

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO GASTROPROTETORA DA EPICATEQUINA E
VERIFICAÇÃO DE SEUS MECANISMOS DE AÇÃO**

ALEXANDRE TANIMOTO

Monografia apresentada ao Instituto
de Biociências, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biomédicas

**BOTUCATU – SP
2010**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO GASTROPROTETORA DA EPICATEQUINA E
VERIFICAÇÃO DE SEUS MECANISMOS DE AÇÃO**

ALUNO: ALEXANDRE TANIMOTO
ORIENTADORA: CLÁUDIA HELENA PELLIZZON
CO-ORIENTADORA: CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA

Monografia apresentada ao Instituto
de Biociências, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biomédicas

**BOTUCATU – SP
2010**

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

Tanimoto, Alexandre.

Avaliação gastroprotetora da epicatequina e verificação de seus mecanismos de ação / Alexandre Tanimoto. - Botucatu, 2010

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Cláudia Helena Pellizzon

Co-orientador: Clélia Akiko Hiruma-Lima

Capes: 20603002

1. Estômago – Úlceras. 2. Flavonóides.

Palavras-chave: Epicatequina; Gastroproteção; Polifenóis, Úlcera Gástrica.



Proc. 08/53798-1

Professora Doutora Cláudia Helena Pellizzon (orientadora)

Departamento de Morfologia

Instituto de Biociências – UNESP – Campus de Botucatu

Professor Doutor Helton Carlos Delício

Departamento de Fisiologia

Instituto de Biociências – UNESP – Campus de Botucatu

Agradecimentos

Existem tantas pessoas que quero agradecer, por favor, perdoem-me caso esqueça alguém, mas o fato de um nome não estar escrito aqui, não significa que não sou grato. Sou grato por todos os momentos felizes e difíceis pelos quais passei, mas sou realmente grato pelos momentos que não passei.

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, por ter me guiado durante esses anos de faculdade.

Claro que não poderia deixar de agradecer meus pais, Roberto e Luísa Tanimoto. Sei que foram inúmeros sacrifícios para me manter estudando fora, espero que eu tenha retribuído a esse sacrifício e os tenha deixado orgulhosos com as conquistas que obtive juntamente com meus companheiros. E claro agradeço a toda minha família; também peço desculpas por ficar tanto tempo afastado de vocês!

Agradeço também à minha orientadora Professora Doutora Cláudia Helena Pellizzon, por ter TANTA paciência com minhas neuroses e “conclusões”, por ser minha amiga, confidente, companheira, professora, e querendo ou não minha mãe aqui em Botucatu.

Agradeço à minha co-orientadora Professora Doutora Clélia Akiko Hiruma-Lima por todo o carinho nas correções de projetos, seminários, resumos e relatórios. Obrigado também por sempre nos emprestar um cantinho ai no Laboratório de Produtos Naturais, onde sempre me sinto a vontade de realizar meus experimentos.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, Ariane Leite Rozza e Bianca Barbosa Gregório por terem me acompanhado em TODOS os experimentos (foram muitos sábados, domingos e feriados), por sempre terem paciência na hora de ler e fazer as primeiras correções nas besteiras que escrevo e claro, agradeço as duas pelas conversas

e fofocas! (rs). Também tenho que agradecer ao Jean Felipe Marques, Gustavo Mendes, Paulo César de Paula Vasconcelos e Paulo Roberto Floriano Júnior pela convivência no laboratório.

Não poderia deixar de agradecer às pessoas do Laboratório de Fitoterápicos e do Laboratório de Produtos Naturais, por toda a ajuda e conselhos durante minha ainda curta vida acadêmica, então, Leonardo, Hélio, Catarine, Thiago, Flávia, Raquel, Hélen, Katharinne (não sei se acertei dessa vez), Laísa, Célio, Patrícia, Ana Eliza, Alexandre, Adriana, Luiz e claro, Marília: MUITO OBRIGADO!

Ainda falta agradecer aos meus companheiros de república e aos agregados por esses anos de “casamento” muitas risadas e alguma discussões, mas todos sabem que eu adoro esta república, vai mais um obrigado para o Evandro Katsui Utsunomia, Marco Aurélio Pessotto, Bruno Spinetti Moda, Gustavo, Laura Migliorini de Araujo e Bruna da Silva Portes! Aos meus colegas de classe, agradeço principalmente ao nosso querido grupo “sem amigos”, ou seja, Thalita de Almeida Tavarez, Bianca Barbosa Gregório, Evandro Katsui Utsunomia, Gabriel Rodrigues Manolio, Danilo Flávio Moraes Riboli e Marília do Vale Carneiro. E também vai um muito obrigado a todos os colegas biomédicos, veteranos e “bixos” pelo apoio!

Bom, os agradecimentos vão além de Botucatu e da UNESP, agradeço a todas as pessoas de Bastos que sempre torceram pelo meu futuro e sempre perguntam como eu estava indo na faculdade; às pessoas de São Paulo que sempre me recebem tão bem, valeu Rô, Yuki, Gui, Wilker, Dani, Tupi, Dona Anaide, Sr. Mário, Vanessa e Everton.

Por fim, agradeço ao Instituto de Biociências e à UNESP pelo ensino de qualidade durante esses quatro anos, muito agradecido aos diretores, professores e a todos os outros funcionários desta instituição por todos os ensinamentos.

“Aquilo que é impenetrável para nós existe de fato. Por trás dos segredos da natureza há algo sutil, intangível e inexplicável. A veneração a essa força que está além de tudo o que podemos compreender é a minha religião.”

Resumo

O estômago é um órgão excepcional, cujas funções são esterilizar o alimento ingerido, formar o bolo alimentar primitivo, digerir lipídeos e proteínas e armazenar temporariamente o alimento dentro do tubo gastrointestinal. Sua capacidade de digerir o alimento sem se auto-digerir é incrível. Tal fato ocorre devido a uma série de fatores protetores adjacentes à mucosa gástrica. Quando os fatores agressivos superam os fatores protetores, uma lesão na mucosa é formada. Lesões na mucosa gástrica que atingem a lâmina própria são chamadas de úlceras gástricas, onde são classificadas macroscopicamente como aberturas na parede gástrica e, microscopicamente, como uma descamação na camada mucosa com infiltração eosinofílica, descamação da mucosa, dano glandular e em alguns casos com presença de hemorragias. A terapêutica atual é eficaz, porém causa uma série de efeitos colaterais, devido a isso, a pesquisa de novos fármacos é necessária. Este trabalho visou avaliar o efeito gastroprotetor da epicatequina frente a lesões gástricas induzidas por etanol e anti-inflamatório não esteroide, que são, atualmente, dois dos maiores causadores desta enfermidade; além de estudar os principais mecanismos de ação responsáveis pelo efeito gastroprotetor. Os resultados mostram que a epicatequina apresenta significativo efeito gastroprotetor macro e microscópico frente a lesões gástricas induzidas por etanol absoluto e indometacina, atua localmente aumentando a secreção de muco, auxiliando o sistema antioxidante na manutenção dos níveis de glutathione total. Tais mecanismos dependem da ativação de compostos sulfidrílicos e independem da atuação da enzima NO-sintetase.

Palavras-chave: epicatequina, polifenóis, úlcera gástrica, gastroproteção.

Abstract

The stomach is an exceptional organ, which functions are sterilize food ingested, form the primitive bolus, digest lipids and proteins, and to store food temporarily in the gastrointestinal tract. Its capacity of digesting food without digesting itself is amazing. This fact occurs due to innumerable protective substances adjacent to the gastric mucosa. When aggressive factors overwhelm the protective factors, a lesion in the gastric mucosa is formed. Lesions that reach the lamina propria are called gastric ulcers, which are classified macroscopically as openings on the gastric wall and; microscopically, as a gastric injury characterized with epithelial desquamation, mucosal hemorrhage, glandular damage and eosinophilic infiltration. The current therapy available is effective, although it causes collateral effects, therefore researching new drugs is necessary. This work aim to evaluate the gastroprotective effect of epicatechin against gastric lesions induced by absolute ethanol and non steroidal anti-inflammatory drugs which are the main causes of this disease currently, yet we aim to study the main mechanisms of action responsible for the gastroprotective effect. The results show that epicatechin has a significant macroscopic and microscopic gastroprotective effect against gastric injuries induced by ethanol and indomethacin, acting locally by augmenting gastric mucus secretion and it also acts via antioxidant system by holding total glutathione levels. Epicatechin's gastroprotective mechanisms depend on the activation of sulfhydryl compounds and doesn't depend on the NO-synthase enzyme.

Key words: epicatechin, polyphenols, gastric ulcer, gastroprotection.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O ESTÔMAGO	1
1.2	ÚLCERAS GÁSTRICAS	2
1.3	TERAPÊUTICA ATUAL	3
1.4	PLANTAS MEDICINAIS	5
1.5	EPICATEQUINA	7
2	OBJETIVO	9
3	MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1	SUBSTÂNCIA DE ESTUDO	9
3.2	VEÍCULO DE ADMINISTRAÇÃO	9
3.3	ANIMAIS	10
3.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-ULCEROGÊNICA DA EC	10
3.4.1	INDUÇÃO DE ÚLCERAS GÁSTRICAS POR ETANOL ABSOLUTO (MORIMOTO ET. AL., 1991)	11
3.4.2	INDUÇÃO DE ÚLCERAS GÁSTRICAS POR AINE (INDOMETACINA) (RAINSFORD, 1987)	11
3.5	AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DO SUCO GÁSTRICO (SHAY, 1945)	11
3.6	AVALIAÇÃO DE FATORES PROTETORES DA MUCOSA GÁSTRICA	12
3.6.1	ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO (NO) (ARRIETA ET AL., 2003) E DOS GRUPAMENTOS SULFIDRÍLICOS (SH) (MATSUDA ET AL., 1999) NO EFEITO GASTROPROTETOR DA EC CONTRA ETANOL ABSOLUTO	12
3.6.2	QUANTIFICAÇÃO DA GLUTATIONA TOTAL (GSSH) PRESENTE NA MUCOSA GÁSTRICA	12
3.6.3	QUANTIFICAÇÃO DO MUCO GÁSTRICO ADERIDO À MUCOSA GÁSTRICA (RAFATULLAH ET AL., 1990)	13

3.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA EC (STOCKS ET AL., 1974)	13
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	13
4	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	<u>14</u>
4.1	ATIVIDADE ANTI-ULCEROGÊNICA	14
4.1.1	CHARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA	14
4.1.2	CHARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA	18
4.2	AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DO SUÇO GÁSTRICO	19
4.3	AVALIAÇÃO DE FATORES PROTETORES DA MUCOSA	20
4.3.1	ENVOLVIMENTO DO NO E DOS SH NA GASTROPROTEÇÃO CONTRA ETANOL ABSOLUTO	20
4.3.2	QUANTIFICAÇÃO DA GSSH PRESENTE NA MUCOSA GÁSTRICA	22
4.3.3	QUANTIFICAÇÃO DO MUCO GÁSTRICO ADERIDO À MUCOSA GÁSTRICA	23
4.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	25
5	<u>CONCLUSÃO</u>	<u>26</u>
6	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>27</u>
7	<u>PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	<u>36</u>
7.1	RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS	36
7.2	APRESENTAÇÃO DE TRABALHO	38
7.3	ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO	38
8	<u>PRÊMIOS</u>	<u>38</u>
9	<u>ATIVIDADES EXTRA-CURRICULARES</u>	<u>39</u>

9.1	PARTICIPAÇÃO EM OUTROS PROJETOS DE PESQUISA	39
9.2	PARTICIPAÇÃO DE CONSELHOS E COMISSÕES	39
9.3	ESTÁGIOS E ATIVIDADES DE EXTENSÃO	39
9.4	PARTICIPAÇÃO DE EVENTOS	40
9.5	ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS	42
10	<u>ANEXOS</u>	<u>43</u>

Lista de Abreviaturas

AINE	Anti-inflamatório não esteroidal
ANOVA	Análise de variância
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)
EC	Epicatequina
EC25	Epicatequina na dose de 25 mg/kg
EC50	Epicatequina na dose de 50 mg/kg
EC75	Epicatequina na dose de 75 mg/kg
EPM	Erro padrão médio
GSSH	Glutathiona total
i.p.	Administração por via intraperitoneal
L-NAME	N-nitro-L-arginine methyl Ester
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P
NEM	N-ethylmaleimide
NO	Óxido Nítrico
p.o.	Administração por via oral
PG	Prostaglandina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
SH	Grupamentos sulfidrílicos não protéicos

Lista de figuras

Figura 1: Ação da EC no modelo de indução de úlcera gástrica por etanol absoluto em ratos. Resultados expressos em área ± EPM. Análise estatística entre grupos comparados ao grupo tratado com veículo: ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações, teste de Dunnett, diferença significativa quando $P < 0,05$ () ou $P < 0,01$ (**).* _____ 15

Figura 2: Ação da EC no modelo de indução de úlcera gástrica por etanol absoluto em ratos. Resultados expressos em área ± EPM. Análise estatística entre grupos comparados ao grupo tratado com veículo: ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações, teste de Dunnett, diferença significativa quando $P < 0,05$ () ou $P < 0,01$ (**).* _____ 16

Figura 3: Ação da EC no modelo de indução de úlcera gástrica por indometacina em ratos. Resultados expressos em área ± EPM. Análise estatística entre grupos comparados ao grupo tratado com veículo: ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações, teste de Dunnett, diferença significativa quando $P < 0,05$ () ou $P < 0,01$ (**).* _____ 18

Tabela 1: Escala semi-quantitativa microscópica de estômagos de ratos tratados com EC induzidos a úlceras por administração de etanol absoluto ou indometacina. _____ 19

Critérios de avaliação microscópica: hemorragia na mucosa (0-3), dano glandular (0-3), descamação da mucosa (0-3), infiltrado eosinofílico (0-3); somando uma escala total de 0 a 12. Mediana (range), Análise estatística entre grupos comparados ao grupo tratado com veículo: ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações, teste de Dunn, diferença significativa quando $P < 0,05$ (), $P < 0,01$ (**) ou $P < 0,001$ (***)*. _____ 19

Tabela 2: Efeito da administração oral ou intraduodenal da EC sobre o pH, volume do conteúdo gástrico e concentração de H^+ no modelo de ligadura de piloro em ratos. _____ 20

Análise estatística entre grupos comparados ao grupo tratado com veículo: ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações, teste de Dunnett, diferença significativa quando $P < 0,05$ () ou $P < 0,01$ (**).* ____ 20

Tabela 3: Efeito da EC contra etanol absoluto em ratos pré-tratados com NEM ou L-NAME. _____ 22

Área de lesão gástrica (mm^2) induzida por etanol absoluto em ratos pré-tratados com NEM ou Salina. Teste t não pareado com correção de Welch. a indica $P < 0,05$ na mesma coluna (entre o mesmo pré-

tratamento). *b* indica $P < 0,05$ na mesma linha (entre o mesmo tratamento oral - veículo). *c* indica $P < 0,05$ na mesma linha (entre o mesmo tratamento oral – EC50). _____ 22

Figura 4: Efeito da EC nos níveis de glutathione total presente na mucosa gástrica em ratos. Análise estatística entre grupos: ANOVA seguida pelo Teste de Múltiplas comparações de Tukey, $P < 0,05$: glutathione total expressa como $\eta\text{g/g}$ de tecido. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos. _____ 23

Figura 5: Efeito da EC nos níveis de muco aderido à parede gástrica de ratos. Análise estatística entre grupos comparados ao grupo tratado com veículo: ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações, teste de Dunnett, diferença significativa quando $P < 0,05$ (*) ou $P < 0,01$ (**): muco gástrico quantificado em $\mu\text{g/g}$ de tecido. _____ 25

Figura 6: Atividade antioxidante da EC. Ensaio de peroxidação lipídica em membrana de cérebro de ratos *in vitro*. A: curva da calibração do espectrofotômetro, B: Curva de inibição da peroxidação lipídica com concentrações crescentes de EC. _____ 26

Anexos

Anexo 1: Fotomicrografias de estômagos após indução de úlceras por administração oral de etanol absoluto. Aumento de 20x, coloração em hematoxilina e eosina. A: veículo, B: carbenoxolona (100 mg/kg), C: EC25, D: EC50, E: EC75. _____ 43

Anexo 2: Fotomicrografias de estômagos após indução de úlceras por administração oral de indometacina (100 mg/kg). Aumento de 20x, coloração em hematoxilina e eosina. A: veículo, B: carbenoxolona (100 mg/kg), C: EC25, D: EC50, E: EC75. _____ 44

Anexo 3: Fotomicrografias de estômagos após indução de úlceras por administração oral de indometacina (100 mg/kg). Aumento de 20x, coloração em Ácido periódico de Schiff. A: veículo, B: carbenoxolona (100 mg/kg), C: EC25, D: EC50, E: EC75. _____ 45

Lista de tabelas

Tabela 1: Escala semi-quantitativa microscópica de estômagos de ratos tratados com EC induzidos a úlceras por administração de etanol absoluto ou indometacina. _____ 19

Tabela 2: Efeito da administração oral ou intraduodenal da EC sobre o pH, volume do conteúdo gástrico e concentração de H^+ no modelo de ligadura de piloro em ratos. _____ 20

Tabela 3: Efeito da EC contra etanol absoluto em ratos pré-tratados com NEM ou L-NAME. _____ 22

1 Introdução

1.1 O estômago

O estômago é um órgão visceral, oco, com paredes estratificadas, e pode ser visto como uma dilatação do canal alimentar que se segue ao esôfago e é continuado pelo intestino delgado. Está situado abaixo do diafragma, com sua maior porção à esquerda do plano mediano corpóreo. É composto por dois orifícios, um proximal (óstio cárdico) e outro distal (óstio pilórico), ambos possuem esfíncteres denominados, respectivamente, cárdia e piloro. As duas margens do estômago são denominadas curvatura maior, à esquerda, e curvatura menor, à direita; entre a parte vertical desta última existe um sulco, a incisura angular, que corresponde, aproximadamente, ao limite do antro pilórico (Dangelo, 2007).

O estômago possui três áreas topográficas: o fundo, o corpo gástrico e a região pilórica que por sua vez é subdividida em antro pilórico, canal pilórico e o piloro propriamente dito (Dangelo, 2007).

Sua forma e posição se modificam de acordo com mudanças em seu interior e das vísceras que o circundam. Sua capacidade varia de 30 ml ao nascimento, aumentando para 1000 ml na puberdade e atingindo 1500 ml no adulto (Bannister, 1995).

Ele é composto por três áreas topográficas (fundo, corpo e antro) e dois funcionais (oxíntica e pilórica) (Schubert e Peura, 2008). A área das glândulas oxínticas é onde se localizam as células oxínticas (do grego *oxys*, ácido) ou parietais e cobrem cerca de 80% do órgão (fundo e corpo). A área pilórica é composta pelas células G ou liberadoras de gastrina e ocupam a área do antro (Schubert e Peura, 2008).

Quando a mucosa gástrica é normal, o muco pode prevenir a digestão da parede gástrica, mesmo que a concentração de íons hidrogênio é 3-4 milhões de vezes mais alta que no sangue. A maioria das ulcerações é causada por um enfraquecimento da habilidade

protetora da mucosa provocado por aumento dos fatores agressivos (Wallace e Granger, 1996; Maity *et al.*, 2003).

1.2 Úlceras gástricas

Por mais de um século, a úlcera péptica foi considerada a maior causa de morbidade e mortalidade (Chan e Leung, 2002). No entanto, ela ainda é considerada um grave fator de morbidade havendo alto índice de morte em casos extremos, como em úlceras hemorrágicas promovidas pelo estresse (Sontaj, 1997; Spirit, 2004).

Úlcera gástrica é caracterizada por lesões que penetram nas camadas da mucosa gástrica (Wallace, 2008). Sua etiopatogênese envolve fatores genéticos, distúrbios fisiopatológicos e fatores ambientais, porém a teoria mais aceita é que úlceras gástricas são causadas por um desequilíbrio entre os fatores protetores e os fatores agressivos presentes no ambiente dinâmico dentro do estômago (Wallace e Granger, 1996; Maity *et al.*, 2003). Entre os fatores protetores existem as prostaglandinas, mediadores gasosos (óxido nítrico e sulfeto de dihidrogênio), grupamentos sulfidrílicos, camada epitelial, renovação do epitélio, fluxo sanguíneo adequado, muco e bicarbonato; e entre os fatores agressores existem a secreção ácida, a pepsina, radicais livres, presença da bactéria *Helicobacter pylori* e agentes necróticos (etanol, água quente, bases, ácidos, detergentes, citotoxinas entre outros) (Wallace e Granger, 1996).

As úlceras gástricas podem ser assintomáticas, hemorrágicas ou perfurantes e tem maior possibilidade de ocorrência quando estão associadas a infecções virais e bacterianas, tuberculose, insuficiência renal crônica, sarcoidose, doenças mieloproliferativas e existem casos de doenças críticas associadas à úlcera gástrica, como a trombose, embolia e cirurgias que podem levar a um quadro de hipoperfusão da artéria esplênica causando necrose de coagulação no tecido gástrico (Ziegler, 2005).

No Brasil, não há dados oficiais, mas os custos nos EUA do tratamento desta doença são estimados em 10 bilhões de dólares por ano, e anualmente surgem aproximadamente 500 mil novos casos; 100 mil pacientes são hospitalizados e pelo menos 3 mil pessoas morrem em decorrência dessa enfermidade nos EUA (Cotram, 1999; Ramakrishnan *et al.*, 2007). A úlcera péptica ocorre em 5% a 10% da população; O'Malley (2003) considerou-a a epidemia do século, pois a úlcera também pode ser causada por estresse e hábitos comuns como o tabagismo, consumo de álcool, alimentação desbalanceada de baixo valor nutricional e uso contínuo de drogas anti-inflamatórias não esteroidais (Kamath, 2008).

1.3 Terapêutica atual

A terapêutica atual consiste, principalmente, em inibir a secreção ácida. A introdução dos antagonistas de receptores H₂, como a cimetidina e inibidores da bomba de prótons, como o lansoprazol, está associada ao aumento da taxa de cura de úlceras gástricas, porém seu uso prolongado causa uma série de efeitos colaterais. Os antagonistas de receptores H₂ podem causar diarreia, fadiga, dor muscular, constipação e, raramente, delírio, alucinações, confusão mental, galactorrêia em mulheres; e ginecomastia, diminuição na produção de espermatozoides e impotência sexual em homens. Estes antagonistas de receptores H₂ também atravessam a barreira placentária e passam para o leite materno. Os efeitos adversos dos inibidores de H⁺/K⁺-ATPase incluem náusea, constipação, dor abdominal e diarreia, inibem algumas enzimas do sistema citocromo P450, que pode resultar na diminuição da depuração de benzodiazepínicos, fenitoína e warfarin, além de causar câncer (DeLucia *et al.*; 2007). Ambas as classes de fármacos inibidores da secreção ácida causam também a

hipergastrinemia, definida como um aumento acima do normal de gastrina sérica e redução do pH luminal (Orlando *et al.*, 2007).

As úlceras gástricas podem apresentar chance de cura superior a 95%, mas a probabilidade de reincidência está entre 65-80% um ano após a cura e quase 100% depois de dois anos. O tratamento e cura de recidivas ainda é um sério problema na clínica (Fan *et al.*, 2005).

A eficiência no tratamento farmacológico, tanto para cura ou prevenção das úlceras, não depende apenas do bloqueio da secreção ácida, mas também do aumento dos fatores protetores da mucosa. Nesse sentido, a terapêutica atual também oferece fármacos que são derivados de prostaglandina (misoprostol) e modificadores da secreção de muco (carbenoxolona). A incidência de efeitos adversos do misoprostol é mínima, porém sua comercialização no Brasil é proibida, pois estava sendo utilizado como abortivo devido a sua capacidade de aumentar a motilidade uterina (DeLucia *et al.*; 2007). Os efeitos adversos mais frequentes da carbenoxolona são o hiperaldosteronemismo com hipertensão, tal fato ocorre porque a carbenoxolona liga-se às proteínas plasmáticas competindo por seus sítios de ligação com a aldosterona (DeLucia *et al.*; 2007).

Essas considerações levam a promover a pesquisa de novos fármacos. O uso de plantas medicinais, seus extratos e suas respectivas substâncias isoladas têm mostrado resultados promissores no tratamento e na prevenção de úlceras gástricas; tais resultados foram demonstrados nos relatórios dos projetos temáticos “Bioprospecção de plantas superiores do estado de São Paulo” (Proc. 02/05503-6) e “Avaliação do Potencial da Flora do Cerrado em Tratamento de Lesões de Mucosa Gástrica e Intestinal em Modelos Experimentais” (Proc. 06/55542-9).

1.4 Plantas medicinais

A utilização de plantas com fins medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (Fabricant e Farnsworth, 2001; Veiga Jr *et al.*, 2005; Gurib-Fakim, 2006). O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana (Maciel *et al.*, 2002).

Ao longo do tempo têm sido registrados variados procedimentos clínicos tradicionais utilizando plantas medicinais. Apesar da grande evolução da medicina alopática a partir da segunda metade do século XX, existem obstáculos básicos na sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de exames e medicamentos. Estes motivos associados com a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais contribuem para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (Veiga Jr *et al.*, 2005), subsidiando a importância do estudo farmacológico das plantas medicinais.

Cerca de 25% das drogas prescritas a redor do mundo vêm das plantas, 121 como compostos ativos em uso corrente. Entre as 252 drogas consideradas como básicas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 11% são de origem exclusivamente vegetal e um número significativo são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais (Rates *et al.*, 2001; Fabricant e Farnsworth, 2001). 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).

Estima-se, no Brasil, a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microorganismos. O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies (Dias, 1996). Entretanto, o uso de plantas superiores como fonte de novas drogas é ainda pouco explorado. Uma pequena porcentagem da flora tem sido investigada fitoquimicamente e uma porcentagem ainda menor (5000 espécies) foi estudada em suas propriedades farmacológicas (Rates *et al.*, 2001).

Entretanto, muitas vezes as supostas propriedades farmacológicas anunciadas não possuem validade científica, por não terem tido suas ações farmacológicas comprovadas em testes científicos pré-clínicos (Veiga Jr *et al.*, 2005), nos quais a elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas e seus mecanismos de ação vêm sendo um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e farmacologia (Maciel *et al.*, 2002).

As plantas são importantes fontes de produtos biologicamente ativos, sendo consideradas como um promissor caminho para a descoberta de novas drogas. Pressões evolutivas selecionaram metabólitos nas plantas gerando compostos de valor adaptativo, os denominados metabólitos secundários, que facilitam a adequação da planta produtora ao seu meio (Simões *et al.*, 2004). Esta é a base científica que explica a presença de moléculas bioativas, eventualmente terapêuticas, encontradas nas plantas (Fabricant e Farnsworth, 2001; Chadwick, 2006)

As informações existentes sobre a magnitude do mercado de compostos de origem vegetal são pouco precisas, na década de 90 estimativas revelaram que o mercado mundial de produtos farmacêuticos movimentou US\$ 320 bilhões/ano, dos quais US\$ 20 bilhões são originados de substâncias ativas derivadas de plantas (Robbers *et al.*, 1996); no início desta década, plantas e seus derivados têm sido as maiores fontes de drogas, movimentando cerca de 30% do mercado farmacêutico (Kirkpatrick, 2002). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), devido à pobreza ou a falta de acesso a medicamentos modernos, cerca de 60 a 80% da população dos países em desenvolvimento dependem essencialmente das plantas para os cuidados primários com a saúde (Fabricant e Farnsworth, 2001). Esta é a base da importância científica e social do estudo das plantas medicinais.

A pesquisa sistemática para a obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica pode ser executada por meio de vários processos. Os mais utilizados são a síntese de novas moléculas, a modificação molecular de substâncias naturais e/ou sintéticas com propriedades farmacológicas definidas, extração, isolamento e purificação de novos compostos de fontes naturais, especialmente de origem vegetal, a qual se caracteriza como uma fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas como medicamento. Por outro lado, as plantas medicinais devem ser consideradas não apenas como matéria-prima, ponto de partida para a descoberta de novas moléculas, mas também como um recurso natural potencialmente ativo na forma de fitoterápico padronizado e eficaz (Di Stasi, 2007).

1.5 *Epicatequina*

Os polifenóis são, indiscutivelmente, os mais pesquisados fitoquímicos nutricionais (Gescher, 2010). Compostos fenólicos formam uma grande classe de

substâncias que possuem uma hidroxila ligada a um anel aromático. Inúmeras subclasses existem e são classificadas como fenóis simples, fenilpropanóides, flavonóides, taninos e quinonas (Leland *et al.*, 2006).

As proantocianidinas, também conhecidas como taninos condensados ou oligômeros são polímeros formados por pelo menos duas unidades de flavan-3-ol (catequinas) (De Bruyne *et al.*, 1999; Khanbabaee e van Ree, 2001), que são a segunda classe mais abundante de compostos fenólicos naturais depois da lignina (De Bruyne *et al.*, 1999), tais substâncias possuem atividade gastroprotetora em ulcerações causadas por estresse. Essa proteção está relacionada com a inibição da secreção ácida via célula G e diminuição da atividade da enzima superóxido dismutase (Iwasaki *et al.*, 2004). Elas também têm a capacidade de precipitar proteínas no local da ulceração formando uma película protetora que evita a absorção de substâncias tóxicas e resiste ao ataque de enzimas proteolíticas (John e Anabanjo, 1990; Nwafor *et al.*, 1996). Proantocianidinas estão presentes em muitos alimentos e apresentam atividade antioxidante e anti-inflamatória.

A epicatequina (EC), isômero da catequina, é um polifenol que atenua ou previne lesões na mucosa do trato gastrointestinal que são induzidas por inúmeros agentes agressivos, tais como *Helicobacter pylori* e estresse (Ito *et al.*, 2008). A propriedade antioxidante dos polifenóis reduz o dano causado por radicais livres de espécies de oxigênio-reativos e nitrogênio-reativos, que quando presentes levam ao dano na mucosa gástrica em resposta a agentes lesivos como o álcool ou drogas anti-inflamatórias não-esteroidais. Tais radicais livres causam peroxidação lipídica nos tecidos atacando ácidos graxos insaturados, que por sua vez causam o estresse oxidativo. Portanto, a EC pode prevenir o estresse oxidativo e as consequentes lesões teciduais por neutralização dos efeitos causados pelos radicais livres e não livres (Odabasoglu, 2008).

2 Objetivo

O objetivo deste projeto é avaliar a capacidade antiulcerogênica e citoprotetora da EC, e caracterizar os prováveis mecanismos de ação da mesma em modelos experimentais.

3 Material e Métodos

3.1 Substância de estudo

A substância utilizada neste projeto foi a (-)-epicatequina (EC) sintética fornecida pela empresa Sigma[®] nas respectivas doses: 25 (EC25), 50 (EC50) e 75 (EC75) mg/kg para os ensaios biológicos de “Indução de úlceras gástricas por etanol absoluto” e “Indução de úlceras gástricas por AINE (indometacina)”. Após a realização e análise estatística (teste de múltiplas comparações de Dunnett) de ambos os experimentos, uma única dose de EC foi selecionada para verificação de seus principais mecanismos de ação.

3.2 Veículo de administração

Em doses superiores a 10 mg/kg a EC é insolúvel em solução salina, a EC permanecia na forma de cristais mesmo após muito tempo de tentativas de solubilização no ultra-som (MaxiCleaner 750).

A solução encontrada para solubilizar a EC foi adicionar 10% de etanol absoluto à salina (salina alcoólica). O material foi submetido ao ultra-som durante dez minutos antes da administração. Para padronizar a técnica e não ocorrer alteração entre os grupos, todas as soluções de tratamento foram solubilizadas nesse veículo e colocadas no ultra-som, incluindo controle positivo (carbenoxolona).

Foi feito um experimento piloto para comparar o efeito entre o grupo salina e o novo veículo, a salina alcoólica, no modelo experimental de “Indução de úlceras gástricas por etanol absoluto” e constatou-se que não houve diferença estatística entre estes grupos.

3.3 Animais

Ratos Wistar machos (180 a 250g) provenientes do Biotério Central da UNESP, aclimatados às condições do biotério do Departamento de Morfologia por pelo menos vinte e um dias antes da manipulação experimental, sob temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro (12 horas) controlados. Os animais foram alimentados com ração Guabi[®] destrusada e água *ad libitum*. Todos os experimentos obedeceram aos protocolos experimentais n^o 002/04-CEEA submetidos e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu.

3.4 Avaliação da atividade anti-ulcerogênica da EC

Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos (n=7): tratados (EC25, EC50 e EC75), controle negativo (não tratados) e controle positivo (tratados com carbenoxolona 100 mg/kg ou cimetidina 100 mg/kg). Todos os animais passaram por 24h de jejum antes da realização de cada ensaio biológico, mantidos em pisos elevados para evitar a coprofagia. Após cada experimento, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados e escaneados para a medida da área (mm²) das úlceras gástricas pelo programa *AVSoft*.

3.4.1 *Indução de úlceras gástricas por etanol absoluto (Morimoto et. al., 1991)*

Após jejum os animais foram aleatoriamente separados em 5 grupos. Os animais de cada grupo recebem os respectivos tratamentos p.o.: salina alcoólica, carbenoxolona 100 mg/kg, EC25, EC50 ou EC75. Após uma hora da administração dos tratamentos, todos os animais receberam 1 mL de etanol absoluto, decorridos mais 60 min. os animais foram sacrificados, os estômagos foram retirados e abertos pela curvatura maior para análises bioquímicas; macro e microscópicas.

3.4.2 *Indução de úlceras gástricas por AINE (indometacina) (Rainsford, 1987)*

Após jejum os animais foram aleatoriamente separados em 5 grupos. Trinta minutos antes da indução de úlceras gástricas por indometacina (100 mg/kg), os animais de cada grupo receberam os respectivos tratamentos p.o.: salina alcoólica, cimetidina 100 mg/kg, EC25, EC50 ou EC75. Após 5h da indução de úlceras, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados e abertos pela curvatura maior para análises macro e microscópicas.

3.5 *Avaliação de parâmetros do suco gástrico (Shay, 1945)*

Randomicamente separados em 3 grupos experimentais após 24h de jejum, os animais receberam veículo, cimetidina 100 mg/kg ou EC50 trinta minutos antes da ligadura de piloro (p.o.) ou imediatamente antes da mesma (i.p.). Quatro horas após a ligadura, os animais foram sacrificados, o abdômen foi aberto e outra ligadura foi colocada na cárdia. Os estômagos foram removidos, inspecionados internamente e seus conteúdos foram drenados em tubos graduados e por fim centrifugados a 2000 xg (3500 rpm) por 15 min. O conteúdo ácido total do suco gástrico foi determinado por titulação

para pH 7,0 com 0,01 NaOH usando uma bureta digital (E.M., Hirschmann Technicolor, Alemanha). Os resultados foram expressos em mEquiv./mL/4h.

3.6 Avaliação de fatores protetores da mucosa gástrica

3.6.1 Envolvimento do óxido nítrico (NO) (Arrieta et al., 2003) e dos grupamentos sulfidrílicos (SH) (Matsuda et al., 1999) no efeito gastroprotetor da EC contra etanol absoluto

Os ratos foram separados aleatoriamente em 6 grupos, onde dois grupos foram pré-tratados (i.p.) com salina, outros dois com L-NAME (N-nitro-L-arginine methyl ester 70 mg/kg, um inibidor da síntese de NO) e outros dois com NEM (N-ethylmaleimide 10mg/kg, um depletor de SH). Trinta minutos depois dos pré-tratamentos, os grupos de cada pré-tratamento foram tratados (p.o.) com veículo ou EC50. Decorridos 60 minutos, todos os animais receberam (p.o.) 1 mL de etanol absoluto e, uma hora após a administração do agente lesivo, os animais foram sacrificados para determinação da área ulcerada (mm²).

3.6.2 Quantificação da glutathiona total (GSSH) presente na mucosa gástrica

Amostras de estômagos que foram coletadas após indução de úlceras por etanol absoluto foram lavadas em solução salina, pesadas, homogeneizadas e centrifugadas. O sobrenadante foi retirado e colocado sob reação que é baseada no método de oxidação total de glutathiona presente no tecido pelo reagente DTNB (5, 5'-dithiobis 2-nitrobenzoic acid), seguida da redução desta forma oxidada pela enzima glutathiona redutase e NADPH (Anderson, 1985). A concentração da glutathiona reduzida foi

determinada pela velocidade de redução do DTNB que gera uma onda detectável em espectrofotômetro a 412 nm.

3.6.3 *Quantificação do muco gástrico aderido à mucosa gástrica (Rafatullah et al., 1990)*

Uma hora após a administração (p.o.) de veículo, carbenoxolona 200 mg/kg ou EC50 em três grupos de animais, foi feita a ligadura de piloro. Quatro horas após o procedimento cirúrgico, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados e sua porção aglandular foi retirada, a porção glandular foi imersa em solução de alcian blue para posterior quantificação do muco por espectrofotometria à 598 nm. Os resultados foram expressos em µg de muco/g de tecido.

3.7 *Avaliação da atividade antioxidante da EC (Stocks et al., 1974)*

Ratos wistar machos (n=2) foram sacrificados para a retirada de todo o conteúdo encefálico, que foi processado para posterior peroxidação lipídica induzida por sulfato ferroso e ácido ascórbico. O principal produto da peroxidação lipídica é o malonil-dialdeído (MDA), portanto a atividade antioxidante é baseada na reação colorimétrica do MDA com o ácido tiobarbitúrico e quantificada por espectrofotometria a 532 nm. Resultado expresso em CI (µg/ml) de 50% da peroxidação lipídica induzida.

3.8 *Análise estatística*

Dados paramétricos foram expressos na forma de média ± erro padrão da média e submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste *a posteriori* de múltiplas comparações de Dunnett. Dados não paramétricos (escala microscópica) foram expressos na forma de mediana (range) e submetidos à análise de variância de

uma via (ANOVA), seguida pelo teste *a posteriori* de Dunn. Todas as análises foram feitas pelo software *GraphPad Instat* com nível de significância mínimo de $p < 0,05$.

4 Resultados e Discussão

4.1 Atividade Anti-ulcerogênica

4.1.1 Caracterização Macroscópica

Altas concentrações de etanol levam a um aumento da permeabilidade epitelial, como consequência de mudanças da diferença de potencial celular que é causado pela re-difusão de íons H^+ através da mucosa lesada, e danos da mucosa principalmente devido aos distúrbios vasculares e diminuição do fluxo sanguíneo local (Siegmund *et al.*, 2003). O etanol também é capaz de alcançar o epitélio da mucosa através do rompimento da barreira muco-bicarbonato e suas ações celulares refletem em ruptura da parede dos vasos sanguíneos, sendo as hemorragias a consequência das lesões gástricas observadas neste modelo (Mincis *et al.*, 1995). A sua administração também aumenta a peroxidação lipídica, reduz os níveis de SOD (superóxido dismutase), catalase, glutatona reduzida e grupamentos sulfidrílicos não-protéicos (GSH) das células que é um dos mais importantes fatores de proteção da mucosa gástrica (Repetto e Llesuy, 2002; Bafna e Balaram, 2004), depleta o muco contido na parede gástrica (Al-Howiriny *et al.*, 2003), estimula a formação do leucotrieno C4 (LTC4), de produtos secretados por mastócitos (Oates e Hakkinen, 1988) e de espécies reativas de oxigênio (Mizui *et al.*, 1987), resultando em dano à mucosa gástrica. Esses efeitos provavelmente se devem a ações de lipoperoxidação, formação de radicais livres, estresse oxidativo intracelular, alterações na permeabilidade e despolarização da membrana que precedem a morte celular (Repetto e Llesuy, 2002) por danos ao DNA e diminuição dos grupamentos

sulfidrílicos não-protéicos (GSH) das células que é um dos mais importantes fatores de proteção da mucosa gástrica (Repetto e Llesuy, 2002).

As primeiras doses de EC foram 3, 5 e 10 mg/kg, tais doses foram escolhidas com base nos resultados obtidos por Farias-Silva *et al.* (2007) com a substância índigo, que é uma substância com alto poder oxidante obtida das folhas da *Indigofera truxillensis* Kunth (Fabaceae) e popularmente indicada para gastrite, tais semelhanças nos levaram a utilizar doses semelhantes às utilizadas por Farias-Silva *et al.* (2007), porém essas doses não foram efetivas na citoproteção da mucosa gástrica durante os ensaios de indução de úlcera por etanol absoluto, entretanto os nossos resultados mostram que a dosagem não foi efetiva (**Figura 1**). Então, foi estabelecida uma nova curva dose resposta de 25, 50 e 75 mg/kg para os testes com a EC.

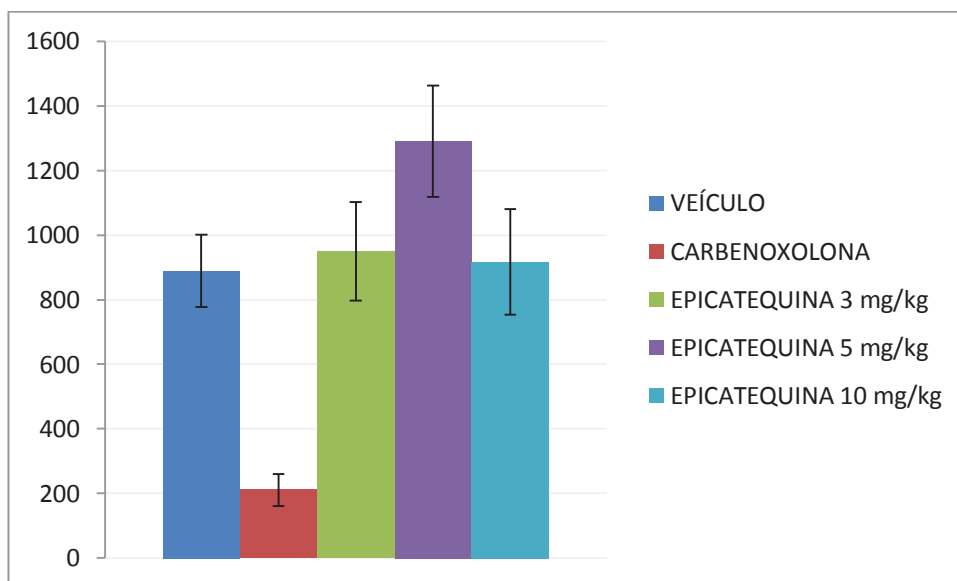


Figura 1: Ação da EC no modelo de indução de úlcera gástrica por etanol absoluto em ratos. Resultados expressos em área \pm EPM. Análise estatística entre grupos comparados ao grupo tratado com veículo: ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações, teste de Dunnett, diferença significativa quando $P < 0,05$ (*) ou $P < 0,01$ (**).

As novas doses estabelecidas de EC preveniram lesões causadas pela administração de etanol; a EC50 teve o melhor efeito citoprotetor, mostrando-se mais

efetiva e duas vezes mais potente que a carbenoxolona (controle positivo), oferecendo efeito gastroprotetor de 94,83% (**Figura 2**).

A substância isolada preveniu a formação de úlceras com potência equivalente aos extratos e as frações isoladas de plantas que continham a EC em sua composição fitoquímica, tais como a *Mouriri pusa* (Andreo *et al.*, 2006; Vasconcelos *et al.*, 2008) e a *Virola surinamensis* Warb. (Myristicaceae) (Hiruma-Lima *et al.*, 2008), portanto os resultados obtidos neste trabalho podem indicar que a EC era o composto responsável pelo efeito gastroprotetor obtido pelas frações e extratos das plantas citadas.

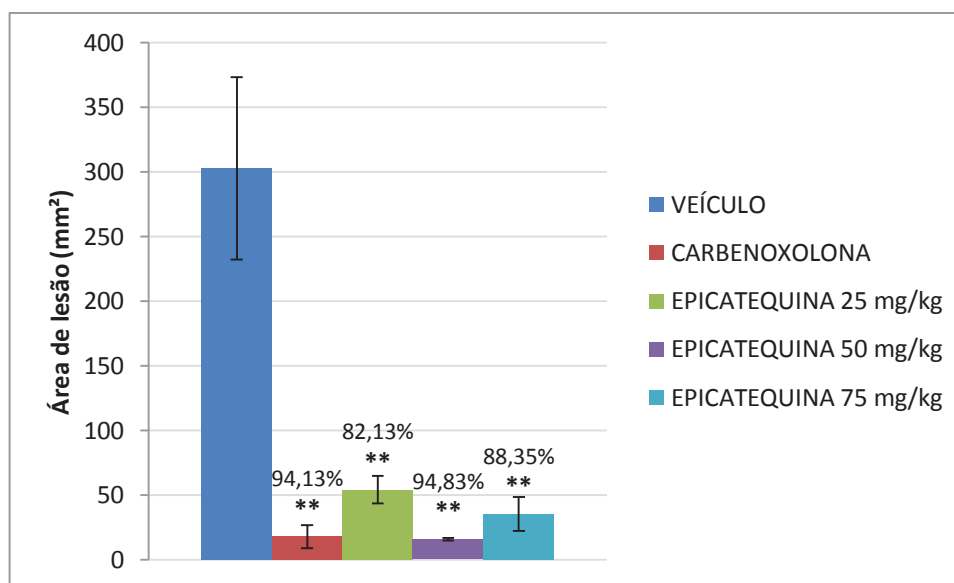


Figura 2: Ação da EC no modelo de indução de úlcera gástrica por etanol absoluto em ratos. Resultados expressos em área \pm EPM. Análise estatística entre grupos comparados ao grupo tratado com veículo: ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações, teste de Dunnett, diferença significativa quando $P < 0,05$ (*) ou $P < 0,01$ (**).

Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) reduzem os níveis de prostaglandinas E_2 (PGE_2) por inibição das cicloxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2). As PGE_2 estimulam a síntese de muco e bicarbonato e regulam a secreção ácida e o fluxo sanguíneo que nutre a mucosa gástrica. (Halter *et al.*, 2001). A redução dos níveis de PGE_2 compromete a integridade da mucosa gástrica devido ao comprometimento da barreira protetora que é composta majoritariamente por muco e bicarbonato, facilitando lesões causadas por secreções gástricas, tanto ácidas quanto enzimáticas; fato que pode ser observado no grupo controle (Salina Alcoólica) (**Figura 3**). A Indometacina, um AINE,

induz úlceras gástricas através de vários processos, incluindo geração de espécies reativas de oxigênio, inibição da síntese de PGE₂, infiltração de leucócitos polimorfonucleares, indução de apoptose, iniciação da peroxidação lipídica (Yoshikawa *et al.*, 1993) e diminuição da produção de muco resultando em úlceras hemorrágicas (Bech *et al.*, 2000).

A EC apresentou redução significativa do dano causado pela administração de indometacina (**Figura 3**), no entanto sua dose efetiva na gastroproteção mostrou-se menor que a observada na indução de úlceras por etanol absoluto. A curva dose-resposta não é dose dependente (**Figura 3**), corroborando com os dados da literatura que mostram que a EC é antioxidante em doses baixas e pró-oxidante em doses altas (Luchini *et al.*, 2008). Muitos outros polifenóis possuem efeito dual na síntese de prostaglandina, em doses baixas estimulam a PG-sintase e em altas doses a inibem. Estimulam-na por sua ação redutora dos componentes intermediários oxidados da biossíntese de prostaglandina, acelerando o ciclo da peroxidase; e também atuam como co-substratos doadores de elétrons para o componente peroxidase da PG-sintase. Inibem-na em altas doses via inibição da atividade da COX-2 por competição alostérica no sítio de ligação do ácido aracdônico e também por competição na redução da PG-sintase.

Andreo *et al.* (2006) verificou que o extrato metanólico de folhas de *Mouriri pusa* também oferece citoproteção contra AINE (piroxicam) em baixas doses e em altas doses a gastroproteção não é significativa, eles acreditam que tal efeito ocorre devido à composição química do extrato, que é constituído por catequinas e inúmeros flavonóides, e associam-no ao efeito dual de compostos polifenólicos descrito acima (Andreo *et al.*, 2006; Luchini *et al.*, 2008). Eles também discutiram que a presença da

EC poderia estar associada à gastroproteção do extrato frente ao piroxicam devido à sua capacidade em inibir peroxidação lipídica e por sua potente atividade antioxidante.

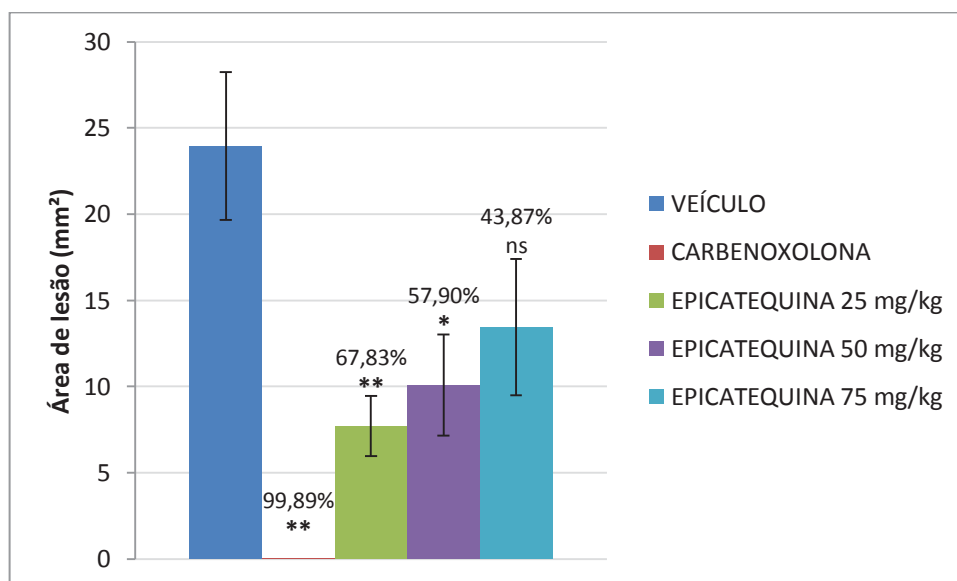


Figura 3: Ação da EC no modelo de indução de úlcera gástrica por indometacina em ratos. Resultados expressos em área \pm EPM. Análise estatística entre grupos comparados ao grupo tratado com veículo: ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações, teste de Dunnett, diferença significativa quando $P < 0,05$ (*) ou $P < 0,01$ (**).

4.1.2 Caracterização Microscópica

Análises microscópicas do material também mostram que a EC protege o estômago contra danos causados pelos dois agentes lesivos (etanol e indometacina) em nível microscópico (**Tabela 1**), diminuindo o dano tecidual em quatro parâmetros: hemorragia da mucosa, dano glandular, descamação da mucosa e infiltrado eosinofílico.

A EC mostrou efeito gastroprotetor contra o agente lesivo etanol em E25, E50 e E75, indicando a efetiva ação de proteção da mucosa gástrica pela EC por prevenção de lesões hemorrágicas, danos glandulares, por diminuição da infiltração eosinofílica e da descamação de células da mucosa gástrica promovidas pelo agente lesivo (Anexo 1).

As análises microscópicas das úlceras induzidas por indometacina indicam que a E25 e E50 diminuem estatisticamente as lesões microscópicas (danos glandulares, hemorragia, infiltrados leucocitários e descamação da mucosa) (**Tabela 1**) comparadas ao grupo controle negativo, contudo a EC75 não diminuiu estatisticamente os danos em

nível microscópico (**Tabela 1**, Anexo 2), corroborando com os resultados obtidos nas análises macroscópicas e com os dados da literatura (Luchini *et al.*, 2008).

Tabela 1: Escala semi-quantitativa microscópica de estômagos de ratos tratados com EC induzidos a úlceras por administração de etanol absoluto ou indometacina.

Grupos Experimentais	Escala Semi-Quantitativa Microscópica	
	Úlceras induzidas por etanol	Úlceras induzidas por indometacina
Veículo	11 (11-12)	8 (5-11)
Controle positivo	4,5 (2-7) ***	4 (2-6) **
EC25	6 (3-8) **	3 (2-6) **
EC50	3 (2-3) ***	5 (2-7) *
EC75	3 (2-3) ***	5 (4-10)

Crítérios de avaliação microscópica: hemorragia na mucosa (0-3), dano glandular (0-3), descamação da mucosa (0-3), infiltrado eosinofílico (0-3); somando uma escala total de 0 a 12. Mediana (range), Análise estatística entre grupos comparados ao grupo tratado com veículo: ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações, teste de Dunn, diferença significativa quando $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**) ou $P < 0,001$ (***).

4.2 Avaliação de parâmetros do suco gástrico

O ácido clorídrico do estômago facilita a absorção de proteínas, ferro, cálcio e vitamina B₁₂, além de prevenir crescimento bacteriano e posterior infecção entérica. (Schubert, 2010). Porém, quando as quantidades de ácido e de pepsina excedem os mecanismos de defesa da mucosa, ocorre a úlcera. Para que isso não ocorra, a secreção gástrica deve ser precisamente regulada. Isto é possível por uma série de ações coordenadas e interações neurais, hormonais e vias parácrinas; ou seja, por estímulos que se originam no cérebro ou reflexos de estímulos originados no próprio estômago (distensão, presença de proteínas e ácido) (Schubert, 2010).

Ao proceder a ligadura de piloro, as ulcerações são formadas em decorrência da hipersecreção gástrica. Acredita-se que esta hipersecreção ácida seja estimulada por reflexo vago-vagal devido à distensão gástrica provocada pelo aumento do volume gástrico devido à obstrução do piloro. Este procedimento estimula a secreção do hormônio gastrina, cuja função no trato gástrico é estimular as células parietais a secretarem HCl (Baggio *et al.*, 2003). Na forma de administração intraduodenal, onde se

avalia o efeito sistêmico da droga sobre o controle da secreção gástrica, onde a EC50 diminuiu o volume da secreção gástrica (Tabela 2) em relação aos animais tratados com o veículo. Apesar da diminuição do volume da secreção gástrica promovida pela administração de EC, não houve alteração na concentração de íons H^+ (Tabela 2).

Contudo, a EC50 diminuiu estatisticamente a concentração de íons H^+ em ratos tratados oralmente e não alterou o volume luminal total. Tal fato nos permite sugerir que a administração de EC50 via oral pode diminuir a secreção ácida no estômago, ou seja, a EC possui efeito gastroprotetor por atuação local e não sistêmica.

Tabela 2: Efeito da administração oral ou intraduodenal da EC sobre o pH, volume do conteúdo gástrico e concentração de H^+ no modelo de ligadura de piloro em ratos.

Via de Administração	Tratamento	Volume do suco gástrico (mL)		Concentração de íons H^+ (mEq H^+ /mL/4h)	
Intraduodenal	Veículo	3,45±0,37		7,82±0,45	
	Cimetidina	2,08±0,16	**	4,20±0,63	**
	E50	1,82±0,15	**	7,64±1,29	ns
Oral	Veículo	1,22±0,80		8,03±1,28	
	Cimetidina	1,17±0,36	ns	2,49±0,47	**
	E50	1,80±0,55	ns	4,56±0,56	*

Análise estatística entre grupos comparados ao grupo tratado com veículo: ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações, teste de Dunnett, diferença significativa quando $P < 0,05$ (*) ou $P < 0,01$ (**).

4.3 Avaliação de fatores protetores da mucosa

4.3.1 Envolvimento do NO e dos SH na gastroproteção contra etanol absoluto

Estudos indicam que o NO está envolvido na preservação da mucosa em modelos experimentais de úlcera gástrica por promover redução da peroxidação lipídica e também por uma ação anti-inflamatória nos tecidos (Cho, 2001; Kwiecién *et al.*, 2002; Ancha *et al.*, 2003), além de ser importante na regulação de secreção ácida e básica do estômago, na secreção de muco e no fluxo sanguíneo da mucosa gástrica (Andreo *et al.*, 2006). Porém, o papel do NO na regulação e manutenção das funções da mucosa gástrica ainda não é totalmente conhecido (Khattab *et al.*, 2001).

Para investigar o envolvimento do NO endógeno na citoproteção, ratos foram pré-tratados com um inibidor da NO sintase (L-NAME); para verificar o efeito gastroprotetor da EC na indução de úlceras gástricas por etanol absoluto. Os resultados mostram que o efeito gastroprotetor não foi alterado com sua administração (**Tabela 3**), indicando que o mecanismo de ação da EC não envolve a participação de NO para promoção de seu efeito gastroprotetor.

Os nossos resultados contrariam os dados obtidos com o extrato metanólico de folhas de *Mouriri pusa* que é um extrato rico em EC (Andreo *et al.*, 2006), onde foi demonstrado que a participação do NO é essencial para o efeito citoprotetor do extrato. A diferença entre os resultados pode ser devido a outros elementos presentes no extrato, que é constituído, além da EC, por catequina e doze flavonóides e seus glicosídeos, que provavelmente são as substâncias que dependem do envolvimento da participação do óxido nítrico para exercer efeito gastroprotetor frente a lesões induzidas por etanol absoluto.

Outra possível explicação é que o NO foi produzido por uma via independente da NO-sintase. A produção de NO por uma via independente da NO-sintase ocorre quando há uma demanda de compostos nitrogenados, tais como o nitrito e nitrato da saliva; um pH ácido, tal como o do estômago, e a presença de agentes redutores como compostos polifenólicos (Lundberg e Weitzberg, 2010). Portanto seria mais apropriado afirmar que o efeito gastroprotetor exercido pela EC não depende do envolvimento da enzima NO-sintase.

Os grupamentos sulfidrílicos participam da proteção da mucosa pela ligação a radicais-livres, atuando como um antioxidante e; por formar pontes de dissulfeto entre as subunidades do muco de maneira a impedir a sua dissociação, deixando-o menos hidrofílico (Avila *et al.*, 1996). Esses grupamentos estão presentes na glutatona, uma

substância endógena que, em sua forma reduzida, tem importância na redução do estresse oxidativo, por eliminar radicais livres, reduzir formação de peróxidos e 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 e 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 grande aumento das lesões gástricas em todos os grupos experimentais, revertendo grande parte do efeito gastroprotetor da EC (**Tabela 3**).

Portanto, a EC não tem seu efeito gastroprotetor revertido com a administração do inibidor da NO-sintase (L-NAME), porém quando os grupamentos sulfidrílicos são depletados pelo NEM, a gastroproteção contra o etanol desaparece (**Tabela 3**).

Tabela 3: Efeito da EC contra etanol absoluto em ratos pré-tratados com NEM ou L-NAME.

Pré-Tratamento (i.p)	Salina	NEM	L-NAME
Tratamento (p.o)	Veículo	Veículo	Veículo
Área da Lesão (mm ²)	251,68±46,59 _{a,b}	1157,40±266,09 _b	287,46±63,04 _a
Gastroproteção (%)	-	-	-
Tratamento (p.o)	EC	EC	EC
Área da Lesão (mm ²)	30,11±10,61 _{a,c}	558,70±86,11 _c	117,61±45,98 _a
Gastroproteção (%)	88,04	51,73	59,09

Área de lesão gástrica (mm²) induzida por etanol absoluto em ratos pré-tratados com NEM ou Salina. Teste t não pareado com correção de Welch. *a* indica P < 0,05 na mesma coluna (entre o mesmo pré-tratamento). *b* indica P < 0,05 na mesma linha (entre o mesmo tratamento oral - veículo). *c* indica P < 0,05 na mesma linha (entre o mesmo tratamento oral - EC50).

4.3.2 Quantificação da GSSH presente na mucosa gástrica

A indução de úlcera gástrica por etanol absoluto esta associada à redução de compostos sulfidrílicos, especialmente a glutatona intracelular (GSH) (Szabo e Brown, 1987), que possui importante papel no funcionamento do sistema antioxidante enzimático ou primário (Roberts e Sindhu, 2009). Como já foi dito a glutatona

endógena possui importante papel citoprotetor (Klaassen *et al.*, 1985; Hayes e McLellan, 1999; Kimura *et al.*, 2001).

A EC mostrou-se significativamente eficiente em manter os níveis de GSSH elevados após a administração de etanol absoluto (**Figura 4**), este resultado mostra que o efeito gastroprotetor da EC pode estar intimamente relacionado com sua elevada capacidade antioxidante, fato posteriormente reforçado pelo ensaio de prevenção da peroxidação lipídica, onde a EC mostrou-se eficaz na prevenção da peroxidação lipídica induzida por agentes oxidantes (**Figura 6**), que indica que a EC pode prevenir estresse oxidativo causado pela ingestão de agentes oxidantes (Odabasoglu, 2008).

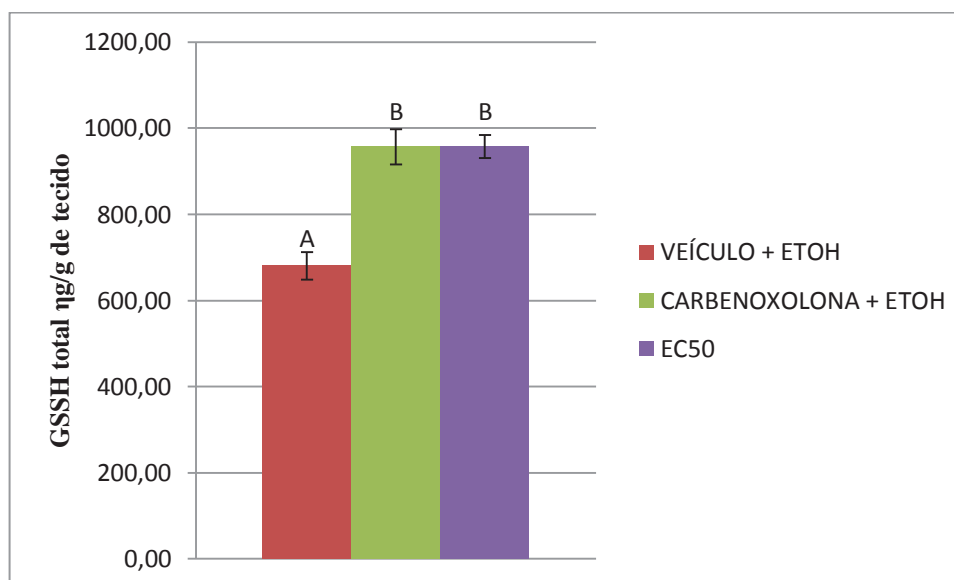


Figura 4: Efeito da EC nos níveis de glutatona total presente na mucosa gástrica em ratos. Análise estatística entre grupos: ANOVA seguida pelo Teste de Múltiplas comparações de Tukey, $P < 0,05$: glutatona total expressa como ng/g de tecido. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos.

4.3.3 Quantificação do muco gástrico aderido à mucosa gástrica

Em experimentos anteriores, foi constatado que com a administração de um depletor de compostos sulfidrílicos (NEM) o efeito gastroprotetor da EC foi revertido. Sabe-se também que os compostos sulfidrílicos atuam na manutenção das pontes dissulfetos do muco; se as pontes dissulfetos forem danificadas pela ausência de

compostos sulfidrílicos, o muco se torna mais solúvel e deixa a mucosa gástrica mais propensa a danos causados por agentes lesivos (Avila *et al.*, 1996).

O muco tem inúmeras funções no estômago, é secretado por toda a superfície mucosa e age como lubrificante para reduzir choques mecânicos causados por materiais ingeridos e como um armadilha para bactérias (Forstner, 1978; Belley *et al.*, 1999). O muco também tem um papel estrutural importante, pois cria uma barreira na superfície mucosa que ajuda a manter o pH neutro e também age como uma barreira contra a pepsina luminal (Allen e Flemström, 2005).

O aumento de muco aderido à mucosa gástrica do grupo tratado com EC50 foi significativo comparado ao grupo que foi tratado somente com o veículo (**Figura 5**), portanto a EC50 estimula a produção ou a secreção de muco da mucosa gástrica durante a ligadura de piloro induzida cirurgicamente (Anexo 3).

Ito *et al.* (2008) mostrou que administração oral de chá verde enriquecido de catequinas (epigallocatequina-galato, EC, EC-galato e epigallocatequina) em roedores aumentam a mucina presente no íleo, principalmente a sulfomucina derivada de células caliciformes, contudo não alterou a mucina gástrica nos estômagos de ratos. No entanto, as doses usadas por Ito *et al.* (2008) foram de 100 e 500 mg/kg, que são doses elevadas comparadas às usadas nos modelos experimentais deste projeto, portanto podem inibir a produção de PGE₂, que são importantes na modulação da secreção e produção de muco (Halter *et al.*, 2001; Luchini *et al.*, 2008).

Figura 5 mostra que os animais tratados com EC tiveram aumento significativo de muco aderido à mucosa gástrica comparados ao controle negativo.

Apesar de estudos anteriores afirmarem que a EC é um inibidor da K⁺/H⁺-ATPase *in vitro* (Murakami *et al.*, 1992; Murakami *et al.*, 1999), não podemos mais afirmar que a EC50 diminui a secreção de íons H⁺ pois o aumento da secreção de muco

(Figura 5) que ocorre, concomitantemente, com a administração de EC50 também aumentaria o pH luminal, portanto não podemos afirmar se esse aumento deve-se ao fato do aumento da secreção de muco ou pela inibição da bomba K^+/H^+ - ATPase.

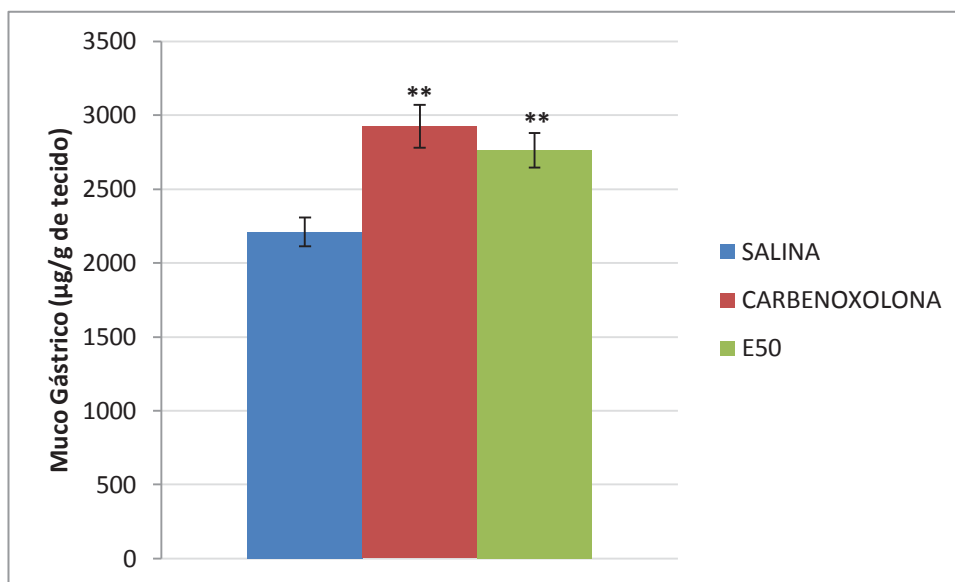


Figura 5: Efeito da EC nos níveis de muco aderido à parede gástrica de ratos. Análise estatística entre grupos comparados ao grupo tratado com veículo: ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações, teste de Dunnett, diferença significativa quando $P < 0,05$ (*) ou $P < 0,01$ (**): muco gástrico quantificado em $\mu\text{g/g}$ de tecido.

4.4 Atividade Antioxidante

Como já foi descrito anteriormente, a indometacina e o etanol induzem lesões ao tecido gástrico pela formação de radicais livres e pela indução da peroxidação lipídica (Yoshikawa *et al.*, 1993) que podem ser neutralizadas por antioxidantes. O sistema antioxidante natural do organismo consiste em uma série de enzimas antioxidantes e numerosos compostos endógenos (glutathiona) e exógenos que neutralizam espécies reativas de oxigênio. A defesa antioxidante primária do organismo consiste principalmente das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx); enquanto a secundária é constituída principalmente pelos antioxidantes não enzimáticos como a vitamina C, vitamina E, β -caroteno, glutathiona e numerosos fitoquímicos e fitomedicamentos (Roberts e Sindhu, 2009).

Radicais livres por sua vez podem ser originados da respiração celular, inatividade física, alimentação inadequada, tabagismo entre outros. Eles originam o radical superóxido que é metabolizado pela SOD, que dá origem ao peróxido de hidrogênio que pode ser transformado em água e oxigênio pela CAT, ou transformado em água pela GPx na presença de glutathione, ou ainda originar o radical hidroxila que causa dano ao DNA, peroxidação lipídica e dano protéico. Se este sistema enzimático falhar, é necessária a presença de substâncias antioxidantes não enzimáticas endógenas ou exógenas (Roberts e Sindhu, 2009).

Neste ensaio de “Peroxidação lipídica em membrana de cérebro de ratos *in vitro*”, é verificado se a EC é capaz de inibir a peroxidação lipídica na ausência do sistema antioxidante enzimático e também é determinada a concentração inibitória de 50% (IC₅₀) da peroxidação lipídica da mesma. Verificou-se que a EC é um antioxidante, pois é capaz de prevenir a peroxidação lipídica induzida por ácido ascórbico e sulfato ferroso (IC₅₀=5.29 µg/mL) (**Figura 6**).

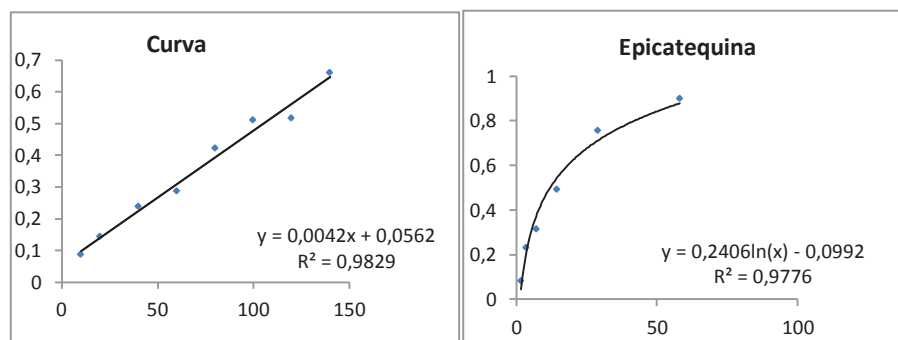


Figura 6: Atividade antioxidante da EC. Ensaio de peroxidação lipídica em membrana de cérebro de ratos *in vitro*. A: curva da calibração do espectrofotômetro, B: Curva de inibição da peroxidação lipídica com concentrações crescentes de EC.

5 Conclusão

A EC apresenta significativo efeito gastroprotetor macro e microscópico frente a lesões gástricas induzidas por etanol absoluto e indometacina, atua localmente aumentando a secreção de muco, auxiliando o sistema antioxidante na manutenção dos

níveis de glutathione total. Tais mecanismos dependem da ativação de compostos sulfidrílicos e independem da atuação da enzima NO-sintetase.

6 Referências Bibliográficas

- AL-HOWIRINY, T.; AL-SOHAIBANI, M.; EL-TAHIR, K. and RAFATULLAH, S. Prevention of experimentally-induced gastric ulcers in rats by an ethanolic extract of "Parsley" *Petroselinum crispum*. **Am. J. Chin Med.**, v. 31, n. 5, p. 699-711, 2003.
- ALLEN, A.; FLEMSTRÖM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 288, p. C1–C19, 2005.
- ANCHA, H.; OJEAS, H.; TEDESCO, D.; WARD, A. and HARTY, R. F. Somatostatin-induced gastric protection against ethanol: involvement of nitric oxide and effects on gastric mucosal blood flow. **Regul. Pept.**, v. 110, n. 2, p. 107-113, 2003.
- ANDERSON, N. E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods Enzymology**, v. 114, p. 548-555, 1985.
- ANDREO, M. A.; BALLESTEROS, K. V.; HIRUMA-LIMA, C. A.; HADO DA ROCHA, L. R.; SOUZA BRITO, A. R. and VILEGAS, W. Effect of Mouriri pusa extracts on experimentally induced gastric lesions in rodents: role of endogenous sulfhydryls compounds and nitric oxide in gastroprotection. **J. Ethnopharmacol.**, v. 107, n. 3, p. 431-441, 2006.
- ARRIETA, J.; BENITEZ, J.; FLORES, E.; CASTILO, C.; NAVARRETE, A. Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. **Planta Med.**, v. 69, n. 10, p. 905-909, 2003.

- AVILA, J. R.; DE LA LASTRA, C. A.; MARTIN, M. J.; MOTILVA, V.; LUQUE, I.; DELGADO, D.; ESTEBAN, J.; HERRERIAS, J. Role of endogenous sulfhydryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. **Inflammation Research**, v. 45, p. 83-88, 1996.
- BAFNA, P. A. and BALARAMAN, R. Anti-ulcer and antioxidant activity of DHC-1, a herbal formulation. **J. Ethnopharmacol.**, v. 90, n. 1, p. 123-127, 2004.
- BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; RIECK, L.; MARQUES, M. C. Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC in rats. **Pharmacol Res**, v. 47, n.1, p. 93-98, 2003.
- BANNISTER, L. H. Alimentary System. In: WILLIAMS, P. L. **Gray's Anatomy**. Ed. 38. New York, Churchill Livingstone, 1995, n. 12, p. 1753-1760.
- BECH, P. L.; XAVIER, R.; LU, N.; NANDA, N. N.; DINAUER, M.; PODOLSKY, D. K.; SEED, B. Mechanism of NSAID-induced gastrointestinal injury defined using mutant mice. **Gastroenterology**, v. 119, p. 699–705, 2000.
- BELLEY, A.; KELLER, K.; GOTTKER, M.; CHADEE, K. Intestinal mucins in colonization and host defense against pathogens. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 4, p. 10–15, 1999.
- CHADWICK, L. R.; PAULI, G. F. and FARNSWORTH, N. R. The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (hops) with an emphasis on estrogenic properties. **Phytomedicine.**, v. 13, n. 1-2, p. 119-131, 2006.
- CHAN, F. K. and LEUNG, W. K. Peptic-ulcer disease. **Lancet**, v. 360, n. 9337, p. 933-941, 2002.
- CHO, C. H. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders. **J. Physiol Paris**, v. 95, n. 1-6, p. 253-256, 2001.

- COTRAM, R. S. Robbins Pathologic Basis of Disease. 6th. Sanders Company, EUA, 1999.
- DANGELO, J. G. Anatomia humana sistêmica e segmentar/José Geraldo Dangelo, Carlo Américo Fattini. – 3ª Ed. – São Paulo: Editora Atheneu, 2007.
- DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; DEELSTRA, H.; VLIETINCK, A. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 445-449, 1999.
- DELUCIA, R.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; PLANETA, C. S.; GALLACI, M.; AVELLAR, M. C. W. Farmacologia Integrada. 3 ed., p. 328-444, 2007.
- DI STASI, L.C. Plantas medicinais: verdades e mentiras: o que os usuários e os profissionais da saúde precisam saber/ Luiz Claudio Di Stasi. – São Paulo: Editora UNESP, 2007 (Saúde e cidadania).
- DIAS, B.F.S. A implementação sobre biodiversidade biológica no Brasil: Desafios e oportunidades. Campinas: André Tosselo, 10, 1996.
- FABRICANT, D. S. & FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environ. Health Perspect.**, v. 109 Suppl 1, p. 69-75, 2001.
- FAN, T.; FENG, Q.; JIA, C.; FAN, Q.; LI, C.; BAI, X. Protective effect of Weikang decoction and partial ingredients on model rat with gastric mucosa ulcer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 8, p. 1204-1209, 2005.
- FARIAS-SILVA, E.; COLA, M.; CALVO, T. R.; BARBASTEFANO, V.; FERREIRA, A. L.; DE PAULA, M. D.; VES DE ALMEIDA, A. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W. and BRITO, A. R. Antioxidant activity of indigo and its preventive effect against ethanol-induced DNA damage in rat gastric mucosa. **Planta Med.**, v. 73, n. 12, p. 1241-1246, 2007.

- FORSTNER, J. F. Intestinal mucins in health and disease. **Digestion**, v. 17, p. 234–263, 1978.
- GESCHER, A. New perspectives on dietary polyphenols: Taking stock, more to come. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, p. S125-S126, 2010.
- GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Mol. Aspects Med.**, v. 27, n. 1, p. 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**, v. 49, p. 443-459, 2001.
- HAYES, J. D.; MCLELLAN, L. I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defense against oxidative stress. **Free Radical Research**, v. 4; p. 273-300, 1999.
- HIRAISHI, H.; SHIMADA, T.; IVEY, K. J.; TERANO, A. Role of antioxidante defenses against ethanol-induced damage in cultured rat gastric epithelial cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic**, v. 289, p. 103-109, 1999.
- HIRUMA-LIMA, C. A.; BATISTA, L. M.; DE ALMEIDA, A. B.; DE PIETRO MAGRI, L.; DOS SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A. R. Antiulcerogenic action of ethanolic extract of the resin from *Virola surinamensis* Warb. (Myristicaceae). **J Ethnopharmacol**, v. 122, n. 2, p. 406-409, 2008.
- ITO, Y.; ICHIKAWA, T.; IWAI, T.; SAEGUSA, Y.; IKEZAWA, T.; GOSO, Y. and ISHIHARA, K. Effects of tea catechins on the gastrointestinal mucosa in rats. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, n. 24, p. 12122-12126, 2008.

- IWASAKI, Y.; MATSUI, T. and ARAKAWA, Y. The protective and hormonal effects of proanthocyanidin against gastric mucosal injury in Wistar rats. **J. Gastroenterol.**, v. 39, n. 9, p. 831-837, 2004.
- JOHN, T. A. and ONABANJO, A. O. Gastroprotective effects of an aqueous extract of *Entandrophragma utile* bark in experimental ethanol-induced peptic ulceration in mice and rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 29, n. 1, p. 87-93, 1990.
- KAMATH, B. S.; SRIKANTA, B. M.; DHARMESH, S. M.; SARADA, R.; RAVISHANKAR, G. A. Ulcer preventive and antioxidative properties of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **European Journal of Pharmacology**, v. 590, p. 387-395, 2008.
- KHANBABAEE, K. and VAN, R. T. Tannins: classification and definition. **Nat. Prod. Rep.**, v. 18, n. 6, p. 641-649, 2001.
- KHATTAB, M. M.; GAD, M. Z.; ABDALLA, D. Protective role of nitric oxide in indometacin induced gastric ulceration by a mechanism independent of gastric secretion. **Pharmacological Research**, v. 43, p. 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 vacuolation cytotoxin from *Helicobacter pylori*. **Microbial Pathogenesis**, v. 31, p. 29-36, 2001.
- KIRKPATRICK, P. Stitching together naturally. **Nature**, v. 1, p. 748, 2002.
- KLASSEN, C. D.; BRACKEN, W. M.; DUDLEY, R. E.; GORING, P. L.; HAZELTON, G. A.; HJELLE, J. J. Role of sulfhydryls in the hepatotoxicity of organic and metallic compounds. **Fundam. Appl. Toxicol.**, v. 5, n. 5, p. 806-615, 1985.

- KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P. C. and KONTUREK, S. J. The role of reactive oxygen species in action of nitric oxide-donors on stress-induced gastric mucosal lesions. **J. Physiol Pharmacol.**, v. 53, n. 4 Pt 2, p. 761-773, 2002.
- LELAND, J.; CSEKE *et al.* Natural products from plants. 2nd ed. Taylor & Francis Group, 2006.
- LUCHINI, A. C.; RODRIGUES-ORSI, P.; CESTARI, S. H.; SEITO, L. N. Intestinal Anti-inflammatory Activity of Coumarin and 4-Hydroxycoumarin in the Trinitrobenzenesulphonic Acid Model of Rat Colitis. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 7, p 1343-1350, 2008.
- LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E. NO-synthase independent NO generation in mammals. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 396, p. 39-40, 2010.
- MACIEL M.A.M.; PINTO A.C.; VEIGA JR. V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim. Nova*, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- MAITY, P., BISWAS, K., ROY, S., BANERJEE, R.K., BANDYOPADHYAY, U. Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer-recent mechanistic update. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 253, p. 329-338, 2003.
- 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**, v. 65, p. 27-32, 1999.
- MINCIS, M.; CHEBLI, J. M.; KHOURI, S. T. and MINCIS, R. [Ethanol and the gastrointestinal tract]. **Arq Gastroenterol.**, v. 32, n. 3, p. 131-139, 1995.

- MIZUI, T.; SATO, H.; HIROSE, F. and DOTEUCHI, M. Effect of antiperoxidative drugs on gastric damage induced by ethanol in rats. **Life Sci.**, v. 41, n. 6, p. 755-763, 1987.
- MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; HARA, H. and SUKAMOTO, T. Effects of KB-5492, a new anti-ulcer agent with a selective affinity for the sigma-receptor, on aspirin-induced disruption of the rat gastric mucosal barrier. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 64, n. 1, p. 49-55, 1994.
- MURAKAMI, S., MURAMATSU, M., OTOMO, S. Gastric H⁺, K(+)-ATPase inhibition by catechins. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 44, p. 926-928, 1992.
- MURAKAMI, S., MURAMATSU, M., TOMISAWA, K. Inhibition of gastric H⁺, K(+)-ATPase by flavonoids: a structure-activity study. **J. Enzyme Inhib.**, V. 14, P. 151-166, 1999.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. and SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J. Nat. Prod.**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.
- NWAFOR, P.A.; EFFRAIM, K.D.; JACKS, T.W. Gastroprotective effects of aqueous extract of *Khaya senegalensis* bar on indomethacin-induced ulceration in rats. **Western African Journal of Pharmacology and Drug Research**, v. 12, p. 46-50, 1996.
- O'MALLEY, P. Gastric ulcers and GERD: the new "plagues" of the 21st century update for the clinical nurse specialist. **Clinical Nurse Specialist**, v. 17, p. 286-289, 2003.
- OATES, P. J. and HAKKINEN, J. P. Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats. **Gastroenterology**, v. 94, n. 1, p. 10-21, 1988.

- ODABASOGLU, F.; HALICI, Z.; CAKIR, A.; HALICI, M.; AYGUN, H.; SULEYMAN, H.; CADIRCI, E. and ATALAY, F. Beneficial effects of vegetable oils (corn, olive and sunflower oils) and alpha-tocopherol on anti-inflammatory and gastrointestinal profiles of indomethacin in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 591, n. 1-3, p. 300-306, 2008.
- ORLANDO, L. A.; LENARD, L.; ORLANDO, R. C. Chronic hypergastrinemia: causes and consequences. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 52, p. 2482-2489, 2007.
- RAFATULLAH, S.; TARIQ, M.; AL-YAHYA, M. A.; MOSSA, J. S.; AGEEL, A. M. Evaluation of turmeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 29, p. 25–34, 1990.
- RAINSFORD, K. D. Gastric ulcerogenicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs in mice with mucosa sensitized by cholinomimetic treatment. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 39, p. 669-672, 1987.
- RAMAKRISHNAN, K.; SALINAS, R. C. Peptic Ulcer Disease. **American Family Physician**, v. 76, p. 1005-1012, 2007.
- RATES, S. M. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.
- REPETTO, M. G. and LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, n. 5, p. 523-534, 2002.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. Pharmacognosy and pharmacobiotechnology. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996.
- ROBERTS, C. K.; SINDHU, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sciences**, v. 84, p. 705-712, 2009.
- SCHUBERT, M.L. & PEURA, D. Control of Gastric Acid Secretion in Health and Disease. **Gastroenterology**, v.134, p. 1842-1860, 2008.

- SHAY, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. **Gastroenterol**, v. 5, p. 43-61, 1945.
- SHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opin Gastroenterol**, v. 26, n. 6, p. 598-603, 2010.
- SIEGMUND, S.; HAAS, S.; SCHNEIDER, A.; SINGER, M. V. Animal models in gastrointestinal alcohol research-a short appraisal of the different models and their results. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 17, n. 4, p. 519-542, 2003.
- SIMÕES C. M. O., SCHENKEL E. P., GOSMANN G., MELLO J. C. P., MENTZ L. A. Farmacognosia da planta ao medicamento 5ªed. Porto Alegre/Florianópolis Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2004.
- SPIRT, M. J. Stress-related mucosal disease: risk factors and prophylactic therapy. **Clin. Ther.**, v. 26, n. 2, p. 197-213, 2004.
- SPONTAG, S. J. Guilty as charged: bugs and drugs in gastric ulcer. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 92, n. 8, p. 1255-1261, 1997.
- STOCKS, J.; GUTTERIDGE, J. M.; SHARP, R. J.; DORMANDY, T. L. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. **Clinical Science and Molecular Medicine**, v. 47, p. 215–222, 1974.
- SZABO, S.; BROWN, A. Prevention of ethanol-induced vascular injury and gastric mucosal lesions by sucralfate and its components: possible role of endogenous sulfhydryls. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 4, p. 493-497, 1987.
- VASCONCELOS, P. C.; KUSHIMA, H.; ANDREO, M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W.; TAKAHIRA, R. K. and PELLIZZON, C. H. Studies of gastric mucosa regeneration and safety promoted by Mouriri pusa treatment in acetic acid ulcer model. **J. Ethnopharmacol.**, v. 115, n. 2, p. 293-301, 2008.

- VEIGA JR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.
- WALLACE, J. L.; GRANGER, D. N. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. **FASEB Journal**, v. 10, p. 731–740, 1996.
- WALLACE, J. L.; VONG, L. NSAID-induced gastrointestinal damage and the design of GI-sparing NSAIDs. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 9, n. 11, p. 1151-1156, 2008.
- YOSHIKAWA, T.; NAITO, Y.; KISHI, A.; TOMII, T.; KANEKO, T.; IINUMA, S.; ICHIKAWA, H.; YASUDA, M.; TAKAHASH, S.; KONDO, M. Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats. **Gut**, v.34, p. 732-737, 1993.
- ZIEGLER, A. B. The role of proton pump inhibitors in acute stress ulcer prophylaxis in mechanically ventilated patients. **Dimensions of Critical Care Nursing**, v. 24, p. 109-114, 2005.

7 Produção Bibliográfica

7.1 Resumos Publicados em Anais de Congressos

1. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA EPICATEQUINA NA PREVENÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM MEMBRANA DE CÉREBRO DE RATOS. XIV Semana da Bio, 2010, Botucatu.
2. GASTROPROTECTIVE EFFECT OF EPICATECHIN IN ETHANOL INDUCED GASTRIC ULCER BY STIMULATION OF MUCUS SECRETION AND NITRIC OXIDE PRODUCTION OF NITRIC OXIDE

- PRODUCTION. XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2010, Águas de Lindóia.
3. PARTICIPAÇÃO DOS COMPOSTOS SULFIDRÍLICOS E DO ÓXIDO NÍTRICO NO EFEITO GASTROPROTETOR DO MENTOL FRENTE A ÚLCERAS GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ETANOL ABSOLUTO. XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2010, Águas de Lindóia.
 4. EPICATECHIN STIMULATES GASTRIC MUCUS PRODUCTION AND PROTECTS THE STOMACH AGAINST ETHANOL AND INDOMETHACIN. 11th Congress of the International Society of Ethnopharmacology and 1er Encuentro Hispano-Portugués de Etnobiología, 2010, Albacete.
 5. CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA DE ULCERAÇÕES GÁSTRICAS CAUSADAS POR ETANOL ABSOLUTO E EFEITO GASTROPROTETOR DA EPICATEQUINA CONTRA ESTE AGENTE LESIVO. XIII Semana da Bio, 2009, Botucatu.
 6. ROLE OF EPICATECHIN IN GASTROPROTECTION AGAINST ABSOLUTE ETHANOL IN RATS PRE-TREATED WITH L-NAME (N-NITRO-L-ARGININE-METHYL ESTER) OR NEM (NMETHYL-MALEINIDE). V Encontro da Pós Graduação da FMB, 2009, Botucatu.
 7. THERAPEUTICAL EFFECT OF EPICATECHIN PRESENT IN *Mouriri pusa* GARDN. (MELASTOMATACEAE) IN TNBS INDUCED CHRONIC COLITIS WITH RELAPSE. XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2009, Águas de Lindóia.

8. EPICATEQUINA: AÇÃO GASTROPROTETORA FRENTE A LESÃO GÁSTRICA POR ETANOL ABSOLUTO EM RATOS. XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2009, Águas de Lindóia.

7.2 Apresentação de Trabalho

Apresentação oral: CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA DE ULCERAÇÕES GÁSTRICAS CAUSADAS POR ETANOL ABSOLUTO E EFEITO GASTROPROTETOR DA EPICATEQUINA CONTRA ESTE AGENTE LESIVO. XIII Semana da bio de Botucatu. 2009.

7.3 Artigo aceito para publicação

ARIANE LEITE ROZZA, THIAGO DE MELLO MORAES, HÉLIO KUSHIMA, ALEXANDRE TANIMOTO, MÁRCIA ORTIZ MAYO MARQUES, TAÍS MARIA BAUAB, CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA, CLÁUDIA HELENA PELLIZZON. Gastroprotective mechanisms of Citrus lemon (RUTACEAE) essential oil and its majority compounds limonene and β -pinene: involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E2. **Chemico-Biological Interactions.**

8 Prêmios

1. Menção Honrosa/Honra ao Mérito na XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE 2010. GASTROPROTECTIVE EFFECT OF EPICATECHIN IN ETHANOL INDUCED GASTRIC ULCER BY STIMULATION OF MUCUS SECRETION AND NITRIC OXIDE PRODUCTION OF NITRIC OXIDE PRODUCTION.

2. Menção Honrosa/Honra ao Mérito na XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE 2009. THERAPEUTICAL EFFECT OF EPICATECHIN PRESENT IN *Mouriri pusa* GARDN. (MELASTOMATACEAE) IN TNBS INDUCED CHRONIC COLITIS WITH RELAPSE.
3. Quatro melhores trabalhos da XIII Semana da Bio de Botucatu, 2009. CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA DE ULCERAÇÕES GÁSTRICAS CAUSADAS POR ETANOL ABSOLUTO E EFEITO GASTROPROTETOR DA EPICATEQUINA CONTRA ESTE AGENTE LESIVO.

9 Atividades Extra-Curriculares

9.1 Participação em outros Projetos de Pesquisa

1. Avaliação de gastroproteção, mecanismo de ação e comparação do efeito da vitamina E (α -tocoferol) nas formas naturais e sintéticas.
2. Ação gastroprotetora e cicatrizante do óleo essencial de *Citrus lemon*, de seus componentes principais limoneno e β -pineno e do óleo essencial da casca de *Croton cajucara* e determinação de seus mecanismos de ação.

9.2 Participação de Conselhos e Comissões

1. Membro Discente da Comissão de Estudos e Reestruturação do Curso de Ciências Biomédicas.
2. Representante Titular do Conselho de Curso de Ciências Biomédicas.

9.3 Estágios e Atividades de Extensão

1. Estágio de técnicas laboratoriais em Histologia.

2. Estágio de Instrumentação em Hematologia, Imuno-hematologia e bioquímica Eritrocitária.
3. Estágio de Diretor de Recursos Humanos da Empresa Júnior – IBBJR.
4. Professor de Química Orgânica e de Matemática e Trigonometria do Curso pré-vestibular CAVJ.

9.4 *Participação de eventos*

1. IX Workshop de Plantas Medicinais. 2010.
2. IX Workshop de Plantas Medicinais. Mini-curso: Extração e análise de produtos naturais. 2010.
3. XIV Semana da Bio. Atividade antioxidante da epicatequina na prevenção da peroxidação lipídica em membrana de cérebro de ratos. 2010.
4. XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Gastroprotective effect in ethanol induced gastric ulcer by stimulation of mucus secretion and nitric oxide production. 2010.
5. XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Mini-curso: Novas Ferramentas para avaliação da proliferação celular, diferenciação e morte celular. 2010.
6. Palestra: UNISCIENCE. 2010.
7. XIV Semana da Bio. Mini-Curso: Anatomia Patológica. 2010.
8. XIV Semana da Bio. Mini-Curso: Psicobiologia do medo e da ansiedade: bases neurais das emoções e novos horizontes para o tratamento farmacológico da Síndrome do Pânico. 2010.
9. II Congresso de atualização em Hematologia. 2009.

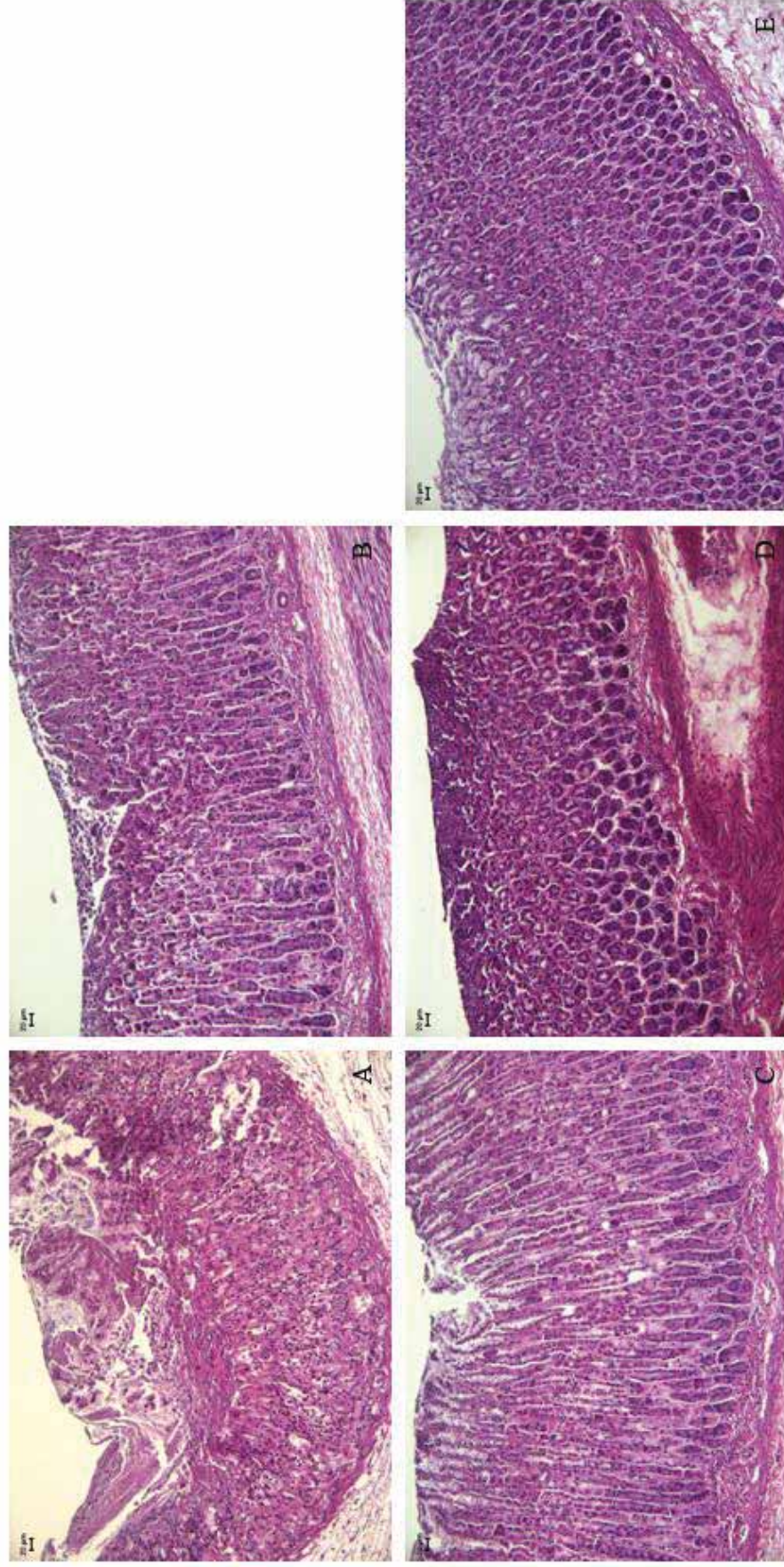
10. XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE 2009. Curso: Darwin e sua biologia experimental: 200 anos do pai da seleção natural. 2009.
11. XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE 2009.
12. XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE 2009. Curso: Comunicação celular no sistema nervoso: novos aspectos, velhos problemas. 2009.
13. XIII Semana da Bio. 2009.
14. XIII Semana da Bio. Mini-Curso: Psicofarmacologia. 2009.
15. XIII Semana da Bio. Oficina: Métodos de conservação de alimentos e nutrientes. 2009.
16. V Encontro da Pós Graduação da FMB. 2009.
17. XII Semana da Bio. Mini-curso: Seleção de espécies vegetais para produção de novos medicamentos. 2008.
18. XII Semana da Bio. Mini-curso: Tópicos em Biologia da Reprodução. 2008.
19. XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congress of Ethnopharmacology. 2008.
20. XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congress of Ethnopharmacology. Mini curso: Efeitos farmacológicos de plantas, em modelos animais de desordens psiquiátricas e neurodegenerativas. 2008.
21. IX Simpósio Nacional de Biologia Molecular Aplicada à Medicina. 2008.
22. XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. 2008.
23. III Simpósio de Extensão Universitária. 2008.

24. 11º Encontro Regional de Biomedicina. 2008.
25. 11º Encontro Regional de Biomedicina. Mini-curso: Análises Clínicas. 2008.
26. VII Workshop da Pós-Graduação. 2008.
27. VII Workshop da Pós-Graduação. Mini curso: A Importância do Estudo de Plantas Medicinais. 2008.
28. II Jornada de Atualização em Neurologia. 2008.
29. XI Semana da Bio. 2007.
30. XI Semana da Bio. Mini Curso: Alterações Metabólicas no Exercício Exaustivo e Indicadores de Fadiga Muscular. 2007.
31. XI Semana da Bio. Mini Curso: Diagnóstico Laboratorial do Trato Genital Inferior. 2007.

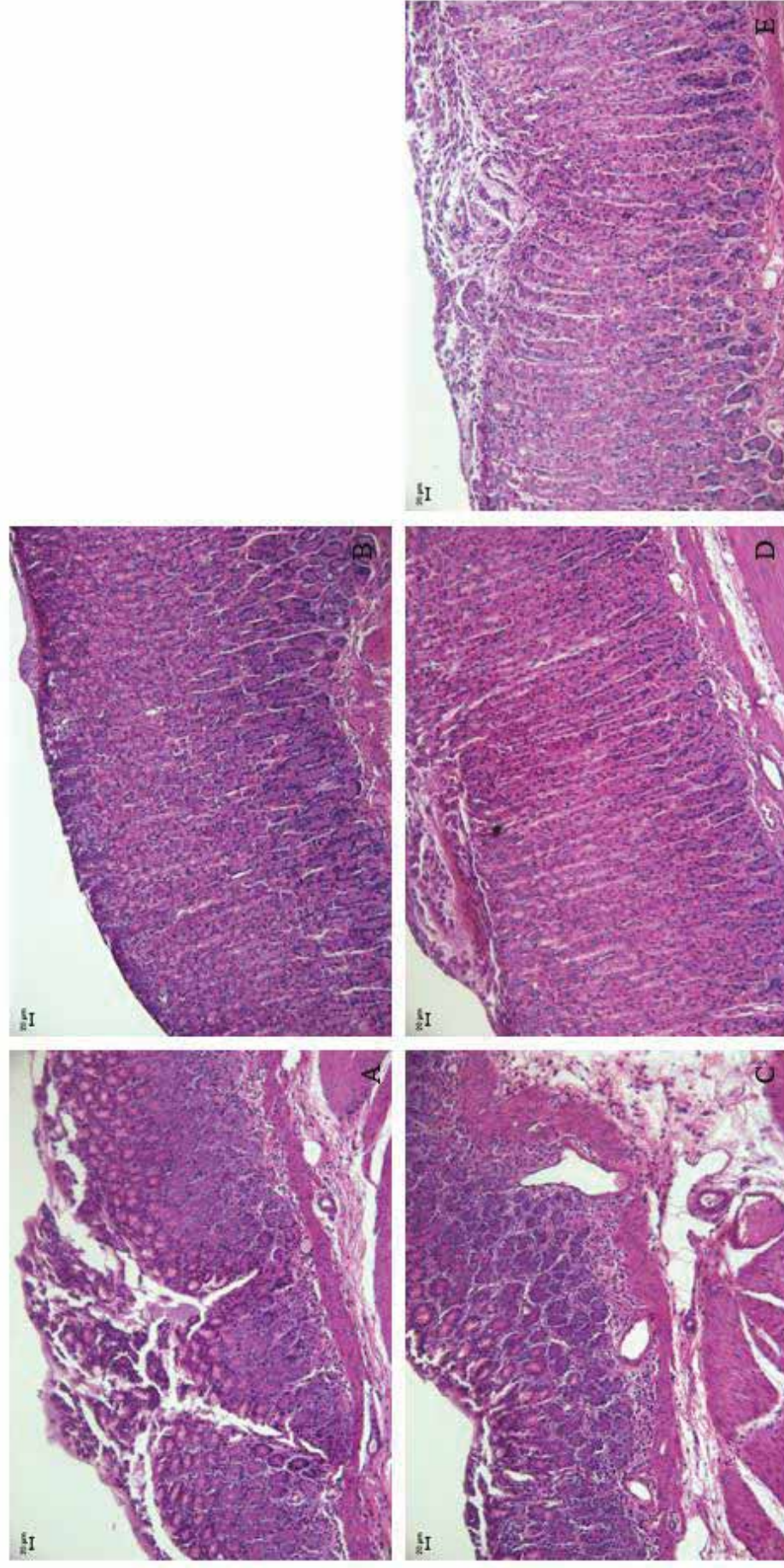
9.5 Organização de Eventos

1. Venha Conhecer o IB. 2010.
2. Comissão Organizadora da XII Semana da Bio. 2008.
3. Comissão Apoio do 10º Encontro Regional de Biomedicina (ERBM). 2007.

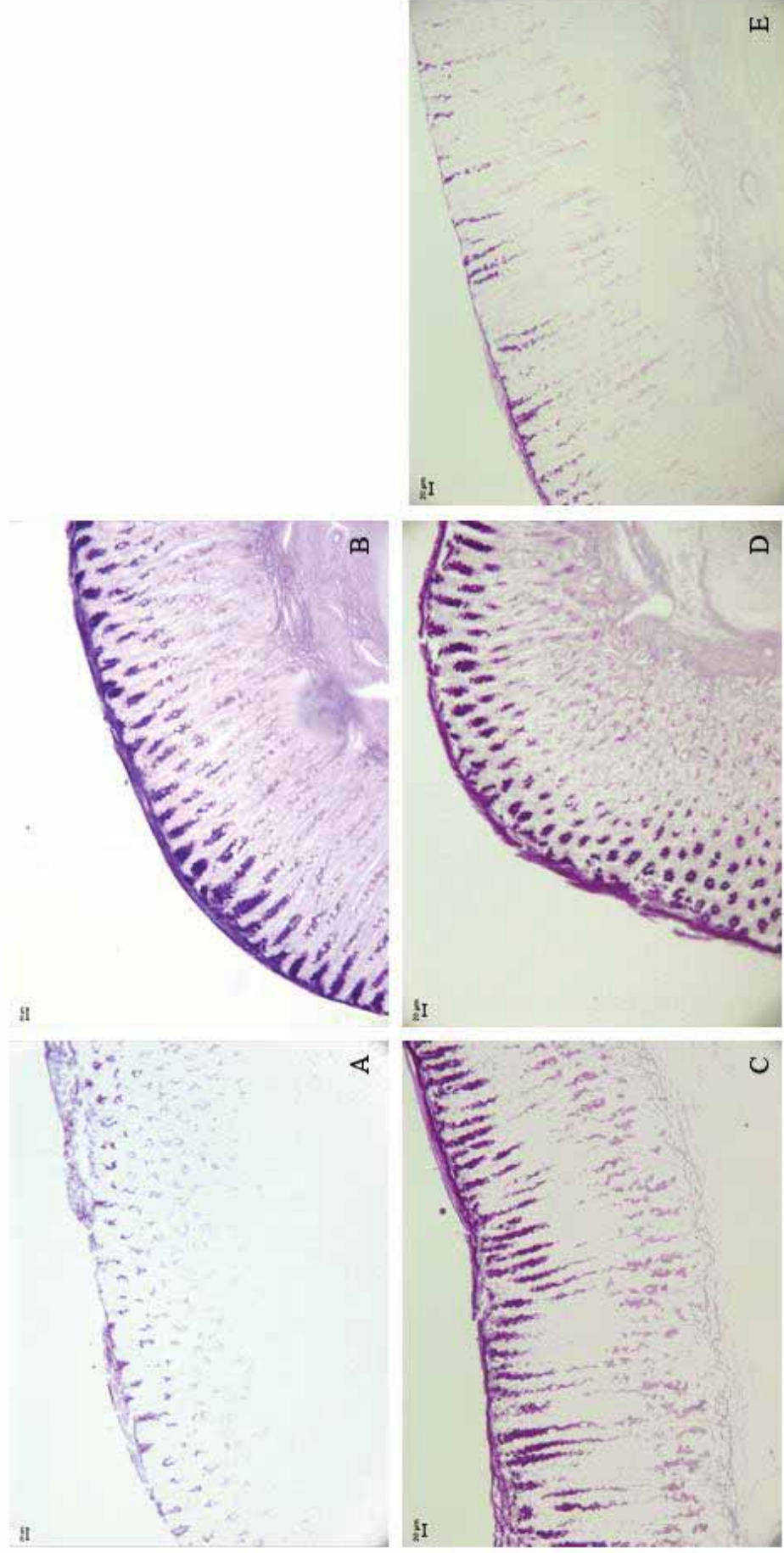
10 Anexos



Anexo 1: Fotomicrografias de estômagos após indução de úlceras por administração oral de etanol absoluto. Aumento de 20x, coloração em hematoxilina e eosina. A: veículo, B: carbenoxolona (100 mg/kg), C: EC25, D: EC50, E: EC75.



Anexo 2: Fotomicrografias de estômagos após indução de úlceras por administração oral de indometacina (100 mg/kg). Aumento de 20x, coloração em hematoxilina e eosina. A: veículo, B: carbenoxolona (100 mg/kg), C: EC25, D: EC50, E: EC75.



Anexo 3: Fotomicrografias de estômagos após indução de úlceras por administração oral de indometacina (100 mg/kg). Aumento de 20x, coloração em Ácido periódico de Schiff. A: veículo, B: carbenoxolona (100 mg/kg), C: EC25, D: EC50, E: EC75.