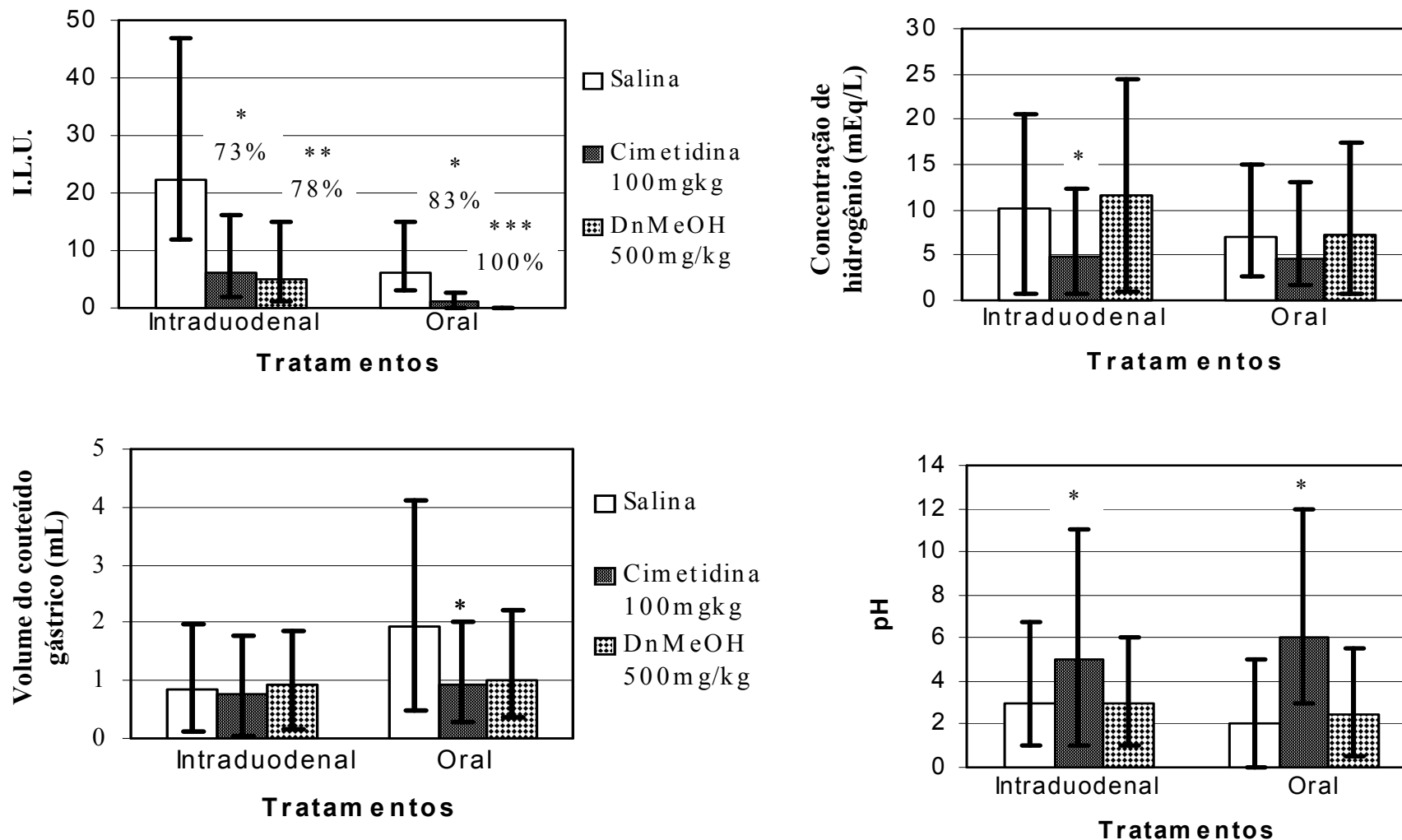


Medianas e intervalos Q1 e Q3 dos índices de lesões ulcerativas dos grupos experimentais (n=7). Os números de porcentagem indicam a proteção em relação à salina. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Kruskall -Wallis, Dunn)

E. Úlceras induzidas pela ligadura de piloro e avaliação dos parâmetros do suco gástrico

A administração oral de DnMeOH (500 mg/kg), mostrou-se significativa na redução das lesões gástrica induzidas neste modelo promovendo 100% de proteção em relação ao grupo tratado com salina. Porém, não houve alterações nos demais parâmetros analisados. Obteve-se, também, proteção efetiva de 78% com a administração intraduodenal de DnMeOH, mas nenhum dos parâmetros do suco gástrico analisados também apresentou distinção significativa ($p > 0.05$) em relação ao grupo salina (figura 32).

Figura 32 - Efeito da administração oral ou intraduodenal do extrato metanólico de *D.nitida* (DnMeOH) no modelo de ligadura de piloro em camundongos

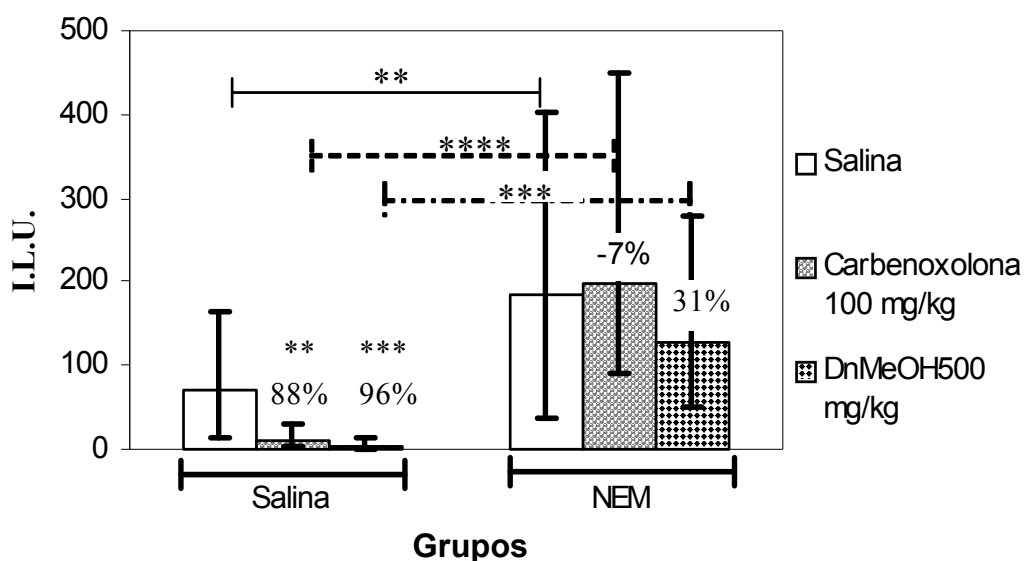


Medianas e intervalo Q1 e Q3 dos índices de lesões ulcerativas, concentração de hidrogênio, volume de suco gástrico e pH dos grupos experimentais (n=6-10). * p < 0.05, ** p < 0.01 e ***p < 0.005 (Kruskall -Wallis, Dunn).

F. Determinação do papel dos grupamentos sulfidrílicos na citoproteção

A dose de 500mg/kg de DnMeOH mostrou-se efetiva na gastroproteção em 96% frente ao pré-tratamento com salina; porém, não foi capaz de promover o mesmo resultado frente ao pré-tratamento com o inibidor dos grupamentos sulfidrílicos (NEM), com redução da taxa de proteção de 31% (figura 33).

Figura 33 - Efeito do extrato metanólico de *D. nitida* (DnMeOH) frente ao depletor de sulfidril endógena (NEM) em modelo de úlcera por Etanol

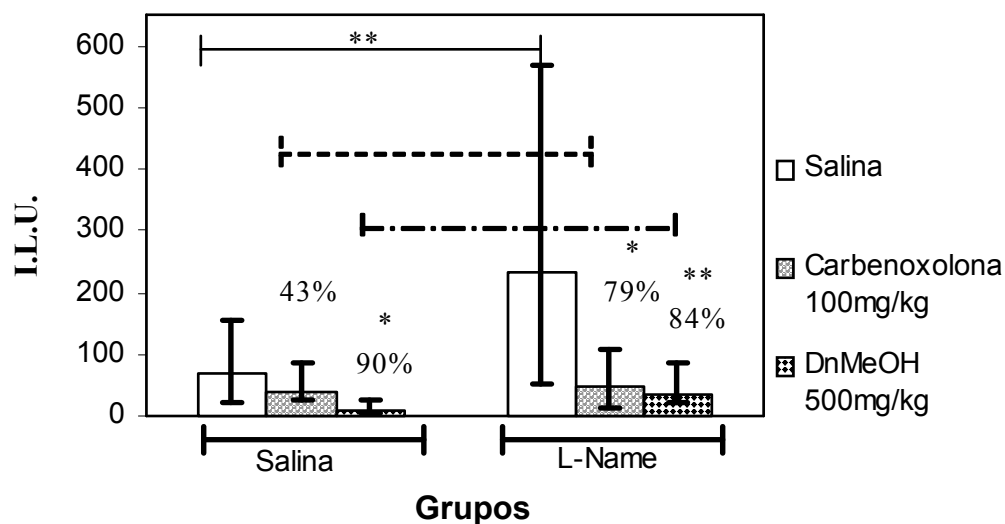


Medianas e intervalos Q1 e Q3 dos índices de lesões ulcerativas dos grupos experimentais (n=7-10) com as respectivas porcentagens de proteção, **p < 0.01 e ***p < 0.005 (Kruskall -Wallis, Dunn). As barras transversais comparam as diferenças entre os pré-tratamentos com salina e NEM **p < 0.01, ***p < 0.005 e ****p < 0.001 (Mann-Whitney).

G. Determinação do papel do Óxido Nítrico (NO) na citoproteção

O pré-tratamento com L-NAME nos animais tratados com DnMeOH por via oral não promoveu diferença de resultado em relação aos animais pré-tratados com salina; ambos exerceram proteções expressivas de 84 e 90% para os respectivos pré-tratamentos. O pré-tratamento com L-NAME mostrou-se ativo no aumento das lesões induzidas pelo etanol nos animais tratados com salina pela via oral (figura 34).

Figura 34 - Efeito do extrato metanólico de *D. nitida* (DnMeOH) frente ao inibidor de NO endógeno (L-NAME) em modelo de úlcera por Etanol

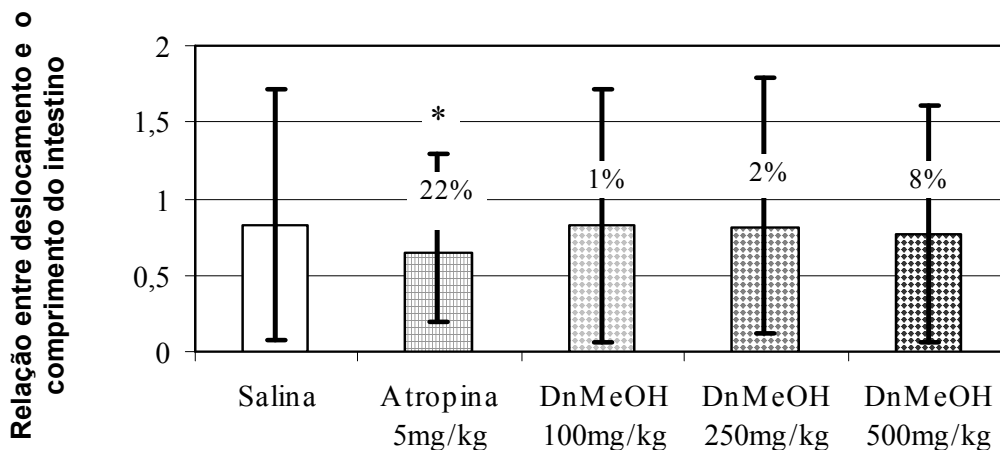


Medianas e intervalos Q1 e Q3 dos índices de lesões ulcerativas dos grupos experimentais (n=6-7) com as respectivas porcentagens de proteção, *p < 0.05 e ** p < 0.01 (Kruskall -Wallis, Dunn). As barras transversais comparam as diferenças entre os pré-tratamentos com salina e L-Name, **p < 0.01 (Mann-Withney).

H. Determinação da motilidade intestinal

Neste experimento nenhuma das doses de DnMeOH apresentou efeito sobre a motilidade intestinal. Somente a atropina mostrou-se efetiva na redução do trânsito intestinal (figura 35).

Figura 35 – Efeito do extrato metanólico de *D.nitida* (DnMeOH) sobre a motilidade intestinal



Tratamentos (p.o.)

Medianas e intervalos Q_1 e Q_3 da razão entre distância percorrida e tamanho total do intestino dos grupos experimentais (n=7). * $p < 0.05$ (Kruskall -Wallis, Dunn).

I - Avaliação das atividades cicatrizante e tóxica de DnMeOH

Após os 14 dias de tratamentos, o grupo tratado com DnMeOH 250mg/kg não sofreu a diminuição do tamanho das lesões de forma significativa em relação ao grupo que recebeu salina (tabela 7).

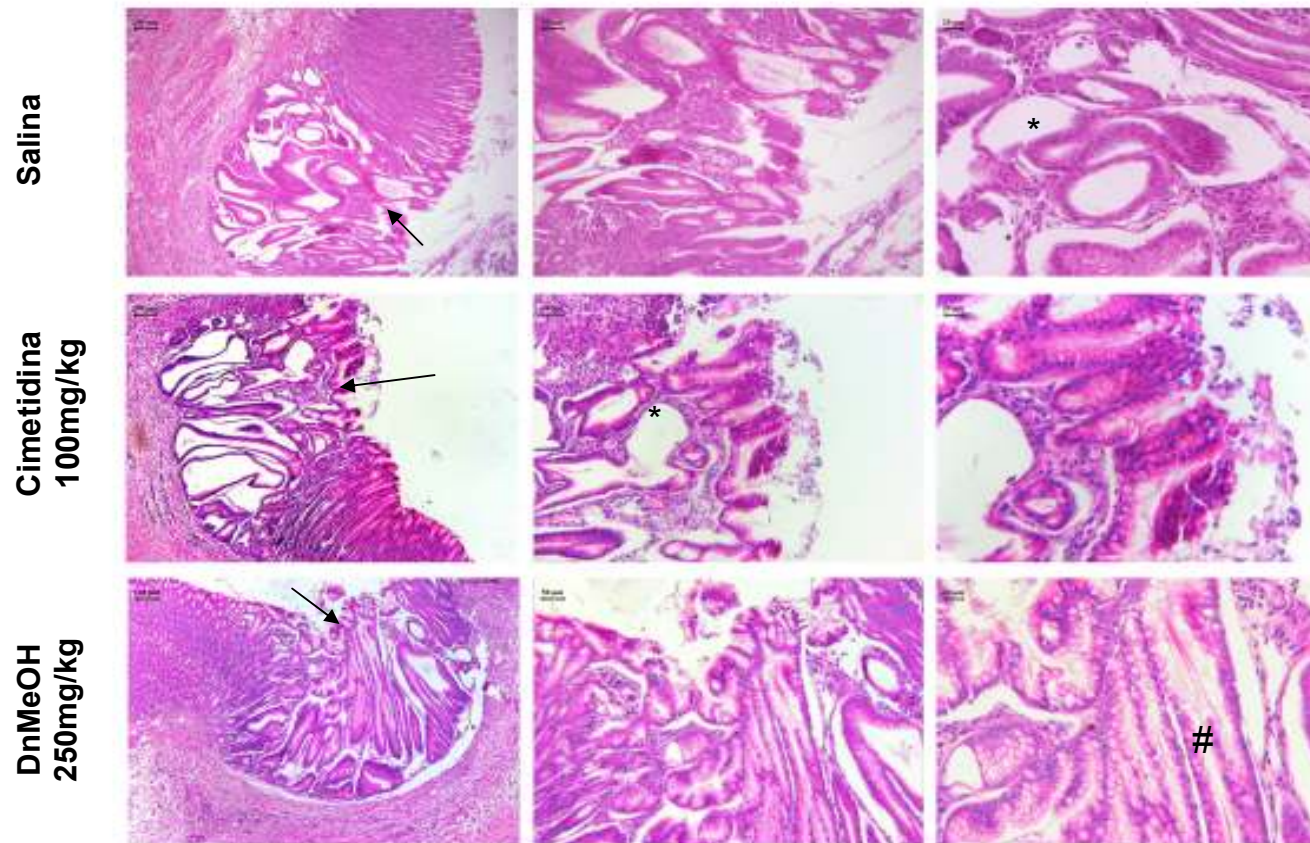
Tabela 7 - Efeito do extrato metanólico de *D.nitida* (DnMeOH) sobre o processo de cicatrização em lesões causadas por ácido acético

Tratamentos	Doses	N	Borda interna	% de cicatrização	Borda externa	% de cicatrização
Salina	10mL/kg	08	0,35 ± 0,05	--	1,84 ± 0,15	--
Cimetidina	100	08	0,31 ± 0,03	11	1,56 ± 0,20	15
DnMeOH	250	08	0,31 ± 0,04	11	1,66 ± 0,26	10

Dados de média ± erro padrão da média das áreas de lesão (cm^2) dos diferentes tratamentos. $p > 0.05$, Anova, Dunnet.

Na análise de H&E, nota-se uma organização das glândulas gástricas no sentido da luz estomacal, formação esta distinta dos animais tratados com salina que apresentam-se sem um padrão definido de forma (figura 36). Além disso, a partir das imagens de PAS (coloração específica de muco) observa-se um aumento de muco nas glândulas mucosas dos animais tratados com DnMeOH 250mg/kg (figura 37).

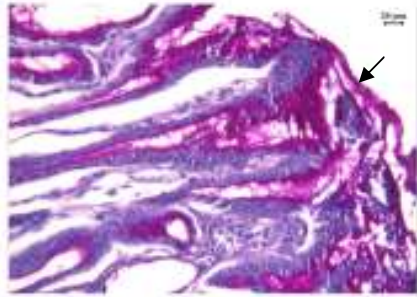
Figura 36 – Cortes histológicos de lesões estomacais produzidas por ácido acético corados com H&E do efeito de cicatrização do extrato metanólico de *Davilla nitida* (DnMeOH).



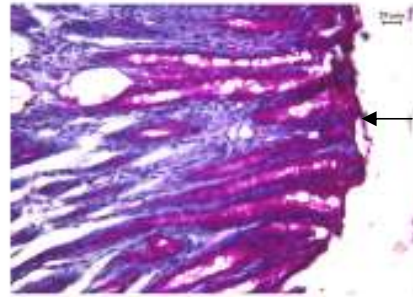
As setas indicam a mucosa em re-organização. Observar em # a organização linear das glândulas tubulosas, e * a organização pouco linear das mesmas glândulas.

Figura 37 – Efeito do extrato etanólico de *D. nitida* (DnMeOH) em lâminas histológicas coradas com PAS, durante 14 dias tratamento sobre produção de mucos em experimento lesão gástrica induzida por ácido acético.

Salina



**Cimetidina
100mg/kg**



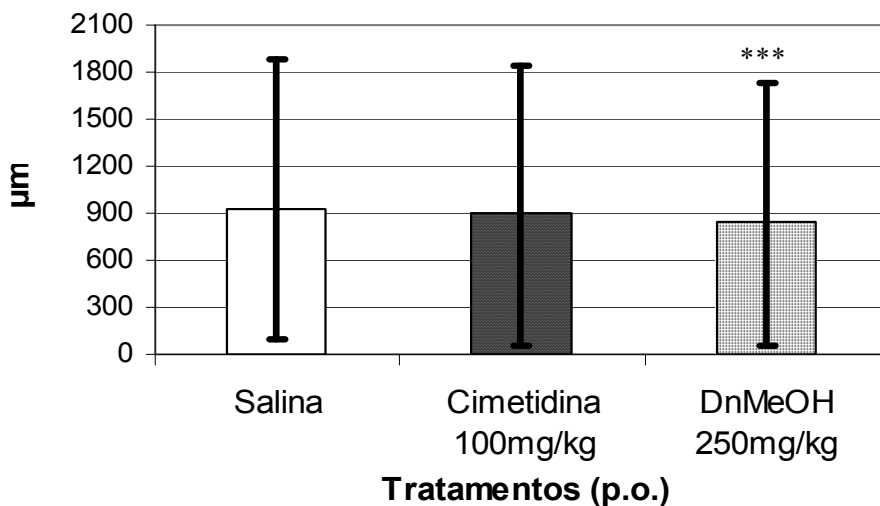
**DnMeOH
250mg/kg**



Notar intenso revestimento por muco nas células das glândulas tubulosas no grupo *Davilla nitida* (DnMeOH). As seta indicam a presença glândulas contendo muco.

A análise morfométrica feita neste experimento, demonstrou que a altura da região de regeneração das lesões dos animais tratados com DnMeOH, diminuiu em relação ao controle negativo de forma significativa (figura 38).

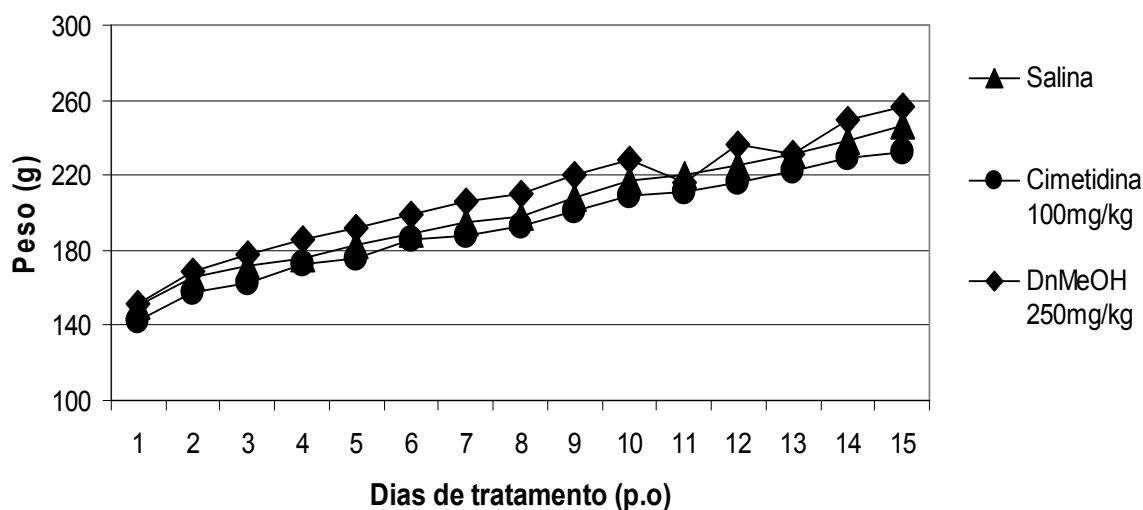
Figura 38 – Efeito do extrato metanólico de *D. nitida* (DnMeOH) sobre parâmetro morfométrico (altura) da região de regeneração em lesões gástricas causadas por ácido acético em ratos



Medianas e intervalos Q₁ e Q₃ da altura da região de regeneração dos diferentes tratamentos (n= 6-8). *** p < 0.005 (Kruskall -Wallis, Dunn).

Os estudos de toxicidade subagudos realizados com o extrato DnMeOH 250mg/kg foram avaliados a partir do monitoramento diário do peso corporal (figura 39), da relação peso órgão/corpo (tabela 8) e da análise dos parâmetros séricos (tabela 9), porém nenhum desses parâmetros sofreu alteração após os 14 dias de tratamentos com o extrato.

Figura 39- Evolução do peso corporal de ratos frente ao tratamento *D. nitida* (DnMeOH) durante 14 dias em experimento de indução de úlcera por ácido acético



Médias dos pesos diários dos grupos experimentais (n=8). $p > 0.05$ (Anova, Dunnet).

Tabela 8- Efeito da administração subaguda do extrato metanólico de *D. nitida* (DnMeOH) sobre os órgãos vitais em ratos submetidos ao modelo de indução lesões gástricas por ácido acético

Tratamentos (p.o)	N	Fígado	Coração	Pulmões	Rins	Baço	Mortalidade
Salina	08	9,30 ± 0,06	3,65 ± 0,07	4,10 ± 0,07	4,79 ± 0,05	3,08 ± 0,08	0
Cimetidina 100mg/kg	08	9,47 ± 0,10	3,60 ± 0,05	4,08 ± 0,08	4,75 ± 0,03	2,73 ± 0,08	0
DnMeOH 250mg/kg	08	9,02 ± 0,14	3,57 ± 0,05	4,05 ± 0,05	4,67 ± 0,04	2,93 ± 0,06	0

Dados da razão dos órgãos e peso corpóreo expressos em média (arcoseno) ± erro padrão da média.

Tabela 9- Efeito da administração subaguda do extrato metanólico de *D.nitida* (DnMeOH) sobre parâmetros bioquímicos de toxicidade em modelo de indução de úlcera por ácido acético

Tratamentos (p.o.)	AST U/L	ALT U/L	γ-GT U/L	Creatinina mg/dL	Uréia mg/dL
Salina	320 (300-343)	64,4 (62,3-68,1)	18,1 (13,1-18,1)	0,8 (0,7-0,8)	30 (26-33)
Cimetidina 100mg/kg	328 (310-331)	73,9 (68,1-75,4)	14,3 (13,1-16,2)	0,9 (0,8-0,9)	32 (30-33)
DnMeOH 250mg/kg	284 (268-296)	71,2 (59,7-81,7)	13,7 (12,5-13,7)	0,8 (0,7-0,9)	26 (25-29)

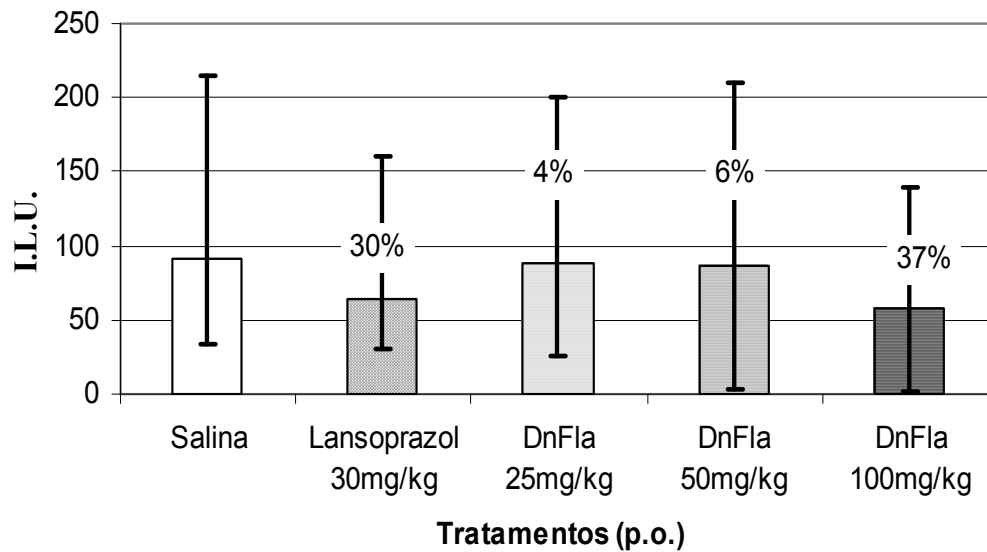
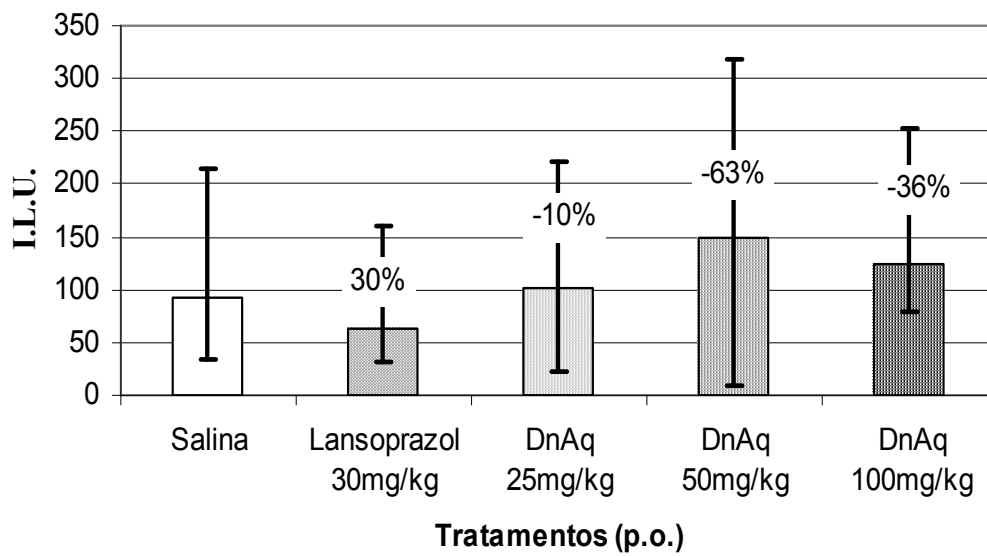
Medianas e intervalos Q₁ e Q₃ dos parâmetros bioquímicos obtidos dos diferentes grupos experimentais (n=8) após 14 dias de tratamento diário. p > 0.05 (Kruskall -Wallis, Dunn).

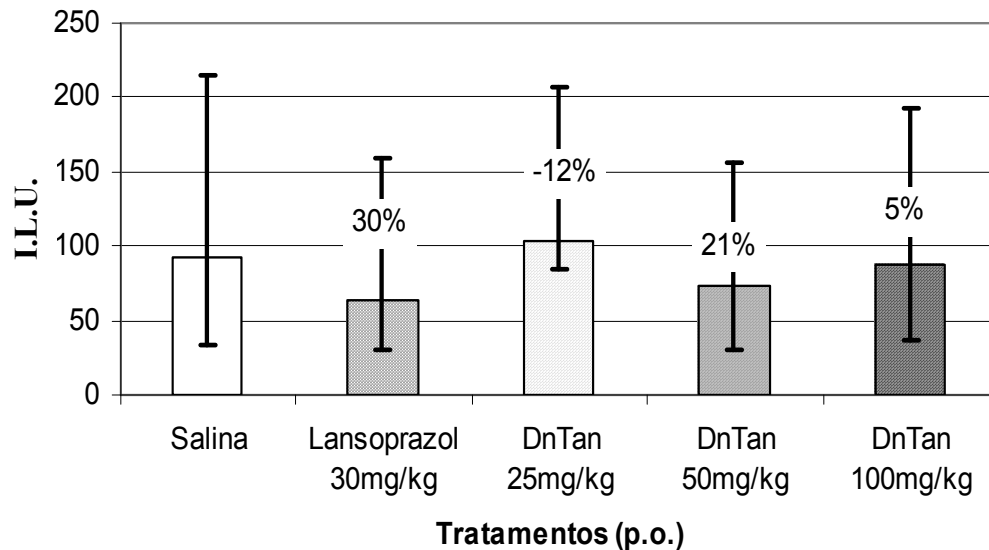
IV.2.2. Atividade farmacológica das frações enriquecidas de *Davilla nitida*

A - Indução de úlcera por Etanol absoluto (Morimoto *et al.*, 1991)

Frente a administração de etanol, as frações aquosa, de flavonoides e taninos de *D. nitida* não apresentaram atividade gastroprotetora efetiva. Observa-se uma tendência de diminuição das lesões com o aumento de dose da fração flavonoídica DnFla (figura 40).

Figura 40- Efeito das frações aquosa (DnAq), de flavonoides (DnFla) e taninos (DnTan) de *D. nitida* em úlceras induzidas por etanol absoluto





Medianas e intervalo Q_1 e Q_3 dos índices de lesões ulcerativas dos grupos experimentais (n=5 -21). Os números de porcentagem indicam a proteção em relação à salina. $p > 0.05$ (Kruskall -Wallis, Dunn).

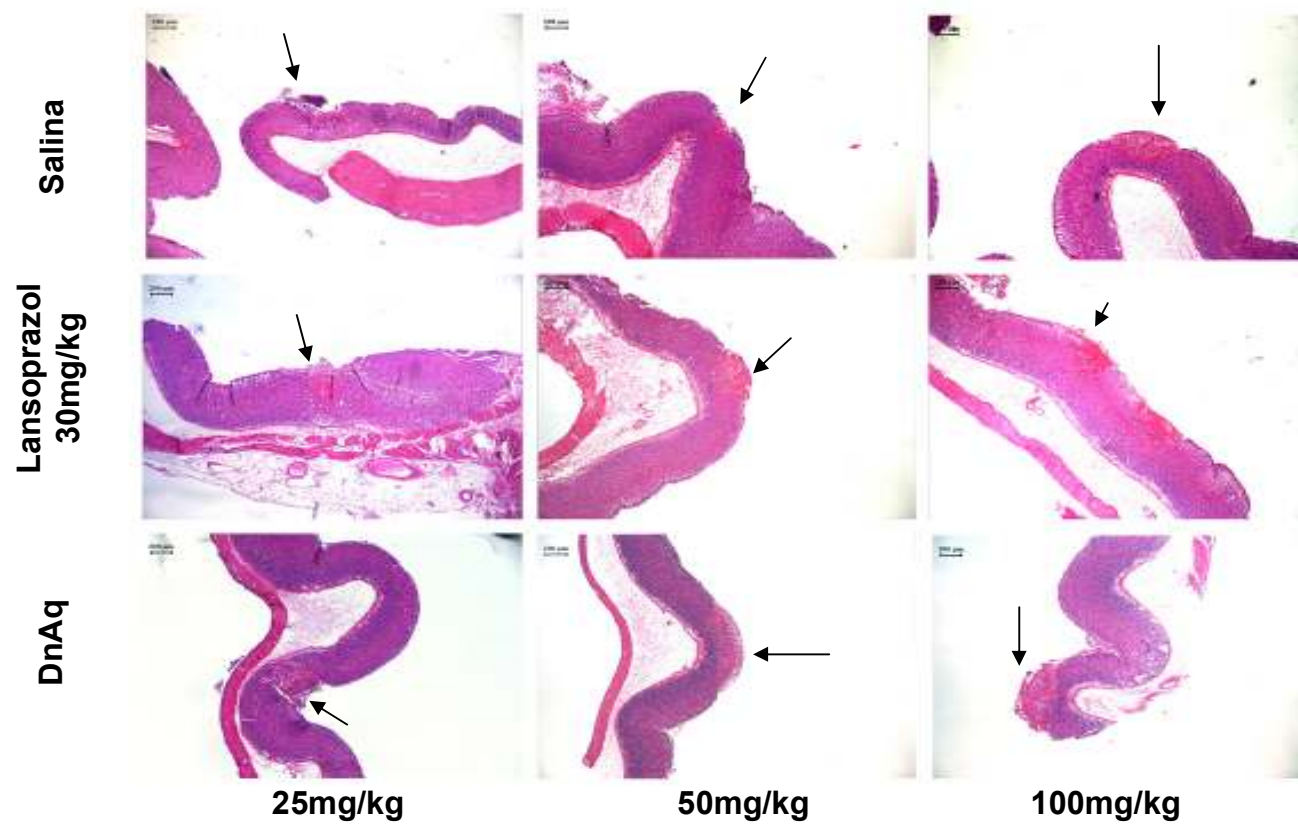
As lâminas da mucosa gástrica coradas com H&E apresentam grandes lesões hemorrágicas promovidas pela administração de etanol e instalação de lesões acompanhadas de edema em todas as frações. Existe uma tendência de diminuição das lesões, porém não tão evidenciada ao se percorrer toda a lâmina (figura 41). A presença de muco é evidenciada nas lâminas coradas com PAS, principalmente os animais tratados com DnTan (figura 42).

A quantificação manual das células marcadas com HSP 70, demonstram um aumento significativo de sua expressão em doses baixas, principalmente nos estômagos dos ratos tratados com DnAq e DnFla (figura 43).

Nas lâminas expostas ao anticorpo de COX 2, através da contagem de células, não foi comprovado aumento da expressão dessa enzima com nenhuma das frações de *D. nitida* (figura 44).

A atividade da enzima SOD não foi evidenciada pela administração das frações, como pode ser observado na figura 45, pois não ocorreu modificação expressiva de sua ação pela administração dos tratamentos.

Figura 41- Cortes histológicos de estômagos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol tratado com frações em diferentes concentrações de *Davilla nitida* corados com H&E. As setas indicam pontos hemorrágicos.



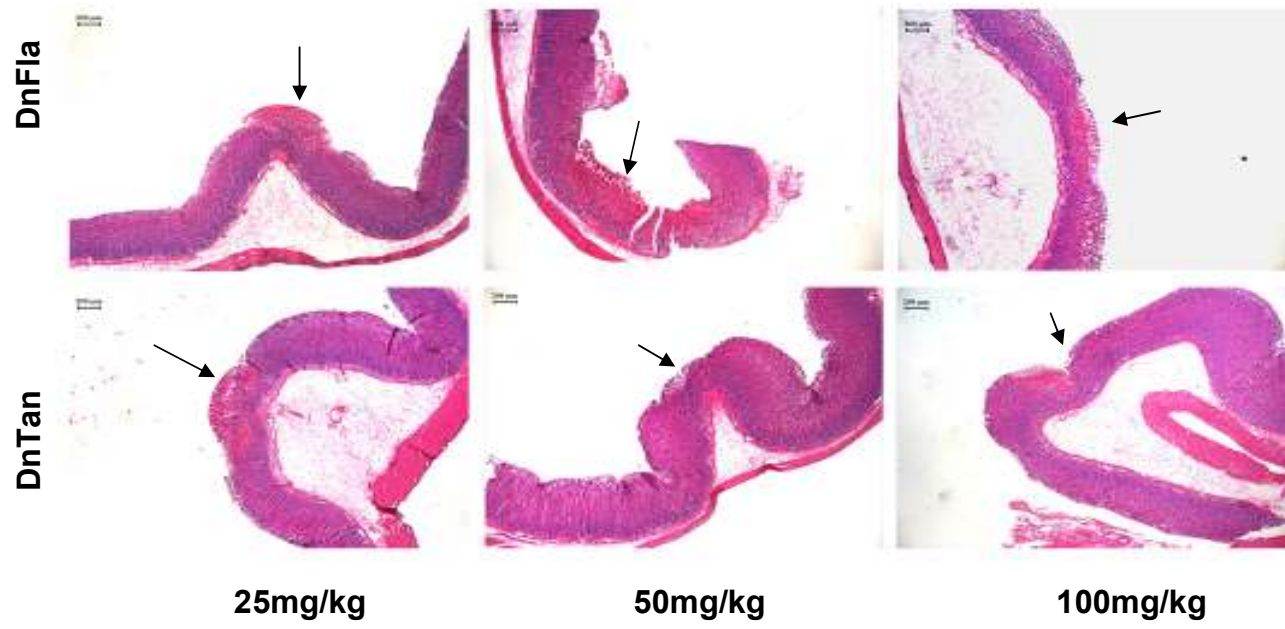
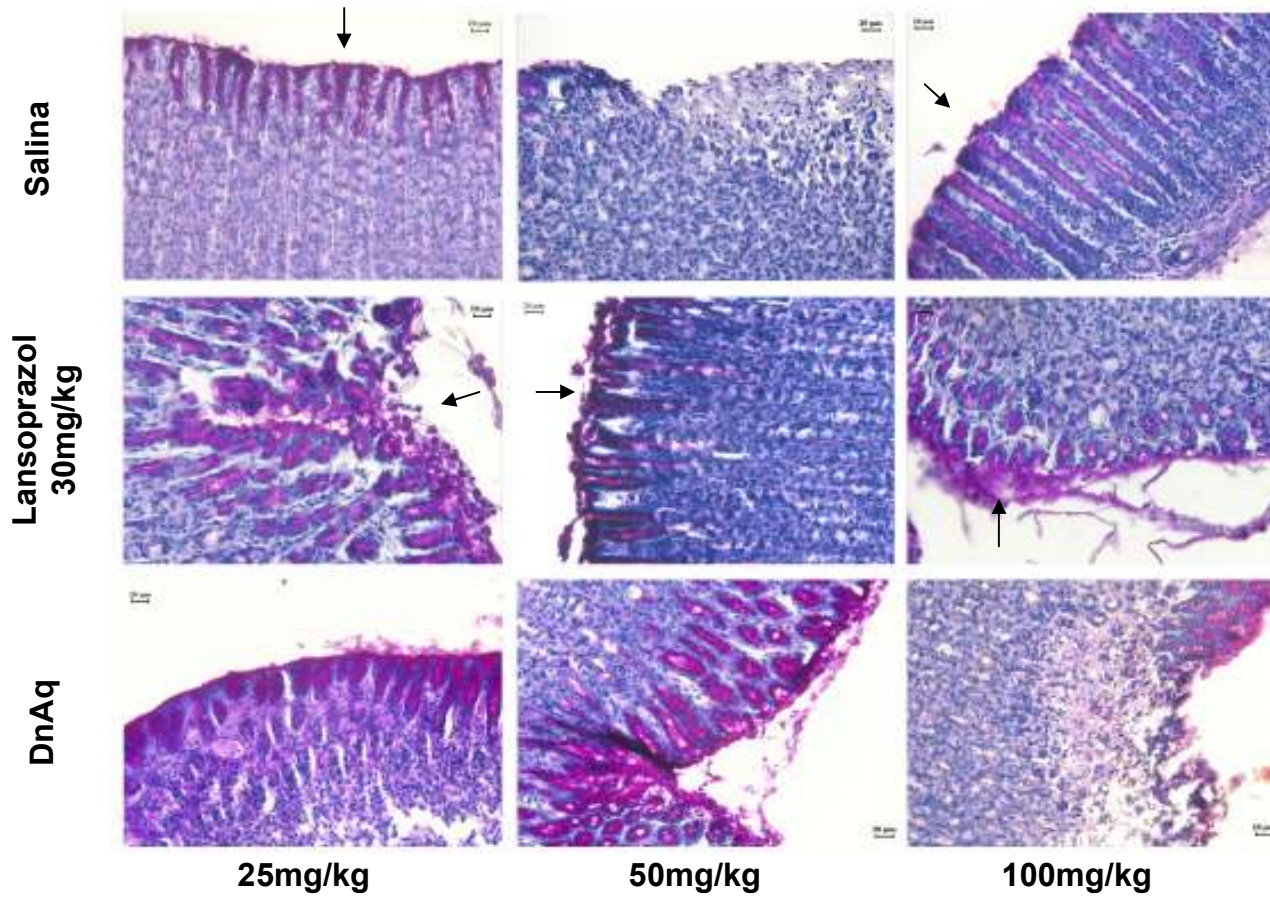


Figura 42 - Cortes histológicos de estômagos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol tratado com frações em diferentes concentrações de *Davilla nitida* corado com PAS. As setas indicam secreção de muco.



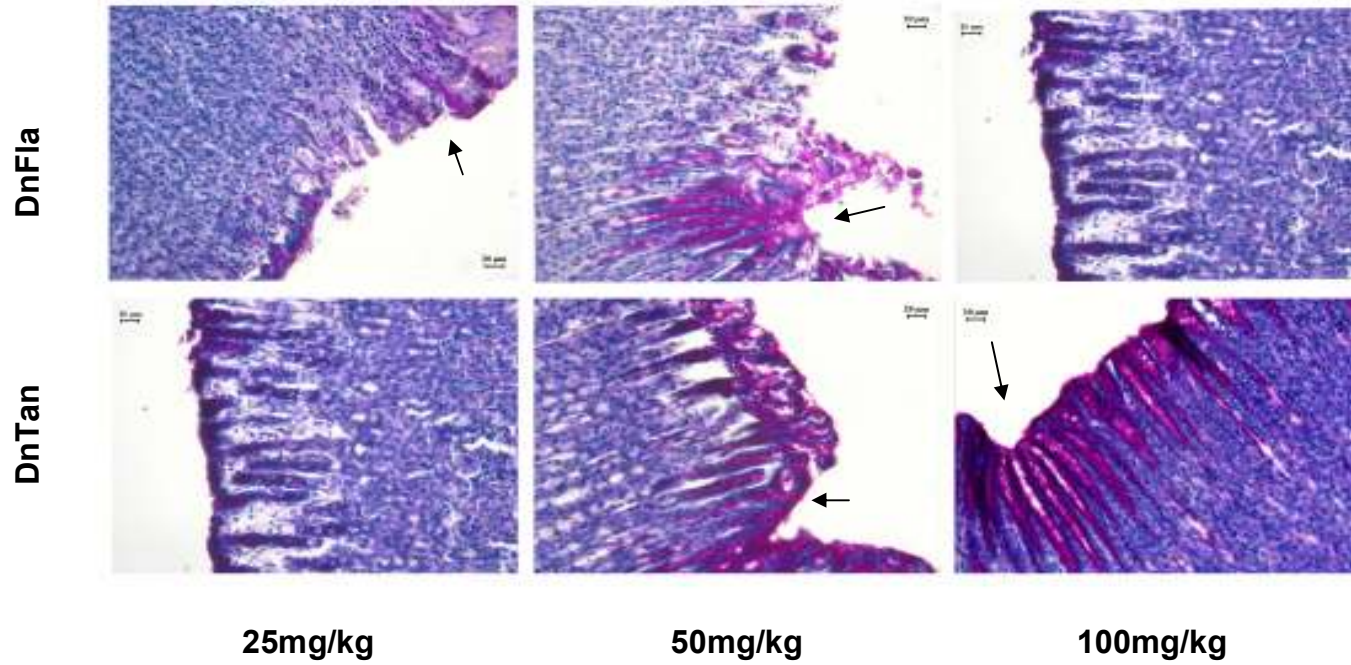
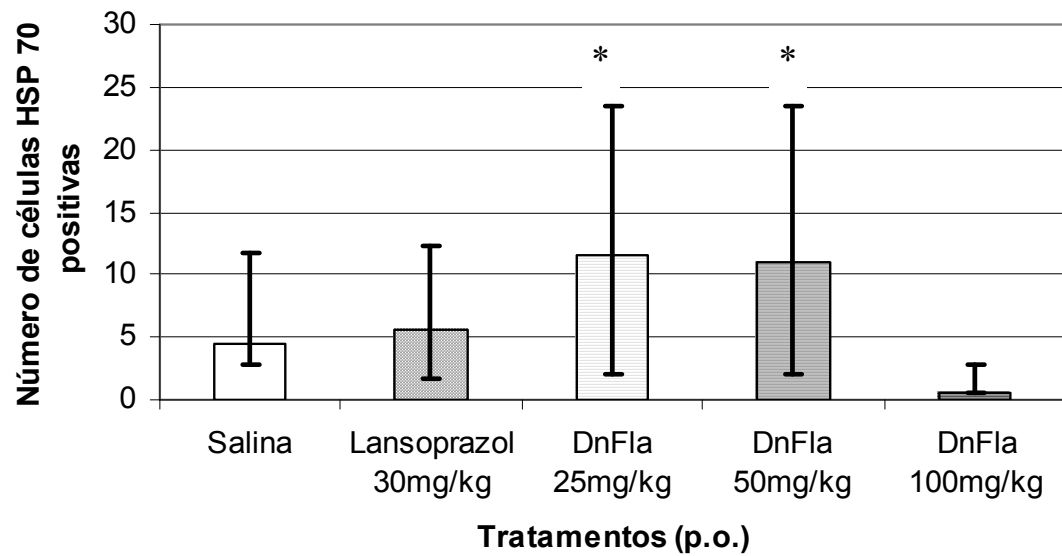
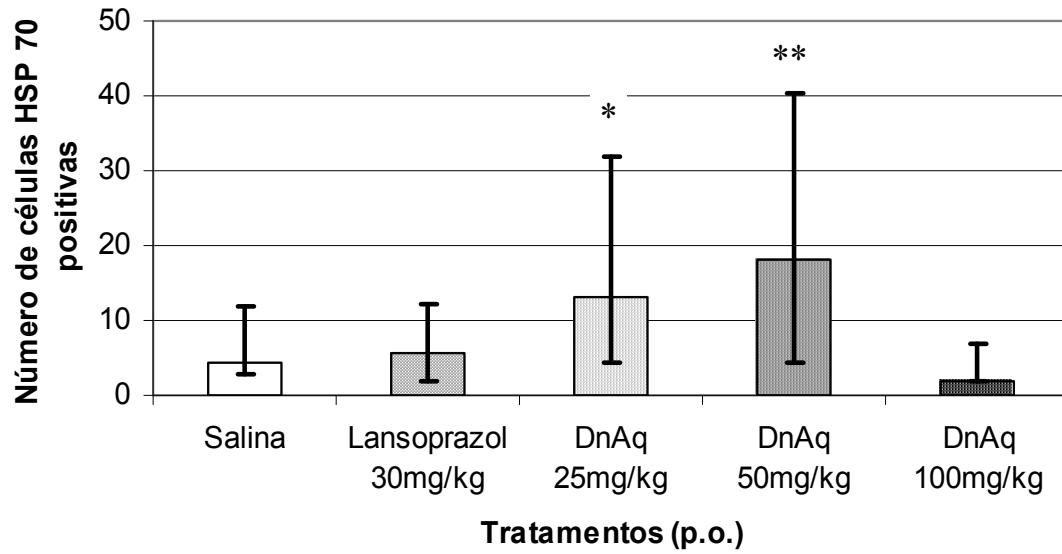
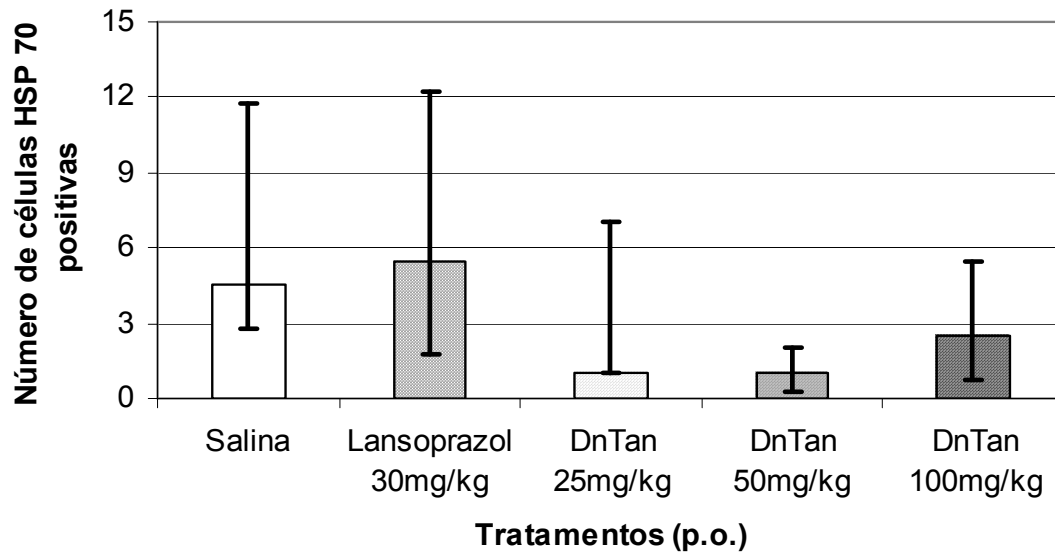


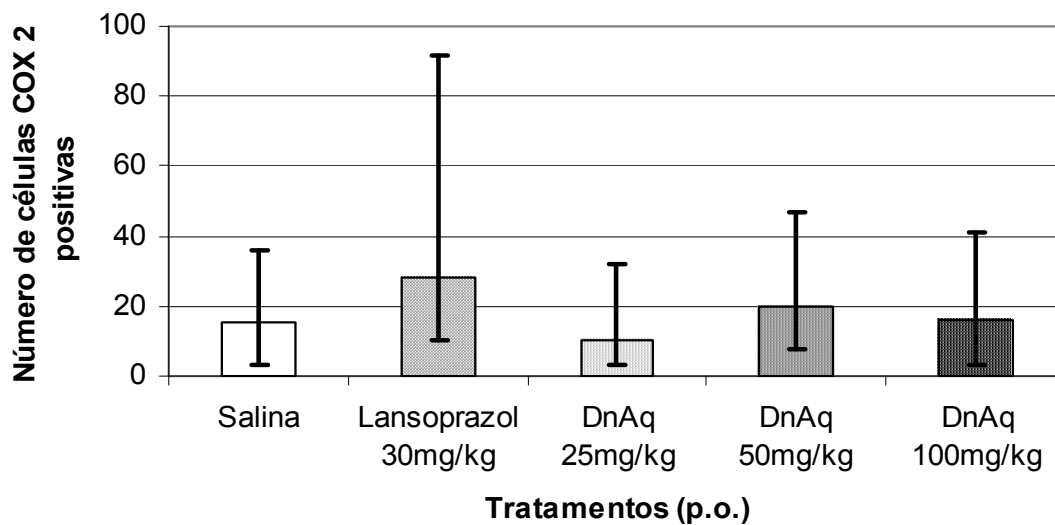
Figura 43- Efeito das frações aquosa (DnAq), de flavonoides (DnFla) e taninos (DnTan) de *D. nitida* sobre a expressão de HSP 70 em modelo de indução de úlceras por etanol absoluto

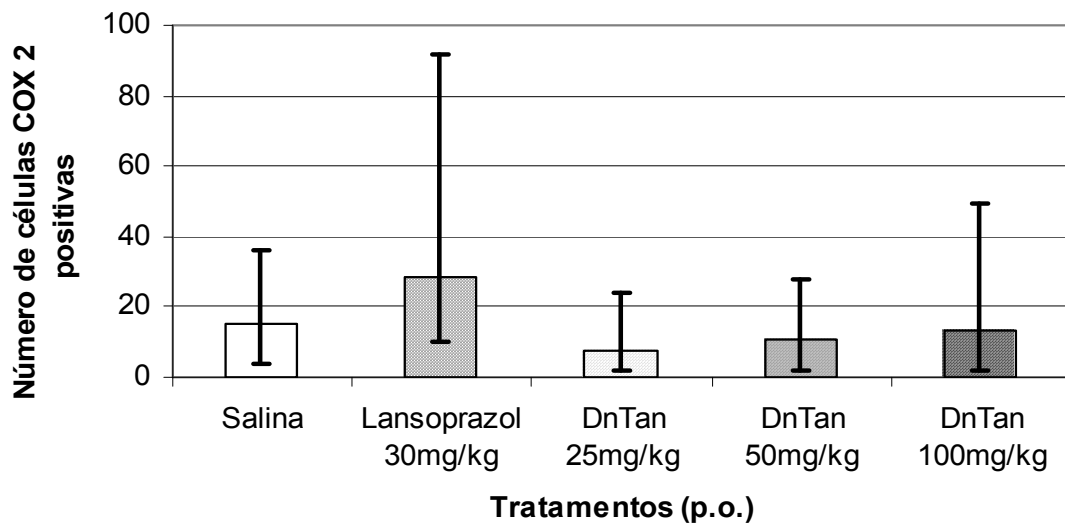
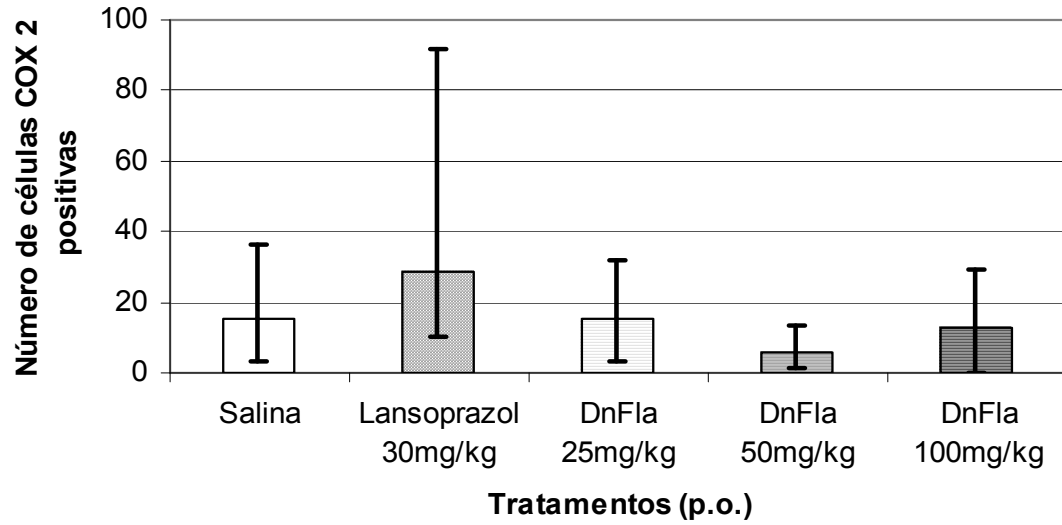




Medianas e intervalo Q_1 e Q_3 do número de células marcadas com o anticorpo de HSP 70 nos diferentes grupos (n=5 -21). * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ (Kruskall -Wallis, Dunn).

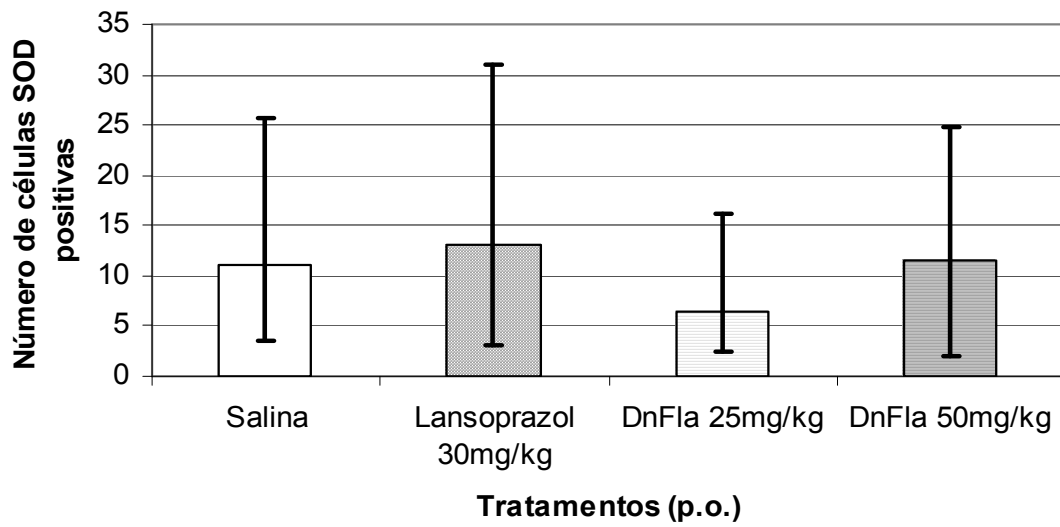
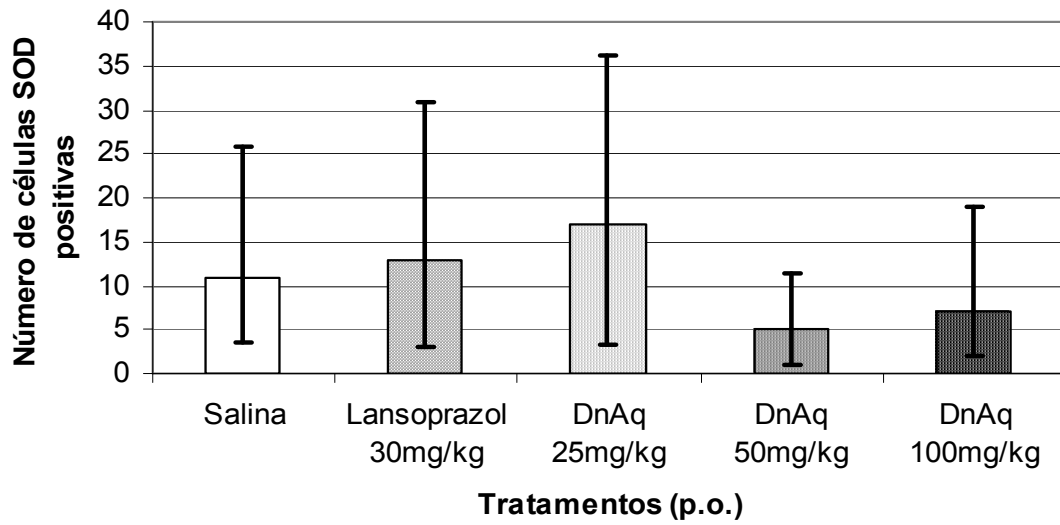
Figura 44- Efeito das frações aquosa (DnAq), de flavonoides (DnFla) e taninos (DnTan) de *D. nitida* sobre a expressão de COX 2 em modelo de indução de úlceras por etanol absoluto

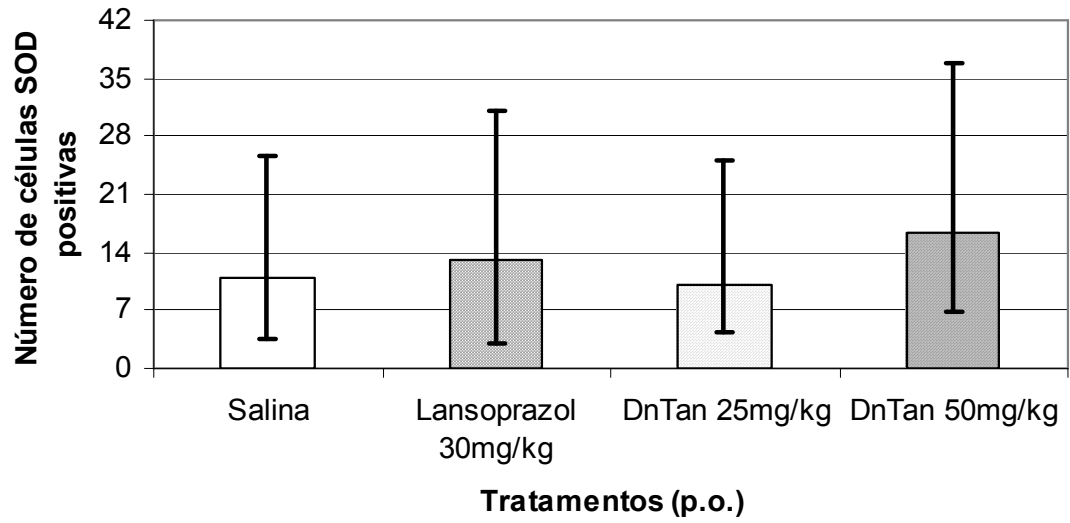




Medianas e intervalo Q_1 e Q_3 do número de células marcadas com o anticorpo de COX 2 nos diferentes grupos (n=5 -21). $p > 0.05$ (Kruskall -Wallis, Dunn).

Figura 45- Efeito das frações aquosa (DnAq), de flavonoides (DnFla) e taninos (DnTan) de *D. nitida* sobre SOD em modelo de indução de úlceras por etanol





Medianas e intervalo Q_1 e Q_3 do número de células marcadas com o anticorpo de SOD nos diferentes grupos (n=5 -21). $p > 0.05$ (Kruskall -Wallis, Dunn).

IV.3. Resumo dos resultados

A tabela (10) a seguir contém todos os resultados, de maneira sucinta, dos extratos e frações de *Davilla elíptica* e *Davilla nitida*.

Tabela 10- Resumo das atividades farmacológicas dos extratos e frações de *Davilla elliptica* e *Davilla nitida*

Experimentos com os Extratos		<i>Davilla elliptica</i>		<i>Davilla nitida</i>	
Atividade Farmacológica	Modelo Experimental	Comprovação da Atividade Farmacológica	Doses Efetivas mg/kg	Comprovação da Atividade Farmacológica	Doses Efetiva mg/kg
Toxicidade aguda e subaguda	Toxicidade aguda e Screening hipocrático	Negativo	--	Negativo	--
	Lesões gástricas induzidas por Ac. Acético (14 dias)	Negativo	--	Negativo	--
Gastroproteção em modelos agudos de indução de lesões gástricas	Lesões gástricas induzidas por HCl/Etanol	65% (proteção)	500	52% e 64% (proteção)	100 e 500 (respectivamente)
	Lesões gástricas induzidas por Etanol absoluto	96%	500	89%	500
	Lesões gástricas induzidas por DAINE	74%	500	67% e 58%	250 e 500
	Lesões gástricas induzidas por estresse (contenção e frio)	83% e 75%	250 e 500 (respectivamente)	--	--
	Lesões gástricas induzidas pela ligadura do piloro (oral)	Negativo	--	100%	500 (dose única)
	Lesões gástricas induzidas pela ligadura do piloro (intraduodenal)	73%	500 (dose única)	78%	500 (dose única)
Alterações dos parâmetros do suco gástrico	Lesões gástricas induzidas pela ligadura do piloro (oral)	Negativo	--	Negativo	--
	Lesões gástricas induzidas pela ligadura do piloro (intraduodenal)	Negativo	--	Negativo	--
Envolvimento da atividade dos extratos com os compostos sulfidrílicos endógenos	Lesões gástricas induzidas por Etanol absoluto na presença de NEM	Positivo	500 (dose única)	Positivo	500 (dose única)

Experimentos com os Extratos		<i>Davilla elliptica</i>		<i>Davilla nitida</i>	
Envolvimento da atividade dos extratos com o NO	Lesões gástricas induzidas por Etanol absoluto na presença de L-Name	Negativo	--	Negativo	--
Atividade sobre o trânsito intestinal	Motilidade intestinal	Negativo	--	Negativo	--
Atividade cicatrizante	Lesões gástricas induzidas por Ac. Acético (14 dias)	Positivo	250 (dose única)	Negativo	--
Atividade sobre a proliferação celular	Anticorpo NCL-PCNA em lâminas histológicas do experimento de lesões gástricas induzidas por Ac. Acético (14 dias)	Negativo	--	--	--
Atividade sobre a altura do epitélio de regeneração	Técnica morfométrica em lâminas coradas com H&E do experimento de lesões gástricas induzidas por Ac. Acético (14 dias)	Redução	250 (dose única)	Redução	250 (dose única)
Atividade sobre a produção de muco	Lâminas histológicas coradas com PAS do experimento de lesões gástricas induzidas por Ac. Acético (14 dias)	Não houve aumento significativo	250 (dose única)	Aumento expressivo	250 (dose única)
Atividade sobre as glândulas mucosas da região de regeneração	Lâminas histológicas coradas com H&E do experimento de lesões gástricas induzidas por Ac. Acético (14 dias)	Estruturação linear das glândulas	250 (dose única)	Estruturação linear das glândulas	250 (dose única)

Experimentos com as frações		<i>Davilla elliptica</i>		<i>Davilla nitida</i>	
Atividade Farmacológica	Modelo Experimental	Comprovação da Atividade Farmacológica	Doses Efetivas mg/kg	Comprovação da Atividade Farmacológica	Doses Efetiva
Gastroproteção em modelos agudos de indução de lesões gástricas	Lesões gástricas induzidas por Etanol absoluto	79% (DeAq) e 71% (DeTan)	100	Negativo	--
	Lesões gástricas induzidas pela ligadura do piloro (intraduodenal)	Negativo	--	--	--
Atividade sobre a expressão de HSP 70	Lâminas histológicas do experimento de lesões gástricas induzidas por Etanol absoluto, marcadas com o anticorpo SC1060	Negativo	--	Negativo	--
Atividade sobre a expressão de COX 2	Lâminas histológicas do experimento de lesões gástricas induzidas por Etanol absoluto, marcadas com o anticorpo 160106	Positivo (DeAq)	50	Negativo	--
Atividade sobre a expressão de SOD	Lâminas histológicas do experimento de lesões gástricas induzidas por Etanol absoluto, marcadas com o anticorpo SC 8637	Negativo	--	Negativo	--
Envolvimento da atividade das frações com o NO	Lesões gástricas induzidas por Etanol absoluto na presença de L-Name	Positivo (DeTan)	100 (dose única)	--	--
Envolvimento da atividade das frações com os compostos sulfidrílicos endógenos	Lesões gástricas induzidas por Etanol absoluto na presença de NEM	Negativo	--	--	--

Experimentos com as frações		<i>Davilla elliptica</i>		<i>Davilla nitida</i>	
Alterações dos parâmetros do suco gástrico	Lesões gástricas induzidas pela ligadura do piloro (intraduodenal)	Negativo	--	--	--
Atividade sobre a produção de prostaglandina E ₂	Determinação dos níveis basais de prostaglandina E ₂ na mucosa gástrica	Produção reduzida (porém não significativa)	100 (dose única)	--	--

V. DISCUSSÃO

Os extratos polares das folhas de *Davilla elliptica* e *D. nitida* estudados, não apresentaram efeito tóxico agudo aparente, com a administração de 5 g/kg. De acordo com Souza-Brito (1996) em experimentos de validação dos efeitos antiulcerogênicos com plantas medicinais, pressupõe-se que para a dose de 1g/kg do extrato bruto, exista uma correspondência de 10% de concentração de substâncias ativas como cimetidina (100 mg/kg), de 2% para similares ao omeprazol (20 mg/kg) e de 0.1% para aquelas semelhantes ao misoprostol (1mg/kg). A partir desses dados, pode-se concluir que em 5 g/kg haveria um aumento de 5 vezes da concentração desses compostos ativos presentes nos extratos, porém não se pode dizer, a partir dos dados deste trabalho, que eles não causem efeitos tóxicos em altas concentrações. Entretanto, se a concentração de compostos ativos mostra-se aumentada, a de compostos potencialmente tóxicos também aumenta, o que certamente evidenciaria os efeitos tóxicos com a dose de 5 g/kg. Porém, nenhum efeito tóxico agudo foi observado através dos parâmetros analisados neste trabalho. Considerando que a população geralmente faz uso de veículos polares para preparação de suas plantas medicinais, existe a necessidade de estudos complementares de toxicidade para que possa garantir a segurança de seu uso e a ausência de toxicidade em humanos.

Os modelos experimentais utilizados neste trabalho para a avaliação dos efeitos gastroprotetores foram selecionados por envolverem diferentes agentes e mecanismos, conhecidos na indução de lesões gástricas. A formação de lesões ulcerativas em modelos experimentais, assim como as ocorrentes em humanos, envolvem a explicação clássica, de que elas são provocadas por um desbalanço entre os fatores protetores e lesivos da mucosa gástrica (Maity *et al.*, 2003). Esse desbalanço pode ser induzido de

diversas maneiras seja por mecanismos nervosos (estimulação vagal), substâncias químicas ou pela realização de procedimentos cirúrgicos.

Os modelos de indução de úlceras por HCl/Etanol e Etanol absoluto promovem as lesões necróticas de maneira multifatorial na mucosa gástrica. O etanol é capaz de alcançar o epitélio da mucosa através do rompimento da barreira mucosa e suas ações celulares refletem em ruptura da parede dos vasos sanguíneos, sendo as hemorragias a consequência das lesões gástricas observadas nestes modelos (Mincis *et al.*, 1995). Esses efeitos provavelmente se devem a ações de lipoperoxidação, formação de radicais livres, estresse oxidativo intracelular, alterações na permeabilidade e despolarização da membrana mitocondrial que precedem a morte celular (Bagchi *et al.*, 1998; Hirokawa *et al.*, 1998; Repetto & Llesuy, 2002).

Os resultados do experimento de indução de úlcera por HCl/Etanol, indicam uma similaridade de efeito entre DeEtOH e DnMeOH, na dose de 500 mg/kg (tabela 10). O efeito dose-dependente foi verificado com DeEtOH, cuja relação dose-efeito apresenta-se bem delineada. Apesar de DnMeOH não apresentar resultado semelhante quanto a evolução do efeito com o aumento da dose, não se pode ignorar o fato de que o extrato de *D. nitida* também apresenta atividade gastroprotetora frente a este agente lesivo. Essa oscilação pode ser justificada pela variabilidade química do extrato conferindo valores discrepantes de I.L.U. até mesmo entre animais do mesmo grupo.

DeEtOH e DnMeOH apresentaram, no modelo de indução de úlcera por Etanol absoluto, proteção significativa com a maior dose utilizada (500mg/kg), apresentando valores muito próximos de proteção gástrica (96% e 89%, respectivamente). Mas o lansoprazol não apresentou efeito citoprotetor em ambos, porém sua atividade antissecreatória foi observável pelo aumento provocado no pH do suco gástrico, pois o lansoprazol é um derivado benzimidazol capaz de inibir a secreção ácida pela célula

parietal através do bloqueio da bomba H^+/K^+ ATPase (Aihara *et al.*, 2003). Segundo Natale *et al.* (2004), o efeito citoprotetor do lansoprazol estaria relacionado à manutenção dos níveis de GSH (glutationa) na mucosa no experimento de úlceras induzidas por etanol. Conseqüentemente, os animais previamente tratados com lansoprazol neste modelo experimental, não apresentaram suas mucosas gástricas protegidas, uma vez que o agente indutor é lesivo ao extremo. O ideal seria o misoprostol, porém devido principalmente a sua ação sobre as contrações uterinas (Dodd *et al.*, 2006) e seu potencial efeito abortivo, não é mais comercializado no Brasil, o que dificulta sua aquisição para a realização de experimentos.

Úlceras causadas por drogas antiinflamatórias não-esteroidais envolvem mecanismos de inibição das cicloxigenases I e II, de maneira a promover redução da produção de prostaglandinas E_2 . As prostaglandinas possuem efeitos na síntese de muco e bicarbonato, na regulação da secreção ácida e do fluxo sangüíneo da mucosa gástrica (Curtis *et al.*, 1995; Halter *et al.*, 2001). Segundo Suzuki *et al.* (2000), outros fatores como a hipermotilidade gástrica e infiltração ou ativação de neutrófilos estariam envolvidos com os processos iniciais de formação das lesões. 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). No modelo experimental de úlceras induzidas por droga antiinflamatória não esteroidal, os efeitos de DeEtOH e DnMeOH foram evidenciados pois ambas conseguiram promover a redução das lesões de maneira significativa ($p < 0.05$ e $p < 0.01$).

O estresse exerce muitas ações sobre o organismo, dentre elas a formação de úlceras que envolvem várias hipóteses de mecanismos como aumento de motilidade, da atividade vagal, degranulação de mastócito, diminuição do fluxo sangüíneo e dos níveis de prostaglandina (Das & Banerjee, 1993). De acordo com Das & Banerjee (1993), no

experimento de úlcera por estresse causado por contenção e frio, ocorre a inativação de peroxidase, que acarreta no acúmulo de H_2O_2 e de OH^- , provocando danos oxidativos, além de causar queda da atividade da prostaglandina sintetase, que reduz a quantidade de prostaglandina e isso deixa a mucosa desprotegida e susceptível aos danos oxidativos. DeEtOH apresentou, no modelo de indução de úlcera por estresse, atividade significativa em duas doses (250 e 500mg/kg). Porém, este experimento é de difícil execução e pouco reprodutível, o que implicou no abandono da técnica, sendo o motivo da não realização deste experimento com DnMeOH.

Os resultados inéditos e promissores obtidos com os extratos polares de *D. elliptica* e *D. nitida* frente aos severos agentes indutores de lesão descritos anteriormente, levaram a realização de experimentos que caracterizassem por quais mecanismos estas plantas atuam. Dessa maneira, foram executados experimentos que visavam verificar o envolvimento das plantas sobre: a secreção ácida gástrica (ligadura de piloro), participação do óxido nítrico (NO), envolvimento dos grupamentos sulfidrílicos (SH) na gastroproteção e a motilidade intestinal.

Ao proceder a ligadura de piloro, as ulcerações são formadas em decorrência da hipersecreção gástrica, porém o entendimento do mecanismo desencadeador ainda é obscuro. Acredita-se que a secreção ácida seja liberada por reflexo vago-vagal em decorrência da distensão gástrica provocada pelo aumento do volume gástrico devido a obstrução piloro. Este procedimento estimula a secreção do hormônio gastrina, cuja função no trato gástrico é estimular as células parietais a secretar em HCl (Baggio *et al.*, 2003). As diferenças nas formas de administração dos tratamentos se devem ao fato de possibilitarem a observação dos efeitos local (via oral) ou sistêmico (via intraduodenal) de DeEtOH e DnMeOH. Na avaliação da atividade de DeEtOH e DnMeOH (500 mg/kg) pela via sistêmica, observou-se efeito gastroprotetor de ambos extratos; porém, a

atuação local somente foi evidenciada pela administração do DnMeOH (500 mg/kg), que foi capaz de promover gastroproteção. A administração dos extratos pelas duas vias utilizadas não interferiram no pH, concentração íons H⁺ e no volume do suco gástrico demonstrando não haver atividade anti-secretória pela administração dos extratos.

Estudos indicam que o NO está envolvido na preservação da mucosa em modelos experimentais de úlcera gástrica por promover vasodilatação, redução da peroxidação lipídica e também por uma ação antiinflamatória nos tecidos (Cho, 2001; Kwiecién *et al.*, 2002; Ancha *et al.*, 2003). Porém, o papel do NO na regulação e manutenção das funções da mucosa gástrica ainda não são totalmente conhecidas (Khattab *et al.*, 2001). Os resultados dos experimentos com o inibidor de NO (L-NAME) mostram que o efeito gastroprotetor de DeEtOH e DnMeOH se manteve independentemente da administração do L-NAME. Pode-se dizer que o mecanismo de proteção induzido pelo NO não é o mecanismo preponderante na gastroproteção observadas com a administração dos extratos em modelo de indução de úlceras por etanol.

Os grupamentos sulfidrílicos participam da proteção da mucosa pela ligação a radicais-livres (antioxidante) e por formar pontes de dissulfeto entre as subunidades do muco de maneira a impedir a sua dissociação (Avila *et al.*, 1996). Esses grupamentos estão presentes na glutathione, uma substância endógena que, em sua forma reduzida, tem importância na redução do estresse oxidativo, por eliminar radicais livres, reduzir peróxidos e por se complexar com compostos eletrofilicos de maneira a proteger estruturas celulares protéicas, DNA e lipídeos, além de proteger a célula de outros produtos tóxicos, como o cádmio (Klaassen *et al.*, 1985; Hayes & McLellan, 1999; Kimura *et al.*, 2001). Apesar de se conhecer o envolvimento dos grupamentos sulfidrílicos na proteção da mucosa em experimentos de indução de úlcera por etanol, os

mecanismos de ação ainda não foram totalmente esclarecidos (Hiraishi *et al.*, 1999). A administração do depletor dos grupamentos sulfidrílicos (NEM) provocou um grande aumento das lesões gástricas em todos os grupos experimentais. O tratamento dos animais com DeEtOH e DnMeOH, promoveu 99 e 96% de proteção, respectivamente, frente a lesão induzida por etanol. Porém, o pré-tratamento com NEM, porém, promoveu reduções drásticas na gastroproteção. A carbenoxolona, controle positivo utilizado, também apresentou variação grande de proteção. Isso se deve, provavelmente, à atuação da carbenoxolona em promover proteção em modelos de indução de úlcera por etanol, devido a um aumento da síntese de muco (Nagayama *et al.*, 2001). Estes resultados indicam, portanto, a participação de grupamentos sulfidrílicos na proteção promovida por DeEtOH e DnMeOH no modelo lesão gástrica induzida por etanol.

A motilidade intestinal está relacionada com a velocidade de esvaziamento gástrico. De acordo com Suzuki *et al.* (2000) a hipermotilidade gástrica é de grande importância no processo inicial de formação de lesões em modelo de úlceras por DAINE. Ao se determinar a ação de DeEtOH e DnMeOH sobre a motilidade intestinal, não foram observadas alterações dos padrões normais de velocidade do trânsito, o que indica a não participação desse tipo de mecanismo inespecífico na atividade dos extratos.

A confirmação da atividade gastroprotetora promovida pela administração dos extratos de ambas as plantas, levou a realização de estudos que caracterizassem outras atividades, diferentes das ações preventivas discutidas acima, tais como efeito cicatrizante, mecanismos de ação e toxicidade subaguda.

No modelo de indução de úlcera por ácido acético, a administração durante 14 dias de DeEtOH reduziu significativamente a área da região lesada em até 46% quando comparado aos animais tratados somente com salina. Porém, o mesmo efeito

cicatrizante das lesões gástricas não foi observado macroscopicamente pelo tratamento com DnMeOH. Apesar do efeito cicatrizante ter sido melhor evidenciado macroscopicamente pelo tratamento com DeEtOH, do que com DnMeOH, através da análise das lâminas histológicas coradas com H&E, observa-se que a conformação das glândulas mucosas da região de regeneração encontra-se melhor estruturada em ambos tratamentos quando comparados com salina. Associado a esses resultados, é possível observar a marcação de muco (PAS) produzido nos tratamentos com DeEtOH e DnMeOH, que apesar de não ser um dado expressivo em relação aos controles, indica uma potencial participação do muco no processo de cicatrização. A estruturação adequada das glândulas facilita a passagem do muco em direção à superfície da mucosa gástrica. De acordo com Wallace & Whittle (1986) o muco apresenta importante relação com o processo de cura em casos de injúrias agudas, pela formação de uma capa mucóide que permite a re-epitelização do local lesionado. Drogas ou substâncias envolvidas na secreção ou na alteração da consistência do muco demonstram apresentar efeito citoprotetor ou aceleram o processo de cicatrização (Ye *et al.*, 2003). As análises das imagens de microscopia eletrônica comprovam o aumento de secreção de muco, ocasionado nos animais tratados com DeEtOH, em relação aos animais controle negativo, reforçando o papel do muco no processo de cicatrização dos extratos.

Através das medidas morfométricas da região de regeneração, pode-se constatar a diminuição da altura do epitélio de regeneração nos animais tratados com DeEtOH e DnMeOH. Esses dados indicam que o mecanismo de ação dos dois extratos não apresenta relação direta com a estimulação da proliferação celular. Estas informações ainda foram confirmadas pela marcação com o antígeno NCL-PCNA, evidenciando que DeEtOH não aumenta a proliferação celular na região de regeneração, o que reforça exclusão desse mecanismo.

DeEtOH e DnMeOH não demonstraram atividade tóxica após 14 dias de tratamento em nenhum dos parâmetros físicos analisados (peso corporal e peso dos órgãos). Para maior confiabilidade dos resultados, foram avaliados parâmetros bioquímicos usualmente utilizados em laboratórios de análise clínica veterinária. AST (indicador de lesão hepática aguda), ALT (indicador de lesão hepática crônica), γ -GT (indicador de lesão do canal biliar), creatinina e uréia (indicadores de lesão renal) foram analisados (Cury *et al.*, 2005). Novamente não houve alteração de nenhum dos parâmetros. Todos esses resultados, associados ao estudo de toxicidade aguda dos extratos, confirmam o baixo efeito tóxico das plantas.

Para a determinação dos mecanismos de ação envolvidos nas atividades farmacológicas de *D. elliptica* e *D. nitida*, discutidas anteriormente, necessitou-se de dados de caracterização fitoquímica de cada extrato. Os fracionamentos e descrição dos componentes foram realizados pelo Prof. Dr. Wagner Vilegas e sua equipe, no Instituto de Química da UNESP de Araraquara. O fracionamento dos extratos levou a obtenção das frações de tanino, flavonóide e aquosa para as duas espécies. A partir dos métodos descritos por Simões *et al.* (2000) e Shneider (1990) verificou-se a presença dos taninos, dentre eles os taninos condensados, mas devido a natureza polimérica e instabilidade das catequinas (taninos condensados) não foi possível a caracterização exata do conteúdo das frações de taninos para ambas espécies. O perfil fitoquímico de cada fração encontra-se na tabela 11.

Tabela 11- Perfil fitoquímico das frações aquosa, de flavonoides e taninos de *D. elliptica* e *D. nitida*

<i>Davilla elliptica</i>		<i>Davilla nitida</i>	
Frações	Fitoquímica	Frações	Fitoquímica
DeAq	-Açúcares -Taninos	DnAq	-Açúcares -Taninos - Ácidos fenólicos
DeFla	-Quercetina-3-O-alfa-L-rhamnopiranosídeo -Miricetina-3-O-alfa-L-rhamnopiranosídeo -Miricetina -Miricetina-3-O-(2''-O-Galoil)-alfa-rhamnopiranosídeo -Miricetina-3-O-(3''-O-Galoil)-alfa-rhamnopiranosídeo	DnFla	-Miricetina-3-O- α -rhamnopiranosídeo -Quercetina-3-O- α -rhamnopiranosídeo -Miricetina -Miricetina-3-O-(2''-O-galoil)- α -rhamnopiranosídeo -Miricetina-3-O-(3''-O-galoil)- α -rhamnopiranosídeo - Quercetina
DeTan	- Taninos -Taninos condensados	DnTan	- Taninos -Taninos condensados

Com a obtenção das frações e caracterização fitoquímica qualitativa, seguiram-se os experimentos agudos subsequentes no intuito de se encontrar quais grupos de substâncias estão envolvidos com as atividades gastroprotetoras dos extratos. A opção pelos modelos agudos se deve ao fato de haver quantidade insuficiente das frações

aquosa, flavonoídica e de taninos de ambas as espécies, para realização de experimentos subagudos.

O modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto serviu como uma triagem na escolha das frações que prosseguiram nos estudos deste trabalho, pois é um modelo de fácil e rápida reprodução, além de ser um modelo severo de indução de lesões gástricas. Somente as frações de DeTan e DeAQ apresentaram efeito citoprotetor neste modelo de indução com a obtenção de 71 e 79% de proteção, respectivamente. Essa atividade pode ser explicada, pois ambas as frações apresentam taninos em sua constituição, cujas propriedades biológicas envolvem atividade antioxidante. Os taninos também podem interagir com a mucina, isso possibilita a proteção da mucosa (Mitjavila *et al.*, 2003; Okuda, 2005). Apesar das demais frações não terem demonstrado efeito gastroprotetor significativo, foram realizadas análises histológicas da mucosa gástrica para verificar possíveis alterações indetectáveis em uma análise macroscópica.

As imagens obtidas a partir das lâminas de PAS indicam uma evidente produção e liberação de muco, principalmente nas frações DeTan, DeFla e DnTan (todas na dose de 100mg/kg). De acordo com Ye *et al.* (2003) o muco apresenta atividade citoprotetora, o que seria mais um mecanismo envolvido na atividade protetora de DeTan. A análise das lâminas histológicas coradas com H&E das 3 frações de *D. elliptica* na dose de 100mg/kg indicam uma ação gastroprotetora, pela redução da severidade das lesões mesmo de DeFla, que na análise macroscópica não foi capaz de proteger a mucosa das lesões por etanol

O provável envolvimento de outros mecanismos de gastroproteção levou a realização de protocolos que poderiam explicar esses efeitos promovidos pelas frações, além da possibilidade de se fazer projeções que busquem elucidar os mecanismos de cicatrização dos extratos.

Dentre os protocolos foi avaliado o papel da HSP 70 na citoproteção das frações. HSP 70 é uma proteína conservada e consistentemente produzida no interior das células em resposta as diferentes formas de estresse (Shichijo *et al.*, 2003) como calor, agentes tóxicos e infecção (Oberringer *et al.*, 1995). Tais proteínas têm a função de proteger os processos homeostáticos celulares de injúrias ambientais e fisiológicas através da preservação de estruturas de proteínas normais e reparo ou remoção de proteínas danificadas (Tytell & Hooper, 2001), tornando interessante o estudo de sua possível ativação. No caso das frações DeAq e DeTan (100 mg/kg), que apresentaram efeito gastroprotetor, não foi evidenciado aumento na expressão de células HSP 70 positivas. Todas as frações cujas doses apresentaram um aumento da expressão dessa proteína, tiveram um alto índice de lesão ulcerativa (I.L.U), muitas vezes superior a mediana do I.L.U. dos animais tratados com salina. Isso provavelmente se deve ao fato de que HSP 70 é expressa em condições de injúria (no caso o etanol) ou como próprio nome sugere, um “choque” de diferentes naturezas. Assim, quanto maior a quantidade de lesões, maior a atividade da HSP 70; havendo efeito gastroprotetor, a atividade desta proteína encontra-se diminuta. Pode-se concluir a partir destes resultados que HSP 70 não participa da atividade gastroprotetora das frações de DeAq e DeTan no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol.

O interesse em caracterizar a expressão de COX 2 através de ensaios, reside no fato desta isoforma produzir prostanóides, como prostaglandina E₂, que desempenha ações gástricas importantes no processo de cicatrização por induzir angiogênese e proliferação celular. Além disso, apresentam efeito citoprotetor (ainda não esclarecido totalmente) relacionado principalmente com a produção de muco e bicarbonato (Brozowisk *et al.*, 2005). O resultado da contagem de células marcadas positivamente pela presença de COX 2, indicou somente uma expressão significativa pela administração de DeAq 50mg/kg. A fração de flavonoides *D. elliptica* demonstrou

diminuir o número de células marcadas, de forma dose-dependente. Este resultado é explicável pelo conhecimento das ações antiinflamatórias dadas pelos flavonóides por inibição da COX 2 (Robak & Gryglewski, 1996). As frações de taninos tenderam a aumentar o número de células marcadas (não significativo), também de forma dose-dependente. Isso demonstra que os taninos de *D.elliptica* apresentam relação com atividade de COX 2, pois a fração aquosa também apresenta esse grupo de substâncias em sua composição, sendo este o constituinte majoritário. As frações de *D. nitida* não alteraram o número de células COX 2 positivas, indicando que ativação desta enzima não é representativa no mecanismo de ação da planta.

A determinação da participação da SOD (superóxido dismutase) no mecanismo de ação das frações também foi avaliada, devido sua importância como antioxidante e eliminadora de radicais livres das células (Fan *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2005). Sua atividade gastroprotetora é reconhecida, tendo como um dos possíveis mecanismos o aumento do nível de prostaglandinas (Ogino *et al.*, 1987; Iwasaki *et al.*, 2004). Os resultados deste estudo com as frações no modelo de etanol, não manifestaram efeito significativo, tornando essa via antioxidativa de pouco interesse neste trabalho.

Os experimentos tomaram um novo rumo com relação ao estudo das frações, sendo avaliados somente aquelas que apresentaram dados estatisticamente significativos de atividade gastroprotetora macroscópica no modelo de etanol (DeAQ e DeTan, 100mg/kg), devido a maior probabilidade de se atingir resultados mais satisfatórios. Além disso, este critério foi adotado antes da realização do experimento. Como métodos de investigação foram utilizados experimentos já realizados no estudo dos extratos para fins de se caracterizar atividade das frações relacionada aos grupamentos sulfidrílicos, ao óxido nítrico e alterações dos parâmetros de suco gástrico.

As frações DeAq e DeTan não apresentaram perda da atividade gastroprotetora com a administração do inibidor de compostos sulfidrílicos (NEM), indicando que os

mesmos não apresentam relação com o efeito das frações. Ao se avaliar a atividade anti-secretória de DeTan não se verificou alterações dos parâmetros do suco gástrico no modelo de ligadura de piloro, o que torna possível afirmar que este mecanismo não é representativo de sua atividade.

O envolvimento do mecanismo das frações com o NO foi caracterizado. Houve ligação da atividade farmacológica de DeTan com essa substância, diferente do resultado obtido com o extrato; porém, faltam dados na literatura que expliquem essa relação de efeito antagônico quando todas as substâncias estão presentes no extrato (taninos, flavonoides, açúcares), sobre a produção de NO.

Frente à importância das prostaglandinas na gastroproteção, descrita anteriormente, os níveis de prostaglandina E₂ foram determinados na mucosa gástrica de ratos. O uso da indometacina promove inibição das ciclooxigenases 1 e 2 (Meade *et al.*, 1993) e o seu emprego neste experimento serviu como parâmetro para avaliar a atividade da fração de taninos de *D. elliptica* na produção de prostaglandina, de maneira a relacionar a existência de uma dependência dessa ação via indução da COX. Porém, os resultados indicaram não haver um aumento da produção de prostaglandina pela administração de DeTan. Esses resultados tornam-se contraditórios quando comparados aos obtidos através da imunohistoquímica, onde houve um aumento da expressão de COX 2 na mucosa dos ratos no modelo de indução de lesão gástrica por etanol. Mas segundo Luo *et al.* (2001), a administração de etanol em cultura de células nervosas, promove um aumento dos níveis de prostaglandina, porém não é acompanhado alteração da expressão de COX. Com base nos dados obtidos, pode-se supor que a administração do etanol promove lesões que aumentam a produção de prostaglandina via indução da atividade COX 2. Esta elevação na produção de prostaglandina é potencializada pela administração DeTan devido a sua ação sobre a expressão de COX 2. Além disso, outra via de ativação de COX 2 envolvendo o NO pode reforçar este

mecanismo de ação. O NO promove aumento da expressão de COX 2, em diferentes sistemas (Cobert *et al.*, 1993; Salvemini *et al.*, 1995; Aldini *et al.*, 2003). Dados discutidos anteriormente evidenciam a participação do NO gastroproteção de DeTan. Assim, pode-se afirmar que o NO está envolvido na atividade gastroprotetora de DeTan ao promover aumento de COX 2, causando elevação da síntese de prostaglandina na mucosa gástrica.

Todos esses resultados confirmam que os taninos de *D. elliptica* representam um grupamento de substâncias de maior importância nos efeitos farmacológicos antiulcerogênicos obtidos com o DeEtOH, sendo caracterizada a relevância do NO, nessa atividade, que possivelmente também esteja relacionado à regulação da ciclooxigenase 2, promovendo aumento de prostaglandina, em condições de injúria gástrica. Porém, não foi possível caracterizar o mecanismo de ação referente aos grupos de substâncias de *D. nitida*, com os modelos experimentais realizados.

VI. CONCLUSÃO

Frente a apresentação de todos estes resultados, pode-se concluir que os extratos DeEtOH e DnMeOH apresentam atividade gastroprotetora em diferentes modelos de indução de lesões gástricas, confirmando-se a indicação popular e a relação quimitaxonomica utilizadas para a seleção das plantas.

Ambos os extratos não apresentaram efeito tóxico agudo e subagudo, frente todas as análises realizadas (comportamental, evolução do peso corporal, peso dos órgãos e análise de parâmetros bioquímicos como AST, ALT, Gama-GT, uréia e creatinina).

DeEtOH e DnMeOH apresentam atividade gastroprotetora relacionada com os grupamentos sulfidrílicos. Além disso, DeEtOH apresenta atividade cicatrizante com redução da área de lesão, porém, sem ter relação com a proliferação celular.

As frações de *Davilla nitida* não apresentam efeito gastroprotetor frente a indução de lesões por etanol absoluto e não alteram a expressão de HSP 70, COX 2 e SOD.

A fração de taninos de *Davilla elliptica* apresentam efeito gastroprotetor e sua atividade está associada ao óxido nítrico e aumento da expressão de COX 2. Porém necessita-se estudos mais aprofundados para a caracterização da composição da frações taninos de *D. elliptica*, para se ter maiores esclarecimentos quando aos mecanismo de ação.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aihara, T.; Nakamura, E.; Amagase, K.; Tomita, K.; Fujishita, T.; Furutani, K.; Okabe, S. *Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: past, present, and future*. *Pharmacology & Therapeutics*, 98, 109-127, 2003.
- Aldini, G.; Carinia, M.; Piccolia, A.; Rossonib, G.; Facinoa, R. M. *Procyanidins from grape seeds protect endothelial cells from peroxynitrite damage and enhance endothelium-dependent relaxation in human artery*. *Life Sciences*, 73, 2883-2898, 2003.
- Ancha, H.; Ojeas, H.; Tedesco, D.; Ward, A.; Harty, R.F. *Somatostatin-induced gastric against ethanol: involmiment of nitric oxide and effects on gastric mucosal blood flow*. *Regulatory peptides*, 110, 107-113, 2003.
- Arrieta, J.; Benitez, J.; Flores, E.; Castilho, C.; Navarrete, A. *Purification of gastroprotective triterpenoids from stem bark of Amphipterygium adstringens; roles of prostaglandins, sulphidryls, nitric oxide and capsaicin neurons*. *Planta Medica*, 69, 905-909, 2003.
- Avila, J.R.; Lastra, A.D.L.; Martín, M.J.; Motilva, V.; Luque, I.; Delgado, D.; Esteban, J.; Herrerias, J. *Role of endogenous sulphidryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats*. *Inflamm. Res.*, 45, 83-88, 1996.
- Bagchi, D.; Carryl, O.R.; Tran, M.X.; Krohn, R.L.; Bagchi, D.J.; Garg, A.; Bagchi, M.; Mitra, S.; Stohs, S.J. *Stress, diet and alcohol-induced oxidative gastrointestinal mucosal injury in rats and protection by bismuth subsalicylate*. *J. Appl. Toxicol.*, 18(1), 3-13, 1998.

- Baggio, C. H.; Freitas, C. S.; Rieck, L.; Marques, M. C. A. *Gastroprotective effects of a crude extract of Baccharis illinita DC in rats*. Pharmacological Research, 47, 93-98, 2003.
- Balunas, M. J.; Kinghorn, A. D. *Drug discovery from medicinal plants*. Life Sciences, 78, 431-441, 2005.
- Barroso, G. M.; Guimarães, E. F.; Ichaso, C.F.L.; Costa, C. G.; Peixoto, A. L. *Sistemática das Angiospermas*. V. 1. Rio de Janeiro: Ed. da Universidade de São Paulo, p.255, 1978.
- Bauer, H. & Mark-Hermann, E. *Therapy with nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. Orthopade, 32 (12), 1088-1099, 2003.
- Behmer, O.A.; Tolosa, E.M.C.; Freitas Neto, A.G. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. EDART, Editora da Universidade de São Paulo, p241, 1976.
- Berenguer, B.; La Lastra C. A.; Moreno, F.J.; Martín, M.J. *Chronic gastric ulcer healing in rats subjected to selective and non-selective cyclooxygenase-2 inhibitors*. European J. Pharmacol, 442, 125-135, 2002.
- Brzozowski, T.; Konturek, P. C.; Konturek, S. J.; Brzozowska, I.; Pawlik, T. *Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation*. Journal of Physiology and Pharmacology, 56 (5), 33-55, 2005.
- Calvo, T.R.; Hiruma-Lima, C.A.; Souza Brito, A.R.M.; Vilegas, W. *Triagem química em Davilla elliptica*. Anais do V Workshop de Plantas Medicinais de Botucatu, p. 19, 2002.
- Chan, F. L.; Leung, W. K. Peptic ulcer disease. Lancet, 360, 933-941, 2002.
- Cho, C. H. *Current roles of oxide nitric in gastrointestinal disorders*. Journal of Physiology. Paris 95, 253-256, 2001.

- Cobertt, J. A.; Kwon, G.; Turk, J.; McDaniel, M. L. *IL-1 β induces the coexpression of both nitric oxide synthase and cyclooxygenase by islets of Langerhans: activation of cyclooxygenase by nitric oxide*. *Biochemistry*, 32, 13767-13770, 1993.
- Cotram, R.S. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. 6th. Sanders Company, E.U.A., 1999.
- Curtis, G. H.; ManNaughton, W. K.; Gall, D. G.; Wallace, J. L. *Intraluminal pH modulates gastric protaglandin synthesis*. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 73, 130-134, 1995.
- Curtis, G.H.; Macnaughton, W.K.; Gall, D.G. & Wallace, J.L. *Intraluminal pH modulates gastric prostaglandin synthesis*. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 73: 130-134, 1995.
- Cury, M. C.; Guimarães, M. P.; Lima, W. S.; Caldeira, M. C. M. ; Couto, T. R.; Murta, K.; Carvalho, M. G.; Baptista, J. M. B. *Biochemical serum profiles in dogs experimentally infested with *Angiostrongylus vasorum**. *Veterinary Parasitology*, 128, 121-127, 2005.
- Das, D. & Banerjee, R. K. *Effect of stress on the antioxidant enzymes and gastric ulceration*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 125, 115-125, 1993.
- Dodd, J. M.; Crowther, C. A.; Robinson, J. S. *Oral misoprostol for induction of labour at term: randomized controlled trial*. *BMJ*, no prelo, 2006
- Fan, Y.; Hua, J.; Li, J.; Yang, Z.; Xina, X.; Wang, J.; Ding, J.; Geng, M. *Effect of acidic oligosaccharide sugar chain on scopolamine-induced memory impairment in rats and its related mechanisms*. *Neuroscience Letter*, 374, 222-226, 2005.
- Firenzouli, F.; Gori, I.; Neri, D. *Clinical phytherapy: opportunities and problematics*. *Ann Ist. Super Sanita*. 41 (1), 27-33, 2005.
- Go, M. F. *What are de host factors that place an individual at risk for *Helicobacter pylori*-associated disease?* *Gastroenterology*, 113 (6), 15-20, 1997.

- Guaraldo, L.; Chagas, D.A.; Konno, A.C.; Korn, G.P.; Pfiffer, T.; Nasello, A.G. *Hydroalcoholic extract and fractions of Davilla rugosa Poiret: effects on spontaneous motor activity and elevated plus-maze behavior*. J. Ethnopharmacology, 72: 61-67, 2000.
- Guaraldo, L.; Sertie, J.A.A.; Bacchi, E.M. *Antiulcer action of the hydroalcoholic extract and fractions of Davilla rugosa Poiret in the rat*. J. Ethnopharmacology, 76: 191-195, 2001.
- Guo, J.S.; Cho, C.H.; Lam-Lui, E.S.; Coi, H.T.; Wang, J.Y.; Leung Koo, M.W. *Antiangiogenic effect of a highly selective cyclooxygenase-2 inhibitory on gastric ulcer healing in rats*. Toxicol. Appl. Pharmacol. v.183, p.41-45, 2002
- Gürbüz, I.; Üstün, O.; Yesilada, E.; Sezik, E.; Akyürek, N. *In vivo gastroprotective effects of live Turkish folk remedies against ethanol-induced lesions*. Journal of Ethnopharmacology, 83, 241-244, 2002.
- Gurib-Fakim, A. *Medicinal plants: traditions of yesterday*. Molecular Aspect of Medicine, 27, 1-93, 2006.
- Halter, F.; Tarnawski, A.S.; Schmassmann, A.; Peskar, B.M. *Cyclooxygenase-2, implications on maintenance of gastric mucosal integrity an ulcer healing: controversial issues and perspectives*. Gut, 49, 443-59, 2001.
- Hayes, J.D. & McLellan, L.I. *Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress*. Free Radical Research, 4, 273-300, 1999.
- Hiraishi, H.; Shimada, T.; Ivey, K.J.; Terano, A. *Role of Antioxidant Defenses Against Ethanol-Induced Damage in Cultured Rat Gastric Epithelial Cells*. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic, 289:103–109, 1999.

- Hirokawa, M.; Miura, S.; Yoshida, H.; Kurose, I.; Shigematsu, T.; Hokari, R.; Higuchi, H.; Watanabe, N.; Yokoyama, Y.; Kimura, H.; Kato, S.; Ishii, H. *Oxidative stress and mitochondrial damage precedes gastric mucosal cell death induced by ethanol administration*. Alcohol. Clin. Exp. Res., 22 (3), 111-114, 1998.
- Holetz, F. B.; Pessini, G. L.; Sanches, N. R.; Cortez, D. A. G.; Nakamura, C. V.; Dias Filho, B. P. *Screening of some plants used in the Brazilian medicine for treatment of infectious disease*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 97 (7), 1027-1031, 2002.
- Ishihara, M.; Ito, M. *Influence of aging on gastric ulcer healing activities of cimetidine and omeprazole*. European Journal of Pharmacology, 444, 209-215, 2002.
- Iwasaki, Y.; Matsui, T.; Arakawa, Y. *The protective and hormonal effects of proanthocyanidin against gastric mucosal injury in Wistar rats*. Journal of Gastroenterology, 39, 831-837, 2004.
- Khattab, M.M.; Gad, M.Z.; Abdalla, D. *Protective role of nitric oxide in indomethacin induced gastric ulceration by a mechanism independent of gastric secretion*. Pharmacological Research. 43, 463-467, 2001.
- Kimura, M.; Goto, S.; Ihara, Y.; Wada, A.; Yahiro, K.; Niidome, T.; Oyagi, H.; Hirayama, T.; Kondo, T. *Impairment of glutathione metabolism in human gastric epithelial cells treated with vacuolating cytotoxin from Helicobacter pylori*. Microbial Pathogenesis, 31, 29-36, 2001.
- Kinghorn, A. D. *The role of pharmacology in modern medicine*. Expert Opin. Pharmacother. 3 (2), 77-9, 2002.
- Kirkpatrick, P. *Stitching together naturally*. Nature, 1, 748, 2002.
- Kitajima, T.; Okuhira, M.; Tani, K.; Nakano, T.; Hiramatsu, A.; Mizuno, T.; Inoue, K.; *Cell proliferation kinetics in acetic acid-induced gastric ulcer evaluated by*

- immunohistochemical staining of proliferating cell nuclear antigen*. Journal of Clinical Gastroenterology, 17, 116-120, 1995.
- Klaassen, C.D.; Bracken, W.M.; Dudley, R.E.; Goering, P.L.; Hazelton, G.A.; Hjelle, J.J. *Role of sulfhydryls in the hepatotoxicity of organic and metallic compounds*. Fundam Appl Toxicol., 5 (5), 806-15, 1985.
- Kwiecién, S.; Brzozowski, T.; Konturek, P. C. H.; Konturek, S.J. *The role of reactive oxigen species in action of nitric oxide-donors on stress-induced gastric mucosal lesions*. Journal of physiology and pharmacology, 53, 4, 761-773, 2002.
- La Vecchia & Tavani, A. *A review of epidemiological studies on cancer in relation to the use of anti-ulcer drugs*. Eur. J. Cancer Prev. 11(2): 117-123, 2002.
- Levine, R.J. *A method for rapid production of stress ulcers in rats*. In: *Peptic Ulcer*, C.J. Pfeiffer (Ed.), Munksgaard, Copenhagen, 92-97, 1971.
- Li, Y. & Ohizumi, Y. *Search for constituents with neurotrophic factor potentiating activity from the medicinal plants of Paraguay and Thailand*. Yakugaku Zasshi, 124 (7), 417-424, 2004.
- Luo, J.; Lindström, C. L. B.; Donahue, A.; Miller, M. W. *Differential effects of ethanol on the expression of cyclo-oxygenase in cultured cortical astrocytes and neurons*. Journal of Neurochemistry, 76, 1354-1363, 2001.
- Maity, P.; Biswas, K.; Roy, S.; Banerjee, R. K.; Bandyopadhyay, U. *Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer – recent mechanism update*. Molecular and Cellular Biochemistry, 253, 329-338, 2003.
- Malone, M.H. & Robichaud, R.C. *A hippocratic screen for pure or crude drug materials*. Llooydia, 25, 320-322, 1962.
- Matheucci, L.G. *Tese de Mestrado*, Universidade do Estado de São Paulo, 1996.

- Matsuda, H.; Li, Y.; Yoshikawa, M. *Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulphhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by mormodin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesion in rats.* Life Sciences, 65, 27-32, 1999.
- Mcintosh, J.H.; Byth, K.; Piper, D.W. *Causes of death amongst a population of gastric ulcer patients in New South Wales, Australia.* Scand. J. Gastroenterol., 26, 806-811, 1991.
- Meade, E. A.; Smith, W. L.; DeWitts, D. L. *Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other Nonsteroidal anti-inflammatory drugs.* The Journal of Biological Chemistry, 268 (9), 6610-6614, 1993
- Mincis, M.; Chebli, J. M. F.; Khouri, S. T.; Mincis, R. *Etanol e o trato gastrointestinal.* Arq Gastroenterol., 32, 131-139, 1995.
- Miranda, A.; Janssen, L.; Bosman, C. B.; Duijin, W.; Rui, M. M. O.; Kubben, F. J. G. M.; Griffioen, G.; Lamers, C. B. H. W.; Han, J.; Krieken, J. M.; Velde, C. J. H.; Verspaget, H. W. *Superoxide dismutase in gastric and esophageal cancer and prognostic impact in gastric cancer.* Clinical Cancer Research, 6, 3183-3192, 2000.
- Mitjavila, S.; Lacombe, C.; Carrera, G.; Derache, R. *Tannic acid and oxidized tannic acid on the functional state of rat intestinal epithelium. In: Effect of tannins from Quercus suber and Quercus coccifera leaves on ethanol-induced gastric lesions in mice.* Agricultural and Food Chemistry, 51, 1469-1473, 2003.
- Mizui, T. & Douteuchi M. *Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats.* Jap. J. Pharmacol. 33, 934-945, 1983.
- Morimoto, Y.; Shimohara, K.; Oshima, S.; Sukamoto, K. *Effects of the new antiulcer agent kb-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal*

- defensive factors, as compared to those of terpenone and cimetidine.* Japan J. Pharmacology, 57, 495-505. 1991.
- Nagayama, S.; Jono, H.; Suzaki, H.; Sakai, K.; Tsuruya, E.; Yamatsu, I.; Isohama, Y.; Miyata, T.; Kai, H. *Carbenoxolone, a new inducer of heat shock protein 70.* Life Sciences. 69, 2867-2873, 2001.
- Natale, G.; Lazzeri, G.; Lubrano, V.; Colucci, R.; Vassalle, C.; Fornai, M.; Blandizzi, C.; Del Tacca, M. *Mechanisms of gastroprotection by lansoprazole pretreatment against experimentally induced injury in rats: role of mucosal oxidative damage and sulfhydryl compounds.* Toxicology and Applied Pharmacology 195, 62– 72, 2004.
- Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. *Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002.* Journal of Natural Product, 66, 1022-1037, 2003.
- Oberinger M, Baum HP, Jung V, Welter C, Frank J, Kuhlmann M, Mutschler W, Hanselmann RG. *Differential expression of heat shock protein 70 in well healing and chronic human wound tissue.* Biochem Biophys Res Commun., 214 (3), 1009-1014, 1995.
- Ogino, K.; Oka, S.; Matsuura, S. *Superoxide dismutase and rat gastric mucosal injury – indomethacin-induced ulcer.* Jpn J Gastroenterol, 84, 1389-1393, 1987.
- Okabe, S.; Agamase, K. *An Overview of Acetic Acid Ulcer Models - The History and State of the Art of Peptic Ulcer Research.* Biol. Pharm. Bull, 28 (8), 1321-1341, 2005.
- Okuda, T. *Systematic and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants.* Phytochemistry. In press, 2005.
- Peura. D. A. *Prevention of nosteroidal anti-inflammatory drug-associated gastrointestinal symptoms and ulcer complications.* American Journal of Medicine, 117 (5A), 63-71, 2004.
- Pott, A. & Pott, V.J. *Plantas do Pantanal.* Editora da Embrapa, Corumbá, p.103, 1994.

- Raghunath, A. S.; O'Morain, C.; Mcloughlin, R. C. *Review article: long-term use of proton-pump inhibitors*. *Aliment and Pharmacology Therapy*, 22 (1) 55-63, 2005.
- Rainsford, K.D. *Gastric Ulcerogenicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs in mice with mucosa sensitized by cholinomimetic treatment*. *J. Pharm. Pharmacol.* 39, 669-672, 1987.
- Rates, S. M. K. *Plants as source of drugs*. *Toxicon*, 39, 603-613, 2001.
- Repetto, M.G. & Llesuy, S.F. *Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers natural antiulcerogenic antioxidant compounds*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35, 523-534, 2002.
- Robak, J. & Gryglewisk, R. J. *Bioactivity of flavonoids*. *Pol. J. Pharmacol.*, 48 (6), 555-564, 1996.
- Rodrigues, V. E.; Carvalho, D. A. *Levantamento etnobotânico de plantas medicinais do Cerrado na região do Alto Rio – Minas Gerais*. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras – MG, v.25, n.1, p. 102-123, 2001.
- Salvemini, D.; Manning, P. T.; Zweifel, B.; Seibert, K.; Connor, J.; Currie, M. G.; Needleman, P.; Masferrer, J.L. *Dual inhibition of nitric oxide and prostaglandin production contributes to the antiinflammatory properties of nitric oxide synthase inhibitors*. *J Clin Invest.*, 96, 301-308, 1995.
- Schmeda- Hirschmann, G.; Yesilada, E. *Traditional medicine and gastroprotective crude drugs*. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 61-66, 2005.
- Schneider, G. *Arzneidrogen. Ein Kompendium für Pharmazeuten, Biologen und Chemiker*. Mannheim : Wissenschaftsverlag, p. 379, 1990.
- Shay, H. *A simple for the uniform production of gastric ulceration in rat*. *Gastroenterology*, 5, 43-61, 1945.

- Shichijo, K.; Ihara, M.; Matsuu, M.; Ito, M.; Okumura, Y.; Sekine, I. *Overexpression of heat shock protein 70 in stomach of stress-induced gastric ulcer-resistant rats. Digestive Diseases and Sciences*, v.48, n.2, p. 340-348, 2003.
- Silva, S.R.; Silva, A.P.; Munhoz, C.B.; Silva Jr., M.C.; Medeiros, M.B. *Guia de plantas do Cerrado utilizadas na Chapada dos Veadeiros*. Ed. WWF, Brasilia, p.42, 2001.
- Simões, C. M. O.; Schemkel, E. P.; Gosman, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*. 2. Ed, Porto Alegre / Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS, Ed. da UFSC, p. 821, 2000.
- Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Editora Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, 87-99, 1999.
- Sontaj, S. J. *Guilty as charged: bugs and drugs in gastric ulcer*. *American Journal of Gastroenterology*, 92 (8), 1255-1261, 1997.
- Souza Brito, A.R. *Manual de ensaios toxicológicos "in vivo"*. Ciências médicas. Campinas: Unicamp, p. 15-22, 1994.
- Souza-Brito, A. R. M. *How to study the pharmacology of medicinal plants in underdeveloped countries*. *Journal of ethnopharmacology*, 54, 131-138, 1996.
- Spirt, M. J. *Stress-related mucosal disease: risk factors and prophylactic therapy*. *Clinical Therapeutics*, 26 (2), 197-213, 2004.
- Suzuki, K.; Araki, H.; Komoike, Y.; Takeuchi, K. *Permissive role of neutrophils in pathogenesis indomethacin-induced gastric lesions in rats*. *Med. Sci. Monit.* 6(5), 908-914, 2000.
- Suzuku, H.; Kajiwarra, M.; Miura, S.; Ishii, H. *Ethanol-induced injury and GI bleeding*, *Nippon Rinsho*, 56 (9), 2269-2275, 1998.

- Tytell, M.; Hooper, P.L. *Heat shock proteins: new keys to the development of cytoprotective therapies. Expert Opin Ther Targets*, v.5, n.2, p.267-87, 2001.
- Vacca, L.L. *Laboratory Manual of Histochemistry*. Raven Press, New York, 578, 1985.
- Wallace, J. L. & Whittle, B. J. *Role of mucus in the repair of gastric epithelial damage in the rat. Inhibition of epithelial recovery by mucolytic agents. Gastroenterology*, 91, 603-611, 1986.
- Wallace, J. L.; Granger, D. N. *The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. FASEB Journal*, 10, 731-740, 1996.
- Wang, S.; Wang, L.; Zhang, K, Shen, J.; Zhou, H.; Qiu, X. *Effect of superoxide dismutase and malondialdehyde metabolic changes on carcinogenesis of gastric carcinoma. World J. Gastroenterology*, 11 (28), 4305-4310, 2005.
- Watanabe, T. & Chiba, T. *Pathogenesis of gastric and duodenal ulcer in the elderly. Nippon Rinsho*, 60 (8), 1515-1520, 2002.
- Ye, Y. N.; Soa, H. L.; Liua, E. S. L.; Shina, V. Y.; Choa C. H. *Effect of polysaccharides from Angelica sinensis on gastric ulcer healing. Life Sciences*, 72, 925-932, 2003.