



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA ODONTOLOGIA E
ENFERMAGEM – FFOE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**

KARLA MONISE PINHEIRO BEZERRA

**AÇÃO ENTEROPROTETORA DO ÁCIDO CENTIPÉDICO, ISOLADO DE
Egletes viscosa Less, EM MODELO DE LESÕES INTESTINAIS INDUZIDAS
POR INDOMETACINA EM RATOS**

FORTALEZA

2012

KARLA MONISE PINHEIRO BEZERRA

**AÇÃO ENTEROPROTETORA DO ÁCIDO CENTIPÉDICO, ISOLADO DE
EGLITES VISCOSA LESS, EM MODELO DE LESÕES INTESTINAIS INDUZIDAS
POR INDOMETACINA EM RATOS**

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem-FFOE, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Flávia Almeida Santos

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

B469a Bezerra, Karla Monise Pinheiro.
Ação enteroprotetora do ácido centipédico, isolado de *Egletes viscosa* less, em modelo de lesões intestinais induzidas por indometacina em ratos/ Karla Monise Pinheiro Bezerra. – 2012.
75 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2012.
Orientação: Profa. Dra. Flávia Almeida Santos

1. *Egletes viscosa* Less 2. Ácido Centipédico 3. Diterpeno 4. Indometacina 5. Lesões intestinais I. Título.

CDD 615.1

KARLA MONISE PINHEIRO BEZERRA

**AÇÃO ENTEROPROTETORA DO ÁCIDO CENTIPÉDICO, ISOLADO DE
EGLITES VISCOSA LESS, EM MODELO DE LESÕES INTESTINAIS INDUZIDAS
POR INDOMETACINA EM RATOS.**

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem- FFOE, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Bacharel em Farmácia.

Aprovada em ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Flávia Almeida Santos (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Mary Anne Medeiros Bandeira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Patrícia de Araújo Rodrigues
Faculdade Vale do Jaguaribe

Dedico a Deus, aos meus amados pais Regina e Webister, a minha irmã Renata Kely e a meu sobrinho, Paulo Arthur.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo cuidado e pela força que me foi dada em tantos momentos decisivos durante todo meu caminho como acadêmica.

A meus pais, por toda a dedicação e comprometimento com minha educação. Aos senhores, papai e mamãe o meu amor e gratidão eternos.

A minha irmã, Kely e ao meu sobrinho, Arthur, que me ensinam cada dia mais o sentido da palavra FORÇA. Ao meu príncipezinho que é uma das minhas grandes razões e o meu maior exemplo de luta, quero ressaltar a importância que tem conviver com ele para o meu fortalecimento diante de tantas situações.

À minhas tias Regina Lúcia e Neide pelo carinho de mãe nos momentos mais frágeis de minha vida. Aos tios, Charles e Orlete, pelo carinho e ajuda em tantas situações. A meus primos, Camila, Ítalo, Marcelo e Stephanie pela amizade e pelo companheirismo. Aos meus outros familiares que só engrandecem a minha vida.

A meu namorado, Robson, por todo o amor, pelo convívio sadio e pela cumplicidade que me tem dedicado.

Aos grandes amigos que conquistei durante estes 5 anos de faculdade: Adriano, Gadelha, May e Tati. A vocês, minha imensa gratidão por todos os momentos difíceis enfrentados, os alegres compartilhados, pelo companheirismo nas tardes e/ou noites de estudo e pela irmandade em tantas outras situações.

Às colegas Brenna, Hellen, Santelma, Sibelle e Talita pelo companheirismo em algumas decisivas avaliações. Aos amigos, Auriana, Carol, Débora, Isabela, Mirlayne, Paulo Victor, Raquel, Rebeca, Ricardo Braz, Sávio e Thiago.

A minha orientadora, Profa. Dra. Flávia, pela oportunidade concedida de estagiar no Laboratório de Produtos Naturais e pelo apoio em meu trabalho de término de curso.

À doutoranda Talita: jamais esquecerei a prontidão com que me ajudou nas soluções de algumas importantes dúvidas para a finalização de minha monografia.

Ao Professor Edilberto pelo fornecimento da droga usada nesse trabalho.

Aos outros bolsistas do LPN, com destaque para Patrícia Rodrigues e Tiago Melo, pelo apoio nos experimentos e pelos aconselhamentos.

Às Professoras Aparecida, Fátima e Renata pelas lições que extrapolaram os limites do conhecimento científico e por todo o cuidado e atenção dados a nós alunos.

Aos Professores Everardo e Rao pelas chances em me orientarem em alguns anos de estágio. Ao Professor Fenando pela orientação na iniciação à docência.

Às minhas amigas Ana Karla, Raquel Macêdo, Samille Tavares e Vânia Fernandes, pelo apoio e conforto em muitos momentos do meu caminho.

Aos amigos, Aurenilson, Fernando e Kécia, como é maravilhosa a presença de vocês em minha vida. Obrigada por tudo, amigos amados!

Aos meus vizinhos, Daniely, Paula e Rafael, pelo auxílio indireto que me dedicaram.

Ao CNPq pela concessão do apoio financeiro.

“O Senhor deu aos homens a ciência para que pudessem glorificá-Lo por causa das maravilhas Dele. Com elas, o *médico* cura e elimina a dor, e o *farmacêutico* prepara as fórmulas. Dessa maneira, as obras de Deus não tem fim, e Dele vem o bem estar para a Terra.”

Eclesiástico 38, 6-8.

RESUMO

Egletes viscosa Less, conhecida popularmente como macela da terra, é uma espécie vegetal utilizada na medicina popular, especialmente, no tratamento de patologias gastrointestinais. O ácido centipédico, um diterpeno presente em seu óleo essencial foi analisado neste trabalho, a fim de se verificar a sua farmacológica no tratamento de lesões intestinais ocasionadas por indometacina. A partir do modelo de úlcera intestinal induzido pelo respectivo AINE, em uma concentração de 10mg/kg, v.o., administrado por três dias, não foram verificadas alterações renais (uréia e creatinina) nem hepáticas (AST e ALT). O tratamento com AC (50 mg/kg) diminuiu de maneira significativa o número de úlceras longitudinais (>5mm), mas não o número de úlceras pontuais (<5mm). AC demonstrou ação antioxidante através da diminuição dos níveis de MDA e MPO e restauração dos níveis de NP-SH e catalase. Em cultura de células intestinais (IEC-6), AC (12,5, 25, 50 e 100 μ M) mostrou ação pró-migratória, e, sua associação (25, 50 e 100 μ M) com indometacina 250 μ M reverteu a toxicidade da indometacina. AC (6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200 μ M) sozinho não mostrou diferença estatística sobre a proliferação celular de IEC-6. No entanto, em associação à indometacina, o diterpeno (12,5, 25, 50, 100 μ M) protegeu significativamente IEC-6 da toxicidade deste AINE (250 e 1000 μ M). Os resultados obtidos neste trabalho mostram, portanto, que AC influenciou a migração das células IEC-6. Além do mais, a substância estudada mostrou-se hábil na proliferação celular. Os dados sugerem que o diterpeno ácido centipédico tem o potencial enteroprotetor possivelmente relacionado a um mecanismo principalmente antioxidante e que poderia ser um agente terapêutico eficaz no tratamento de úlceras intestinais e efeitos colaterais ocasionados pelos AINEs.

Palavras-chave: *Egletes viscosa* Less. Ácido centipédico. Diterpeno. Indometacina. Lesões intestinais.

ABSTRACT

Egletes viscosa Less, popularly known as “macela”, is a vegetable species used in folk medicine, especially in the treatment of gastrointestinal diseases. The centipedic acid, a diterpene that is present in essential oil was analyzed this work, to verify their involvement in the of intestinal lesions caused by indomethacin. From the model of intestinal ulcers induced by respective NSAIDs, in concentration of 10 mg/kg, oral tract, administered for three days, there were no disorder kidney (urea and creatinine) neither disorder of liver (AST and ALT). The treatment with AC (50 mg/kg) decreased significantly the number of longitudinal ulcers (>5mm), but not the specific number of ulcers (<5mm). AC showed antioxidant activity by decreasing of MDA and MPO levels and restoration of NP-SH and catalase levels. In intestinal cultured cells (IEC-6), AC (12,5, 25, 50 and 100 μ M) showed activity pro-migratory, and their combination (25, 50 and 100 μ M) with indomethacin 250 μ M, but not with 1000 μ M, change toxicity of indomethacin. AC (6,25, 12,5, 25, 50, 100 and 200 μ M) alone didn't show statistical difference on cell proliferation of IEC-6. However, in combination. the diterpene (12,5, 25, 50, 100 μ M) significantly protected IEC-6 of toxicity by indomethacin (250 and 1000 μ M). The present results show, therefore, that AC influenced migration of IEC-6 cells. Moreover, the substance studied showed skill in cell proliferation. The data suggest that the acid diterpene centipédico has the potential enteroprotector possibly related to a particular antioxidant mechanism and that could be an effective therapeutic agent to treat of ulcers and intestinal side effects caused by NSAID.

Keywords: *Egletes viscosa* Less. Centipedic acid. Diterpene. .Indomethacin. Intestinal lesions.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Trato Gastrointestinal	20
FIGURA 2 - Vilosidades intestinais	23
FIGURA 3 - <i>Egletes viscosa</i> Less	31
FIGURA 4 - Estrutura química do ácido centipédico.	34
FIGURA 5 – Esquema do método de extração do ácido centipédico	40
FIGURA 6 - Efeito do ácido centipédico e dexametasona sobre as lesões intestinais induzidas por indometacina achados histológicos	52

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Efeito do ácido centipédico e dexametasona sobre o número de úlceras intestinais pontuais e longitudinais induzidas por indometacina em ratos	47
GRÁFICO 2 - Efeito do ácido centipédico e dexametasona sobre os níveis de malonildialdeído no modelo de úlcera intestinal induzida por indometacina em ratos.	48
GRÁFICO 3 - Efeito do ácido centipédico e dexametasona sobre os níveis de catalase nas lesões intestinais induzidas por indometacina em ratos.....	49
GRÁFICO 4 - Efeito do ácido centipédico e dexametasona sobre os níveis de mieloperoxidase nas lesões intestinais induzidas por indometacina em ratos.....	50
GRÁFICO 5 - Efeito do ácido centipédico e dexametasona sobre os níveis de grupos sulfidríla não protéicos nas lesões intestinais induzidas por indometacina em ratos	51
GRÁFICO 6 - Efeito do ácido centipédico e indometacina sozinhos ou associados na migração das células IEC-6 após 24 horas de exposição	54
GRÁFICO 7 - Efeito do ácido centipédico e indometacina sozinhos ou associados na proliferação das células IEC-6 após 24 horas de exposição	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Efeito do ácido centipédico e dexametasona no modelo de úlcera intestinal induzida por indometacina em ratos: função renal.	45
TABELA 2 - Efeito do ácido centipédico e dexametasona no modelo de úlcera intestinal induzida por indometacina em ratos: função hepática.	46
TABELA 3 - Efeito do ácido centipédico e dexametasona sobre o número de úlceras intestinais pontuais e longitudinais induzidas por indometacina em ratos.	47
TABELA 4 - Efeito do ácido centipédico e dexametasona sobre os níveis de malonildialdeído no modelo de úlcera intestinal induzida por indometacina em ratos.	48
TABELA 5 - Efeito do ácido centipédico e dexametasona sobre os níveis de catalase nas lesões intestinais induzidas por indometacina em ratos.	49
TABELA 6 - Efeito do ácido centipédico e dexametasona sobre os níveis de mieloperoxidase nas lesões intestinais induzidas por indometacina em ratos.	50
TABELA 7 - Efeito do ácido centipédico e dexametasona sobre os níveis de grupos sulfidríla não-protéicos nas lesões intestinais induzidas por indometacina em ratos.	51

LISTA DE SIGLAS

%	Porcentagem
<i>et al.</i>	...e colaboradores
h	hora
DL50	Dose letal 50%
±	Mais ou menos
AST	Aspartato Aminotransferase
ALT	Alanina Aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AINEs	Antiinflamatórios não esteroidais
AC	Ácido Centipédico
CA	Centipedic Acid
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
COX	Ciclooxigenases
COX-1	Ciclooxigenase tipo 1
COX-2	Ciclooxigenase tipo 2
DL50	Dose letal 50%
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético sal dissódico
E.P.M.	Erro padrão da média
ERO	Espécies reativas de oxigênio
g	Gramas
h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
IBD	Doença Inflamatória Intestinal
i.p.	Intraperitoneal

IL-10	Interleucina 10
IV	Infravermelho
Kg	Quilograma
L	Litros
L-NAME	NG-nitro-L-arginina-metilester
MDA	Malonildialdeído
MPO	Mieloperoxidase
NP-SH	Grupos sulfidril não-protéicos
NH ₄ OH	Hidróxido de Amônio
M (M)	Molar
μM	Micromolar
M-	Meio sem glutamina
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm ²	Milímetros quadrados
NAC	N-acetilcisteína
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetros
nmoles	Nanomoles
nmol	Nanomol
nm	Nanômetros
NO	Óxido nítrico
NP-SH	Grupos sulfidril não-protéicos
°C	Grau Centígrados
P	Nível de significância
P.A.	Para análise
PIV	Peptídeo Vasoativo Intestinal

PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGI ₂	Prostaciclina I ₂
PGs	Prostaglandinas
RPM	Rotações por minuto
s	Segundo
s.c.	Sub-cutâneo
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TGI	Trato gastrointestinal
TNB	Ácido trinitrobenzeno sulfônico
TRPV1	Canal de potencial transiente tipo vanilóide subtipo 1
U.S.A.	United States of America
UV	Ultravioleta
v.o.	Via oral
Vs	Versus
α	Alfa
β	Beta
Δ	Delta
μg	Micrograma
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 O trato gastrointestinal	20
1.2 Úlceras pépticas	24
1.2.1 Etiologia e fisiopatologia	25
1.3 Plantas medicinais	28
1.4 A <i>Egletes viscosa</i> Less.....	30
1.4.1 Principais componentes químicos	32
1.4.2 Usos medicinais	32
1.4.3 Estudos farmacológicos	32
1.5 Diterpenos	33
2 OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo Geral	35
2.2 Objetivos Específicos	35
3 MATERIAIS	36
3.1 Material botânico	36
3.2 Animais experimentais	36
3.2.1 Aspectos éticos	36
3.3 Drogas e reagentes	37
3.4 Equipamentos	38
4 MÉTODOS	39
4.1 Obtenção do ácido centipédico	39
4.2 Lesão intestinal induzida por indometacina em ratos	41
4.2.1 Dosagem de catalase	41
4.2.2 Dosagem de mieloperoxidase	41
4.3 Cultura de células epiteliais intestinais (IEC-6)	42
4.3.1 Migração celular em cultura de células intestinais (IEC-6)	42
4.3.2 Proliferação celular em cultura de células intestinais (IEC-6)	43
4.4 Análise estatística	43
5 RESULTADOS	44
5.1 Obtenção do ácido centipédico	44

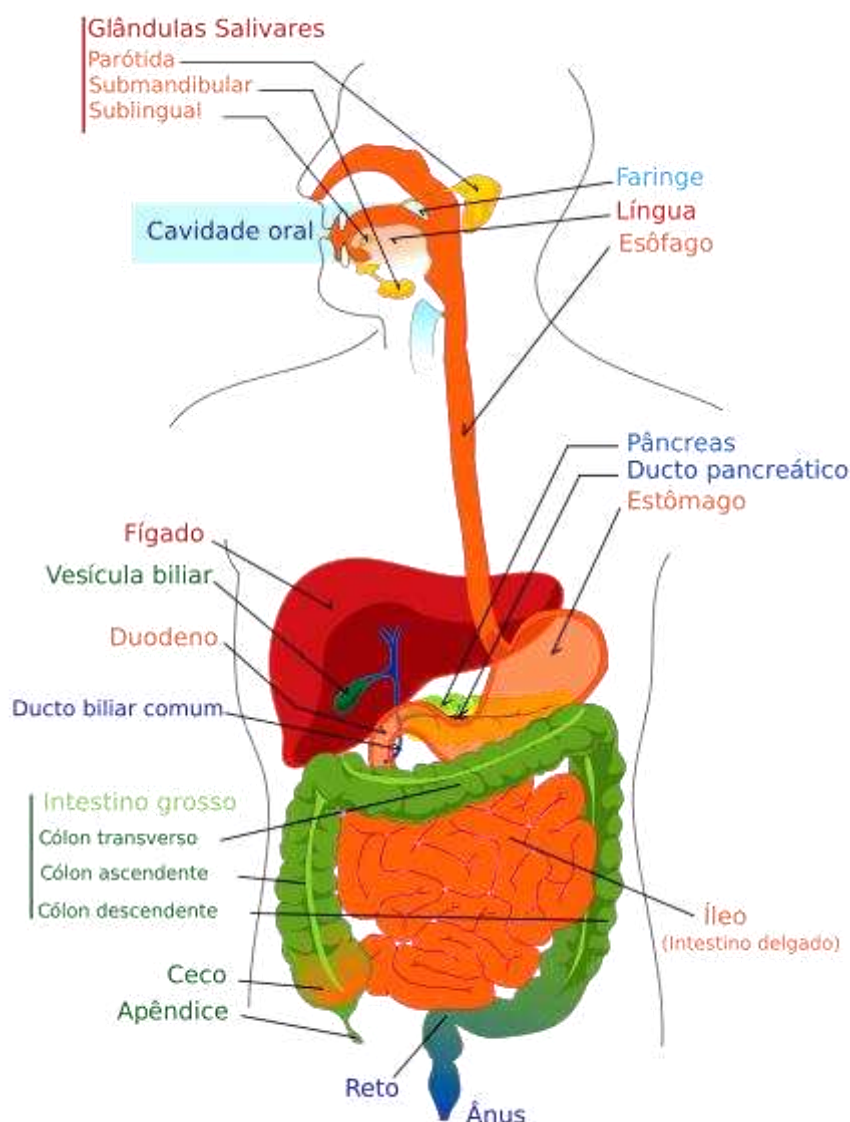
5.2 Efeito do ácido centipédico sobre úlceras intestinais induzidas por indometacina em ratos	44
5.2.1 Análise de parâmetros bioquímicos	44
5.2.1.1 Função renal (dosagem de uréia e creatinina)	44
5.2.1.2 Função hepática (dosagem de AST e ALT)	45
5.2.2 Quantificação das úlceras – Análise macroscópica	46
5.2.3 Ação sobre o estresse oxidativo	47
5.2.3.1 Dosagem de malonildialdeído	47
5.2.3.2 Dosagem de catalase	48
5.2.3.3 Dosagem de mieloperoxidase	49
5.2.3.4 Determinação de grupos sulfidrila não protéicos	50
5.2.4 Efeito do ácido centipédico na lesão intestinal induzida por indometacina em ratos: achados histológicos.....	52
5.3 Efeito do ácido centipédico sozinho ou associado à indometacina sobre a migração celular de células intestinais (IEC-6)	53
5.4 Efeito do ácido centipédico sozinho ou associado à indometacina sobre a proliferação celular de células intestinais (IEC-6).....	54
6 DISCUSSÃO.....	56
7 CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 O trato gastrointestinal

O sistema digestório é basicamente um tubo muscular com epitélio especializado que compreende a cavidade bucal, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado e grosso, e ânus (FIGURA 1). Além disso, existem os órgãos anexos, tais como: glândulas salivares, fígado e pâncreas, os quais secretam substâncias que auxiliam no processo digestivo dos alimentos. O TGI, juntamente com os órgãos anexos, tem a função de receber, digerir, absorver e eliminar substâncias ingeridas, e todos esses processos são controlados pelo sistema nervoso e pelo sistema hormonal (MERCHANT, 2007; GUYTON; HALL, 1997).

Figura 1 - Trato gastrointestinal



Fonte: Wikimedia Foundation

Compondo o TGI encontra-se o esôfago, caracterizado por ser um órgão tubular que tem como função conduzir o alimento da faringe até o estômago. O esôfago se localiza posteriormente à traquéia, começando na altura da 7ª vértebra cervical. Perfura o diafragma pela abertura chamada hiato esofágico e termina na parte superior do estômago. Sua principal função é conduzir o alimento até o estômago, ao qual se liga através do esfíncter esofágico inferior, também denominado cárdia (NETTER, 2000).

Situado logo abaixo do esôfago, encontra-se o estômago, um órgão com paredes musculosas, cuja principal função é a digestão dos alimentos pela ação do suco gástrico.

Anatomicamente é dividido em três porções: fundo, corpo e antro pilórico, sendo limitado por dois sistemas de esfíncteres: o esfíncter esofágico inferior, na parte superior ou proximal do estômago; e o esfíncter pilórico ou piloro, na parte inferior ou distal do estômago (HOGBEN *et al.*, 1974).

Funcionalmente, a mucosa gástrica pode ser dividida em duas regiões glandulares: a mucosa oxíntica e a mucosa antral. A mucosa oxíntica é mais extensa, ocupando as regiões do corpo e do fundo, e é o sítio da secreção de ácido clorídrico. É formada por glândulas oxínticas, constituídas por diversos tipos celulares, como: células parietais (ou oxínticas) responsáveis pela regulação da secreção ácida, células principais (produtoras de pepsinogênio), células produtoras de somatostatina (células D) e células do tipo enterocromafins (ECL) que liberam histamina. No colo glandular, predominam as células produtoras de muco, que atuam protegendo a mucosa gástrica da ação corrosiva das secreções originadas pela glândula (JAIN *et al.*, 2007). As glândulas da mucosa antral apresentam os mesmos tipos celulares que as glândulas oxínticas, exceto pela ausência das células principais, e inclusão das células G, produtoras de gastrina. (HOGBEN *et al.*, 1974).

A maior parte da digestão ocorre no intestino delgado por ação das secreções pancreáticas e intestinais e da bÍlis. Estas secreções são estimuladas pelos hormônios secretina e colecistocinina. Noventa por cento da absorção ocorre dentro do intestino delgado, quer por transporte ativo quer por difusão. Muitos nutrientes, como os aminoácidos, os monossacarídios, o sódio e o cálcio, são absorvidos por transporte ativo, exigindo dispêndio de energia metabólica. Outros nutrientes, como os ácidos gordos e a água, difundem-se passivamente através da membrana celular. A lipase pancreática e os sais biliares, conjugados, devem estar presentes no lúmen intestinal para a hidrólise das gorduras em ácidos graxos, a fim de permitir a difusão através das membranas celulares das vilosidades (PHIPPS *et al.*, 1990; SANDS, 2003).

O intestino delgado estende-se da porção distal do esfíncter pilórico até ao ceco, primeira porção do intestino grosso. Possui um comprimento de aproximadamente 6,5m e divide-se em três partes bem definidas: o duodeno, o jejuno e o Íleo (CREMA; SILVA, 1997).

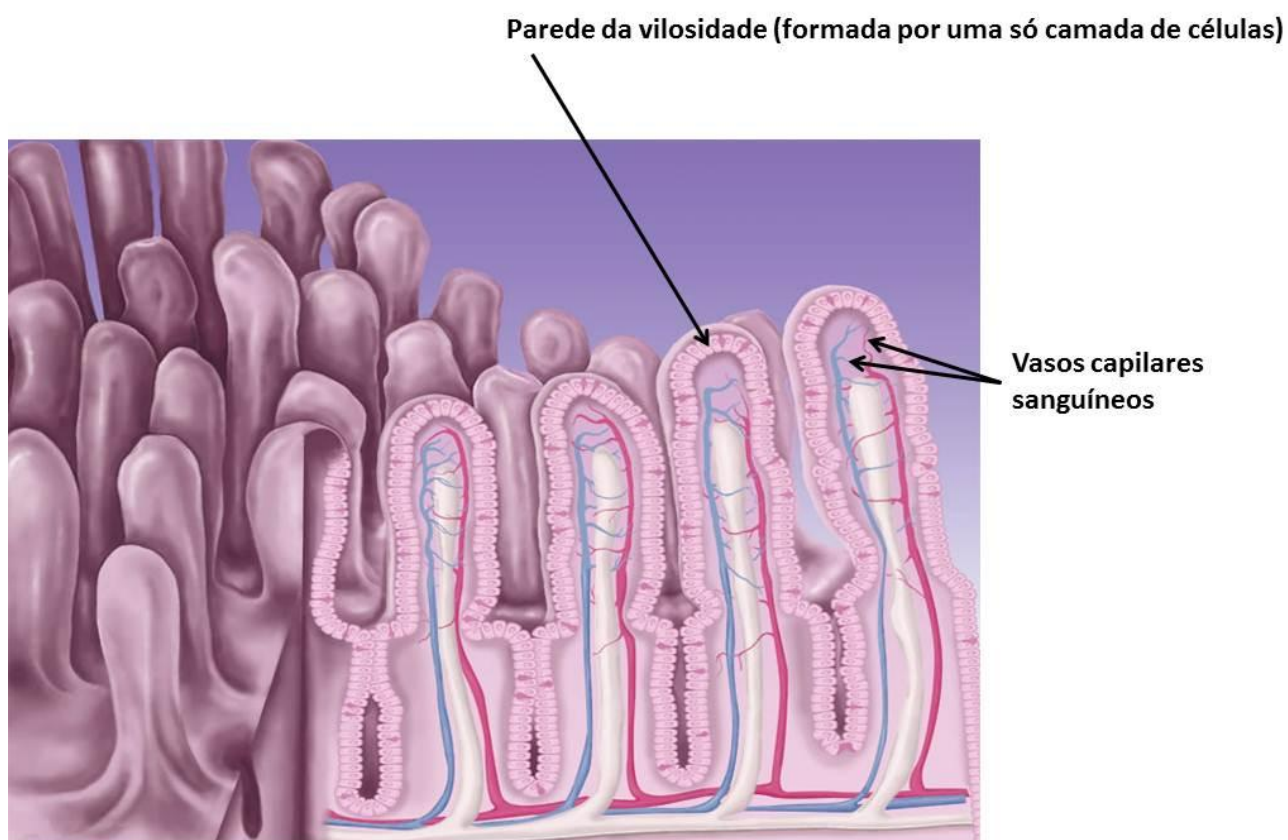
O duodeno, com cerca de 26 cm, contorna frequentemente a cabeça do pâncreas em forma de “U”. A primeira porção, o bulbo duodenal, tem aproximadamente 5cm; a segunda porção a descendente, tem cerca de 10cm; a terceira porção, a transversa, tem cerca de 8cm de tamanho e o seu limite distal está localizado no ponto onde os vasos mesentéricos superiores se cruzam. A quarta e última porção, a ascendente, tem entre 7 e 10cm e dirige-se obliquamente até ao ângulo duodeno-jejunal. A superfície mucosa do bulbo duodenal é

relativamente lisa e esse segmento está intimamente integrado na bomba muscular antropiloro-duodenal. Tem trânsito extremamente rápido, pois o conteúdo gástrico que chega ao bulbo é rapidamente impelido para frente. Essa porção constitui a primeira área do intestino delgado que recebe conteúdo gástrico, razão pela qual está envolvido na patogênese da úlcera péptica. Já a mucosa da porção duodenal descendente é rica em pregas de Kerkring, que confere grande capacidade de absorção. Na terceira e quarta porções, as mucosas não se diferenciam entre si, propiciam a mistura do quimo com as secreções bilio-pancreáticas (ORTIZ *et al.*, 1994).

O jejuno e o íleo apresentam inúmeras diferenças anatômicas e funcionais, mas alguns desses aspectos conferem a ambos características de um único órgão, o qual se estende do ângulo duodeno-jejunal de Treiz à válvula íleo-cecal. Esta válvula impele o refluxo de conteúdo do cólon e do íleo (POTRICH, 2009).

De uma forma sucinta, podemos dizer que a função do intestino delgado consiste em fazer com que os elementos nutritivos dos alimentos sofram um processo digestivo a fim de serem absorvidos. A digestão realiza-se através das diferentes enzimas e fermentos existentes nos sucos entéricos, pancreático e biliar (ORTIZ *et al.*, 1994). A parede intestinal tem muitas pregas cobertas por projeções semelhantes a dedos (vilosidades). Há células epiteliais a cobrir a superfície de cada vilosidade (figura 1), e cada célula tem diversas microvilosidades que se projetam da sua superfície. Assim, as pregas intestinais, vilosidades e microvilosidades aumentam grandemente a área de absorção do intestino delgado. No centro de cada vilosidade, existe um vaso linfático sem saída (vaso quilífero) para absorção do sistema linfático. O vaso quilífero está rodeado de capilares, vênulas, e arteríolas para absorção para o sistema porta (PHIPPS *et al.*, 1990; HUFFSTUTLER; SANDS, 2003).

Figura 2 - Vilosidades intestinais



Fonte: <http://espacociencias6ano.blogspot.com.br/2011/10/absorcao-digestiva.html>

O intestino grosso tem cerca de 1,5m de comprimento e 7cm de diâmetro, apresentando por isso um maior calibre que o intestino delgado. Começa na parte inferior direita do abdómen, pouco acima da junção da coxa com o tronco e divide-se em vários segmentos: ceco, que está ligado ao intestino delgado, cólon ascendente, transverso, descendente, sigmóide e reto (AMORIM *et al.*, 2007).

O ceco comunica-se com o íleo, tendo na sua base o apêndice cecal, que tem em média 8 a 10cm de comprimento e 0,5 a 1cm de diâmetro, Para impedir o refluxo de matéria proveniente do intestino delgado, existe a válvula íleo-cecal (CREMA; SILVA, 1997).

O cólon ascendente encontra-se parcialmente na frente do rim direito e habitualmente é fixo. O cólon transverso é totalmente intraperitoneal na sua porção média, o que lhe confere grande mobilidade, sendo parcialmente extraperitoneal em ambas as flexuras. O cólon descendente e o sigmóide têm um calibre menor que o cólon direito, o que explica que os tumores do cólon esquerdo sejam mais obstrutivos do que os do cólon direito (CREMA; SILVA, 1997).

O reto é um cilindro com cerca de 15cm de comprimento, termina na ampola retal com 2 a 3cm, e comunica-se para o exterior através do ânus. O músculo liso circular no canal anal espessa-se para formar o esfíncter anal (SANDS, 2003)

1.2 Úlceras pépticas

A humanidade tem convivido com as úlceras pépticas desde tempos remotos, e acredita-se que a primeira possível descrição dessa doença tenha sido inscrita nos pilares do templo de Esculápio, em Epidaurus, por volta do século IV antes de Cristo (HOOPERWERF; PASRICHA, 2003).

Fatores como fumo, álcool, estresse, uso de medicamentos, faixa etária, infecção pela *Helicobacter pylori*, hereditariedade de afecções pépticas, entre outros, podem desempenhar diferentes papéis na gênese da doença (SAUL, 2007). A patogenia da doença ulcerosa péptica é mais bem representada como um complexo cenário envolvendo o desequilíbrio entre os fatores de defesa da mucosa (bicarbonato, muco, prostaglandinas, fluxo sanguíneo, óxido nítrico, fatores de crescimento, etc.) e fatores agressivos que compreendem os agentes químicos, que podem ser endógenos (HCl, pepsina) ou exógenos (etanol, antiinflamatórios não esteroidais), e agentes biológicos (*H. pylori*).

A úlcera péptica (gástrica e duodenal) se destaca por sua frequência na população e pelos altos custos econômicos que suscita. Suas recidivas são elevadas e a doença é onerosa tanto diretamente (limitações impostas ao doente, consultas médicas, hospitalizações, medicações) quanto associada à redução da produtividade (absentismo nos locais de trabalho) (ISENBERG; SOLL, 1997).

As úlceras ocorrem frequentemente no duodeno (úlcera duodenal), onde mais de 95% estão localizadas na sua primeira porção, e 90% próximo à junção do piloro com a mucosa duodenal. No estômago (úlcera gástrica), as úlceras se localizam mais comumente no antro (60%) e na junção do antro com o corpo, na pequena curvatura (25%). A incidência de úlceras gástricas parece ser ligeiramente maior em homens em relação às mulheres (1,3: 1), sendo que a faixa etária de maior ocorrência das úlceras duodenais é de 30-55 anos, e das úlceras gástricas é de 50 - 70 anos (ABITBOL, 2007).

O sexo masculino é mais susceptível ao desenvolvimento das úlceras pépticas, sendo que a proporção entre este sexo e o feminino para as úlceras duodenais é cerca de 3:1, e para as úlceras gástricas é cerca de 1,5:1 a 2:1. As mulheres, por sua vez, são geralmente mais afetadas durante ou após a menopausa (CRAWFORD, 2000).

Houve uma diminuição na proporção entre homens e mulheres com úlcera péptica, isto talvez não se deva a um declínio na incidência dessa afecção em homens. Por causa da similaridade dos hábitos entre ambos os sexos e sua atividade social e profissional cada vez mais parecida, pode-se pressupor que as mulheres incorram nos mesmos riscos de desenvolver úlceras pépticas que os homens. Há uma elevada prevalência de tabagismo (80%) em pacientes portadores de úlceras pépticas, porém sua morbidade se reduz após a suspensão do vício. Como o número de mulheres que passaram a fumar foi maior do que o dos homens nas últimas duas décadas, é possível que esse fato, aliado a tensões emocionais, contribua para o aumento de mulheres ulcerosas. Essa mudança de comportamento feminino ocorreu ao mesmo tempo que aumentou seu ingresso no mercado de trabalho, submetendo-se, assim, à dupla jornada de trabalho: profissional e doméstica (WANG *et al.*, 1996).

A mortalidade anual por causa da doença ulcerosa é baixa, sendo ela consequente a complicações das úlceras em pacientes debilitados por outras moléstias ou do tratamento cirúrgico. Por outro lado, a morbidade dessa afecção é considerável, com dor, sangramento, quadros obstrutivos e peritonite quando perfura (ISENBERG *et al.*, 1997).

1.2.1 Etiologia e fisiopatologia

A úlcera, por definição, é uma lesão profunda da mucosa, onde tanto os componentes dos tecidos epitelial e conjuntivo, incluindo miofibroblastos subepiteliais, células do músculo liso, vasos e nervos, podem ser destruídos (MILANI; CALABRÓ, 2001).

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). Além destes fatores lesivos, as lesões também podem ser desencadeadas e/ou agravadas pelo estresse, consumo excessivo de álcool, tabagismo, uso de drogas antiinflamatórias não esteroidais (DAINEs) e pela presença de *Helicobacter pylori* no trato gastrointestinal (WALLACE; GRANGER, 1996; MAITY *et al.*, 2003).

Sob condições de estresse, o sistema nervoso central é alterado com estimulação do hipotálamo e do centro medular causando alterações na motilidade gastrointestinal, aumento da secreção ácida e de pepsina, alteração da liberação de substâncias endógenas como glicocorticóides, catecolaminas e histamina; e também alterações da microcirculação causando isquemia, que provocam diminuição da vitalidade das células gástricas e de capilares, levando a necrose e ao desenvolvimento de úlceras (PACHALY *et al.*, 1993).

Embora os AINEs sejam úteis por sua ação analgésica e propriedades antiinflamatórias, a maior limitação de seu uso é o dano gastrointestinal. Por exemplo, o tratamento em longo prazo com AINEs provoca inflamação do intestino delgado semelhante a doença de Crohn em 70% dos pacientes que recebem essas drogas (BJARNASON *et al.*, 1993; DAVIES *et al.*, 2000; MAIDEN *et al.*, 2005). Além disso, a administração de AINEs pode causar recaída imediata de doença inflamatória intestinal (IBD) e outras doenças que acompanham as lesões da mucosa (KAUFMAN; TAUBIN, 1987; WILSON *et al.*, 1990). Estes dados indicam que os métodos para a redução das enteropatias são necessários e importantes na terapia de AINEs.

Os AINES estão frequentemente associados a úlceras (em até 60% dos pacientes, particularmente naqueles com complicações, como sangramento). A lesão tópica causada pela presença do fármaco no lúmen parece desempenhar um papel menos importante na patogenia dessas úlceras. Os efeitos desses fármacos são, em vez disso, mediados por via sistêmica; o elemento crítico consiste na supressão da forma constitutiva da ciclooxigenase (COX-1) na mucosa e na produção diminuída das prostaglandinas citoprotetoras, a PGE₂ e a PGI₂ (GANOC, 2003; HOOGERWERF; PASRICHA, 2006).

Prostaglandina E₂ (PGE₂) não é apenas um mediador chave da inflamação, mas também um regulador da homeostase da mucosa gastrointestinal através de sua influência em diversas funções e mediadores (HARRIS *et al.*, 2002; ROCCA; FITZGERALD, 2002; TSUTSUMI *et al.*, 2002). PGE₂ aumenta a síntese de interleucina 10 (IL-10) e modula a resposta imune intestinal a dieta (NEWBERRY *et al.*, 1999; MONTELEONE *et al.*, 1999). Indometacina é um dos antiinflamatórios não esteroides (AINE) que reduzem a produção de PGE através da inibição das ciclooxigenases (COXs), COX-1 e COX-2 (ROCCA; FITZGERALD, 2002).

Inúmeros estudos tem relatado a ação da indometacina como um potente inibidor da biossíntese de prostaglandinas (ROBERT, 1977; SOLL *et al.*, 1989) e existem evidências de que o aumento de certas prostaglandinas endógenas podem acentuar a resistência da mucosa gastrointestinal contra agentes ulcerogênicos (WALLACE; GRANGER, 1995). Baseando-se nisso, muitos autores tem utilizado este AINE na metodologia de seus trabalhos para ocasionar a lesão gastrointestinal. A seguir, apresentamos alguns exemplos de estudos que utilizaram este AINE como causador de lesão: análise dos efeitos citoprotetores da desidrocrotina, uma lactona sesquiterpênica obtida a partir das cascas de *Croton cajucara* Benth, em modelo de lesão gástrica induzida por indometacina (LIMA, 1999). Verificação da atividade gastroprotetora do extrato bruto hidroalcoólico da *Achillea millefolium* L, envolvendo

mecanismos de antioxidação, em modelo de lesões gástricas por substâncias como o etanol e a indometacina (POTRICH, 2009). Em estudo efetuado no ano de 2009, foi confirmado o efeito farmacológico gastroprotetor do (-)- α -bisolol, um sesquiterpeno isolado do óleo essencial da camomila (*Matricaria recutita*), em modelos de lesões gástricas induzidas pelo antiinflamatório não esteroide indometacina, e por etanol (ROCHA, 2009).

A cicatrização das úlceras, apesar do uso contínuo de AINES, é possível com a administração de agentes supressores da secreção ácida, habitualmente em doses mais elevadas e por um período consideravelmente mais longo do que os esquemas padrões (como, por exemplo, 8 semanas ou mais). Nessa situação os inibidores da bomba de prótons são superiores aos antagonistas dos receptores H_2 e aos análogos das prostaglandinas (misoprostol), na promoção da cicatrização das úlceras ativas (taxas de cicatrização de 80 a 90% para os inibidores da bomba de prótons versus 60 a 75% para os antagonistas dos receptores H_2) e na prevenção da recidiva das úlceras gástricas e duodenais em caso de administração contínua de AINES (LANZA, 1998; HOOGERWERF; PASRICHA, 2006).

Atualmente, grande parte das pesquisas científicas, envolvendo úlceras pépticas, estão direcionadas no estudo de *Helicobacter 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; PEURA, 2004).

A etiologia da doença péptica é complexa e multifatorial, ou seja, o desencadeamento das lesões geralmente se relaciona a uma associação de fatores (hereditariedade, sexo, raça, idade, tipo de alimentação, tabagismo, estresse, consumo excessivo de bebidas alcoólicas, presença de *H. pylori*, uso de DAINES, etc.), e raramente a um fator isolado (GUEDES, 2010).

Os desafios futuros para a ciência incluem a compreensão mais detalhada sobre a etiologia e patogênese da doença, e também a individualização do caso clínico de cada paciente, possibilitando assim uma intervenção farmacológica mais direcionada caso a caso (GUEDES, 2010).

1.4 Plantas Medicinais

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), planta medicinal é toda planta que possui em um ou em vários de seus órgãos substâncias com finalidade terapêutica ou que estas substâncias sejam ponto de partida para a síntese de produtos químicos e farmacêuticos. A estas substâncias é dado o nome de princípios ativos e são eles os responsáveis pelo efeito terapêutico que a planta medicinal possui (OMANARI, 2002).

O uso de plantas medicinais é milenar e difundido por todo o mundo, seja no uso em rituais religiosos ou como medicamento (LI; OHIZUMI, 2004). O conhecimento sobre plantas medicinais representa muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (MACIEL *et al.*, 2002) . O emprego de plantas, como medicamento, ainda é de grande importância em todo o mundo (KINGHORN, 2002).

Juntos os países da América Latina possuem grande parte da biodiversidade do mundo. O Brasil sozinho possui de 20 a 22% das plantas e microorganismos existentes. Todavia é estimado que não mais que 25000 espécies de plantas foram objetos de alguma investigação científica (CALIXTO, 2005). Contudo, o potencial dos produtos de origem natural, como fonte de novas drogas, continua largamente inexplorado, uma vez que somente uma pequena fração de plantas, animais e microorganismos tem sido investigada fitoquímica e biologicamente (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991).

No Brasil, especialmente na Região Nordeste, o uso de plantas medicinais e preparações caseiras assumem importância fundamental no tratamento das patologias que afetam as populações de baixa renda, tendo em vista a deficiência de assistência médica, a influência da transmissão oral dos hábitos culturais e a disponibilidade da flora (MATOS, 1989).

As novas tendências globais de preocupação com a biodiversidade e as idéias de desenvolvimento sustentável trouxeram novos olhares sobre o estudo das plantas medicinais brasileiras. Novas linhas de pesquisa foram estabelecidas em universidades brasileiras, algumas delas buscando bases mais sólidas para a validação científica do uso de plantas medicinais (LORENZI; MATOS, 2002).

Em termos históricos, a pesquisa de plantas medicinais tomou impulso após o isolamento da morfina no século XIX (BALUNAS; KINGHORN, 2005). As plantas e seus derivados são as maiores fontes de fármacos, movimentando cerca de 30% do mercado

farmacêutico (KIRKPATRICK, 2002). De acordo com Newman *et al.* (2003), entre os anos de 1981 e 2002, de 877 novas moléculas introduzidas no mercado, cerca de 49% eram substâncias isoladas de produtos naturais, semissintéticos, derivados de produtos naturais ou então moléculas sintetizadas tomando como modelo estruturas de origem natural.

A possibilidade de se encontrar novas moléculas a partir de produtos naturais é imensurável (GURBUZ *et al.*, 2002). O estudo de plantas medicinais não se restringe apenas à procura de novas moléculas, já que as mesmas podem ser empregadas em diferentes formulações, como infusões, tinturas, extratos, frações ou no desenvolvimento de fitoterápicos (RATES, 2001).

Levantamentos etnofarmacológicos realizados nas matas brasileiras são instrumentos promissores na descoberta de novas drogas, uma vez que o Brasil possui altos índices de biodiversidade e endemismo associados a um processo de miscigenação intenso que resultou em riqueza considerável de conhecimentos sobre sua flora (RODRIGUES; CARLINI, 2003). Essa riqueza de saberes serve de alicerce não somente para a descoberta de novas espécies vegetais a serem exploradas com fins terapêuticos ou para a pesquisa fitoquímica de espécies particulares, mas também como base para o entendimento da própria humanidade (OLIVEIRA, 2010).

Com o objetivo de assegurar o acesso, o uso correto de plantas medicinais e fitoterápicos, bem como a utilização sustentável da biodiversidade brasileira e o desenvolvimento da indústria nacional, foi aprovado no dia 22 de junho, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos pelo governo federal (BRASIL, 2006). Essa política vem sedimentar o uso destas substâncias ou plantas nas prescrições médicas, em conjunto à Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS).

É sabido que a natureza oferece uma fonte inesgotável de estruturas químicas a serem descobertas e, como consequência deste fato, há uma grande possibilidade de desenvolvimento de alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças que ainda não apresentam cura ou um tratamento efetivamente adequado, justificando o grande interesse farmacológico nas pesquisas que envolvem plantas medicinais. De fato, as plantas e seus derivados são as maiores fontes de drogas, movimentando cerca de 30% do mercado farmacêutico (KIRKPATRICK, 2002). De acordo com Newman e colaboradores (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, ou então moléculas

sintetizadas tomando como modelo estruturas de origem natural. Além disso, de acordo com Calixto (2003), as pesquisas envolvendo produtos naturais auxiliaram na compreensão de muitos fenômenos complexos envolvendo estruturas biológicas como enzimas, receptores e canais iônicos.

Um ponto importante a ser considerado na realização da pesquisa com plantas medicinais relaciona-se ao critério de seleção das espécies vegetais para se obter sucesso na investigação farmacológica. Sendo o Brasil um país com rica biodiversidade e conhecimentos tradicionais abundantes, a escolha da espécie vegetal com base no conhecimento popular ou etnofarmacológico aumenta a possibilidade de se encontrar novos compostos (HOLETZ *et al.*, 2002). Por outro lado, a seleção com base nos constituintes químicos (potencialmente ativos) encontrados em um dado gênero ou família aumenta ainda mais a possibilidade de se encontrar grandes quantidades de compostos ativos de interesse.

Nos últimos anos, foram realizadas pesquisas no Laboratório de Produtos Naturais da UFC, nas quais foram evidenciados diversos princípios ativos isolados de plantas medicinais com ação protetora sobre o TGI, são exemplos: o efeito gastroprotetor do guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) (CAMPOS *et al.*, 2003), do 1,8 cineol (SANTOS *et al.*, 2001), da resina bruta e da mistura contendo α e β -amirina isolada de *Protium hepthaphyllum* (OLIVEIRA *et al.*, 2004a, OLIVEIRA *et al.*, 2004^b), do lupeol um triterpeno pentacíclico isolado da casca do caule de *Cenostigma macrophyllum* (LIRA, 2009), ação protetora do óleo de copaíba de *Copaifera langsdorff* no modelo de colite (PAIVA *et al.*, 2004) dentre outros.

O Laboratório de Produtos Naturais (LPN) contribui para a validação pré-clínica do uso de plantas medicinais por meio da pesquisa científica com metodologias internacionalmente padronizadas. Desta forma, os estudos realizados neste laboratório visam demonstrar a eficácia, a segurança e o mecanismo de ação de plantas medicinais com atividades sobre o trato gastrointestinal (TGI). Sendo assim, considerando informações etnofarmacológicas, foram iniciados os estudos para investigação das atividades da espécie vegetal denominada *Egletes viscosa* Less., concentrando as pesquisas na avaliação dos efeitos desta planta sobre o trato gastrointestinal e os possíveis mecanismos de ação envolvidos nesse efeito.

1.6 A *Egletes viscosa* Less

A *Egletes viscosa* Less, denominada popularmente macela da terra, para diferenciá-la da macela verdadeira (*Achyrocline satureioides*), também é chamada losna-do-

mato (Minas Gerais), macela do campo (Paraíba) ou botancela (Peru). É uma planta de ampla distribuição nacional, tendo como destaque a região Nordeste, sendo distribuída em praticamente todo estado do Ceará. É a única erva silvestre que está presente às margens das lagoas, açudes e cursos d'água (SOUZA, 1998).

A *Egletes viscosa* Less pertence à família Asteraceae, sendo que esta família representa 10% da flora mundial, apresentando cerca de 1535 gêneros e 23000 espécies (BREMER, 1994).

A parte utilizada da planta são os capítulos florais (conjunto de flores), conhecidos como cabecinhas, estas são comumente encontradas nos mercados (MATOS, 1990). Em nossa capital, os capítulos florais são muito encontrados no antigo Mercado Central, na Praça da Sé, em escala menor nos diversos ervanários populares e raizeiros distribuídos por todas as feiras-livres das grandes e pequenas cidades do Ceará.

Para cultivá-las, as sementes devem ser deixadas, inicialmente, por um período de quatro a seis semanas, imersas em água, para quebra da dormência, e então semeadas. Os capítulos ou cabecinhas, facilmente encontrados no mercado de ervas, podem ser usados na forma de chá ou tintura. (MATOS, 2000).

Figura 3- *Egletes viscosa* Less.



Fonte: Acervo do Prof. Edilberto Rocha Silveira na UFC - Campus do PICI

Os capítulos florais foram obtidos a partir de métodos extrativistas e comercializados para o uso no tratamento caseiro de problemas digestivos e intestinais, cólicas, gases, azia, má digestão, enxaqueca e diarreia, bem como nos casos de irregularidades menstruais (LORENZI & MATOS, 2002).

1.6.1 Principais componentes químicos

Os estudos iniciais com macela comercial, principalmente no fim da década de 80, permitiram a obtenção de um óleo essencial caracterizado principalmente pela presença majoritária do acetato de *trans*-pinocarveíla. Como principais constituintes não voláteis, foram isolados dois diterpenos furânicos: o majoritário, de cadeia linear, o ácido centipédico, e o outro bíblico, de esqueleto *ent*-clerodano, a lactona do ácido hawtriwaico. Além destes, um flavonóide, a 5,4'-dihidroxi-3,7,8,3'- tetrametoxiflavona comumente designada ternatina (SILVEIRA; PESSOA, 2005).

1.6.2 Usos medicinais

Os capítulos florais são obtidos de forma extrativista e comercializados para uso no tratamento caseiro de problemas digestivos e intestinais, cólicas, gases, azia, má digestão, diarreia e enxaqueca, bem como nos casos de irregularidades menstruais (LORENZI; MATOS, 2002).

1.6.3 Estudos farmacológicos

Vários estudos farmacológicos vem sendo desenvolvidos com os componentes ativos principais da macela. Uma variedade de atividades biológicas já foi identificada para a lactona do ácido hawtriwaico, para o ácido centipédico, para ternatina e para o óleo essencial de *Egletes viscosa* Less (GUEDES, 2002).

Investigações farmacológicas identificaram uma atividade antianafilática, antiinflamatória, gastroprotetora, antidiarreica, hepatoprotetora da ternatina (SOUZA, 1992; RAO, 1997; RAO, 1994; SOUZA, 1999), uma atividade gastroprotetora e antinociceptiva do ácido centipédico e da lactona do ácido hawtriwaico (GUEDES, 2002). Estudos com o óleo essencial, que possui como constituinte majoritário o acetato de *trans*-pinocarveíla, mostraram possuir atividade antinociceptiva, anticonvulsivante e bactericida (SOUZA, 1998). Atividade sobre a inibição da migração neutrofílica e modulação da ação dos macrófagos (RAO, 2003). Além de ação antitrombótica (SOUZA, 1994) e agindo ainda na uroproteção, inibindo a cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida (VIEIRA, 2004).

O ácido centipédico e a lactona do ácido hawtriwaico possuem ação gastroprotetora em modelos de úlcera induzidas por etanol e indometacina. Estes diterpenos

tem ainda atividade antinociceptiva (GUEDES, 2002), assim como atividade relaxante em jejuno isolado de rato nas contrações induzidas por acetilcolina e serotonina (SIMOES, 1989). Melo (2006) verificou ainda que a lactona é capaz de inibir inflamação neurogênica. Outros estudos demonstraram a atividade antiinflamatória dos diterpenos em dermatite (CALOU, 2008) e ação antiproliferativa de linhagens de células cancerosas humanas, *in vitro*, com inibição da síntese de DNA (PESSOA, 2000).

1.5 Diterpenos

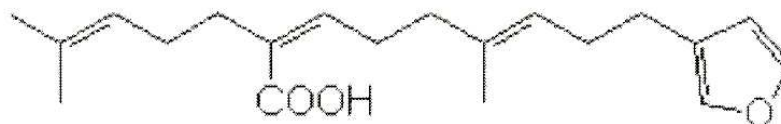
Os diterpenos (C₂₀) compreendem um grande grupo de compostos não voláteis, possuindo uma vasta gama de atividades diferentes que incluem os hormônios, ácidos resínicos e agentes anticancerígenos (ROBBERS *et al.*, 1997; CROTEAU *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2003). Peres (2004) descreve que talvez o principal papel desempenhado por um diterpeno seja o das giberelinas, as quais são importantes hormônios vegetais responsáveis pela germinação de sementes, alongamento caulinar e expansão dos frutos de muitas espécies vegetais.

Possuem esqueleto básico com 20 átomos de carbono e derivam biogeneticamente do pirofosfato de geranyl geranila, que resulta do encadeamento cabeça-cauda de quatro unidades de isopreno (TORSSELL, 1983) (FIGURA 3).

Há várias décadas, as propriedades farmacológicas dos diterpenos vem sendo determinadas, entre elas: antibiótica (NAKANISHI, 1974), antitumoral (SENILH *et al.*, 1998; ADOLF *et al.*, 1985), antiinflamatória (BRAQUET, 1988), antireumática (GU *et al.*, 1995) e antiulcerogênica (SHIRAKABE *et al.*, 1995). Foram descritas também atividades vasodilatadoras (DUARTE *et al.*, 1992; LAMBERTE *et al.*, 1994) e vasoconstritoras (BAZAN *et al.*, 1993; MIRANDA *et al.*, 1998).

Dentre os diterpenos biologicamente ativos estudados, incluem-se: forskolin, com atividade hipotensora e um ativador específico e reversível das isoformas particulada e solúvel da adenililciclase (SEAMON *et al.*, 1981; DALY, 1981); ésteres de forbol, isolados inicialmente de plantas do gênero *Croton* que são ativadores de proteína quinase C e tem sido largamente utilizados para o estudo das funções biológicas, propriedades e distribuição desta enzima e na investigação da carcinogênese química (NISHIZUKA, 1986; CHUANG, 1989) e cleonol com atividades hipotensora, espasmolítica inespecífica, cronotrópica positiva e vasodilatadora (DUBEY *et al.*, 1974). Eles apresentam importância química e comercial, porque o seu uso leva a pesquisa de novos produtos farmacêuticos (DZEROSKI *et al.*, 1998).

Figura 4- Estrutura química do ácido centipédico



2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a ação enteroprotetora do ácido centipédico em modelo de lesão intestinal *in vivo* e sua ação sobre células IEC-6 *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do ácido centipédico contra lesões intestinais induzidas por indometacina em ratos, analisando parâmetros de estresse oxidativo (MDA, NP-SH, mieloperoxidase, catalase) e alterações histológicas.
- Avaliar sua segurança, analisando a toxicidade, a partir de sua ação sobre a função renal (dosagem de uréia e creatinina) e hepática (dosagem de AST e ALT).
- Estudar a ação do ácido centipédico associado à indometacina sobre a proliferação e migração de células intestinais (IEC-6) *in vitro*.

3.MATERIAIS

3.1 Material botânico

Ácido centipédico, a partir dos capítulos florais da *Egletes viscosa*, foi realizada no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC, pelo Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira.

3.2. Animais experimentais

Foram utilizados ratos albinos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, adultos, machos, pesando entre 180-200 g, provenientes do Biotério Central da UFC. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno, à temperatura ambiente de 22-24 °C, com ciclos de claro/escuro de 12 em 12 h, recebendo ração padrão e água “*ad libitum*”.

3.2.1 Aspectos éticos

Os protocolos utilizados neste trabalho possuem aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA), do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da UFC (Protocolo nº40/07).

3.3 Drogas e reagentes utilizados

PRODUTOS	ORIGEM
Ácido clorídrico P.A.	Merck, Brasil
Álcool etílico absoluto P.A.	Synth, Brasil
Acido tricloroacético P.A.	Sigma, USA
Cloreto de sódio	Vetec, Brasil
Dexametasona	Schering-Plough
Indometacina (Indocid®)	Merck, Brasil
N-Acetilcisteína	Sigma, USA
Tween 80	Sigma, USA

3.4 Equipamentos

EQUIPAMENTO	ORIGEM
Balança analítica (mod. AX-200)	Shimadzu, Japão
Balança para animais (mod. MF-6)	Filizola, Brasil
Centrífuga refrigerada, modelo CT 5500 DR	CIENTEC®, Brasil
Flow Cytometer	COULTER® EPICS® XL-MCL™
Freezer -75°C	Legaci System®
Lavadora ultrassônica, modelo USC 700	UNIQUE®
Material cirúrgico	-----
Pipetas automáticas	Gilson®
Seringas plásticas	B-D-Plastipak
Vidrarias	Pirex, USA
Microscópio invertido	Nikon E400, Japão

4 MÉTODOS

4.1 Obtenção do ácido centipédico

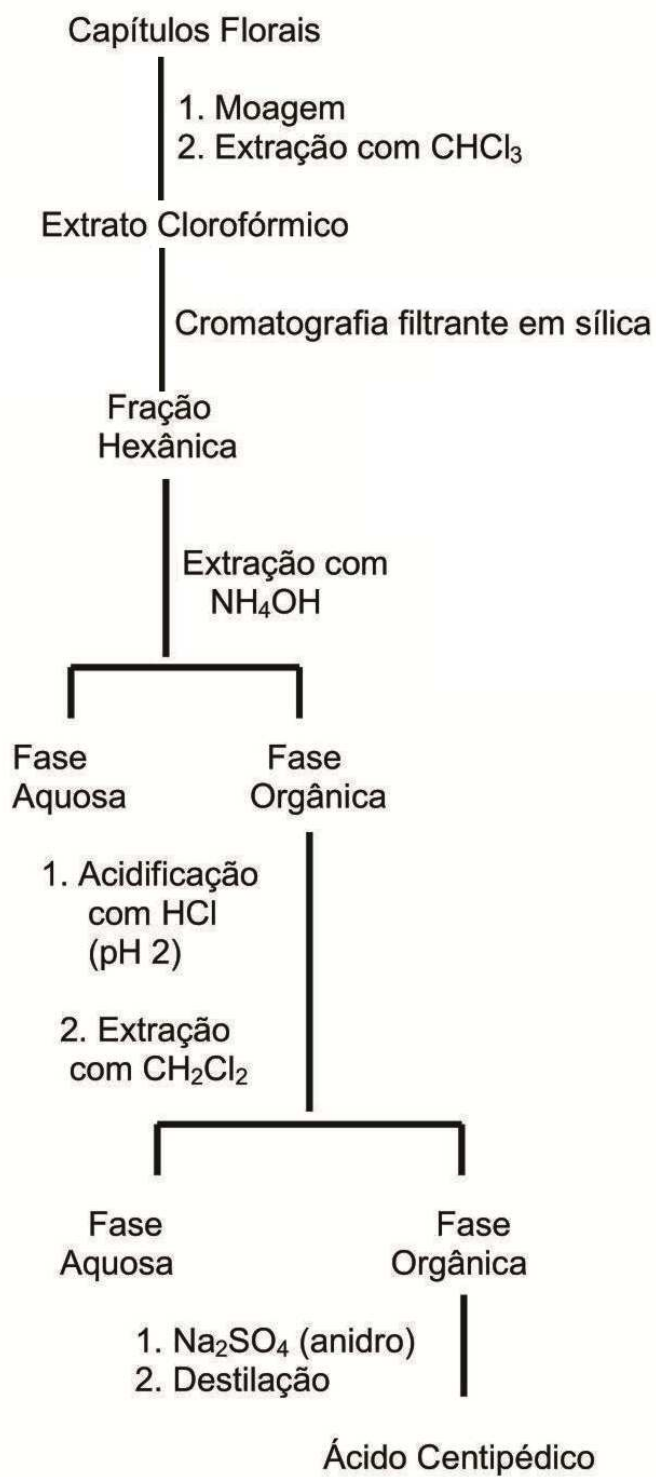
O isolamento e a caracterização do ácido centipédico foram feitas pelo Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, seguindo a metodologia descrita por Lima *et al.* (1996).

Os capítulos florais (2,58kg) de *Egletes viscosa* Less, previamente secos e moídos, foram submetidos à extração com clorofórmio. Após efetuação dos processos de filtração e destilação sob pressão reduzida, foi obtido 200,86g (7,79%) de extrato. Este extrato, foi fracionado em coluna cromatográfica e eluído com hexano, obtendo-se a fração hexânica.

Cerca de 56,87 g da fração hexânica foram dissolvidos em 100 mL de etanol e ao mesmo adicionou-se 300 mL de NH_4OH sob agitação. Após 24 h, 700 mL de água destilada foi adicionada à mistura. Para extrair a gordura do extrato, foi utilizado o éter de petróleo. Enquanto que para a acidificação até pH 2 da solução aquosa, utilizou-se diclorometano. Por fim, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, e o solvente destilado sob pressão reduzida, obtendo-se 30,75 g de um óleo amarelo claro, que foi identificado como ácido centipédico. Com rendimento de 1,19%.

Figura 5 - Esquema do método de extração do ácido centipédico

Isolamento do Ácido Centipédico



4.2 Lesão intestinal induzida por indometacina em ratos

Ratos machos (n=7/grupo), em jejum de sólidos por 18h, foram tratados com veículo (2% Tween 80 em água destilada, 10kg/kg) ou ácido centipédico (50 mg/kg, v.o.) ou dexametasona (3 mg/kg, v.o.) duas horas antes da administração de indometacina (10 mg/kg, v.o.), durante três dias consecutivos. Um grupo tratado apenas com salina, por três dias, foi adicionado ao estudo.

No quarto dia, foram retiradas amostras de sangue para a dosagem de uréia e creatinina, para analisar possível toxicidade renal, e, dosagem de AST e ALT, para analisar possíveis danos hepáticos. As dosagens foram realizadas segundo as instruções dos kits da Labtest®.

Os animais foram então sacrificados. O abdômen foi aberto e o intestino delgado foi retirado e lavado com salina para a retirada de algum resíduo alimentar. O intestino foi aberto e as úlceras formadas contadas em todos os grupos tratados. Foi contado o número de úlceras menores que 5 mm de comprimento e o número de úlceras maiores que 5 mm (SOMASUNDARAM *et al.*, 2002).

Amostras do intestino foram retiradas e homogeneizadas para análise de parâmetros de estresse oxidativo (MDA, MPO, NP-SH e catalase) e para avaliação histológica.

4.2.1 Dosagem de catalase

A atividade da catalase foi medida de acordo com o método descrito por Aebi, 1974. Ao homogenato intestinal a 5% em tampão fosfato (20 μ L), foram adicionados 2 mL de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7) contendo H₂O₂ 10 mM. A atividade da catalase foi definida como a quantidade da enzima requerida para decompor 1 nmol de H₂O₂ por min, a 25 °C e pH 7. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 230 nm. Os resultados foram expressos como milimols por minuto por grama de tecido (mmol/min/g tecido).

4.2.2 Dosagem de mieloperoxidase (MPO)

Amostras de intestino foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Após o congelamento foram homogeneizadas em solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5% (HTAB) em tampão fosfato 50 mM pH 6,0 (10 ml por 50 g do

tecido). O homogenato foi submetido a três ciclos (5min) de congelamento (- 70° C) e descongelamento (15 s no sonicador). As amostras foram então centrifugadas a 4000 rpm, 4°C, por 15 min, para remover o material insolúvel. Ao sobrenadante (0,1ml), foi adicionado 2,9 ml de tampão fosfato (50 mM, pH 6) contendo 0,167mg/ml de hidrócloro de θ – dianisidine e 0,0005% de peróxido de hidrogênio. As cinéticas de mudança na absorvância a 470 nm foram medidas no tempo 0 e 5 min (BRADLEY *et al.*,1982). Os níveis de MPO estão expressos em densidade óptica.

4.3 Cultura de células epiteliais intestinais IEC-6

A linhagem celular IEC-6 (célula epitelial intestinal de ratos) foi desenvolvida por Quaroni *et al.* (1979). As células utilizadas nesse trabalho foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). A IEC-6 foi cultivada em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com soro fetal bovino inativado 5%, insulina 95% (10 μ g/ml), penicilina 100 U/ml, estreptomicina (100 μ g/ml) e piruvato de sódio 1mM. As células foram mantidas a 37° C em 5% de CO₂. As células foram semeadas a uma densidade de aproximadamente $6,25 \times 10^4$ células/cm² e foram cultivadas em monocamada confluyente, antes da introdução de meios contendo tratamentos experimentais.

4.3.1 Migração celular em cultura de células epiteliais intestinais (IEC-6)

O ensaio da migração celular seguiu o modelo descrito por McCormack *et al.* (1992). As células IEC-6 foram semeadas em placa de cultura (6 poços), em uma concentração de 10^5 células/mL em meio de cultura padrão (com glutamina). Ao atingirem a confluência (depois de 24 h), após retirar 50% do meio de cultura de cada poço, foi feito um risco no centro do poço ao longo de uma distância de 30 mm na monocamada de células com uma lâmina estéril, arrastando-se as células para a borda do poço (no sentido da esquerda para direita). Após a ranhura, lavou-se duas vezes as células com tampão PBS (1 mL/poço) e incubadas com meio sem glutamina suplementado ou não com concentrações crescentes de ácido centipédico (AC) de 12,5-100 μ M ou indometacina (250-1000 μ M), ou, associando-se as concentrações de AC (12.5-100 μ M) a duas concentrações de indometacina (250 e 1000 μ M) para verificar o comportamento do diterpeno frente a esse agente. As placas foram incubadas a 37°C em 5% de CO₂. Depois de 24 h, a coluna com maior taxa de migração foi

selecionada e as células foram observadas em microscópio invertido (Nikon E400, Japan) em um aumento de 100x, fotografadas e contadas seguindo o modelo descrito por Brito *et al.* (2005).

4.3.2 Proliferação celular em cultura de células epiteliais intestinais (IEC-6).

A proliferação celular foi medida indiretamente usando o Kit de proliferação celular, sal tetrazólio WST-1 adquirido da ROCHE® (Mannheim, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. As células IEC-6 foram cultivadas em placa contendo 96 poços em uma concentração de 4×10^4 células/mL em 100 mL de meio padrão (meio com glutamina) na incubadora a 37° C em 5% de CO₂. Após atingirem confluência de 20 a 30%, em torno de 48h, as células foram lavadas duas vezes com solução tampão PBS estéril para remoção de todo o meio de cultura e incubadas com meio (sem glutamina) suplementado ou não com AC (6.25 – 200 µM), indometacina (250-1000µM) ou a associação do AC (12.5-100µM) com a indometacina (250 e 1000 µM). Após 24 horas (37°C em 5% de CO₂), as células foram incubadas por 2 horas com 10µL do sal tetrazólio WST-1. A absorbância foi medida a 450 nm. Esse composto tetrazólio modificado é reduzido a formazan (marcador solúvel em água) por células metabolicamente ativas, sob ação de uma desidrogenase. A produção de formazan é proporcional ao número de células viáveis na cultura e foi observada duas horas após a adição dos reagentes. Essa análise é uma medida indireta da proliferação celular em função do tempo.

4.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa Graph Pad Prism 4.0 (USA). Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média (E.P.M.) ou mediana (máximo e mínimo). Foi realizada análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Student Newman Keul, para dados paramétricos, e teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunns, para dados não paramétricos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção do ácido centipédico

A obtenção do ácido centipédico, a partir dos capítulos florais de *Egletes viscosa* Less, teve um rendimento de aproximadamente 1,19%.

5.2 Efeito do ácido centipédico sobre úlceras intestinais induzidas por indometacina em ratos

5.2.1 Análise de parâmetros bioquímicos

5.2.1.1 Função renal (dosagem de uréia e creatinina)

Os efeitos do AC e da dexametasona sobre os níveis séricos de uréia e creatinina estão demonstrados na **Tabela 1**.

A indometacina não alterou os níveis séricos de uréia no grupo de animais que recebeu apenas o veículo (92.87 ± 8.47 mg/dL) quando comparado ao grupo normal que recebeu apenas solução salina (90.84 ± 2.11 mg/dL).

AC (50 mg/kg) diminuiu discretamente, porém não significativamente, os níveis séricos de uréia (83.58 ± 8.56 mg/dL) quando comparado ao grupo veículo (92.87 ± 8.47 mg/dL).

Dexametasona (3 mg/kg), usado como controle positivo, também diminuiu, porém não significativamente, os níveis séricos de uréia (80.36 ± 15.07 mg/dL) quando comparado ao grupo veículo (92.87 ± 8.47 mg/dL).

A indometacina promoveu aumento significativo ($p < 0,05$) dos níveis séricos de creatinina no grupo de animais que recebeu apenas o veículo (0.87 ± 0.10 mg/dL) quando comparado ao grupo normal que recebeu apenas solução salina (0.59 ± 0.02 mg/dL).

A administração de AC (50 mg/kg) ou dexametasona (3 mg/kg) não conseguiu reverter o aumento dos níveis séricos de creatinina induzidos pela indometacina (0.85 ± 0.01 e 0.86 ± 0.06 mg/dL, respectivamente) quando comparado ao grupo veículo (0.87 ± 0.10 mg/dL).

Tabela 1 - Efeito do ácido centipédico e dexametasona no modelo de úlcera intestinal induzida por indometacina em ratos: função renal.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	URÉIA (mg/dL)	CREATININA (mg/dL)
Salina	-	90.84±2.11	0.59±0.02
Veículo	10	92.87±8.47	0.87±0.10*
AC	50	83.58±8.56	0.85±0.01*
Dexametasona	3	80.36±15.07	0.86±0.06*

Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) para 7 animais/grupo Os animais foram tratados com veículo, AC (50 mg/kg, v.o.) ou dexametasona (3 mg/kg, v.o.), 2h antes da administração da indometacina, durante três dias consecutivos. O sangue dos animais foi coletado no 4º dia após o início dos tratamentos. *p<0,05 vs grupo salina (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

5.2.1.2 Função hepática (dosagem de AST e ALT)

Os efeitos do AC e da dexametasona sobre os níveis séricos de AST e ALT estão demonstrados na Tabela 2.

A indometacina não alterou os níveis séricos de AST (61.07 ± 3.97 U.I./L) quando comparado ao grupo normal que recebeu apenas solução salina (61.47 ± 4.57 U.I./L).

De maneira similar os grupos AC (50 mg/kg) e dexametasona (3 mg/kg) não tiveram alterações significativas nos níveis séricos de AST (63.99 ± 9.21 e 63.16 ± 3.00 U.I./L, respectivamente) quando comparado ao grupo veículo.

Da mesma forma indometacina não alterou os níveis séricos de ALT (29.64 ± 7.07 U.I./L) quando comparado ao grupo normal que recebeu apenas solução salina (24.85 ± 4.99 U.I./dL). De maneira similar, os grupos AC (50 mg/kg) e dexametasona (3 mg/kg) não alteraram os níveis séricos de ALT (24.09 ± 2.09 e 27.30 ± 3.26 U.I./L, respectivamente), quando comparado ao grupo veículo.

Tabela 2 - Efeito do ácido centipédico e dexametasona no modelo de úlcera intestinal induzida por indometacina em ratos: função hepática.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	AST (U.I/L)	ALT (U.I/L)
Salina	-	61.47 ± 4.57	24.85 ± 4.99
Veículo	10	61.07 ± 3.97	29.64 ± 7.07
AC	50	63.99 ± 9.21	24.09 ± 2.09
Dexametasona	3	63.16 ± 3.00	27.30 ± 3.26

Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) para 7 animais/grupo. Os animais foram tratados com veículo, AC (50 mg/kg, v.o.) ou dexametasona (3 mg/kg, v.o.), 2h antes da administração da indometacina, durante três dias consecutivos. O sangue dos animais foi coletado no 4º dia após o início dos tratamentos.

5.2.2 Quantificação das úlceras – análise macroscópica

Os efeitos do AC e da dexametasona sobre o número de lesões intestinais induzidas por indometacina estão demonstrados na **Tabela 3 e Gráfico 1**.

A indometacina promoveu intensos danos à mucosa intestinal sob a forma de erosões no grupo de animais que recebeu apenas o veículo. O número de úlceras pontuais (<5mm) foi de 15,33±3,93, significativamente ($p<0,001$) maior que o grupo controle salina. AC (50 mg/kg) mostrou média de 15,67±0,88 úlceras pontuais. Dexametasona (3 mg/kg) diminuiu de forma significativa ($p<0,001$) o número de úlceras <5mm (1,66±1,30) quando comparado ao grupo veículo.

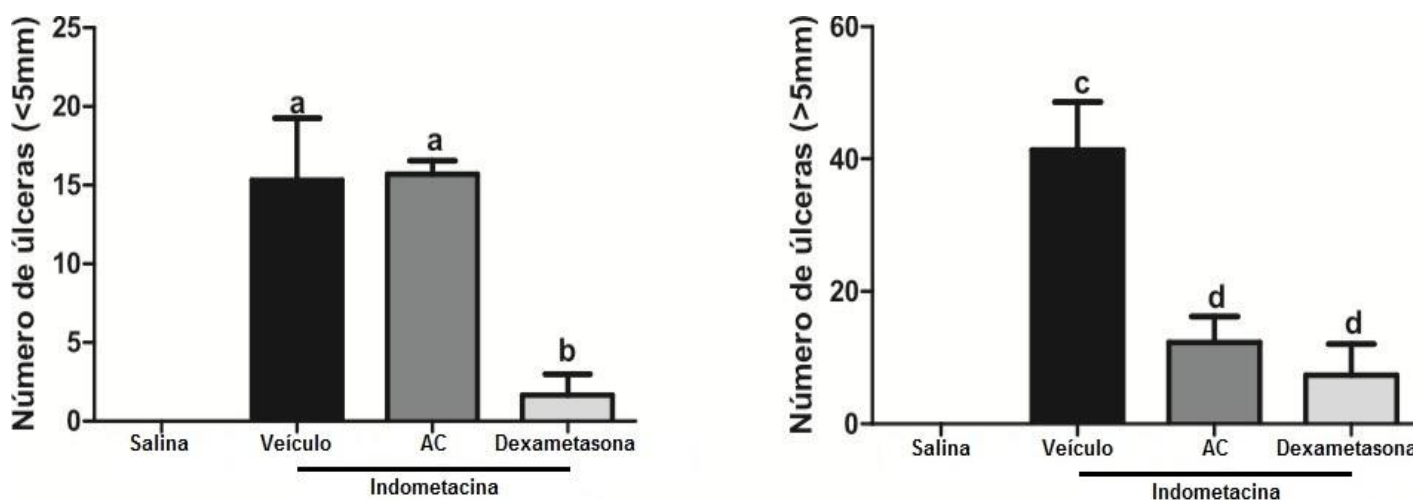
Quanto ao número de úlceras longitudinais (>5mm), observou-se grande quantidade destas no grupo veículo (42,33±7,21). AC diminuiu de forma significativa ($p<0,001$) o número de úlceras longitudinais (12,25±3,96) quando comparado ao veículo (42,33±7,21). De maneira semelhante, dexametasona também inibiu a formação de úlceras longitudinais de forma significativa ($p<0,001$) (7,33±4,66), quando comparada ao grupo veículo.

Tabela 3 - Efeito do ácido centipédico e dexametasona sobre o número de úlceras intestinais pontuais e longitudinais induzidas por indometacina em ratos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	Nº ÚLCERAS PONTUAIS (< 5mm)	Nº ÚLCERAS LONGITUDINAIS (> 5mm)
Salina	-	0	0
Veículo	10	15.33±3.93 ^a	42.33±7.21 ^a
AC	50	15.67±0.88 ^a	12.25±3.96 ^b
Dexametasona	3	1.66±1.30 ^b	7.33±4.66 ^b

Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) para 7 animais/grupo Os animais foram prétratados com veículo, AC (50 mg/kg, v.o.) ou dexametasona (3 mg/kg, v.o.), 2h antes da administração da indometacina, durante três dias consecutivos. O sangue dos animais foi coletado no 4º dia após o início dos tratamentos. ^ap<0,001 vs salina; ^bp<0,001 vs veículo (Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunns).

Gráfico 1- Efeito do ácido centipédico e dexametasona sobre o número de úlceras intestinais induzidas por indometacina em ratos.



Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) para 7 animais/grupo Os animais foram tratados com veículo, AC (50 mg/kg, v.o.) ou dexametasona (3 mg/kg, v.o.), 2h antes da administração da indometacina, durante três dias consecutivos. O sangue dos animais foi coletado no 4º dia após o início dos tratamentos. ^ap<0,001 vs salina; ^bp<0,001 vs veículo (Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunns).

5.2.3 Ação sobre o estresse oxidativo

5.2.3.1 Dosagem de malonildialdeído

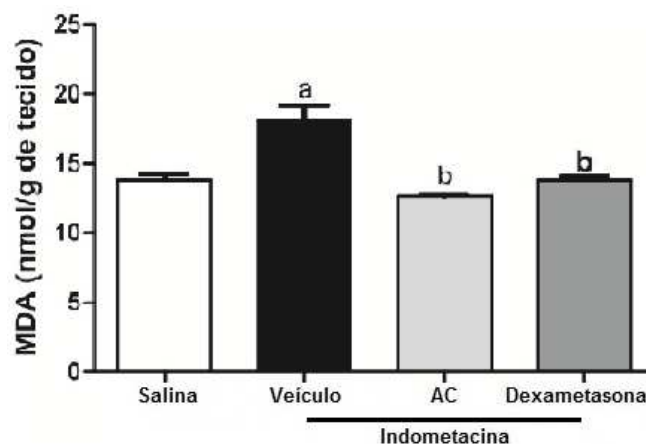
Os animais que receberam indometacina mostraram aumento nos níveis de malonildialdeído (17.06 ± 1.83 nmol/g de tecido), quando comparados aos animais do grupo salina (13.73 ± 0.49 nmol/g de tecido). AC (50 mg/kg) foi capaz de atenuar a produção de malonildealdeído produzida pela indometacina (12.60 ± 0.13 nmol/g de tecido) de forma significativa ($p < 0,05$). A dexametasona (3mg/kg) também inibiu o aumento nos níveis de malonildialdeído (13.75 ± 0.24 nmol/g de tecido) produzida pela indometacina (**TABELA 4 e GRÁFICO 2**).

Tabela 4 - Efeito do ácido centipédico e dexametasona sobre os níveis de malonildealdeído no modelo de úlcera intestinal induzida por indometacina em ratos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	MALONILDIALDEÍDO (nmol/g tecido)
Salina	-	13.73 ± 0.49
Veículo	10	17.99 ± 1.15^a
AC	50	12.60 ± 0.13^b
Dexametasona	3	13.75 ± 0.24^b

Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 7 animais/grupo Os animais foram tratados com veículo, AC (50 mg/kg, v.o.) ou dexametasona (3 mg/kg, v.o.), 2h antes da administração da indometacina, durante três dias consecutivos. No 4º dia após o início dos tratamentos, as amostras do intestino foram retiradas e homogeneizadas para dosagem do MDA. ^a $p < 0,001$ vs salina, ^b $p < 0,01$ vs veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

Gráfico 2 - Efeito do ácido centipédico e dexametasona sobre os níveis de malonildialdeído no modelo de úlcera intestinal induzida por indometacina em ratos.



Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 7 animais/grupo. Os animais foram tratados com veículo, AC (50 mg/kg, v.o.) ou dexametasona (3 mg/kg, v.o.), 2h antes da administração da indometacina, durante três dias consecutivos. No 4º dia após o início dos tratamentos, as amostras do intestino foram retiradas e homogeneizadas para dosagem do MDA. ^a $p < 0,001$ vs salina, ^b $p < 0,01$ vs veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

5.2.3.2 Dosagem de catalase

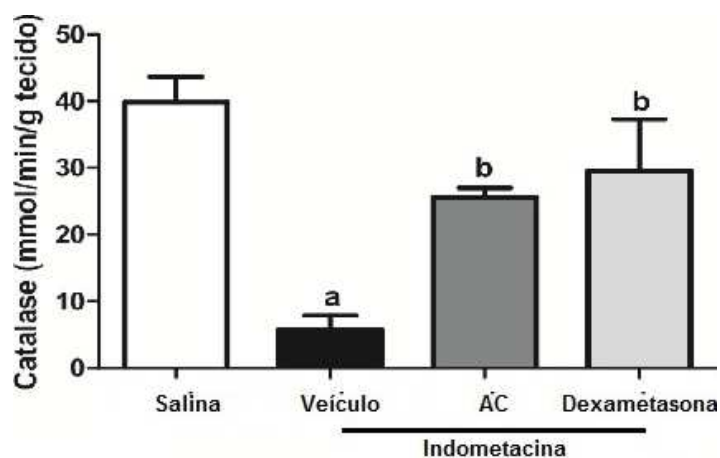
Os animais que receberam o veículo mostraram significativa redução ($p < 0,01$) nos níveis de catalase ($5,71 \pm 2,15$ mmol/min/g tecido) quando comparado ao controle salina ($39,81 \pm 3,83$ mmol/min/g tecido). AC (50 mg/kg) foi capaz de atenuar a diminuição dos níveis de catalase pela indometacina ($25,55 \pm 1,42$ mmol/min/g tecido) de forma significativa ($p < 0,05$). Dexametasona (3 mg/kg) também reverteu os níveis de catalase significativamente ($p < 0,05$) ($29,48 \pm 7,85$ mmol/min/g tecido) diminuídos pela indometacina (**TABELA 5 e GRÁFICO 3**).

Tabela 5 - Efeito do ácido centipédico e dexametasona sobre os níveis de catalase nas lesões intestinais induzidas por indometacina em ratos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	CATALASE (mmol/min/g tecido)
Salina	-	39,81 ± 3,83
Veículo	10	5,71 ± 2,15 ^a
AC	50	25,55 ± 1,42 ^b
Dexametasona	3	29,48 ± 7,85 ^b

Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) para 7 animais/grupo. Os animais foram tratados com veículo, AC (50 mg/kg, v.o.) ou dexametasona (3 mg/kg, v.o.), 2h antes da administração da indometacina, durante três dias consecutivos. No 4º dia após o início dos tratamentos, as amostras do intestino foram retiradas e homogeneizadas para dosagem de catalase. ^ap<0,01 vs salina; ^bp<0,05 vs veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

Gráfico 3 - Efeito do ácido centipédico e dexametasona sobre os níveis de catalase nas lesões intestinais induzidas por indometacina em ratos.



Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) para 7 animais/grupo. Os animais foram tratados com veículo, AC (50 mg/kg, v.o.) ou dexametasona (3 mg/kg, v.o.), 2h antes da administração da indometacina, durante três dias consecutivos. No 4º dia após o início dos tratamentos, as amostras do intestino foram retiradas e homogeneizadas para dosagem de catalase. ^ap<0,01 vs salina; ^bp<0,05 vs veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

5.2.3.3 Dosagem de mieloperoxidase

Os animais que receberam o veículo e depois a indometacina mostraram aumento significativo ($p < 0,001$) nos níveis de mieloperoxidase ($0,607 \pm 0,02$), quando comparados ao grupo controle salina ($0,053 \pm 0,039$).

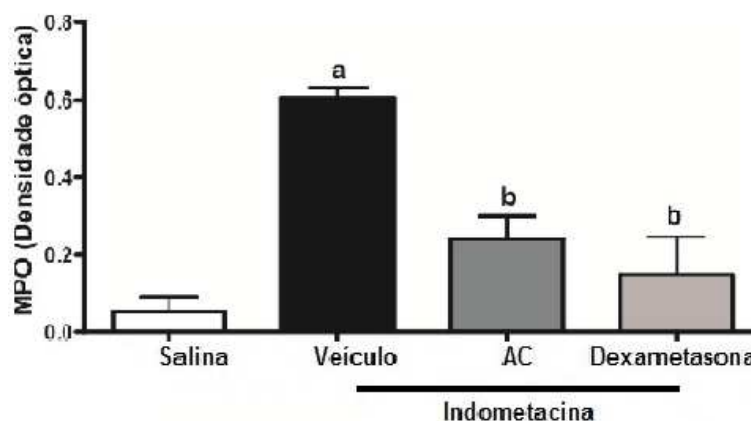
AC (50 mg/kg) e dexametasona (3 mg/kg) reduziram de maneira significativa ($p < 0,001$) os níveis de mieloperoxidase ($0,243 \pm 0,05$ e $0,147 \pm 0,10$, respectivamente) que foram aumentados pela indometacina. Os níveis de mieloperoxidasas estão expressos em densidade óptica (**TABELA 6 E GRÁFICO 4**).

Tabela 6 - Efeito do ácido centipédico e dexametasona sobre os níveis de mieloperoxidase nas lesões intestinais induzidas por indometacina em ratos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	MIELOPEROXIDASE (Densidade óptica)
Salina	-	0.053 ± 0.039
Veículo	10	0.607 ± 0.02^a
AC	50	0.243 ± 0.05^b
Dexametasona	3	0.147 ± 0.10^b

Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 7 animais/grupo. Os animais foram prétratados com veículo, AC (50 mg/kg, v.o.) ou dexametasona (3 mg/kg, v.o.), 2h antes da administração da indometacina, durante três dias consecutivos. No 4º dia após o início dos tratamentos, as amostras do intestino foram retiradas e homogeneizadas para dosagem de mieloperoxidase. ^a $p < 0,001$ vs salina; ^b $p < 0,001$ vs veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

Gráfico 4 - Efeito do ácido centipédico e dexametasona sobre os níveis de mieloperoxidase nas lesões intestinais induzidas por indometacina em ratos.



Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 7 animais/grupo. Os animais foram prétratados com veículo, AC (50 mg/kg, v.o.) ou dexametasona (3 mg/kg, v.o.), 2h antes da administração da indometacina, durante três dias consecutivos. No 4º dia após o início dos tratamentos, as amostras do intestino foram retiradas e homogeneizadas para dosagem de mieloperoxidase. ^a $p < 0,001$ vs salina; ^b $p < 0,001$ vs veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

5.2.3.4 Determinação de grupos sulfidrila não-protéicos (NP-SH)

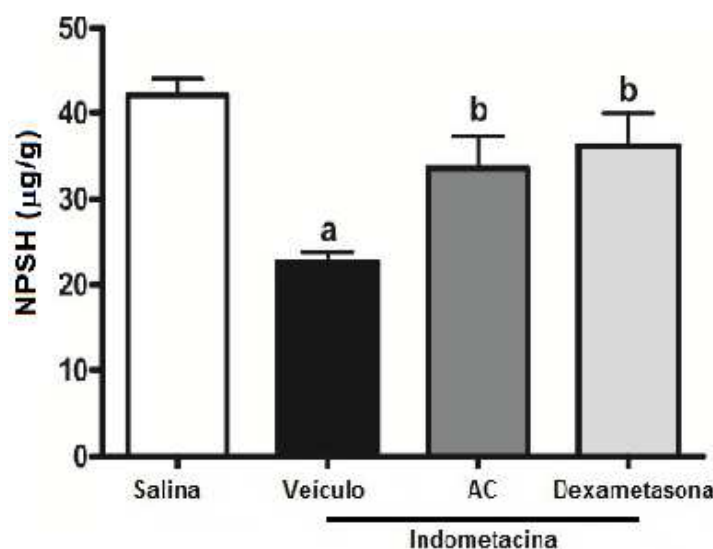
Os animais que receberam indometacina mostraram significativa redução ($p < 0,01$) nos níveis de NP-SH ($22,57 \pm 1,28 \mu\text{g/g}$ de tecido) quando comparados ao grupo salina ($42,11 \pm 1,92 \mu\text{g/g}$ de tecido). AC (50 mg/kg) foi capaz de atenuar a depleção de grupos sulfidrila produzida pela indometacina ($33,59 \pm 3,76 \mu\text{g/g}$ de tecido) de forma significativa ($p < 0,05$). Dexametasona (3 mg/kg) inibiu significativamente ($p < 0,05$) a depleção de grupos sulfidrila ($36,19 \pm 3,78 \mu\text{g/g}$ de tecido) produzida pela indometacina (TABELA 7 e GRÁFICO 5).

Tabela 7 - Efeito do ácido centipédico e dexametasona sobre os níveis de grupos sulfidrila não protéicos nas lesões intestinais induzidas por indometacina em ratos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	NP-SH (m $\mu\text{g/g}$)
Salina	-	42.11 \pm 1.92
Veículo	10	22.57 \pm 1.28 ^a
AC	50	33.59 \pm 3.76 ^b
Dexametasona	3	36.19 \pm 3.78 ^b

Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 7 animais/grupo Os animais foram tratados com veículo, AC (50 mg/kg, v.o.) ou dexametasona (3 mg/kg, v.o.), 2h antes da administração da indometacina, durante três dias consecutivos. No 4º dia após o início dos tratamentos, as amostras do intestino foram retiradas e homogeneizadas para dosagem de NP-SH. ^a $p < 0,01$ vs salina; ^b $p < 0,05$ vs veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

Gráfico 5 - Efeito do ácido centipédico e dexametasona sobre os níveis de grupos sulfidrilas não protéicos nas lesões intestinais induzidas por indometacina em ratos.



Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 7 animais/grupo. Os animais foram tratados com veículo, AC (50 mg/kg, v.o.) ou dexametasona (3 mg/kg, v.o.), 2h antes da administração da indometacina, durante três dias consecutivos. No 4º dia após o início dos tratamentos, as amostras do intestino foram retiradas e homogeneizadas para dosagem de NP-SH. ^ap<0,01 vs salina; ^bp<0,05 vs veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

5.2.4 Efeito do ácido centipédico na lesão intestinal induzida por indometacina em ratos: achados histológicos

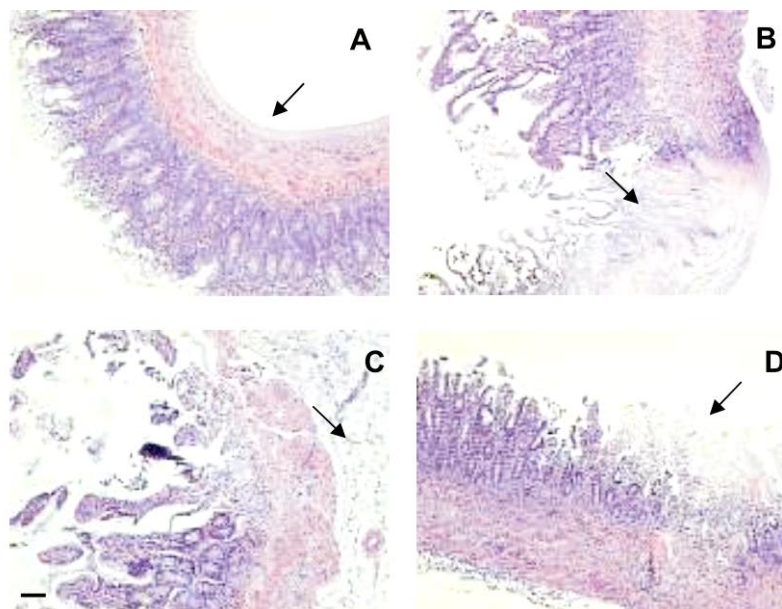
Os animais que receberam apenas solução salina apresentam as camadas mucosa, submucosa e serosa bem preservadas e presença de muco no epitélio (característica normal nessa porção intestinal) (**FIGURA 6-A**).

No grupo que recebeu apenas indometacina (**FIGURA 6-B**), observou-se foco inflamatório com predomínio de linfócitos e área de necrose das camadas mucosa e submucosa (evidente formação de úlcera). Foram vistas áreas de hemociderose e discreto edema.

Os animais que foram tratados com AC (**FIGURA 6-D**) apresentaram discreto princípio de necrose. As camadas mucosa e submucosa foram preservadas, verificando-se ainda a presença de muco. Embora a úlcera não tenha característica histopatológica clássica (necrose e exsudação), a presença de debris celulares demonstra o princípio da formação da mesma.

Nos animais tratados com dexametasona (**FIGURA 6-C**), houve integridade da camada submucosa com discreta presença de edema.

Figura 6 - Efeito do ácido centipédico e dexametasona sobre as lesões intestinais induzidas por indometacina: achados histológicos.



A: salina (seta mostra preservação da mucosa intestinal; grupo não recebeu indometacina); B: veículo (seta mostra formação de úlcera com processo de necrose (células sem núcleos (necrose)); C: dexametasona (seta mostra formação de edema); D: AC (seta mostra início da formação das úlceras com células necróticas) (— 100 μ m).

5.3 Efeito do ácido centipédico sozinho ou associado à indometacina sobre a migração celular de células intestinais (IEC-6)

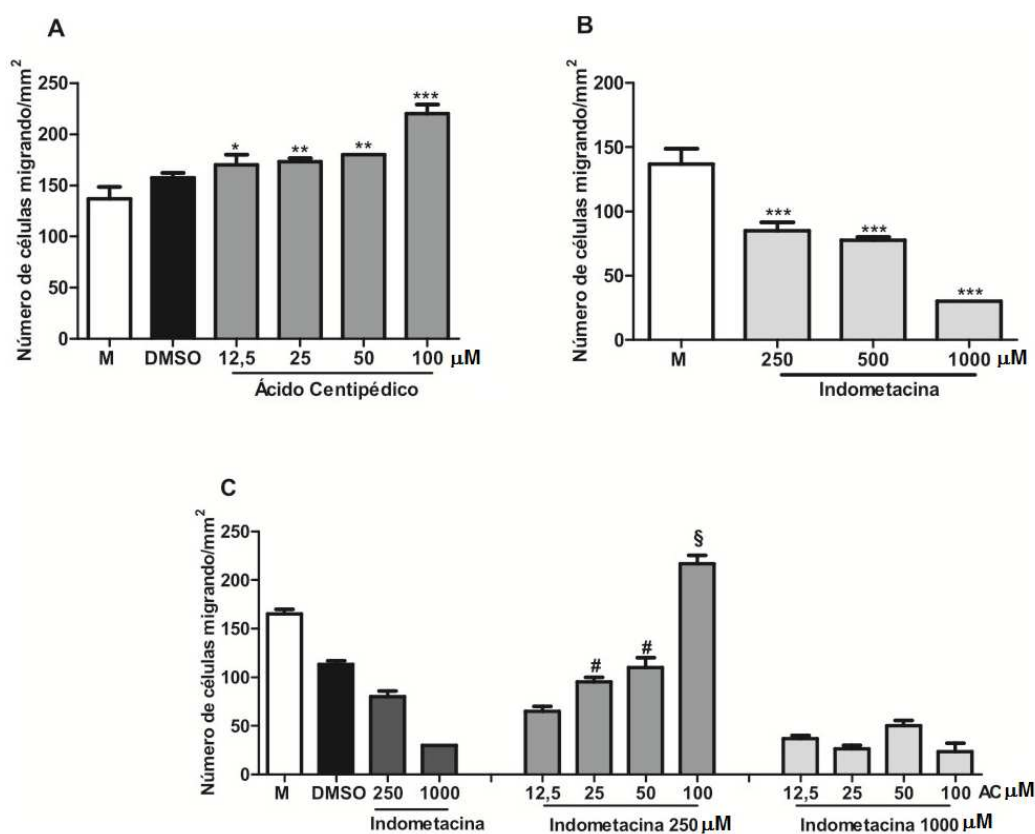
Após o dano mecânico, realizado pelo arraste da monocamada de células IEC-6 para a borda do poço e a exposição dessas células ao AC (12,5, 25, 50 e 100 μ M) durante 24 horas, observou-se um aumento significativo na migração celular com um aumento do número de células de (170 \pm 10,0; 173 \pm 3,33; 180 \pm 0,0; 220 \pm 9,12, respectivamente) em relação ao meio sem glutamina (M-) (136,7 \pm 12,02) (**GRÁFICO 6-A**).

Indometacina, agente deletério de células IEC-6, nas concentrações de 250, 500 e 1000 μ M, diminuiu significativamente de maneira dose-dependente, o número de células na migração celular (80 \pm 5,77; 77,5 \pm 2,5; 30 \pm 0,0, respectivamente), quando comparadas ao meio sem glutamina (M-) (136,7 \pm 1,02) (**GRÁFICO 6-B**).

O fato das concentrações de 250 e 500 μ M da indometacina não terem mostrado diferença entre elas, nos fez associar AC (12,5, 25, 50 e 100 μ M) apenas com a menor ou a

maior concentração do AINE (250 e 1000 μM). Na associação de AC com indometacina 250 μM , o diterpeno foi capaz de proteger a IEC-6 da toxicidade do AINE de forma significativa, $p < 0,01$ nas concentrações de 25, 50 e 100 μM , de maneira concentração-dependente, quando comparado à indometacina sozinha (250 μM) (65 ± 5 ; 95 ± 5 ; 110 ± 10 ; $216 \pm 8,19$, respectivamente). No entanto, na associação de AC (12,5, 25, 50 e 100 μM) com indometacina 1000 μM , o ácido centipédico não conseguiu reverter o efeito da alta dose de indometacina ($36,67 \pm 3,33$; $26,67 \pm 3,33$; $50 \pm 5,77$; $23,33 \pm 8,1$, respectivamente) (**GRÁFICO 6 -C**).

Gráfico 6 - Ação do ácido centipédico e indometacina sozinhos ou associados na migração das células IEC-6 após 24 horas de exposição.



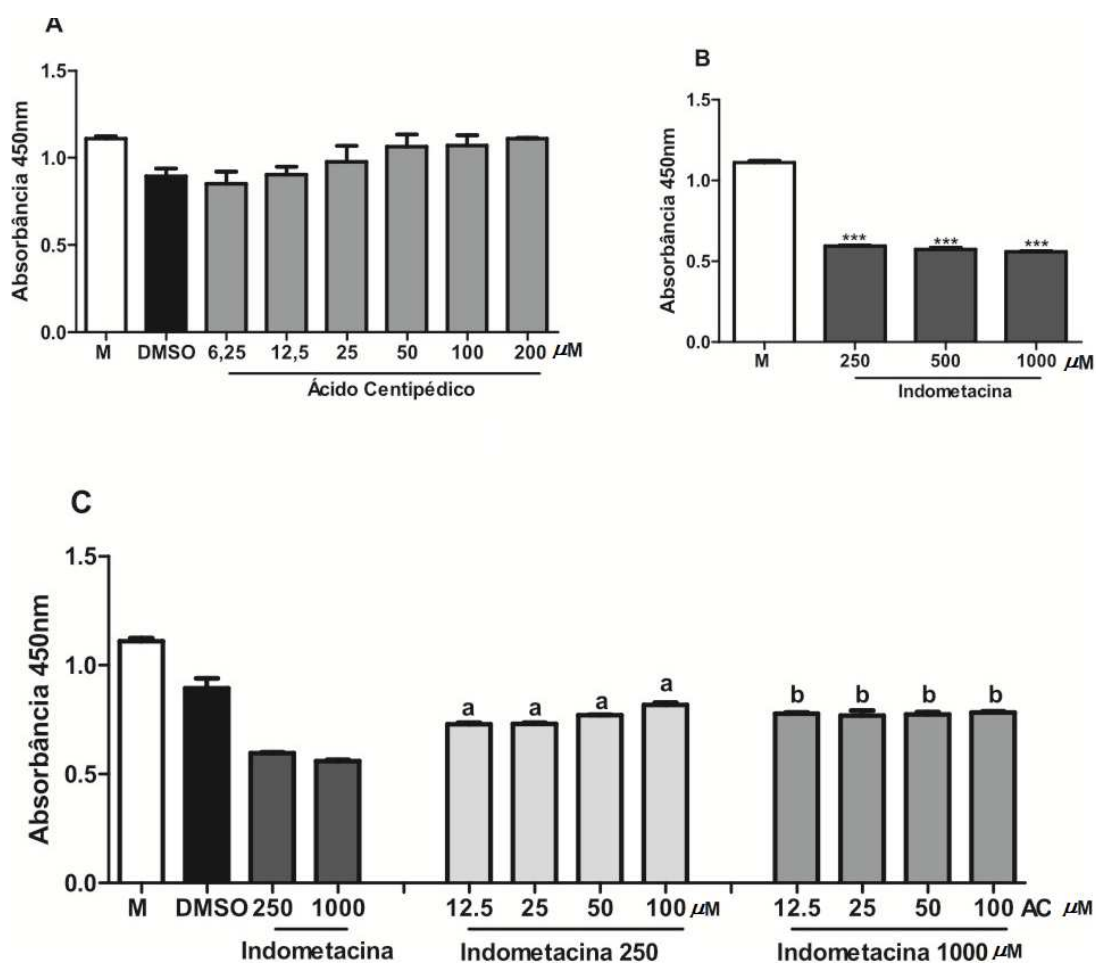
A migração celular foi analisada pela leitura microscópica, em placas de 6 poços em 24 h de exposição ao AC (12,5, 25, 50 e 100 μM), indometacina (250, 500 e 1000 μM) ou a associação entre todas as doses de AC com indometacina (250 e 1000 μM). Depois de 24 h, a coluna com maior taxa de migração foi selecionada e as células foram observadas em microscópio invertido (Nikon E400, Japan), em um aumento de 100x. Os dados demonstraram o aumento da migração celular *in vitro*. ^a $p < 0,05$; vs salina; ^b $p < 0,001$ vs veículo 250 μM ; [#] $p < 0,01$ vs veículo 250 μM . Os valores foram expressos pela média \pm (E.P.M). (ANOVA e Student Newman Keuls).

5.4 Efeito do ácido centipédico sozinho ou associado à indometacina sobre a proliferação celular de células intestinais (IEC-6)

AC (6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200 μ M) aumentou a proliferação celular (0,85 \pm 0,07; 0,90 \pm 0,04; 0,97 \pm 0,09; 1,06 \pm 0,06; 1,07 \pm 0,06; 1,11 \pm 0,0, respectivamente) nas 24 h de exposição nas células IEC-6 quando comparado ao grupo **M(-)** (0,89 \pm 0,04) (**GRÁFICO 7 -A**). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as doses no período estudado.

A indometacina (250, 500 e 1000 μ M) diminuiu de maneira significativa a proliferação (0,59 \pm 0,0; 0,57 \pm 0,01; 0,56 \pm 0,0, respectivamente) de IEC-6 no período de 24 horas de exposição (**GRÁFICO 7-B**). AC (12,5, 25, 50 e 100 μ M) protegeu (0,72 \pm 0,0; 0,73 \pm 0,0; 0,77 \pm 0,0; 0,81 \pm 0,0, respectivamente) as células IEC-6 contra a toxicidade causada pela indometacina tanto na concentração de 250 (0,59 \pm 0,0), como protegeu (0,77 \pm 0,0; 0,76 \pm 0,02; 0,77 \pm 0,0; 0,78 \pm 0,0, respectivamente) na concentração de 1000 μ M (0,56 \pm 0,0)

Gráfico 7 - Ação do ácido centipédico e indometacina sozinhos ou associados na proliferação das células IEC-6 após 24 horas de exposição.



A proliferação celular foi analisada pela leitura da absorbância, em placas de 96 poços, usando o leitor de ELISA em 450 nm em 24 horas de exposição ao AC (6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200 μ M). Após 24 horas os poços foram incubados por 2 horas com sal tetrazólio e a absorbância foi medida. Os dados demonstraram o aumento da proliferação celular *in vitro*. *** $p < 0,001$ vs meio ^a $p < 0,001$ vs Indometacina 250 μ M; ^b $p < 0,001$ vs Indometacina 1000 μ M. Os valores foram expressos pela média \pm (E.P.M). (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi examinada a atividade do ácido centipédico (AC) na ulceração intestinal induzida por indometacina em ratos e também foram avaliados alguns mecanismos envolvidos nessa ação.

A indometacina, (1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-1H-indole-3-ácido acético), é um inibidor não seletivo da ciclooxigenase, que inibe a formação de prostanóides. A utilidade clínica dos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) é limitada por sua toxicidade gastrointestinal e renal. Indometacina causa toxicidade renal, inibindo a enzima ciclooxigenase no glomérulo, produzindo vasoconstrição, além de induzir estresse oxidativo e disfunção mitocondrial. Esse AINE pode levar à insuficiência renal, através de vários mecanismos: o mais importante destes é a diminuição dos níveis de prostaglandinas, que regulam a vasodilatação arterial e glomerular, embora também possa produzir necrose tubular aguda, devido à toxicidade direta ou à nefrite intersticial aguda (KRAUSEL *et al.*, 2005; TABER; MUELLER, 2006; VARGHESE *et al.*, 2009).

Seu efeito renal, também importante, pode resultar em oligúria, aumento das concentrações séricas de uréia e creatinina, além da redução na taxa de filtração glomerular e excreção urinária de sódio. Em geral, há um aumento leve e transitório dos níveis de creatinina sérica, mas às vezes aumentos são intensos (JOHN *et al.*, 1984).

Como a toxicidade renal é comum durante o uso de indometacina e também fator limitante, decidimos verificar essa ação, embora nosso trabalho esteja direcionado a ação gastrointestinal. A administração de indometacina (10mg/kg, v.o.) em alta dose, por três dias consecutivos, não alterou os níveis séricos de uréia, mas elevou os níveis de creatinina, mostrando possível toxicidade, que não foi revertida nem por AC (50mg/kg), nem pela dexametasona (3mg/kg).

Um dos métodos de estudo da função renal mais amplamente utilizado é a estimativa dos níveis de nitrogênio não protéico no sangue, ou seja, a determinação dos níveis séricos de uréia e creatinina (COLES, 1984).

Como ocorre com a uréia, a creatinina é um índice pouco específico da filtração glomerular. Uma severa perda muscular, por exemplo, poderá reduzir a quantidade de creatinina formada. De forma semelhante, uma redução na taxa de filtração glomerular aumenta a concentração sérica da uréia (GUEDES, 2010).

Observou-se que os níveis de uréia não foram alterados, e, embora AC não tenha revertido os níveis séricos de creatinina, é precoce afirmar sua falta de proteção contra a nefrotoxicidade da indometacina. Estudos mais acurados seriam necessários para avaliação do papel do AC sobre a função renal.

Dano hepático por AINEs é raro, mas estes medicamentos não devem ser usados em pessoas com cirrose hepática, pois problemas de sangramento e insuficiência renal são mais susceptíveis (RISSER *et al.*, 2009).

Fisiologicamente, o fígado sintetiza todos os principais metabólitos da cascata do ácido araquidônico, incluindo as prostaglandinas (PGs). Foi constatado que as PGs estão envolvidas em vários processos fisiológicos no fígado, incluindo vasorregulação, agregação plaquetária e mediação da inflamação (NEEDLEMAN *et al.*, 1986).

As transaminases ou aminotransferases são provas de função hepática. ALT é mais específica para as doenças hepáticas, já que a AST pode ser encontrada em outros órgãos que não o fígado, porém, em menor quantidade, tais como nos músculos cardíaco e esquelético, como também nos rins e cérebro (PRATT; KAPLAN, 1999).

A fim de que sejam observadas alterações nas transaminases decorrentes da influência de AINE, recomenda-se a dosagem das enzimas e testes de função hepática, apenas oito semanas após o início da terapia crônica com AINE (MONTEIRO *et al.*, 2008; ROSTOM *et al.*, 2005). O que pode justificar não terem sido obtidas diferenças entre o grupo veículo e o grupo salina, visto que o tratamento com a indometacina ocorreu durante 3 dias e já no 4º dia, após o início da administração da mesma, o sangue dos animais foi coletado.

Estudos anteriores mostram que a administração de indometacina, 20 mg/kg, por via subcutânea, uma vez ao dia, durante 2 dias, provocou graves lesões hemorrágicas e diminuição dos níveis de PGE₂ no intestino delgado, e 80% dos ratos morreram dentro de 9 dias (MIURA *et al.*, 2007). Sabe-se que a extensão das úlceras provocadas por indometacina é dose-dependente (NYGARD *et al.*, 1994; ANTHONY *et al.*, 1996; ETTARD; CARR, 1993).

Em ratos, a administração de indometacina produz inflamação crônica distal do jejuno e íleo, caracterizada pelo aumento da permeabilidade da mucosa e translocação bacteriana (BANERJEE; PETERS, 1990; YAMADA *et al.*, 1993; COLPAERT *et al.*,

2001).

Em nosso estudo, a administração de indometacina produziu inflamação crônica com extensa ulceração confluyente pontual e longitudinal localizadas principalmente ao longo da borda mesentérica do jejuno e íleo proximal. AC (50mg/kg) e dexametasona (3 mg/kg) apresentaram menor número de úlceras longitudinais formadas quando comparados ao grupo veículo; embora AC tenha formado ainda um número considerável de úlceras pontuais. O fato de o grupo que foi tratado com o diterpeno ter apresentado poucas úlceras longitudinais e ter formado mais úlceras pontuais nos faz levantar a hipótese de sua capacidade protetora intestinal, uma vez que úlceras longitudinais, por deixarem mais delgada a espessura do tecido, teriam mais probabilidade de perfuração do mesmo.

A isquemia da mucosa, a formação de radicais livres e a cessação da disponibilidade de nutrientes teciduais resultam em necrose tecidual, que juntamente com a liberação de leucotrienos B atuam como atraentes para leucócitos e macrófagos que liberam fatores pró-inflamatórios como TNF- α e IL-1, resultando em úlcera gastrointestinal (TARNAWSKI, 2005). Além de um aumento da síntese dos leucotrienos, outros possíveis mecanismos tem sido propostos como sendo tão ou mais importantes para a indução da doença intestinal. Entre estes, a capacidade de desacoplamento da fosforilação oxidativa (levando à diminuição de reservas celulares de adenosina trifosfato) (SOMASUNDARAM *et al.*, 1995; WALLACE, 2000), a ação detergente na borda de escova (alterando propriedades da camada de muco) (GULLIKSON *et al.*, 1982) e deposição de fibrina intravascular (ANTHONY *et al.*, 1996). Por fim, a indometacina reduziu o número de vilosidades, microvilosidades e criptas em comparação com os animais do grupo salina por iniciar alterações locais na composição enzimática da borda em escova da membrana, que reveste o trato gastrointestinal até diferentes níveis (LAINE, 2001).

Antiinflamatórios, como a indometacina, induzem a lesão intestinal em proporção direta a sua capacidade de serem excretados na bile, e são conhecidos por associar-se quimicamente com fosfatidilcolina. Assim, a fosfatidilcolina biliar desempenha um papel importante na proteção fisiológica do epitélio gastrointestinal das ações citotóxicas dos sais biliares. A capacidade de AINEs excretados na bile de associar-se com micelas mistas de sais biliares e reduzir a ação protetora da fosfatidilcolina pode ser um componente crítico no mecanismo patogênico dessas drogas (DIAL *et al.*, 2008). Foi

proposto por Naito *et al.* (1998) que as espécies reativas de oxigênio mediadas pela peroxidação lipídica são uma das principais causas de lesões gastrointestinais induzidas por indometacina. O comprometimento estrutural e funcional das mitocôndrias (patologia mitocondrial) induzidos por indometacina levam ao estresse oxidativo mitocondrial, associado com a geração de espécies reativas de oxigênio intramitocondrial. A perda estrutural e funcional das mitocôndrias é comum em danos celulares por estresse oxidativo (TAKEUCHI *et al.*, 1991).

Radicais livres são definidos como moléculas que têm elétrons desemparelhados na órbita externa. Eles são geralmente instáveis e muito reativos (FANG *et al.*, 2002). A geração de radicais livres constitui, por excelência, um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. Sua produção, em proporções adequadas, possibilita a geração de ATP (energia), por meio da cadeia transportadora de elétrons; fertilização do óvulo; ativação de genes; e participação de mecanismos de defesa durante o processo de infecção. Porém, a produção excessiva pode conduzir a danos oxidativos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SHAMI; MOREIRA, 2004).

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos culminou no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante. Estes têm o objetivo de limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BIANCHI; ANTUNES, 1999).

A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com conseqüente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

A fim de verificarmos uma possível ação antioxidante do AC, no modelo de úlcera intestinal induzida por indometacina, foram estudados parâmetros de estresse oxidativo, como: malonildialdeído (MDA), que é produto da peroxidação lipídica, mieloperoxidase (MPO), usada como um marcador enzimático da infiltração de neutrófilos e indica aumento na geração de radicais livres, o que associado à diminuição das atividades

da catalase, enzima de limpeza destes radicais, e aos grupos sulfidrilas não protéicos (NP-SH) sugerem a presença de estresse oxidativo, produzido em resposta a administração do antiinflamatório não esteroideal. (SIVALINGAM *et al.*, 2007). Verificou-se que houve aumento nos níveis de MDA formado nos animais tratados com indometacina em comparação ao controle. Estas observações foram reforçadas pelos resultados da atividade de mieloperoxidase que foi aumentada e a atividade de catalase e NP-SH que foi diminuída.

No estudo realizado por Sivalingam *et al.* (2007), a diminuição da viabilidade de enterócitos em resposta à indometacina, foi explicada com base no aumento dos níveis de produtos da peroxidação que foram detectados e que são prejudiciais ao funcionamento dessas células. Assim, extrapolando os resultados obtidos com animais tratados com ácido centipédico, é provável que sua ação antioxidante viabilize enterócitos não permitindo que a injúria provocada por indometacina seja tão evidente nos animais.

Em modelos animais, a lesão gastrointestinal induzida por indometacina está associada a alterações agudas na morfologia, ou seja, contração do vilo da musculatura lisa, lesão microvascular e as alterações na permeabilidade (BATTARBEE *et al.*, 1996).

Nos achados histológicos do nosso estudo, a indometacina promoveu lesão intestinal resultando em necrose, focos de hemociderose e presença de linfócitos na região ulcerada. AC pareceu retardar o processo de formação da úlcera, por ter sido visualizado um princípio de necrose com o início do desenvolvimento da úlcera somente após 3 dias de tratamento, e, no grupo tratado com indometacina já ser possível visualizar a úlcera no mesmo período. Essa informação pode justificar a maior visualização macroscópica de úlceras pontuais e não longitudinais.

A barreira funcional epitelial consiste em uma monocamada contínua de células especializadas, polarizadas em constante e rápida renovação celular (CEREJIDO *et al.*, 2000). O turnover das células epiteliais intestinais e da barreira funcional intestinal, que envolve proliferação, migração, diferenciação, apoptose e necrose celular, e um processo dinâmico, marcadamente afetado pelo estado nutricional e pelo adequamento de nutrientes específicos na dieta (ZIEGLER *et al.*, 2003).

As células epiteliais formam barreiras de proteção que separam fisicamente o organismo do mundo exterior. Ao invés de ser meramente estático, inexpugnável escudo, o epitélio intestinal é uma estrutura altamente dinâmica que pode ajustar a sua proliferação,

diferenciação e morte em resposta a sinais intrínsecos e extrínsecos (KOCH; NUSRAT, 2012). O intestino de mamífero é coberto por uma única camada de células epiteliais que é renovado a cada 4-5 dias. Esta capacidade de elevada renovação torna o epitélio intestinal muito atraente para o estudo das células proliferação e diferenciação. O intestino é composto por criptas proliferativas, que contêm células-tronco e vilosidades intestinais, que apresentam tipos de células especializadas fundamentais para esta capacidade de auto-renovação (LAURENS; CLEVERS, 2009). A superfície das células epiteliais intestinais é continuamente exposta a agentes nocivos e ingesta de abrasivos que podem causar lesões na mucosa (DIGNASS, 2001). Esse epitélio desempenha um importante papel na prevenção da translocação de substâncias ou organismos nocivos presentes no lúmen do intestino e na manutenção da homeostase (DIGNASS; PODOLSKY, 1995). O epitélio intestinal apresenta a mais vigorosa auto-renovação dos tecidos de mamíferos adultos (HEATH, 1996). A homeostase deste epitélio é baseada em um equilíbrio delicado entre auto-renovação e diferenciação, que deve ser mantida durante toda a vida (SCHOFIELD, 1978). O tecido intestinal é altamente dinâmico no qual o ciclo celular pode ser concluído em questão de poucos dias (POTTEN *et al.*, 1992).

O processo pelo qual a integridade do epitélio intestinal é restabelecida após lesão foi denominado de restituição epitelial (MORRIS; WALLACE, 1981). Foi demonstrado que o processo de restituição envolve migração celular e proliferação.

O processo inicial de migração ocorre muito rapidamente e, portanto, acredita-se ocorrer independente da divisão celular (SILEN; ITO, 1985). Células ao redor da área danificada migram para restabelecer a integridade da mucosa. A proliferação dessas células, então, conclui o processo de reparação. A proliferação começa de 12-16 h após um insulto à mucosa e se completa em 1-2 dias (YEOMANS *et al.* 1973).

Apesar da exaustiva investigação, os mecanismos responsáveis por danos gastrointestinais associados aos AINEs não estão completamente esclarecidos. As evidências mostradas até agora sugerem que os AINEs podem promover a formação de úlcera, não só por inibição da ciclooxigenase (COX) da mucosa e diminuindo prostaglandinas (PGs) citoprotetoras, mas também por influenciar negativamente a microflora intestinal, o recrutamento de neutrófilos, hidrofobicidade de superfície e restituição epitelial (LICHTENBERGER, 2001; LITTLE *et al.*, 2007).

Neste trabalho verificamos, *in vitro*, a ação do AC sobre células intestinais

normais e que receberam injúria por indometacina. Para tal, utilizamos a linhagem de células IEC-6, que é comumente utilizada em modelos *in vitro* de monocamadas de células. Uma das razões escolhidas para utilização de IEC-6, é que essas células não transformadas tem sido amplamente utilizadas para estudar a migração de células do epitélio intestinal (e outros parâmetros), e há conhecimento abundante sobre as vias de transdução de sinais envolvidas na sua migração (MCCORMACK; JOHNSON, 2001; GUO *et al.*, 2002; RAO *et al.* 2002; FREEMAN *et al.*, 2007).

A ranhura com uma lâmina na monocamada confluenta de células IEC-6 permitiu que as células migrassem para a área desnudada após 24h, tempo suficiente para um número adequado de células migrarem para a área ferida (RUTHING, 1999). Os resultados indicaram que AC sozinho aumenta a migração das células IEC-6, sendo que as doses mais efetivas foram de 25, 50 e 100 μM . A associação de AC (100 μM) com indometacina (250 μM), um reconhecido agente lesivo de IEC-6, mostrou ter potente eficácia na prevenção da toxicidade causada pelo AINE, quando verificamos que o número de células que migram retornam ao do AC sozinho.

A proliferação e a migração celular são fenômenos cinéticos agindo em conjunto para alternar a função celular através de renovação e reparação (DIGNASS, 2001). A proliferação das células epiteliais é necessária para reconstituir um pool de células diminuído. Isto exige um equilíbrio entre a proliferação de células progenitoras e a perda de células maduras (HALL *et al.*, 1994). Processos inflamatórios, como nas injúrias por indometacina, podem interferir com a migração e proliferação das células epiteliais e, assim, modular a cicatrização do epitélio intestinal (DIGNASS, 2001).

Nossos resultados evidenciaram a importância do ácido centipédico na melhora da barreira intestinal exposta a uma condição de estresse. Além de influir sobre a migração das células IEC-6, o diterpeno também mostrou habilidade sobre a proliferação celular. Nossos achados mostram que AC foi capaz de proteger da diminuição da proliferação celular provocada pela administração de indometacina, e, mesmo sozinho AC tem tendência ao aumento da proliferação.

A migração celular é modulada por uma variedade de fatores incluindo peptídeos regulatórios, substratos metabólicos, citocinas, integrinas, matriz extracelular e poliaminas (MCCORMACK; JOHNSON, 2001). Vários estudos tem focado a importância de vários nutrientes na migração celular em células intestinais (KAUR;

POTTEN, 1986; MCCORMACK *et al.*, 1999; MCCOMACK; JOHNSON, 2001), entretanto, pouco se sabe sobre a base molecular dessas ações.

O nosso trabalho demonstrou que AC possui papel citoprotetor, sendo capaz de oferecer proteção aos danos da mucosa gastrointestinal induzidos pela indometacina.

A atividade enteroprotetora do AC, em modelo de lesão intestinal induzida por indometacina, é confirmada pela capacidade de atenuar as lesões através de ação antioxidante que envolve: o efeito poupador de NP-SH e catalase, diminuição dos níveis de malonildialdeído e mieloperoxidase. Agindo ainda como agente protetor de células intestinais, pela sua ação na migração e proliferação celular.

O estudo do AC para o tratamento da úlcera no intestino fomenta grandes e importantes perspectivas no uso deste produto de origem natural para o desenvolvimento de um novo agente terapêutico para o combate de enteropatias associadas aos AINES e para o tratamento de distúrbios intestinais humanos, como doença inflamatória intestinal, além de poder ser utilizado como um importante biomarcador da *Egletes viscosa* Less.

7 CONCLUSÕES

- O diterpeno protegeu o intestino a partir do modelo de lesão Intestinal induzida por indometacina em ratos, efeito que foi confirmado pelo diminuído número de úlceras formadas, e, atenuou a depleção dos grupos sulfidrilas não-protéicos e da enzima catalase, e reduziu a formação de malonilaldeído e os níveis de mieloperoxidase, indicando uma ação antioxidante como parte do seu mecanismo de ação.
- Verificamos também que o AC atua de forma positiva na migração e proliferação celular mesmo nas situações em que células intestinais foram tratadas com a indometacina, como agente tóxico.
- Os resultados obtidos indicam que o AC, obtido dos capítulos florais de *Egletes viscosa* Less, apresenta atividade enteroprotetora e fornecem evidências de que este diterpeno é uma substância segura e promissora para o desenvolvimento de um novo agente terapêutico, que poderá ser fundamental para o combate das patologias intestinais associadas a AINES e doença ulcerosa péptica . A partir das ações confirmadas em nosso estudo, sentimo-nos incitados a sugerir a indicação da *Egletes viscosa* Less para a relação de plantas medicinais de interesse do SUS (RENISUS). Além do mais, o AC poderá funcionar como um biomarcador de *E. viscosa*, no possível desenvolvimento de um fitoterápico.

REFERÊNCIAS

- ABITBOL, R. A. Doença ulcerosa péptica. In: MEDSTUDENTS: Rotinas de Clínica Médica. Disponível em: <<http://www.medstudents.com.br/rotinas/clinmed/dup.htm>>. Acesso em: 2 maio 2012.
- AHLMAN, H.; NILSSON, F. The gut as the largest endocrine organ in the body. **Ann. Oncol.**, v. 12, Suppl. 2, p. S63-S68, 2010.
- AMORIM, A. P.; FERREIRA, J.; GABRIEL, M. Doente ostomizado, papel do enfermeiro. **Revista da Associação Portuguesa de Enfermeiros e da Associação de Enfermeiros da Sala de Operações Portugueses**, v. 5, p. 7-10, 2007
- ANTHONY, A. Gastric mucosal contraction and vascular injury induced by indomethacin precede neutrophil infiltration in the rat. **Gut**, v. 39, p. 363-368, 1996.
- ATAY, S.; TARNAWSKI, A. S.; DUBOIS, A. Eicosanoids and the stomach. **Prostaglandins Other Lipids Mediat.**, v. 61, p. 105-124, 2000.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.
- BANERJEE, A. K.; PETERS, T. J. Experimental non-steroidal anti-inflammatory drug induced enteropathy in the rat: similarities to inflammatory bowel disease and effect of thromboxane synthetase inhibitors. **Gut**, v. 31, p. 1358-1364, 1990.
- BAUER, H.; Mark-Hermann, E. Therapy with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Orthopade**, v. 32, n. 12, p. 1088-1099, 2003.
- BAZAN, E.; CAMPBELL, A. K.; RAPOPORT, R. M. Effects of protein kinase C activation on norepinephrine-induced phosphatidylinositol hydrolysis in intact rat aorta. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 245, n. 2, p. 173-177, 1993.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr.**, v. 12, n. 12, p. 123-130, 1999.
- BJARNASON, I.; HAYLLAR, J.; MACPHERSON, A. J., RUSSELL A. S.. **Gastroenterology**, v. 104, p. 1832-1847, 1993.
- BRAQUET, P. **Ginkgolides**: chemistry, biology, pharmacology and clinical perspectives. Barcelona: J. R. Prous, 1988.
- CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Cienc. Cult.**, v.55, n.3, p.37-39, 2003.
- CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin América a Personal Reviw. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 131-134, 2005.
- CAMPOS, A.R.; BARROS, A.I.S.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Guarana (*Paullinia*

cupana Mart.) offers protection against gastric lesions induced by ethanol and indomethacin in rats. **Phytother. Res.**, v. 17, p. 1199-1202, 2003.

CEREIJIDO, M.; SHOSHANI, L.; CONTRERAS, R. G. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Biogenesis of tight junctions and epithelial polarity. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 279, n. 3, p. G477-82, 2000

CHUANG, D.M. Neurotransmitter receptors and phosphoinositide turnover. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 29, p. 71-110, 1989.

CNUBBEN, N. H. P.; RIETJENS, I. M. C. M.; WORTELBOER, H.; VAN ZANDEN, J.; VAN BLADEREN, P. J. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environmental. Toxicol. Pharmacol.**, v. 10, p. 141-152, 2001.

COLES, E. H. **Patologia clínica veterinária**. 3. ed. São Paulo. São Paulo: Manole, 1984.

COLPAERT, S.; LIU, Z.; DE GREEF, B. Effects of anti-tumour necrosis factor, interleukin-10 and antibiotic therapy in the indometacin-induced bowel inflammation rat model. **Aliment Pharmacol. Ther.**, v.15, p. 1827–1836, 2001.

CRAWFORD, J. M. O trato gastrointestinal. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 697-758.

CREMA, E.; SILVA, R. **Estomas: uma abordagem interdisciplinar**. Belo Horizonte: Pinti Artes Gráficas Ltda., 1997.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. [S.l.]: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250-1318.

DAVIES, N. M.; SALEH, J. Y.; SKJODT, N. M. **J. Pharm. Pharm. Sci.**, v. 3, p. 137—155, 2000.

DIAL, E. J.; DARLING, R. L.; LICHTENBERGER, L. M. Importance of biliary excretion of indomethacin in gastrointestinal and hepatic injury. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 23, n. 8, Pt. 2, p. e384-3849, 2008.

DIAL, E. J.; DARLING, R. L.; LICHTENBERGER, L. M. Importance of biliary excretion of indomethacin in gastrointestinal and hepatic injury. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 23, n. 8, Pt. 2, p. e384-389, 2008.

DIGNASS, A. U.; PODOLSKY, D. K. Growth factors and cytokines in inflammatory bowel disease: injury and healing in the epithelium. In: TYGAT, G. N. J.; BARTELSMAN, J. F. W. M.; Van DEVENTER, S. J. H. (Ed.). **Inflammatory Bowel diseases**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 375–383

DIGNASS, A. U. Mechanisms and modulation of intestinal epithelial repair. **Inflamm Bowel Dis** 7:68–77, 2001.

DI STASI, L.C.; HIRUIMA, C.A.; SANTOS, E.M.G., Medicinal Plants populary used in brasilian amazon. **Fitoterapia**, v. 65, n. 6, p 529-540, 1994.

DONG, M.H.; KAUNITZ, J.D. Gastroduodenal mucosal defense. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 22, p. 599 – 606, 2006.

DZEROSKI, S.; SCHULZE-KREMER, S.; HEIDTKE, K.; SIEMS, K.; WETTSCHERECK, D.; BLOCKEEL, H. Diterpene structure elucidation from ¹³C NMR spectra with inductive logic programming. **Appl. Artificial Intelligence**, v. 12, p.363-384, 1998.

DUBEY, M.P.; SRIMAL, R.C.; PATANAİK, G.K.; DHAVAN, B.N. Hypotensive andspasmolytic activities of coleonol, active principle of Coleus forsholii Briq. **Ind. J. Pharmacol.**, p. 6-15, 1974.

DUARTE, D.F.; SANT'ANA, A.E.; CALIXTO, J. B. Analysis of the vasorelaxant action of jatrophone in the isolated aorta of the rat: influence of potassium channel blockers. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 215, p. 75-81, 1992.

FANG, Y. Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v.18, p.872-879, 2002.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.M. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Méd. Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FREEMAN, L. C.; NARVAEZ, D. F.; MCCOY, A.; VON STEIN, F. B.; YOUNG, S.; SILVER, K.; GANTA, S.; KOCH, D.; HUNTER, R.; GILMOUR, R. F.; LILLICH, J. D. Depolarization and decreased surface expression of K⁺ channels contribute to NSAID-inhibition of intestinal restitution. **Biochem. Pharmacol.**, v. 74, n. 1, p. 74-785, 2007.

GEIBEL, J. P.; HERBET, S. C. The Functions and Roles of the Extracellular Ca²⁺-Sensing Receptor along the Gastrointestinal Tract. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 71, p. 241–260, 2009.

GO, M. F. What are the host factors that place an individual at risk for Helicobacter pylori - associated disease? **Gastroenterology**, v. 113, n. 6, p. 15-20, 1997.

GU, J. Y.; WAKIZONO, Y.; TSUJITA, A.; LIM, B. O.; NONAKA, M.; YAMADA, K.; SUGANO, M. Effects of sesamin and alpha-tocopherol, individually or in combination, on the polyunsaturated fatty acid metabolism, chemical mediator production, and immunoglobulin levels in Sprague-Dawley rats. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 59, n. 12, p. 2198-202, 1995.

GUEDES, M. M.; CUNHA, A. N.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. N. Antinociceptive and Gastroprotective Effects of Diterpenes from the Flower Buds of Egletes viscosa. **Planta Med.**, v. 68, p. 1044-1046, 2002.

GULLIKSON, G. W.; SENDER, M.; BASS, P. Laxative-like effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on intestinal fluid movement and membrane integrity. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 220, p. 236-242, 1982.

GUO, X.; RAO, J. N.; LIU, L.; RIZVI, M.; TURNER, D. J.; WANG, J. Y. Polyamines regulate beta-catenin tyrosine phosphorylation via Ca² during intestinal epithelial cell migration. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 283, p. C722–C734, 2002.

GURBUZ, I.; USTUN, O.; YESILADA, E.; SEZIK, E.; AKYUREK, N. In vivo gastroprotective effects of five Turkish folk remedies against ethanol-induced lesions. **J. Ethnopharmacol.**, v. 83, n. 3, p. 241-244, 2002.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

HALL, P. A.; COATES, P. J.; ANSARI, B.; HOPWOOD, D. Regulation of cell number in the mammalian. Gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. **J. Cell Sci.**, v. 107, Pt. 12, p. 3569–3577, 1994.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3864–3874, 1991.

HARRIS, S. G.; PADILLA, J.; KOUMAS, L.; RAY, D.; PHIPPS, R. P. **Trends Immunol.**, v. 23, p. 144–150 2002.

HEATH, J. P. Epithelial cell migration in the intestine. **Cell Biol. Int.**, v. 20, p. 139–146, 1996.

HOGBEN, C.A.M.; KENT, T. H.; WOODWARD, P. A.; SILL, A. J. Quantitative histology of gastric mucosa: Man, dog, cat, guinea pig, and frog. **Gastroenterology**, v. 67, p. 1143-1154, 1974.

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, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOOGERWERF, W.A.; PASRICHA, P. J. Agentes usados para o controle da acidez gástrica e no tratamento de úlceras pépticas e da doença do refluxo gastroesofágico. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman: as bases da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.

HOOGERWERF, W.A.; PASRICHA, P. J. Pharmacotherapy of Gastric Acidity, Peptic Ulcer, and Gastroesophageal Reflux Disease. In: BRUNTON, L.; LAZO, J.; PARKER, K. **Goodman & Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics**. 11th ed. New York: McGraw-Hill, 2006. p. 869-882.

HUFFSTUTLER, S. Y.; SANDS, J. K. Avaliação dos sistemas gastrointestinal, biliar e pancreático exócrino. In: PHIPPS, W. J.; SANDS, J. K.; MAREK, J. F. **Enfermagem medicocirúrgica: conceitos e prática clínica**. Loures: Luso Ciência, 2003. v. 3, cap. 38, p. 1407-1428.

ISENBERG, J. I.; SOLL, A. H. Epidemiologia, manifestações clínicas e diagnóstico. In: BENNETT, J. C.; PLUM, F. (Ed.). **Cecil: Tratado de Medicina interna**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. P. 734-737.

JAIN, K.S.; SHAH, A.K.; BARIWAL, J.; SHELKE, S.M.; KALE, A.P.; JAGTAP, J.R.; BHOSALE, A.V. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. **Bioorg. Med. Chem.**, v.15, p. 1181-1205, 2007.

JOHN, E.G.; VASAN, V.; HASTREITER, A.R.; BHAT, R.; EVANS, M.A. Intravenous indomethacin and changes of renal function in premature infants with patent ductus arteriosus. **Pediatric Pharmacol.**, v. 4, p. 11-19, 1984.

KAUFMANN, H. J.; TAUBIN, H. L. **Ann. Intern. Med.**, v. 107, p. 513—516, 1987.

KAUR, P.; POTTEN, C. S. Effects of puromycin, cycloheximide and noradrenaline on cell migration within the crypts and on the villi of the small intestine. A model to explain cell movement in both regions. **Cell Tissue Kinet.**, v. 19, n. 6, p. 611-625, 1986.

KIRKPATRICK, P. Stitching together naturally. **Nature**, v. 1, p. 748, 2002.

KOCH, S.; NUSRAT, A. The life and death of epithelia during inflammation: lessons learned from the gut. **Annu. Rev. Pathol.**, v. 7, p. 35-60, 2012.

KRAUSE, I.; CLEPER, R.; EISENSTEIN, B.; DAVIDOVITS, M. Acute renal failure, associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs in healthy children. **Pediatr. Nephrol.**, v. 20, p.1295-1298, 2005.

LAINE, L. Approaches to nonsteroidal anti-inflammatory drug use in the high risk patient. **Gastroenterology**, v. 120, p. 594–606, 2001.

LANZA, F. L. A guideline for treatment and prevention of NSAID-induced ulcers. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 93, p. 2037-2046, 1998.

LI, Y.; OHIZUMI, Y. Search for constituents with neurotrophic factor potentiating activity from the medicinal plants of Paraguay and Thailand. **Yakugaku Zasshi**, v. 124, n. 7, p. 417-424, 2004.

LICHTENBERGER, L. M. Where is the evidence that cyclooxygenase inhibition is the primary cause of nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced gastrointestinal injury? Topical injury revisited. **Biochem. Pharmacol.**, v. 61, p. 631–637, 2001.

LIRA, S. R. S.; RAO, V. S.; CARVALHO, A. C.; GUEDES, M. M.; MORAIS, T. C.; SOUZA, A. S.; TREVISAN, M. T. S.; LIMA, A. F.; CHAVES, M. H.; SANTOS, F. A. Gastroprotective effect of lupeol on ethanol-induced gastric damage and the underlying mechanism. **Inflammopharmacology**, v. 17, n. 4, p. 221-228, 2009.

LITTLE, D.; JONES, S. L.; BLIKSLAGER, A. T. Cyclooxygenase (COX) inhibitors and the intestine. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 21, p. 367–377, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

MACIEL, M. A. M Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MAIDEN, L.; THJODLEIFSSON, B.; THEODORS, A.; GONZALEZ, J.; BJARNASON, I. **Gastroenterology**, v. 128, p. 1172—1178, 2005.

MAITY, P.; BISWAS, K.; ROY, S.; BANERJEE, R. K.; BANDYOPADHYAY, U. Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer- recent mechanism update. **Moll. Cell. Biochem.**, v. 253, p. 329-338, 2003.

MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais: guia de seleção e aproveitamento de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: IOCE, 1989.

MCCORMACK, S. A.; RAY, R. M.; BLANNER, P. M.; JOHNSON, L. R. Polyamine depletion alters the relationship of F-actin, G-actin, and thymosin beta4 in migrating IEC-6 cells. **Am. J. Physiol.**, v. 276, n.1/2, p. C459-468, 1999.

McCORMACK, S. A.; JOHNSON, L. R. Polyamines and cell migration. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 52, p. 327–349, 2001.

MELO, P. U.; PALHARES, M. S.; FERREIRA, C. Adynamic ileus in horses: pathophysiology and treatment. **Arq. Cienc. Vet. Zool. Unipar**, Umuarama, v. 10, n. 1, p. 49-58, 2007.

MERCHANT, J. L. Tales from the crypts: regulatory peptides and cytokines in gastrointestinal homeostasis and disease. **J. Clin. Invest.**, v. 117, p. 6 – 12, 2007.
MILANI, S.; CALABRÒ, A. Role of growth factors an their receptors in gastric healing. **Microscopy Research and Technique**, v.53, p.3060-3371, 2001.

MIRANDA, F. J.; ALABADI, J. A.; ORTI, M.; CENTENO, J. M.; PINON, M.; YUSTE, A.; SANZ-CERVERA, J. F.; MARCO, J. A.; ALBORCH, E. Comparative analysis of the vascular actions of diterpenes isolated from *Euphorbia canariensis*. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 50, p. 237-241, 1998.

MIURA, N.; FUKUTAKE, M.; YAMAMOTO, M.; OHTAKE, N.; IIZUKA, S.; IMAMURA, S.; TSUCHIYA, N.; ISHIMATSU, M.; NAKAMURA, Y.; ISHIGE, A.; WATANABE, K.; KASE, Y.; TAKEDA, S. An herbal medicine orengedokuto prevents indomethacin-induce enteropathy. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 30, n. 3, p. 495-501, 2007.

MONTEIRO, E. C. A.; TRINDADE, J. M. F.; DUARTE, A. L. B. P. ; CHAHADE, W. H. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). **Temas de Reumatologia Clinica**, v. 9, n. 2, maio 2008.

MONTELEONE, G.; PARRELLO, T.; MONTELEONE, I.; TAMMARO, S.; LUZZA, F.; PALLONE, F. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 117, p. 469—475, 1999.

MORRIS, G. P. ;WALLACE, J. L. The roles of ethanol and of acid in the production of gastric mucosal erosions in rats. **Virchows Arch. B Cell Pathol.**, p. 23–38, 1981.

NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T.; YOSHIDA, N.; KONDO, M. Role of oxygen radical and lipid peroxidation in indomethacin - induced gastric mucosal injury. **Dig. Dis. Sci.**, v. 43, p. S30-S34, 1998.

NAKANISHI, K.; GOTO, T.; ITO, S.; NATARI, S.; NOZOE, S. Diterpenes. **Natural Products Chemistry**. New York: Academic Press, 1974. p. 185.

NEEDLEMAN, P.; TURK, J.; JAKSCHIK, B. A.; MORRISON, A. R.; LEFKOWITH, J. B. Arachidonic acid metabolism. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 55, p. 69-102, 1986.

NEWBERRY, R. D.; STENSON, W. F.; LORENZ, R. G. **Nat. Med.**, v. 5, p. 900—906 1999.

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

NISHIZUKA, Y. Studies and perspectives of protein kinase C. **Science**, v. 223, n. 4761, p. 305-312, 1986.

NYGARD, G.; ANTHONY, A.; PIASECKI, C. Acute indomethacin-induced jejunal injury in the rat: early morphological and biochemical changes. **Gastroenterology**, v.106, p. 567-575, 1994.

OLIVEIRA, R. B.; GODOY, S. A. P.; COSTA, F. B. **Plantas tóxicas: conhecimento e prevenção de acidentes**. Ribeirão Preto: Editora Holos, 2003.

OLIVEIRA, F.A.; VIEIRA-JUNIOR, G.M.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.; SANTOS, K.A.; MARTINS, F.S.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. Gastroprotective effect of the mixture of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum*: role of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. **Planta Med.**, v. 70, n. 8, p. 780-782, 2004.

ORTIZ, H.; MARTIRAGUE, J.; FOUKLES, B. **Indicadores y cuidados de los estomas**. Barcelona: Editorial JIMS, 1994.

PACHALY, J. R.; WERNER, P. R.; SCHIMANSKI, J. C.; CIFFONI, E. M. G. Estresse por captura e contenção em animais selvagens. **A Hora Veterinária**, v. 74, p. 47-52, 1993.

PAIVA, L.A.; GURGEL, L. A.; DE SOUSA, E. T.; SILVEIRA, E. R.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 93, n. 1, p. 51-56, 2004.

PASRICHA, P.J. Procinéticos, antieméticos e agentes usados na síndrome do intestino irritável. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: Mac Graw Hill, 2006.

PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/USP, 2004.

PETROIANU, A.; LÁZARO DA SILVA, A.; VIEIRA DA SILVA, S. Resultados tardios da vagotomia, antrectomia e anastomose gastroduodenal na curvatura gástrica menor para tratamento da úlcera péptica. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 34, p. 305-309, 1997.

PEURA, D. A. Prevention of nosteroidal anti-inflammatory drug-associated gastrointestinal symptoms and ulcer complications. **Am. J. Med.**, v. 117, n. 5A, p. 63-71, 2004.

PHIPPS, W. J.; LONG, B. C.; WOODS, N. F. (Ed.). **Enfermagem médico cirúrgica, conceitos e prática clínica**. Lisboa: Lusodidacta, 1990 .

POTTEN, C. S.; NELLET, M.; ROBERTS, S. A.; REVI, R. A.; WILSON, G. D. Measurement of in vivo proliferation in human colorectal mucosa using bromodeoxyuridine. **Gut**, v. 33, p. 71–78, 1992.

PRATT, D. S.; KAPLAN, M. M. Laboratory tests. In: SCHIFF, E.R.; SORELL, M.F.; MADDREY, W. C. **Diseases of the Liver**. 8th ed. Philadelphia: Lippincott - Raven, 1999. p. 205-244.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

RAO, J. N.; PLATOSHYN, O.; LI, L.; GUO, X.; GOLOVINA, V. A.; YUAN, J. X.; WANG, J. Y. Activation of K channels and increased migration of differentiated intestinal epithelial cells after wounding. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 282, p. C885–898, 2002.

RASTOGI, L.; PATNAIK, G. K.; DIKSHIT, M. Free radicals and antioxidant status following pylorus ligation induced gastric mucosal injury in rats. **Pharmacol. Res.**, v. 38, n. 2, p. 125-132, 1998.

RATES, S. M. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

REPETTO, M. G.; LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p. 523-534, 2002.

RISSER, A.; DONOVAN, D.; HEINTZMAN, J.; PAGE, T. NSAID prescribing precautions. **Am Fam Physician**, v. 80, n. 12, p. 1371-1378, 2009.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Famacognosia e farmacobiocnologia**. São Paulo: Premier, 1997.

ROCCA, B.; FITZGERALD, G. A. **Int. Immunopharmacol.**, v. 2, p. 603—630, 2002.

RODRIGUES, E.; CARLINI, E.L.A. Levantamento etnofarmacológico realizado entre um grupo de quilombolas do Brasil. **Arq. Bras. Fitomed. Cient.**, v.1, n.2, p. 80-87, 2003.

ROSTOM, A.; GOLDKIND, L.; LAINE, L. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and hepatic toxicity: a systematic review of randomized controlled trials in arthritis patients. **Clin. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 3, n. 5, p. 489-498, 2005.

RUTHIG, D. J.; MECKLING-GILL, K. A. Both (n-3) and (n-6) fatty acids stimulate wound healing in the rat intestinal epithelial cell line, IEC-6. **J. Nutr.**, v. 129, n. 10, p. 1791-1798, 1999.

SANDS, J. K. Avaliação de pessoas com problemas nos intestinos. In: PHIPPS, W. J.; SANDS, J. K.; MAREK, J. F. **Enfermagem médico-cirúrgica: conceitos e prática clínica** Loures: Lusociência, 2003. v. 3, cap. 41, p. 1497-1564.

SANTOS, F.A.; RAO, V.S. 1,8-Cineol, a food flavoring agent, prevents ethanolinduced gastric injury in rats. **Dig. Dis. Sci.**, v. 46, p. 331-337, 2001.

SAUL, C.; TEIXEIRA, C. R.; PEREIRA-LIMA, J. C.; TORRESINI, R. J. S. Redução da prevalência de ulcera duodenal: um estudo brasileiro (análise retrospectiva na última década: 1996-2005). **Arq. Gastroenterol.**, v. 44, n. 4, 2007.

SCHOFIELD, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. **Blood Cells**, v. 4, p. 7-25, 1978.

SEAMON, K.B.; PADDGETT, W.L.; DALY, J.W. Forskolin: unique diterpene activator of adenylyl cyclase in membranes and intact cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 78, p. 3367-3369, 1981.

SEIGLER, L.; WU, W. T. Separation of serum high-density lipoprotein for cholesterol determination: ultracentrifugation vs precipitation with sodium phosphotungstate and magnesium chloride. **Clin. Chem.**, v. 27, n. 6, p. 838-841, 1981.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Rev. Nutr.**, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.

SHIRAKABE, H.; TAKEMOTO, T.; KOBAYASHI, K.; OGOSHI, K.; KIMURA, K.; NAKAMURA, K.; WATANABE, H. Clinical evaluation of teprenone, a mucosal protective agent, in the treatment of patients with gastric ulcers: a nationwide, multicenter clinical study. **Clin. Ther.**, v. 17, n. 5, p. 924-935, 1995.

SIEGMUND, S. 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.

SILEN, W.; ITO, S. Mechanism for rapid-epithelialization of the gastric mucosal surface. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 47, p. 217-229, 1985.

SIVALINGAM, N.; HANUMANTHARAYA, R.; FAITH, M.; BASIVIREDDY, J.; BALASUBRAMANIAN, K. A.; JACOB, M. Curcumin reduces indomethacin-induced damage in the rat small intestine. **J. Appl. Toxicol.**, v. 27, n. 6, p. 551-560, 2007.

SOMASUNDARAM, S.; HAYLLAR, H.; RAO, S. The biochemical basis of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced damage to the gastrointestinal tract: a review and a hypothesis. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 30, p. 289-299, 1995.

TABER, S. S.; MUELLER, B. A. Drug-associated renal dysfunction. **Crit. Care Clin.**, v. 22, p. 357-374, 2006.

TAKEUCHI, Y.; MORII, H.; TAMURA, M.; HAYAISHI, O.; WATANABE, Y. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 289, p. 33-38, 1991.

TARNAWSKI, A.; HOLLANDER, D.; GERGELY, H.; STACHURA, J. Comparison of antacid, sucralfate, cimetidine, and ranitidine in protection of the gastric mucosa against ethanol injury. *Am. J. Med.*, v. 79, n. 2C, p. 19-23, 1985.

TORSSELL, K.G.B. **The mevalonic acid pathway**. New York: John Wiley 1983.

TSUTSUMI, S.; HARUNA, R.; TOMISATO, W.; TAKANO, T.; HOSHINO, T.; TSUCHIYA, T.; MIZUSHIMA, T. **Dig. Dis. Sci.**, v. 47, p. 84-89, 2002.

VARGHESE, J.; FAITH, M.; JACOB, M. Zinc prevents indomethacin-induced renal damage in rats by ameliorating oxidative stress and mitochondrial dysfunction. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 614, n. 1/3, p. 114-121, 2009.

VICKERY, M. L.; VICKERY, B. **Secondary Plant Metabolism**. Hong Kong: The Macmillan Press, 1981.

WALLACE, J. L.; GRANGER, D. N. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. **FASEB J.**, v. 10, p. 731-740, 1996.

WALLACE, J. L.; MILLER, M. J. Nitric Oxide in mucosal defense: a little goes a long way. **Gastroenterology**, v. 119, p. 512-520, 2000.

WANG, J. Y.; LIU, S. B.; CHEN, S. Y. Risk factors for peptic ulcer in Shanghai. **Int. J. Epidemiol.**, v. 25, p. 638-643, 1996.

WATANABE, T.; CHIBA, T. Pathogenesis of gastric and duodenal ulcer in the elderly. **Nippon Rinsho**, v. 60, n. 8, p. 1515-1520, 2002.

WILSON, R. G.; SMITH, A. N.; MACINTYRE, I. M. **Br. J. Surg.**, v. 77, p. 1103-1104, 1990.

YAMADA, T.; DEITCH, E.; SPECIAN, R. D.; Mechanisms of acute and chronic intestinal inflammation induced by indomethacin. **Inflammation**, v. 17, p. 641-662, 1993.

YEOMANS, N. D.; ST. JOHN, D.J.B.; DEBOER, W. G. Regeneration of gastric mucosa after aspirin induced injury to the rat. **Am. J. Dig. Dis.**, v. 18, p. 773-780, 1973.

ZIEGLER, T. R.; EVANS, M. E.; FERNANDEZ-ESTIVARIZ, C.; JONES, D. P. Trophic and cytoprotective nutrition for intestinal adaptation, mucosal repair, and barrier function. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 23, p. 229-261, 2003.