



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**ESTUDO DOS EFEITOS FARMACOLÓGICOS DO (-)- α -BISABOLOL EM
MODELOS ANIMAIS DE NOCICEPÇÃO, INFLAMAÇÃO E ÚLCERA GÁSTRICA
EM CAMUNDONGOS.**

NAYRTON FLÁVIO MOURA ROCHA

FORTALEZA-CE

2009

NAYRTON FLÁVIO MOURA ROCHA

**ESTUDO DOS EFEITOS FARMACOLÓGICOS DO (-)- α -BISABOLOL EM
MODELOS ANIMAIS DE NOCICEPÇÃO, INFLAMAÇÃO E ÚLCERA GÁSTRICA
EM CAMUNDONGOS.**

Dissertação apresentada à Coordenação do programa de Pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora:
Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa.

FORTALEZA-CE

2009

R574e Rocha, Nayrton Flávio Moura

Estudo do efeito farmacológico do (-)- α -bisabolol em modelos animais de nocicepção, inflamação e úlcera gástrica em camundongos / Nayrton Flávio Moura Rocha. – Fortaleza, 2009. 133f. : il.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Úlcera Gástrica 2. Analgesia 3. Inflamação 4. Terpeno 5. Glutathione I. Sousa, Francisca Cléa Florenço de. (Orient.) II. Título.

CDD: 616.334

NAYRTON FLÁVIO MOURA ROCHA

**ESTUDO DOS EFEITOS FARMACOLÓGICOS DO (-)- α -BISABOLOL EM
MODELOS ANIMAIS DE NOCICEPÇÃO, INFLAMAÇÃO E ÚLCERA GÁSTRICA
EM CAMUNDONGOS.**

Dissertação apresentada a Coordenação do Programa de Pós-graduação em Farmacologia como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em 16 / 07 / 2009.

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa
(Orientadora)**

Profa. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar

Ao meu maior orgulho e amor: minha família.

*Em especial aos meus pais, pela paciência, esforço e dedicação na condução da
minha educação.*

AGRADECIMENTOS

À **PROFA.DRA. Francisca Cléa Florenço de Sousa**, pelo estímulo, convívio e valorosa orientação na realização deste trabalho.

Ao **PROF.DR. Damião Pergentino de Sousa** da Universidade Federal de Sergipe, por ter disponibilizado o (-)- α -bisabolol, substância alvo deste trabalho.

Ao **PROF.DR. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro** e a **PROFA.DRA. Nylane Maria Nunes de Alencar** por comporem a banca examinadora deste trabalho

Às **PROFAS.DRAS. Marta Maria de França Fonteles, Danielle Silveira Macêdo e Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos**, e aos demais colegas de trabalho e amigos do Laboratório de Neurofarmacologia (NEURO) da Universidade Federal do Ceará: **Aline Mara, Ana Luíza, Arnaldo, Brinell, Carol, Cerqueira, Charliane, Daniel, Elaine, Eduardo, Fernando, Giuliana, Helvira, Isabel Linhares, Isabel Silva, Kelly Rose, Mariana, M^a do Carmo, Patrícia Gomes, Patrícia Freire, Rufino, Thiciane, Valdécio e Vilani**.

Ao **Emiliano** pela amizade compartilhada desde a graduação e pela ajuda no laboratório. À **Edith** pela ajuda em vários momentos, pelas sugestões e pelo convívio durante a execução deste trabalho.

À **PROFA.DRA. Flávia Almeida Santos**, pela acessibilidade e por ter sido minha orientadora de monitoria, etapa importantíssima na minha vida acadêmica.

Aos demais **professores** do departamento de fisiologia e farmacologia, que transmitindo uma parte de seus conhecimentos tornam possível a realização de trabalhos como este.

Ao meu pai, **Antonio Flávio da Rocha**, entre outras coisas, pelo empenho em formar dos seus três filhos, três mestres, muito obrigado.

À minha mãe, **Terezinha Moura da Rocha**, por tudo.

À **Paula Nágela do Nascimento Lopes**, por ser, e sempre ter sido, **maravilhosa** durante todo nosso convívio. Paula, obrigado pela amizade, cumplicidade e **amor**.

À minhas irmãs e mestras **Nayana e Nayara**, pelos alertas em relação à vida acadêmica.

Aos pós-graduandos **Claudênio, Washington, Natália e Talita**, pela amizade e ótimo convívio.

Aos amigos (as) do curso de graduação em Farmácia **Átila, Davi, Germano** (Chupinha), **Hugo, Jânio** (meu primo), **Márcia Maria, Renata, Saullo, e Weberty** (Maikin).

Aos meus amigos **Ângelo** (Jason), **Bruno, Éderson, Fábio** (Google), **Henrique, Matheus, Marcelo, Tiago e Roque**, entre outras coisas, pelas intermináveis discussões futebolística nos necessários momentos de lazer.

Aos amigos **Cláudio, Felipe e Silano**, pelo companheirismo durante um importante período da vida.

Aos funcionários do Dep. Fisiologia e Farmacologia da U.F.C: **Alana, Dr. Armando, Sr. Carlos, "Seu Francisco" (Chiquinho), Fernando, Haroldo e Íris**.

Às secretárias do Dep. De Fisiologia e Farmacologia **Aura e Márcia**, pela solicitude.

Ao CNPq e Funcap pelo imprescindível apoio financeiro.

*Um sonho que se sonha só é só um sonho que se sonha só, mas sonho que se sonha
junto é realidade (Raul Seixas).*

RESUMO

O (-)- α -bisabolol, um álcool sesquiterpenico comumente obtido de *Matricaria chamomilla* e de espécies do gênero *Vanillosmopsis*, foi testado em modelos animais padronizado de nocicepção, inflamação e úlcera gástrica em camundongos. Nestes ensaios, o (-)- α -bisabolol foi utilizado nas doses de 25 e 50 mg/Kg nos modelos de nocicepção e 100 e 200 mg/Kg nos modelos de inflamação e úlceras gástricas, administrados por via oral. O (-)- α -bisabolol demonstrou possuir atividade antinociceptiva nos modelos de nocicepção visceral induzida por ácido acético intraperitoneal e na segunda fase do teste de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. O (-)- α -bisabolol não demonstrou atividade no modelo de nocicepção térmica da placa quente. Esses achados sugerem que a ação antinociceptiva do (-)- α -bisabolol não está ligada a mecanismos centrais e deve estar relacionada com o processo inflamatório. Nos modelos de edema de pata induzidos por carragenina e dextrano os animais tratados com (-)- α -bisabolol exibiram edemas menores em comparação com os animais tratados apenas com veículo. (-)- α -bisabolol foi capaz de diminuir os edemas de pata induzidos por 5-HT, mas não os edemas induzidos por histamina, assim, pode-se relacionar a atividade anti-inflamatória do (-)- α -bisabolol a sua interferência na ação/liberação ou na síntese/metabolismo da 5-HT. O (-)- α -bisabolol mostrou ter atividade gastroprotetoras frente às lesões gástricas induzidas por etanol absoluto ou indometacina. O mecanismo dessa ação foi testado farmacologicamente, realizando pré-tratamentos com L-NAME, Glibenclamida e Indometacina. Estes experimentos demonstraram que a ação gastroprotetora do (-)- α -bisabolol parece não envolver o óxido nítrico, os canais de potássio ATP-dependentes ou a síntese de prostaglandinas. Por outro lado, a quantificação de GSH nos tecidos gástricos dos animais não lesionados e lesionados por etanol ou indometacina mostraram que o tratamento com (-)- α -bisabolol atenua o decréscimo de GSH associado as lesões pelos agentes lesivos, mas não aumenta a sua quantidade nos estômagos dos animais não tratados com etanol ou indometacina. Dessa forma o (-)- α -bisabolol aumenta a disponibilidade de GSH no tecido gástrico, possuindo ação antioxidante *in vivo*, o que nos permite associar esse achado a sua ação gastroprotetora.

Palavras chaves: Analgesia. Inflamação. Úlcera Gástrica. Terpeno. Glutaciona

ABSTRACT

(-)- α -bisabolol, a sesquiterpenic alcohol, is commonly obtained from *Matricaria chamomilla* and from species of *Vanillosmopsis*, it was tested in animal standardized models of nociception, inflammation and gastric ulcer in mice. In this assays, (-)- α -bisabolol was used in the doses of 25 and 50 mg/Kg in the models of nociception and 100 and 200 mg/Kg in the models of inflammation and gastric ulcers, administered by via oral. (-)- α -bisabolol demonstrated to have an antinociceptive activity in the models of visceral nociception induced by intraperitoneal acetic acid and in the second phase of the test nociception was induced by intraplantar administration of formaline. (-)- α -bisabolol did not demonstrate activity in the thermal nociception model of hot plate. These findings suggests that the antinociceptive action of (-)- α -bisabolol is not linked to central mechanisms and may be related with pre inflammatory process. In the models of paw oedema induced by carragenine and dextran the animals treated with (-)- α -bisabolol showed smaller oedemas as compared to animals treated only with the vehicle. (-)- α -bisabolol was capable to reduce the paw oedemas induced by 5-HT, but not the oedema induced by histamine, so it could relate the antiinflammatory activity of (-)- α -bisabolol to the interference in the action/liberation or in the synthesis/metabolism of 5-HT. (-)- α -bisabolol demonstrated having gastroprotective activity in the absolute ethanol and indomethacin-induced gastric lesions. The mechanism of this action was pharmacologically tested, doing pre-treatments with L-NAME, Glibenclamide and Indomethacin. These experiments demonstrated that the gastroprotective action of (-)- α -bisabolol seems not to be involved the nitric oxide, potassium channels ATP-dependents or the synthesis of prostaglandines. By the way, the quantification of GSH in the gastric tissues of not lesioned animals e lesionated by ethanol or indomethacin showed that the treatment with (-)- α -bisabolol attenuate the decrease of GSH associated with the lesive agents, but it did not increase its levels in the animals that not receive ethanol or indomethacin. This way (-)- α -bisabolol increase the disponibility of GSH in the gastric tissue, having *in vivo* antioxidant activity, that allows us to associate this finding to its gastroprotective action.

Key words: Analgesia. Inflammation. Gastric Ulcer. Glutathione. Terpenes.

ABREVIATURAS

\pm	Mais ou menos
%	Porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	Grau (s) Centígrado (s)
μg	Micrograma
μM	Micromolar
5-HT	5-hidroxitriptamina (Serotonina)
a.C.	Antes de Cristo
AMPc	adenosina 3',5'-monofosfato cíclica
ATP	Trifosfato de adenosina
AAS	Ácido acetil salicílico
AINEs	Anti-inflamatórios não-esteróides
ANOVA	Análise de Variância
BIS	(-)- α -bisabolol
Ca²⁺	Íons cálcio
Cl⁻	Íons cloreto
cm	Centímetros
CAT	Catalase
COX	Cicloxigenase
d.C.	Depois de cristo.
DZP	Diazepam
ECL	Células enterocromafins-símiles
EDTA	Etilenodiaminotetraacético
E.R.O	Espécies reativas de oxigênio
E.P.M	Erro padrão da média
FBG	Federação Brasileita de Gastroenterologia
et al.	...e colaboradores
EUA	Estados Unidos
GMPc	adenosina 3',5'-monofosfato cíclica
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSH-px	Glutationa peróxidase
GSSG	Glutationa oxidada

H	Hora
I.B.P	Inibidores da bomba de prótons
IL	Interleucinas
i.p.	Intraperitoneal
IP₃	Trifosfato de Inositol
K⁺_{ATP}	Canais de potássio ATP-dependentes
kg	Quilograma
L-NAME	N ^G -nitro-L-argenina metil éster
min ou min.	Minuto
ml	Mililitro
Na⁺	Íons sódio
NAC	N-acetil-L-cisteína
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
p	Nível de Significância
PGs	Prostaglandinas
rpm	Rotação por Minuto
s	Segundo
SOD	superóxido-dismutase
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral - α
v.o.	Via oral
vs	Versus

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Diagrama esquemático do controle fisiológico da secreção ácida pelas células parietais.....	29
FIGURA 2. Mucosa gástrica e mecanismos de defesa.....	30
FIGURA 3. Ação das enzimas Superóxido dismutase, Catalase, Glutathiona peroxidase, glutathiona-s-transferase e glutathiona reductase.	34
FIGURA 4. Estrutura química bidimensional(A) e tridimensional(B) do (-)- α -bisabolol.	44
FIGURA 5. Representação esquemática do modelo de nocicepção visceral induzida por ácido acético.....	49
FIGURA 6. Representação esquemática do modelo de úlcera induzida por etanol absoluto .	53
FIGURA 7. Representação esquemática do procedimento experimental utilizado para avaliar o efeito do óxido nítrico (NO) na gastroproteção do (-)- α -bisabolol.....	54
FIGURA 8. Representação esquemática do procedimento experimental utilizado para avaliar o efeito dos K^+_{ATP} na gastroproteção do (-)- α -bisabolol.....	55
FIGURA 9. Efeito do (-)- α -bisabolol (BIS) sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.....	59
FIGURA 10. Efeito do (-)- α -bisabolol (BIS) sobre o tempo de latência de resposta ao estímulo térmico da placa quente.	61
FIGURA 11. Efeito do (-)- α -bisabolol(BIS) sobre o tempo de lambedura da pata direita traseira no modelo de nocicepção induzida pela formalina em camundongos, na primeira fase do teste.	63
FIGURA 12. Efeito do (-)- α -bisabolol(BIS) sobre o tempo de lambedura da pata direita traseira no modelo de nocicepção induzida pela formalina em camundongos, na segunda fase do teste.)	65
FIGURA 13. Efeito do (-)- α -bisabolol(BIS) contra o edema de pata induzido por carragenina.	68
FIGURA 14. Efeito do (-)- α -bisabolol(BIS) contra edema de pata induzido por Dextrano. ...	70
FIGURA 15. Efeito do (-)- α -bisabolol (BIS) frente ao edema de pata induzido por histamina..	72
FIGURA 16. Efeito do (-)- α -bisabolol (BIS) frente ao edema de pata induzido por 5-HT. ...	

.....	74
FIGURA 17. Efeito do (-)- α -bisabolol(BIS) sobre a área ulcerada associada a lesão gástrica por Etanol.	76
FIGURA 18. Envolvimento do Óxido Nítrico(NO) no efeito gastroprotetor associado ao (-)- α -bisabolol(BIS) em modelos de úlcera induzida por etanol absoluto em camundongos.	78
FIGURA 19. Envolvimento dos canais de potássio ATP-dependentes(K^+_{ATP}) na gastroproteção associado ao (-)- α -bisabolol(BIS) no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em camundongos.	80
FIGURA 20. Envolvimento da síntese de prostaglandinas no efeito gastroprotetor associado ao (-)- α -bisabolol(BIS) no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em camundongos.	82
FIGURA 21. Efeito do (-)- α -bisabolol(BIS) frente a lesões gástricas induzidas por Indometacina.	84
FIGURA 22. Avaliação do envolvimento da glutathiona reduzida (GSH) no efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol (BIS) no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto.	86
FIGURA 23. Avaliação do envolvimento da glutathiona reduzida (GSH) no efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol (BIS)..	88
FIGURA 24. Avaliação do envolvimento da glutathiona reduzida (GSH) no efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol(BIS) no modelo de úlcera induzida por Indometacina.	89

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Drogas e reagentes utilizados durante os procedimentos experimentais.	47
TABELA.2. Escores de lesão gástrica.....	56
TABELA 3. Efeito do (-)- α -bisabolol no teste de contorção induzida por ácido acético....	60
TABELA 4. Efeito do (-)- α -bisabolol (BIS) no teste de nocicepção térmica da placa quente	62
TABELA 5. Efeito do (-)- α -bisabolol sobre a 1ª fase da nocicepção induzida por formalina.	64
TABELA 6. Efeito do (-)- α -bisabolol sobre a 2ª fase da nocicepção induzida por formalina.	66
TABELA 7. Efeito do (-)- α -bisabolol sobre o número de quedas no teste da barra giratória.	67
TABELA 8. Efeito do (-)- α -bisabolol(BIS) frente ao edema de pata induzido por carragenina.	69
TABELA 9. Efeito do (-)- α -bisabolol(BIS) frente ao edema induzido por dextrano.....	71
TABELA 10. Efeito do (-)- α -bisabolol(BIS) frente ao edema induzido por histamina	73
TABELA 11. Efeito do (-)- α -bisabolol(BIS) no edema induzido por 5-HT.	75
TABELA 12. Efeito do (-)- α -bisabolol sobre as lesões gástricas induzida por etanol.....	77
TABELA 13. Avaliação do envolvimento do Óxido Nítrico (NO) no efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto.....	79
TABELA 14. Envolvimento dos canais de potássio ATP-dependentes(K^+_{ATP}) na gastroproteção associado ao (-)- α -bisabolol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto.....	81
TABELA 15. Envolvimento da síntese de prostaglandinas no efeito gastroprotetor associado ao (-)- α -bisabolol no modelo de úlcera induzida por etanol.	83
TABELA 16. Efeito do (-)- α -bisabolol sobre as lesões gástricas induzida por indometacina.	85
TABELA 17. Envolvimento da glutatona reduzida (GSH) no efeito gastroprotetor do (-)- α - bisabolol frente as lesões gástricas induzidas por etanol.....	87
TABELA 18. Envolvimento da glutatona reduzida (GSH) no efeito gastroprotetor do (-)- α - bisabolol.	88
TABELA 19. Envolvimento da glutatona reduzida (GSH) no efeito gastroprotetor do (-)- α - bisabolol frente as lesões gástricas induzidas por indometacina.....	90

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. PARTE I.....	17
1.1.1 Nocicepção e dor	17
1.1.2 Os receptores opióides e a analgesia	19
1.1.3 Modelos animais de nocicepção e dor.....	20
1.1.4. Inflamação	21
1.1.5 Edemas de pata induzidos em animais	25
1.2. PARTE II.....	27
1.2.1. O estômago e a secreção ácida	27
1.2.2. Mecanismos de defesa da mucosa gástrica	29
1.2.3 Úlcera péptica.....	35
1.2.4 Etanol e úlceras gástricas.....	36
1.2.5. Anti-inflamatórios não-esteróides e úlceras gástrica.....	37
1.2.6. Tratamento farmacológico das úlceras gástricas.....	39
1.3. PARTE III.....	41
1.3.1 Drogas de origem natural, atividade gastroprotetora, antinociceptiva e anti-inflamatória.....	41
1.3.2 (-)- α -bisabolol.....	44
2. OBJETIVOS.	46
2.1. Geral.	46
2.2. Específicos.....	46
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.1. Animais.....	47
3.2. Drogas e Reagentes	47
3.3. Atividade antinociceptiva	48
3.3.1. Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	48
3.3.2. Teste da formalina.	49
3.3.3. Teste da placa quente.....	49
3.3.4 Avaliação da coordenação motora (teste da barra giratória)	50
3.4. Atividade anti-inflamatória.....	50
3.4.1. Edema de pata induzido por carragenina.....	50

3.4.2. Edema de pata induzido por dextrano	51
3.4.3. Edema de pata induzido por Histamina.....	51
3.4.4. Edema de pata induzido por 5-HT.....	52
3.5. Atividade Antiulcerogênica.....	52
3.5.1. Úlcera gástrica induzida por etanol absoluto.....	52
3.5.2. Avaliação do envolvimento do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto.....	53
3.5.3. Avaliação do envolvimento dos Canais de K^+ -ATP-dependentes(K^+_{ATP}) no efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto.....	54
3.5.4. Avaliação do envolvimento da síntese de prostaglandinas no efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto.	55
3.5.5. Úlcera gástrica induzida por indometacina	55
3.5.6. Avaliação do envolvimento da glutathiona (GSH) reduzida na gastroproteção do (-)- α -bisabolol nas úlceras induzidas por etanol e Indometacina.	56
3.5.7. Dosagem de proteínas no tecido gástrico	57
3.6. Análise estatística.	58
4. RESULTADOS.....	59
4.1 Atividade antinociceptiva.....	59
4.1.1. Avaliação do potencial antinociceptivo do (-)- α -bisabolol no modelo de contorções induzidas por ácido acético.	59
4.1.2 Avaliação do potencial antinociceptivo do (-)- α -bisabolol no modelo de nocicepção térmica na placa quente	61
4.1.3. Avaliação do potencial antinociceptivo do (-)- α -bisabolol no modelo de nocicepção induzida pela formalina.	63
4.1.4. Avaliação da coordenação motora.....	67
4.2. Atividade anti-inflamatória.....	68
4.2.1. Avaliação do efeito anti-inflamatório do (-)- α -bisabolol no modelo de edema de pata induzido por carragenina.	68
4.2.2. Avaliação do efeito anti-inflamatório do (-)- α -bisabolol no modelo de edema de pata induzido por dextrano.	70
4.2.3. Avaliação do efeito anti-inflamatório do (-)- α -bisabolol no modelo de edema de pata induzida por histamina.....	72

4.2.4 Avaliação do efeito anti-inflamatório do (-)- α -bisabolol no modelo de edema de pata induzida por 5-HT.....	74
4.3. Atividade gastroprotetora.	76
4.3.1. Avaliação do efeito do (-)- α -bisabolol frente às lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.	76
4.3.2. Avaliação do envolvimento do Óxido Nítrico (NO) no efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto.....	78
4.3.3 Avaliação do envolvimento dos Canais de K^+ -ATP-dependentes(K^+_{ATP}) no efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto.	80
4.3.4. Avaliação do envolvimento da síntese de prostaglandinas no efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto.....	82
4.3.5. Avaliação do efeito do (-)- α -bisabolol frente às lesões gástricas induzidas por Indometacina em camundongos.	84
4.3.6 Avaliação do envolvimento da glutathiona reduzida (GSH) no efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto.....	86
4.3.7. Avaliação do envolvimento da glutathiona reduzida (GSH) no efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol no modelo de úlcera induzida por Indometacina.	89
5. DISCUSSÃO	91
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	106
7. CONCLUSÃO.....	107
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
9. ANEXO	127

1. INTRODUÇÃO

1.1. PARTE I

1.1.1 Nocicepção e dor

A dor constitui a principal causa de perda da capacidade de trabalho, como também gera nocivas conseqüências psicossociais e econômicas. Como conseqüência de tal processo, 50 a 60% dos que sofrem qualquer tipo de dor ficam parcialmente ou totalmente incapacitados para exercer suas atividades, de maneira transitória ou permanente, contribuindo negativamente para sua qualidade de vida (SBED, 2005).

Estima-se que apenas nos Estados Unidos da América (E. U. A), em função de dias de ausência ao trabalho e redução na capacidade produtiva, uma perda anual de 50-70 bilhões em conseqüência de estados dolorosos crônicos (BRENNAN et al., 2007).

A dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tissular potencial ou real, ou mesmo, a nenhuma lesão, embora, ainda assim, descrita com termos sugestivos de que o dano tecidual tivesse de fato ocorrido. A dor é sempre subjetiva. Cada indivíduo aprende a aplicação da palavra através de experiências relacionadas com lesões no início da vida (IASP, 2007).

A alodínea, dor associada a estímulos geralmente inócuos, ou não-nóxicos, e a hiperalgesia que é o aumento da sensibilidade à dor, são sintomas comuns associados a várias doenças que, do ponto de vista fisiológico, podem ser úteis para a preservação de tecidos vulneráveis (SANDKÜHLE, 2009).

A sensibilização local e fisiológica, principalmente relacionada com a presença de mediadores inflamatórios e neuromoduladores é qualificada como hiperalgesia primária. Outras regiões não envolvidas pelo estímulo nociceptivo inicial podem sofrer pela expansão desta hiperalgesia, de modo que o limiar para desencadear a dor nestes novos locais se torna mais baixo, estabelecendo-se uma dor generalizada, caracterizando a hiperalgesia secundária (MARQUES, 2004).

Os mecanismos moleculares, celulares e sistêmicos ligados aos processos dolorosos, sua amplificação e depressão são chamados de nociceptivos, pró-nociceptivo e anti-nociceptivo, respectivamente (SANDKÜHLE, 2009).

Sendo assim, a nocicepção carece do componente emocional ou subjetivo que está ligado à dor. Dessa maneira a ativação de mecanismos nociceptivos engloba as respostas comportamentais e neurofisiológicas da dor, podendo ter como outros eventos relacionados

que não seja a dor, os reflexos de retirada e a vocalização (SBED, 2005; SANDKÜHLE, 2009).

Os nociceptores são terminações nervosas sensoriais, que diferem dos outros receptores sensitivos pelo seu limiar de ativação mais elevado, estando associado aos estímulos de intensidade potencialmente lesiva (MILLAN, 1999).

A nocicepção compreende a atividade sensorial como também suas vias e processos facilitados pelo estímulo doloroso (DICKENSON & BESSON, 1997). Sendo assim, a nocicepção também pode ser definida como o processo que se refere à recepção de sinais no S.N.C. evocados pela ativação de nociceptores, ativação esta proveniente de dano tissular, ou não. Nem todos os estímulos transmitidos desta forma podem ser qualificados como dor (JESSEL & KELLY, 1991). Os nociceptores podem responder a estímulos térmicos, mecânicos e químicos. O impulso nervoso gerado por tal(is) estímulo(s) se propaga pela fibra nervosa ascendente até a medula espinhal, desta para o córtex cerebral, onde serão comandadas e geradas as respostas fisiológicas, emocionais e comportamentais (MUIR III, 1998).

A dor pode ser classificada de diversas maneiras, dependendo do enfoque ao qual se destina a análise, como em relação à origem, localização e tempo. Em se tratando da origem da estimulação do processo doloroso podemos classificar a dor como nociceptiva (desencadeada pela estimulação dos nociceptores localizados em várias partes do organismo), neurogênica (dano tecidual neuronal nos sistemas nervoso periférico ou central), neuropática (disfunção de nervos) e psicogênica, que é a mais difícil de se trabalhar, já que não se origina de uma fonte somática detectável, sendo possivelmente desencadeada por fatores psicológicos (MILLAN, 1999).

Em relação à localização do processo doloroso, podemos classificá-la em dor somática (onde os estímulos que geram a sensação dolorosa são oriundos da periferia do organismo, podendo ser superficial cutânea ou profunda) e dor visceral (quando os estímulos dolorosos são provenientes dos órgãos internos) (RAJA et al., 1999).

Com base no tempo de permanência da dor no organismo, podemos classificá-la como transitória (onde os receptores da dor são ativados mesmo sem haver dano tecidual), aguda (resposta normal causada por dano tecidual, com ativação de receptores, de modo que a dor pode ser revertida antes mesmo da total restauração fisiológica do local afetado) e crônica (onde a lesão ou a patologia causadora da dor, supera a capacidade do organismo em restaurar o tecido afetado) (LOESER & MELZACK, 1999).

Existem três mecanismos interligados que explicam a ocorrência da sensação de dor. O primeiro deles é a **transdução**, que consiste na ativação dos nociceptores por ocorrência de um estímulo nocivo (podendo ser mecânico, térmico ou químico), gerando um potencial de ação. A **transmissão** efetuada pelo conjunto de vias que conduzem o impulso nervoso gerado pelo nociceptor, leva a informação dolorosa para o SNC. E por fim, a **modulação** que pode ativar vias responsáveis pela supressão da dor gerada pelos próprios nociceptores e suas vias (PORTO, 2004).

As fibras nervosas responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao SNC são (JULIUS & BASBAUM, 2001):

- **Fibras A β** : bastante mielinizada, constituindo a fibra de mais rápida condução nervosa (30 – 100 m/s) dentre as envolvidas com o processo nociceptivo, diâmetro grande (10 μ m). Transmitem estímulos inócuos.
- **Fibras A δ** : pouca mielinização, tendo por isso uma condução nervosa mais lenta que as fibras A β (1,2 – 30 m/s). Apresentam diâmetro intermediário (2 – 6 μ m) e são ativadas através de nocicepção mecânica e térmica.
- **Fibras C**: não apresenta mielinização, sendo dos três tipos, a fibra de condução mais lenta (0,5 – 2 m/s). Apresentam o menor diâmetro (0,4 – 1,2 μ m) e são ativadas por vários tipos de nocicepção (mecânica, térmica e química).

1.1.2 Os receptores opióides e a analgesia

O termo *opióide* se aplica a qualquer substância endógena ou sintética, a qual produz efeitos semelhantes aos da morfina, que são bloqueados por antagonistas como a naloxona. O termo mais antigo, *opiáceo*, é restrito aos fármacos sintéticos semelhantes à morfina, com estruturas não-peptídicas (HERZ et al., 1993). O ópio é um extrato da seiva da papoula *Papaver somniferum*, que foi usado para fins sociais e médicos, já que é indutor de euforia, analgesia e sono.

Três classes de receptores opióides, chamados de μ , δ e κ , todos membros da superfamília de receptores acoplados à proteína G, medeiam os principais efeitos farmacológicos dos opiáceos (SCHUMACHER et al., 2005). Estudos recentes sobre as características das raças de camundongos transgênicos, que não possuem um dos três

principais subtipos de receptores opióides, mostram que os efeitos farmacológicos principais da morfina, incluindo a analgesia, são mediados pelo receptor μ . (CHILDERS, 1997).

Os receptores opióides são amplamente distribuídos no cérebro. Os fármacos que atuam nestes receptores, quando administrados por via intratecal, em doses pequenas, apresentam uma eficácia considerável. Esta evidência sugere que uma ação central possa ser responsável por seu efeito analgésico. A nível espinal, a morfina inibe a transmissão dos impulsos nociceptivos através do corno dorsal, suprime os reflexos nociceptivos espinais, como também inibe a liberação de substância P dos neurônios do corno dorsal *in vitro* e *in vivo* (YAKSH et al., 1980).

A morfina é eficaz em muitos tipos de dor aguda e crônica. Os opiáceos são mais úteis para combater processos dolorosos originados por lesão tecidual, inflamação ou crescimento tumoral do que em processos de dor neuropática. A morfina também é capaz de reduzir o componente afetivo da dor, refletindo uma atividade supra-espinal, possivelmente ao nível de sistema límbico, que está, provavelmente, envolvido no efeito produtor de euforia (RANG et al., 2007).

1.1.3 Modelos animais de nociceção e dor.

No âmbito da pesquisa em animais, a dor não pode ser medida diretamente e dessa forma os efeitos da administração de drogas também não. Assim, os parâmetros comportamentais utilizados para quantificar respostas a estímulos dolorosos em animais são apenas indicativos e na realidade medem a resposta nociceptiva a um dado estímulo (SCHOUENBORG & SJÖLUND, 1983; SANDKÜHLE, 2009).

Os modelos tradicionalmente utilizados para teste de substâncias com potencial atividade antinociceptiva envolvem a observação comportamental de animais após a exposição a um estímulo nóxico. O local da exposição e as propriedades químicas e físicas desses estímulos geram modelos de estudo com características e aplicabilidades diferentes, e dessa forma, fornecem possibilidades de estudo de vários ângulos do processo nociceptivo.

A literatura descreve vários modelos consagrados para a triagem de moléculas no campo da dor, são exemplos:

- teste de nociceção visceral do ácido acético onde a aplicação intraperitoneal deste ácido provoca liberação de neurotransmissores e mediadores

inflamatórios, sendo um modelo sensível a drogas analgésicas de ação central e periférica (KOSTER et al., 1959; RIBEIRO et al., 2000);

- teste da nocicepção química da formalina, um interessante teste bifásico, onde a mediação química e os mecanismos de modulação são distintos em cada fase, apresentando diferenças marcantes na sensibilidade a drogas analgésicas. Nesse ensaio, a primeira fase está ligada à produção de dor de origem neurogênica e a segunda fase está relacionada a dor de origem inflamatória. (HUNSKAAR & HOLE, 1987; LAPA, 2007);
- teste da capsaicina (SAKURATA et al., 1992), utilizado para produzir dor de origem neurogênica, mediada pela liberação de neuropeptídeos como a substância P, neurocininas, somatostatina, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) com participação de fibras aferentes nociceptivas do tipo C, e em parte, fibras do tipo A δ (SZALLASI, 1999; CERVERO & LAIRD, 1999);
- teste da placa-quente que avalia a nocicepção térmica é considerado um teste sensível a fármacos que atuam em nível supraespinal de modulação da resposta dolorosa (EDDY & LEIMBACH, 1953; SILVA et al., 2006).

Esses métodos utilizam comportamento motor como evidencia da resposta nociceptiva. Dessa forma no teste de substâncias com potencial antinociceptivo é importante que seja investigado a possibilidade de que as respostas detectadas nesses experimentos não estejam ligadas à diminuição da capacidade motora do animal.

1.1.4. Inflamação

Um dos mecanismos mais primitivos de defesa do organismo animal a uma invasão de microorganismos patogênicos é o processo inflamatório. Celsius (30 a.C. – 38 d.C.) descreveu os quatro sinais clássicos da inflamação: rubor, tumor, calor e dor. Após muitos anos, Virchow (1821-1902) descreveu a inflamação como um processo e não apenas como um evento simples além de conceituar o quinto sinal clássico da inflamação, a perda de função do órgão ou tecido inflamado (WEISSMAN, 1992; HEIDLAND et al., 2006).

Existem dois tipos de inflamação, tomando como base o critério de tempo de permanência do processo no organismo. A **inflamação aguda** é um tipo de resposta rápida a um agente nóxico de modo que ocorra uma estimulação a síntese de mediadores de defesa e um direcionamento dos mesmos ao local da lesão. Essa resposta pode durar alguns minutos, horas ou, até mesmo, vários dias. Uma maciça presença de proteínas plasmáticas, configurando o edema, e a migração de leucócitos, principalmente os neutrófilos, constituem a principal característica deste processo. Ocorre vasodilatação, estimulada por histamina e óxido nítrico, e um consequente aumento da permeabilidade na microcirculação, promovendo o edema (MAJNO & PALACE, 1961; SUFFREDINI et al., 1999; MCDONALD et al., 1999; COLLINS, 1999). Já a inflamação crônica pode se prolongar por períodos bem mais extensos e está associada com alguns outros processos de alteração histológica como fibrose e necrose do tecido afetado, proliferação de vasos sanguíneos e, principalmente, a participação de linfócitos e macrófagos.

O principal objetivo da reação inflamatória é possibilitar o acesso ao tecido lesado de células, proteínas e outros elementos originários do sangue ao local da inflamação. A instalação de um processo inflamatório agudo pode ser dividida de forma didática em alguns eventos (COTRAN et al., 2005):

- Aumento do fluxo sanguíneo local, devido à vasodilatação atribuída aos mediadores inflamatórios.
- Retração de células endoteliais, causando um aumento na permeabilidade vascular. Esse processo faz com que mediadores solúveis do plasma, tenham acesso ao local da inflamação.
- O extravasamento de macromoléculas plasmáticas, ao aumentar a pressão oncótica local, se faz acompanhar pela saída de água levando a formação do edema inflamatório.
- Quimiotaxia de leucócitos, essas células migram dos capilares à origem do processo inflamatório.

Os mediadores do processo inflamatório são inicialmente liberados no local onde se deflagrou o processo. Os macrófagos locais sinalizam a presença de material estranho ou lesão através destes mediadores e/ou citocinas que irão recrutar células circulantes (leucócitos

polimorfonucleares, macrófagos, eosinófilos, linfócitos) que apresentam um papel amplificador no processo (FERREIRA, 1980; FERREIRA, 1993).

Entre as substâncias que podem manter e amplificar os diversos processos inflamatórios estão a 5-hidroxitriptamina (5-HT ou serotonina), histamina, bradicinina, os metabólitos do ácido araquidônico, citocinas, óxido nítrico (NO) e neuropeptídeos.

A 5-HT é um mediador vasoativo pré-formado, encontrado nas plaquetas e células enterocromafins (seres humanos e roedores) e nos mastócitos (roedores). É liberado a partir das plaquetas durante o processo de agregação, após contato com o colágeno, trombina, difosfato de adenosina (ADP) e complexo antígeno-anticorpo. Essa amina vasoativa tem um importante papel na alteração do tônus e permeabilidade vascular o que contribui para o extravasamento de fluídos (COLE et al., 1994; COLLINS, 1999).

A 5-HT é um poderoso agente estimulante das terminações nervosas sensitivas para dor e prurido, sendo responsável por alguns dos sintomas causados por picadas de insetos e irritantes vegetais (YAMAGUCHI et al., 1999). A 5-HT produz rubor, uma das características da inflamação e a possível explicação para esse fato é constrição venosa com conseqüente aumento no enchimento capilar (KATZUNG, 2006).

A histamina é um importante mediador das respostas alérgica imediata e inflamatória. Sua fonte mais abundante são os mastócitos, onde se encontra pré-formada nos grânulos mastocitários, porém também são encontradas em outros tecidos como basófilos, plaquetas, células enterocromafins-símiles (ECL) e nos neurônios. Assim como a serotonina, esta substância é um forte estimulante das terminações nervosas sensitivas, e está fortemente associada à produção da sensação de prurido. Além disso, alguns estudos têm associado o bloqueio de receptores de histamina no sistema nervoso central e a produção de potente analgesia (KATZUNG, 2006; HOUGH, 2000; HAAS, 2008).

Vários estímulos podem gerar a degranulação dos mastócitos, liberando histamina, como: lesão física, frio, calor, anticorpos ligados aos mastócitos, fragmentos do complemento (anafilatoxinas C3a e C5a), proteínas de liberação da histamina derivadas dos leucócitos, neuropeptídeos (substância P) e citocinas (COTRAN et al., 2005).

A histamina liberada nos processos inflamatórios está envolvida no desenvolvimento do eritema, devido à vasodilatação das pequenas arteríolas e esfíncteres pré-capilares, e do edema ao aumentar a permeabilidade das vênulas pós-capilares. O aumento da permeabilidade associada à ação da histamina é uma ação direta sobre os receptores de histamina do tipo 1 (H₁), que causa separação das células endoteliais e permitem a transudação de líquidos e moléculas do tamanho de pequenas proteínas no tecido perivascular

(MACDONALD et al., 1999). Ela é considerada o principal mediador na fase aguda de aumento da permeabilidade vascular no processo inflamatório (COTRAN et al., 2005).

A bradicinina, cininogênio vasoativo de alto peso molecular, é descrita como ativadora direta de nociceptores, assim como mediador hiperalgésico. A bradicinina se liga a quatro tipos de receptores conhecidos ($Bk_1 - Bk_4$), sendo que Bk_1 e Bk_2 parecem ser os mais importantes com relação à dor inflamatória. A bradicinina apresenta um potente efeito sobre a permeabilidade vascular, com efeitos semelhantes aos da histamina. É também um importante mediador no que se refere à resposta inflamatória tecidual a estímulos irritantes, porém sua ação é curta devido à rápida degradação enzimática (BOURA & SVOLMANIS, 1984; STERANKA & BURCH, 1991; FARMER & BURCH, 1992).

Entre os muitos mediadores da inflamação, as prostaglandinas (PGs) possuem importância especial. Elas são liberadas por quase todo tipo de estímulos químicos ou mecânicos e sempre acompanham a resposta inflamatória. São sintetizadas através das enzimas cicloxigenases (COX_1 , COX_2 e COX_3) a partir do ácido araquidônico e estão relacionadas com os processos de sinalização entre células, na manutenção da homeostasia tecidual, febre, dor e inflamação. A $COX-2$ é a isoenzima induzida em células inflamatórias mediante estímulo inflamatório. A PGE_2 torna a célula neural hipersensível a estímulos dolorosos e interage com citocinas na geração de febre durante processos infecciosos. A PGD_2 é o principal metabólito da via da COX nos mastócitos e, juntamente com PGE_2 e PGI_2 , causa vasodilatação e potencializam a formação de edema pela ação sinérgica entre as substâncias endógenas que causam o aumento da permeabilidade vascular, como a bradicinina e histamina (DRAY, 1995; RANG et al., 2003; BOTTING, 2006).

Chandrasekharan et al., (2002), descreveram a isoenzima $COX-3$ (ou $COX-1b$) e atribuíram à inibição desta enzima, no Sistema Nervoso Central (S.N.C), o mecanismo de ação analgésico e anti-térmico do paracetamol (acetaminofeno), postulando que a síntese central de PGs envolvidas nos processos de dor e regulação da temperatura são sintetizadas a partir da ação dessa isoenzima.

As citocinas são mediadores protéicos ou peptídicos liberados por células do sistema imune. Apresentam ação direta sobre os receptores celulares, mas também podem induzir a formação de outras citocinas, constituindo uma cascata de amplificação. As citocinas fazem parte da resposta final de uma célula, determinada por um certo número de mensagens diferentes recebidas de modo concomitante, na superfície da célula. Em se tratando do processo inflamatório, pode-se mencionar as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. As citocinas pró-inflamatórias participam das reações inflamatórias agudas e crônicas, bem

como nos processos de reparo (TNF- α e IL-1, por exemplo). São liberadas por macrófagos e por muitas outras células, podendo desencadear uma cascata de citocinas secundárias. As citocinas anti-inflamatórias inibem algumas fases da reação inflamatória: inibição da produção de quimiocinas (citocinas quimioatraentes), inibição da resposta das células Th1. Esta última inibição é importante para evitar ativação celular inapropriada, característica de certas patologias auto-imunes. Como exemplo de citocinas anti-inflamatórias temos: TGF- β , IL-4, IL-10 e IL-13 (RANG et al., 2003).

O papel do óxido nítrico (NO) como mediador inflamatório foi descoberto de forma relativamente recente. Em 1980, demonstrou-se que a vasodilatação estimulada pela acetilcolina necessitava de um endotélio íntegro. Em razão disso, as células endoteliais sintetizavam um Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio (EDRF), levando a um relaxamento da musculatura lisa. Posteriormente, descobriu-se que o endotélio sintetizava NO e que este apresentava as mesmas propriedades físicas e biológicas do EDRF. Esse relaxamento é devido ao aumento de GMPc intracelular, estimulado pelo NO, o que também gera vasodilatação. A entrada de Ca^{++} no interior da célula ativa a produção de NO. A óxido nítrico sintase (NOS) é fundamental para a síntese de NO. Existem três isoformas principais de NOS: duas isoformas constitutivas (eNOS – presente no endotélio e nNOS – presente nos neurônios) e uma isoforma induzível (iNOS – expressa nos macrófagos, células de Kupfer, neutrófilos, fibroblastos, músculo liso vascular e células endoteliais em resposta a estímulos patológicos). Em reações inflamatórias há uma maior expressão da iNOS. O NO é sintetizado a partir da L-arginina e do oxigênio molecular pela NOS (DUSSE et al., 2003).

Os neurônios sensitivos podem gerar sua contribuição para as reações inflamatórias através da liberação de neuropeptídeos. Os principais neuropeptídeos envolvidos com o processo inflamatório são o Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP), um potente vasodilatador, substância P e a neurocinina A, que atuam sobre os mastócitos liberando histamina, produzindo contração da musculatura lisa e secreção de muco. O processo inflamatório onde ocorre à presença de neuropeptídeos é chamado de inflamação neurogênica e está implicada na patogênese de vários eventos inflamatórios: doença intestinal inflamatória, rinite alérgica, fase tardia da asma, entre outros processos (MAGGI, 1996).

1.1.5 Modelo de inflamação em pata de roedores

Os edemas de pata induzidos experimentalmente em roedores têm sido utilizados tanto para o estudo do processo inflamatório quanto para a triagem de moléculas com potencial

atividade antiinflamatória (DI ROSA et al., 1971; DAWSON et al., 1991; GILLIGAN et al., 1994; SALVEMINI et al., 1996; FERNANDES et al., 2002; NONATO, 2009).

Nesses ensaios a indução de edema consiste na aplicação de um agente inflamatório na pata traseira do animal. Os estímulos inflamatórios tradicionalmente utilizados na avaliação da atividade antiinflamatória de novas moléculas e produtos de origem natural são:

- Carragenina: a aplicação intraplantar desta substância produz um edema caracterizado pelo agudo e progressivo aumento no volume da pata injetada. Esse edema é resultado da ação seqüencial e integrada de vários mediadores inflamatórios, como citocinas (TNF- α e IL-1 β), histamina, bradicinina, prostaglandina e substância P (DI ROSA et al., 1971; LORAM et al., 2006).
- Dextrano: esse agente está relacionado com liberação de histamina e serotonina através da degranulação de mastócitos (LO et al., 1982).
- Histamina, 5-HT e Prostaglandina E: são utilizadas para avaliar diretamente o papel de uma dada molécula sobre suas respostas, no processo inflamatório (CUNHA et al., 2001; LAPA et al., 2007).

1.2. PARTE II

1.2.1. O estômago e a secreção ácida

O estômago é um órgão que exerce função exócrina e endócrina digerindo os alimentos e secretando hormônios. É uma dilatação do trato digestivo, entre o esôfago e o duodeno, que tem como funções principais continuar a digestão de carboidratos iniciada na boca, transformar o bolo alimentar em uma massa viscosa chamada de quimo, e iniciar a digestão das proteínas pela ação da pepsina (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Após uma refeição o estomago, expande-se de acordo com a quantidade de alimentos ingerida, mistura, tritura e separa as partículas menores que serão esvaziadas no duodeno a uma velocidade compatível com a capacidade de digestão do pâncreas e absorção do intestino e, também, de acordo com o estado físico e emocional do indivíduo (HIRATA et al., 2007).

O estômago é dividido em quatro regiões anatômicas: a cárdia, o fundo, o corpo e o antro. A cárdia é a porção estreitada do estômago imediatamente distal à junção gástricoesofágica. O fundo constitui a porção do estômago proximal que se estende acima do nível da junção gástricoesofágica. A porção mais distal do órgão demarcado do duodeno pelo esfíncter pilórico é denominada antro. Os dois terços restantes do estômago são chamados de corpo (HAM, 1991).

O epitélio que recobre a mucosa gástrica sofre invaginações em direção a lâmina própria, formando as fossetas gástricas, onde desembocam as secreções das glândulas tubulares ramificadas características de cada região histológica. Na região pilórica e da cárdia é produzida uma secreção rica em muco, enquanto na região oxíntica é secretado principalmente ácido clorídrico e o fator intrínseco, ambos provenientes de células parietais e pepsinogênio proveniente das células principais ou pépticas.(AZERKAN et al., 2001).

O ácido gástrico secretado possui um importante papel no processo de absorção de ferro, cálcio e vitamina B12, além de ativar o pepsinogênio secretado pelas células principais, facilitar a digestão de proteínas e combater às infecções bacterianas (SCHUBERT & PEURA, 2008). No entanto, quando ocorre produção anormalmente altas de ácido, as defesas da mucosa são debeladas e pode ocorrer as lesões características das úlceras pépticas (DUBOIS et al., 2004).

Para regular a secreção de ácido gástrico de acordo com a necessidade fisiológica, as células parietais são reguladas por três mecanismos: neurais, com envolvimento principalmente de acetilcolina e do peptídeo liberador de gastrina (GRP); hormonais, pela ação da gastrina; e de forma parácrina devido à proximidade das células Enterocromafinsímiles (ECL) que liberam histamina (SHUBERT & PEURA, 2008; MCQUAID, 2005).

As células parietais são reguladas por esses três mecanismos de forma integrada. Estas células possuem receptores de membrana para histamina, acetilcolina e gastrina-colecistocinina-B(CCK-B) (SCHUBERT & PEURA, 2008) (**Figura 1**).

O controle nervoso da secreção ácida é mediado principalmente pela ação da acetilcolina, a qual age diretamente nas células parietais estimulando o aumento de cálcio intracelular através da enzima fosfolipase C. Esse aumento de cálcio intracelular leva a ativação de proteína cinases que estimulam a secreção de ácido pela H^+/K^+ -ATPase, cuja ação é mediada por receptores colinérgicos muscarínicos do tipo 3 (MCQUAID, 2005; SCHUBERT & SHAMBUREK, 1990). De forma indireta, a acetilcolina se liga a receptores muscarínicos do tipo 1 que potencializam a secreção de histamina nas células ECL, além de diminuir a secreção de somatoestatina, o principal inibidor da secreção ácida (SCHUBERT & SHAMBUREK, 1990).

A gastrina, principal estimulante da secreção ácida durante a ingestão de alimentos, é produzida nas células G do antro gástrico e, em menores quantidades e de forma variável, na parte proximal do intestino delgado, cólon e pâncreas. Ela se liga aos receptores CCK-B nas células parietais e ECL e em ambos os casos estão ligados à ativação da Fosfolipase C e aumento do cálcio intracelular (SACHS et al., 1997; DUFRESNE et al., 2006). Embora a gastrina possa interagir diretamente com as células parietais, a atividade secretória deste hormônio está muito mais estabelecida como indutor da produção de histamina nas células ECL. Nestas células a gastrina aumenta a expressão de genes ligados a produção e liberação de histamina.(SHUBERT & PEURA, 2008; DUFRESNE et al., 2006).

A histamina produzida pelas células ECL age sobre os receptores do tipo H_2 , os quais são acoplados a proteína-G e a adenilato ciclase e dessa forma aumentam a concentração intracelular de 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). O AMPc por sua vez, ativa proteína cinases que estimulam a secreção de ácido pela H^+/K^+ -ATPase, ou bomba de prótons (SOLL & WOLLIN, 1979; MCQUAID, 2005).

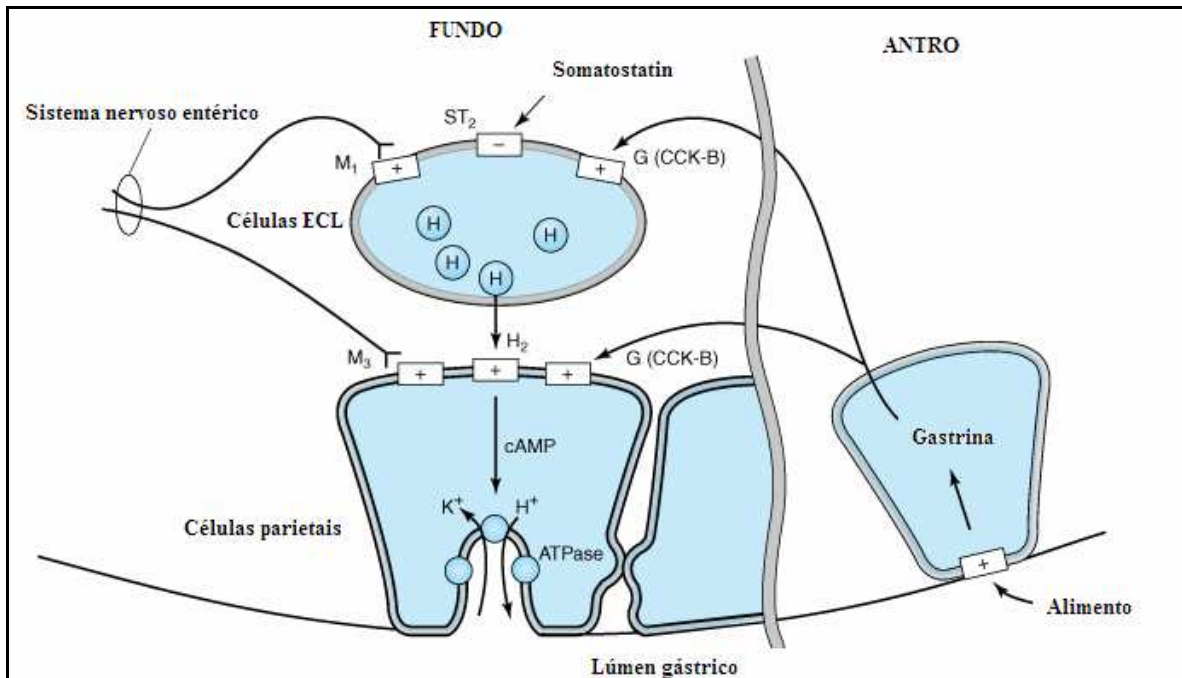


FIGURA 1. Diagrama esquemático do controle fisiológico da secreção ácida pelas células parietais. M1 e M3: receptores muscarínicos; ECL: células enterocromafins-símile; ST2: receptor de somatostatina; H: histamina; H2: receptor de histamina; CCK-B: receptor de gastrina-colecistocina-B. adaptado de Mcquaid, 2005.

Para que as funções e integridade do estômago sejam mantidas em um ambiente com fatores potencialmente lesivos (ácido e pepsina) é necessário que os fatores de proteção da mucosa gástrica sejam capazes de barrar a ação danosa desses fatores lesivos.

1.2.2. Mecanismos de defesa da mucosa gástrica

Em situação fisiológica o estômago convive em equilíbrio com fatores protetores e agressores da mucosa gástrica. O desenvolvimento da úlcera péptica é dependente do desequilíbrio entre esses fatores. A barreira formada por muco, fosfolípidios e bicarbonato, a constante renovação das células epiteliais gástricas, a contínua geração de prostaglandinas (PGs), inervação neuronal sensorial da mucosa gástrica e a manutenção de uma eficiente microcirculação local constituem os principais fatores protetores da mucosa gástrica. Os principais fatores agressores são o ácido clorídrico (HCl) secretado pelas células parietais, pepsina, sais biliares, motilidade anormal do trato gastrintestinal e infecções por microorganismos, *Helicobacter pylori*, principalmente (ADEYEMI et al., 2005; LAINE et al., 2008).

Os componentes de defesa são os fatores que possibilitam a mucosa gástrica resistir às exposições a um amplo espectro de substâncias com variações de pH, osmolaridade e temperatura, a agentes com propriedades detergentes e produtos bacterianos capazes de causar inflamação local e sistêmica (WALLACE & GRANGER, 1998.).

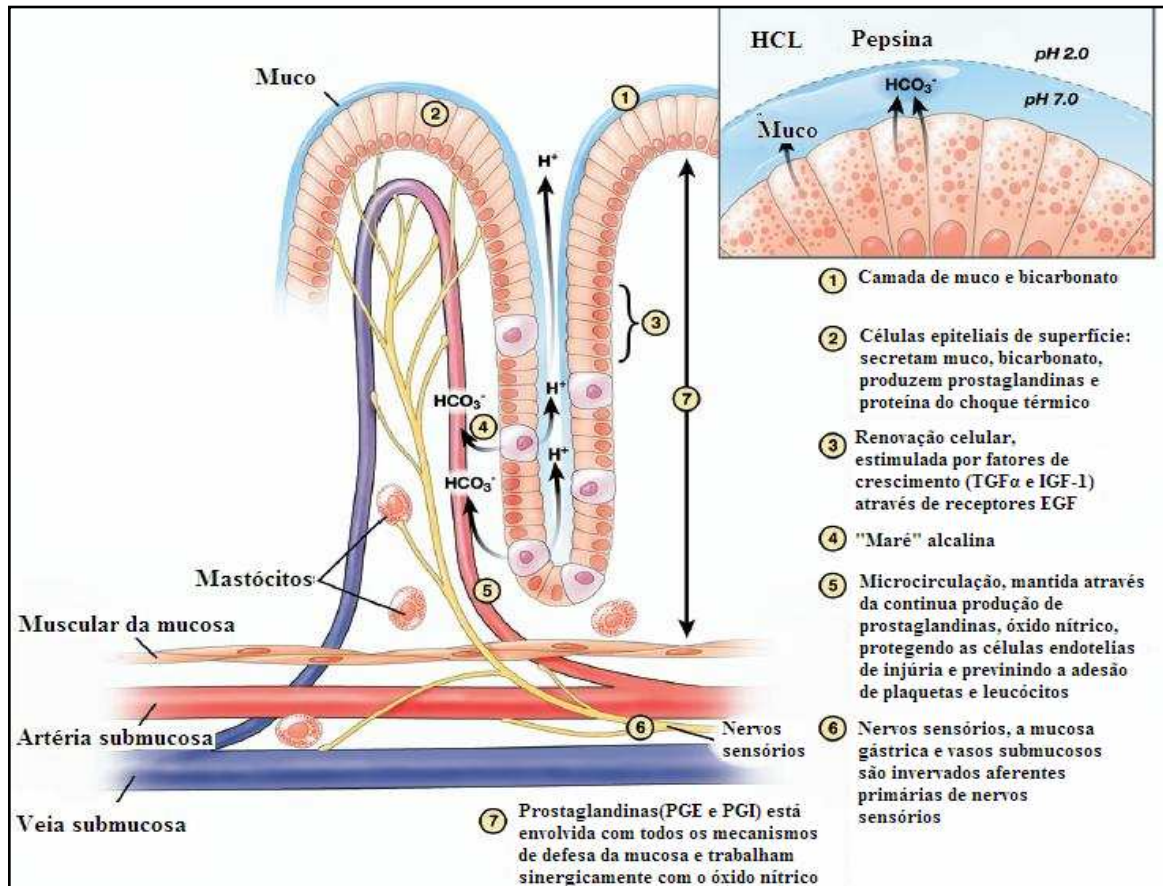


FIGURA 2. Mucosa gástrica e mecanismos de defesa. Adaptado de Laine et al. (2008).

As PGs estão ligadas a quase todos os fatores defensivos para a mucosa gástrica. Esses autacóides agem sobre receptores acoplados a proteína-G (FOEGH & RAMWELL, 2005), no estômago, e atuam principalmente sobre os receptores do tipo E1 relacionado ao aumento da secreção de bicarbonato, aumento do fluxo sanguíneo na mucosa lesionada e diminuição da motilidade gástrica. Os receptores do tipo E3 e E4 exercem ações marcadamente importantes para proteção gástrica como a inibição da secreção ácida e aumento da secreção de muco pelas células epiteliais, respectivamente. Além disso, as PGs diminuem a ativação e aderência de plaquetas e leucócitos ao endotélio vascular (LAINE et al., 2008), e estão ligadas a gastroproteção da colescistocinina em modelos experimentais (MERCER et al., 1998). Os mecanismos de defesa da mucosa gástrica que são estimulados ou facilitados por PGs, são total ou parcialmente abolidos quando são utilizadas inibidores da Cicloxigenase (COX).

A barreira formada por muco, bicarbonato e fosfolipídios constitui a primeira linha de defesa da mucosa gástrica e tem um papel estrutural na proteção desta. Esta barreira forma um micro-ambiente estável que retém íons bicarbonato secretados e, assim, mantém o pH aproximadamente neutro na superfície das células epiteliais mesmo frente ao ácido gástrico, e age como proteção física que impede a pepsina de atingir e causar proteólise ao epitélio gástrico (ALLEN & FLEMSTRO, 2005; LAINE, 2008). O gel mucoso contém fosfolipídios que na superfície luminal é coberto por um filme de surfactante com fortes propriedades hidrofóbicas. Esse muco é secretado pelas células epiteliais sendo composto por 95% de água e 5% de mucina, glicoproteínas e produtos do gene da mucina (MUC). As unidades de mucina se polimerizam para formar a estrutura em gel crucial para a aderência e estabilidade da camada de muco (ALLEN & FLEMSTRO, 2005) (**Figura 2**).

O bicarbonato (HCO_3^-) é secretado da mucosa gástrica frente a vários estímulos fisiológicos. Como dito anteriormente, as PGs estão envolvidas na continuidade de sua secreção, assim como a presença de ácido gástrico (ALLEN & FLEMSTRO, 2005). A estimulação vagal aumenta a sua liberação para o lúmen, enquanto os nervos esplâncnicos adrenérgicos diminuem (FÄNDRIKS & JÖNSEN, 1990).

O Óxido Nítrico (NO) é um mediador gasoso sintetizado a partir do aminoácido L-arginina em uma reação catalisada pela enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS). Essa enzima possui três isoformas sendo diferenciadas pela localização tecidual, pela dependência de Ca^{2+} -Calmodulina e pela sua expressão constitutiva ou não. Assim, as enzimas óxido nítrico sintase constitutivas (NOS-c) representadas pelas NOS-endotélio (NOS-III), presente normalmente no endotélio vascular e plaquetas, e NOS-neuronal (NOS-I), presente nos neurônios, são normalmente dependentes de Ca^{2+} - Calmodulina (DUSSE et al., 2003). A NOS-indutível (NOS-II) não é expressa sob condições normais, e não depende de elevação no cálcio intracelular. É induzida por citocinas e/ou endotoxinas em uma variedade de células, incluindo-se macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condriócitos, neutrófilos e plaquetas (MACMICKING et al., 1997; DUSSE et al., 2003).

O óxido nítrico gerado então se difunde pelo músculo liso vascular e ativa a enzima Guanilato Ciclase solúvel, levando ao acúmulo de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), principal responsável pela vasodilatação mediada por NO (SHEPHERD, 1991). No trato gastrointestinal o NO ajuda na prevenção e cura das lesões. Está envolvido na produção de

muco e bicarbonato, na diminuição da secreção ácida estimulada pela histamina (KATO et al., 1998) no aumento do fluxo capilar na mucosa do trato gastrointestinal (GUTH, 1992). Age como citoprotetor, anti-inflamatório, e em associação com os efeitos protetores das PGs no estômago (BILICI et al., 2002).

A microcirculação é essencial para que o oxigênio e nutrientes possam atingir as células e possa haver remoção de substâncias tóxicas. Os capilares entram na lamina própria e se direcionam para atingir as proximidades das células glandulares epiteliais. Na base das células epiteliais os capilares convergem para vênulas coletoras (GANNON, 1984). Quando ocorre difusão de ácido gástrico do lúmen para a mucosa existe um aumento no fluxo sanguíneo para ajudar a remover o ácido das mucosas. As fibras nervosas sensoriais sensíveis à capsaicina têm um papel importante nesse aspecto ao monitorar o refluxo de ácido e liberar mediadores vasodilatadores (GUTH, 1992).

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 gástrica (TARNAWSKI et al., 2005)

Vasodilatadores potentes como NO e PGI₂ protegem a mucosa gástrica de danos causados por vasoconstritores como leucotrieno C₄, tromboxano A₂ e endotelina, além de prevenir a aderência de plaquetas e leucócitos ao endotélio microvascular (LAINE, 2005).

Uma característica marcante na fisiologia gástrica é o fato de as células epiteliais sofrerem intensa renovação em um curto período de tempo, aproximadamente três dias (EASTWOOD, 1981). Em um ambiente onde fatores agressores estão sempre sendo gerados, a alta taxa de renovação celular é crucial para minimizar a ação desses agentes nóxicos. Estudos demonstraram que em alguns modelos experimentais, a diminuição da taxa de renovação das células epiteliais está implicada como mecanismo de lesão gástrica. Nesse sentido Eastwood & Quimby (1982) e Kuwayama & Eastwood (1985) estabeleceram ligações entre as lesões que ocorrem no estômago dos animais submetidos ao stress e a ação do ácido acetilsalisílico, um anti-inflamatório não esteróide, e uma diminuição da renovação epitelial gástrica.

A formação de radicais livres ou, mais adequadamente descrito como Espécies Reativas de Oxigênio (E.R.O.), é um evento constante nas células e acontece em decorrência do metabolismo normal, como na respiração celular ou em condições patológicas como na inflamação. As E.R.O. compreendem o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (HO^\bullet) (CNUBBEN, 2001).

Em condições fisiológicas, cerca de 95% de oxigênio molecular sofre redução controlada no sistema citocromo oxidase mitocondrial para formar água. O resto do oxigênio molecular sofre redução incompleta o que leva a formação das E.R.O. (FESHARAKI et al., 2006). Essas espécies são altamente danosas para as células, pois interagem indiscriminadamente com DNA, lipídeos e proteínas podendo alterar suas funções. Quando reagem e levam a danos em proteínas de membrana, por exemplo, a permeabilidade desta é alterada e como consequência toda a fisiologia celular pode ficar comprometida, assim como interações com DNA podem levar a mutações e ao desenvolvimento de câncer (CNUBBEN, 2001; KOC et al., 2008).

O papel das E.R.O. em causar lesão ou morte celular é cada vez mais reconhecido. Ânions superóxidos e radicais hidroxila estão envolvidos em um grande número de alterações degenerativas, freqüentemente associadas com um aumento nos processos de peroxidação ligados à baixa concentração de antioxidantes (TAMAGNO et al., 1998).

As células do trato gastrintestinal possuem um sistema de defesa antioxidante capaz de evitar a citotoxicidade das E.R.O. através de mecanismos que envolvem a ação de enzimas e compostos com potencial de seqüestrar radicais livres. No rol de enzimas envolvidas nessa ação estão a superóxido dismutase (SOD), glutaciona peroxidase (GSH-px) e catalase (CAT.). A mucosa também é protegida por um sistema de “seqüestradores” de E.R.O. como tióis, glutaciona reduzida (GSH), alfa-tocoferol (vitamina E), vitamina C, carotenóides, metionina e taurina, que se ligam aos radicais de oxigênio e impedem as suas ações lesivas (FESHAREKI et al., 2006).

A enzima SOD tem a função de remover os ânion superóxido do ambiente celular pela catálise da reação de dismutação desses ânions, gerando oxigênio e peróxido de hidrogênio (FATTMAN et al., 2003). O peróxido de hidrogênio é detoxificado principalmente pela ação da enzima catalase que então gera oxigênio e água. A GSH-px dependente de selênio também

é capaz de catalisar a reação de quebra do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (MATÉS, 2000).

As enzimas glutathiona peroxidases (GSH-px) são bem conhecidas como principal componente enzimático de defesa antioxidante em humanos. Existem pelo menos cinco tipos de GSH-px (I-V), com distribuições diferentes em cada tecido. Essas enzimas catalisam a redução de peróxidos de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos em oxigênio e água, tendo como cofator o tripeptídeo glutathiona reduzida (GSH), formado pelos resíduos cisteína, glicina e ácido glutâmico que então é oxidado durante as reações de peroxidação. Um tipo de glutathiona peroxidase que é encontrada nas membranas celulares detoxifica hidroperóxidos fosfolipídicos e de colesterol (LU & HOLMGREEN, 2009).

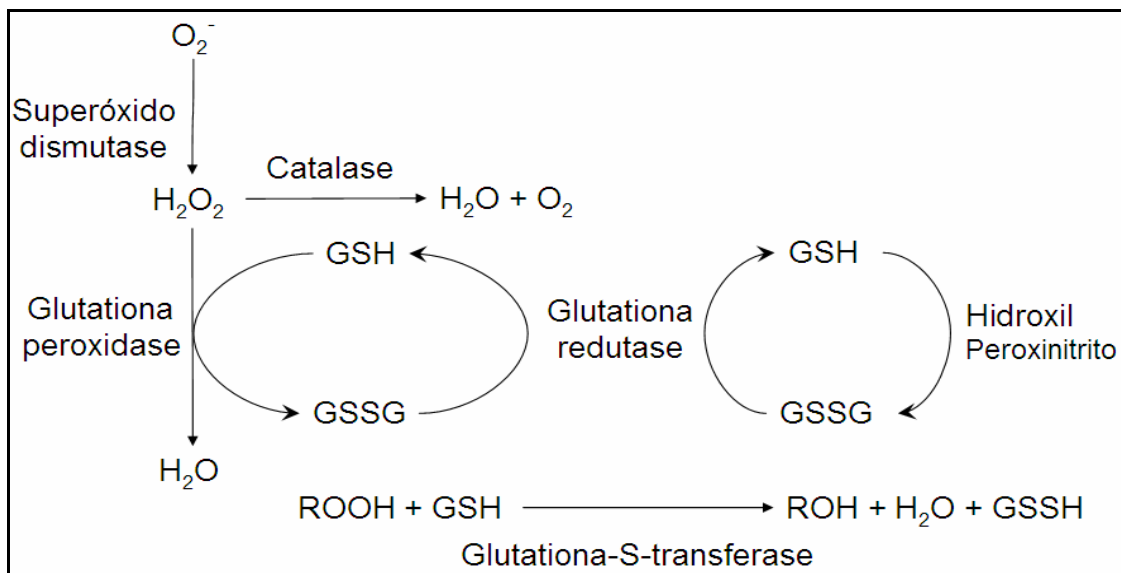


FIGURA 3. Ação das enzimas Superóxido dismutase, Catalase, Glutathiona peroxidase, glutathiona-s-transferase e glutathiona redutase. GSH, glutathiona reduzida. GSSG, Glutathiona oxidada. ROOH radicais peróxido.

O GSH também ocupa um lugar de destaque nos mecanismos antioxidantes das células. Esse tripeptídeo é capaz de se ligar rapidamente de forma direta e não-enzimática com radicais hidroxilas, e com N_2O_3 e peroxinitrito impedindo que esses interajam com estruturas importantes nas células (GRIFFITH, 1999). Ademais, o GSH é cofator da enzima GSH-px e, de forma enzimática, através da ação da glutathiona-S-transferase se liga a compostos eletrofílicos potencialmente lesivos as células. (CNUBBEN et al., 2001). (Figura 3)

Os níveis celulares de GSH são controlados por múltiplos sistemas enzimáticos, como a γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT), aminoácidos transportadores, glutathione sintetase (GS), GSH-px e glutathione reductase (GR), porém, a limitação da reação de síntese de GSH é catalisada pela γ -glutamyl cysteinyl sintetase (γ -GCS) (ISHIKAWA et al., 1997; WILD & MULCAHY, 2000).

A liberação de radicais livres derivados de oxigênio tem recebido grande atenção como provável fator patogênico das lesões da mucosa gástrica associada com estresse de imersão na água, drogas anti-inflamatórias e úlceras induzidas por etanol (BILICI et al., 2002). Nessas condições, há um desequilíbrio entre a formação e a degradação, através das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, das E.R.O. que, dessa forma, podem exercer ações deletérias sobre o epitélio da mucosa gástrica.

1.2.3 Úlcera péptica

Úlcera péptica é uma área focal de lesão que ocorre no estômago ou duodeno. As lesões são denominadas úlceras gástricas ou duodenais dependendo de onde estão localizadas. Estas acontecem onde o epitélio é exposto ao ácido ou pepsina e levam a perda do revestimento mucoso do estômago provocando danos com tamanhos e profundidades variáveis podendo levar a complicações graves como a perfuração gástrica.(ILIAS & KASSAB, 2005; DE ANDRADE et al., 2007; FBG, 2009).

A etiologia da doença ulcerosa péptica é geralmente multifatorial e sua fisiopatologia é mais bem compreendida em função de um desequilíbrio entre mecanismos de proteção da mucosa gástrica (muco, bicarbonato, prostaglandinas, NO) e os agentes agressores (ácido e pepsina). Fatores internos e externos são capazes de alterar os mecanismos protetores da mucosa gástrica. Assim, fumo, infecção bacteriana (*Helicobacter. pylori*), estresse, deficiência alimentar e uso de anti-inflamatórios não esteróides (AINES), podem aumentar a incidência de úlcera gástrica (DUBOIS et al., 2004).

A prevalência e incidência da doença ulcerosa decaíram muito nos últimos anos, porém, ela ainda representa um grande problema de saúde. (SONNENBERG & EVERHART, 1996). A incidência anual desta doença é variável ao redor do mundo. No Japão se estima uma taxa de 1 caso por 1000 habitante, enquanto na Noruega esse valor é de 1,5 e na Escócia 2,7. Nos Estados Unidos, 4.000.000 de pessoas sofrem com esta doença aproximadamente e

são diagnosticados 500.000 novos casos a cada ano, o que representa um gasto acima de oito bilhões de dólares com custos diretos e indiretos (SHRESTHA & LAU, 2007)

Embora a prevalência e morbidade da úlcera péptica estejam diminuindo no ocidente, a incidência de complicações permanece relativamente constante (TORAB et al., 2009). A hemorragia tem sido a complicação mais freqüente da úlcera péptica e está associada com significativa morbidade, mortalidade, e gastos com saúde (COTRAN et al., 2005).

A infecção por *Helicobacter pylori* e o uso de AINEs são as principais causas de ulceração do estômago e duodeno e suas complicações (BAZZOLI et al., 2001). Quando Marshall & Warren (1983) isolaram uma bactéria, posteriormente denominada *Helicobacter pylori*, a partir de fragmentos de mucosa gástrica de pacientes com gastrite e úlcera duodenal, um dos maiores avanços na história da úlcera péptica, e que tem mudado dramaticamente o seu manejo, tinha acontecido.

No início a idéia de que uma bactéria poderia colonizar um ambiente tão ácido quanto o estômago foi combatida; porém este organismo possui mecanismos que possibilitam neutralizar o ambiente gástrico, a partir da atividade da enzima urease que produz a amônia e dióxido de carbono a partir da uréia. O *H. pylori* possui ainda proteases que desmembram as glicoproteínas da camada mucosa e expõem as células epiteliais às ações lesivas do ácido e da pepsina (GIBALDI, 1995; COTRAN et al., 2005). Paralelo a isto, as células produtoras de somatostatina, inibidor da secreção de gastrina, estão diminuídas na infecção por *H. pylori* o que pode contribuir para a secreção de ácido aumentada (HOOPERWERF & PARICHA, 2006).

Estudos subseqüentes em várias partes do mundo confirmaram a hipótese inicial de que esse bastonete gram-negativo estaria associado à gênese da doença péptica ulcerosa (BITTENCOURT et al., 2006), e hoje se sabe que a principal causa do desenvolvimento de úlcera gástrica é a infecção por *H. pylori*, que parece ser responsável por 60-70% dos casos (HOOPERWERF & PARICHA, 2006; SHRESTHA & LAU, 2007).

1.2.4 Etanol e úlceras gástricas

Gottfried et al. (1978) verificaram que a ingestão oral de etanol em uma única ocasião em uma dose de 1g/Kg de peso corpóreo dissolvida em água era capaz de causar alterações microscópicas e macroscópicas no antro gástrico em humanos.

Administração intragástrica de etanol a camundongos produz lesões na mucosa gástrica, que são comumente usadas como estudo da patogênese e terapia das doenças ulcerativas em humanos. O etanol penetra rapidamente na mucosa gastroduodenal causando danos na membrana, esfoliação de células e erosão. O aumento subsequente na permeabilidade da mucosa, em conjunto com a liberação de produtos vasoativos de mastócitos, macrófagos, e outras células sanguíneas podem levar ao dano vascular, necrose e formação de úlceras (SZABO et al., 1985).

O etanol é capaz de diminuir a concentração de compostos sulfidrilicos não-proteicos como a glutathiona reduzida no tecido gástrico (PONGPIRIYADACHA et al., 2003). A depleção de GSH e o aumento da peroxidação lipídica são fatores reconhecidos que contribuem para o desenvolvimento das lesões gástricas causada pelo etanol (ZULLYT et al., 2007).

Alguns estudos relatam o aparecimento de gastrite aguda após a ingestão de bebidas alcoólicas em humanos, ainda que os danos na mucosa gástrica sejam menores do que aqueles produzidos pela ingestão de etanol puro em concentração semelhante. Apesar dos danos conhecidos que o etanol causa a mucosa gástrica, o consumo de bebidas alcoólicas não tem sido associado a riscos aumentados de desenvolvimento de úlceras gástricas (FRIEDMAND et al., 1974; TEYSSEN & SINGER, 2003; CORRAO et al., 2004).

1.2.5. Anti-inflamatórios não-esteróides e úlceras gástrica

Os AINEs são amplamente utilizados para alívio da dor e estão entre os medicamentos mais prescritos em todo o mundo (LAINE, 2002). Taylor & Blaser (1991), apresentaram um estudo no início da década de 1990, onde constava que por volta de 30 milhões de pessoas no mundo utilizavam habitualmente algum AINE.

O principal fator limitante do uso de AINEs é o desenvolvimento de eventos adversos gastrointestinais (GI), que vão desde a dispepsia à graves situações com risco de vida (LAINE, 2002). Esses eventos adversos não são raros em usuários regulares de AINEs, pois 15-30% desses possuem uma ou mais úlceras quando examinados endoscopicamente (YUAN et al., 2006)

Vários outros trabalhos de cunho epidemiológico traçam relações importantes entre o consumo de AINEs e o aparecimento de úlcera gástricas e duodenais, inclusive em usuários de ácido acetil-salicílico em baixas doses (SLATTERY et al., 1995; WEISMAN & GRAHAM, 2002)

De fato, o potencial dos anti-inflamatórios não-esteróides (AINEs) para provocar toxicidade gastrointestinal é bem conhecido, com um número estimado de 100 000 hospitalizações ocorridas anualmente no E.U.A. devido as graves complicações gastrointestinais relacionadas aos AINEs. O uso crônico de AINEs põe pacientes em risco de perfurações, úlceras, ou hemorragia da mucosa gastroduodenal. Esses efeitos adversos têm sido descritos tradicionalmente como resultado da inibição da Ciclooxygenase-1 (COX-1), a isoforma da enzima ciclooxygenase que catalisa a síntese contínua de prostaglandinas gastroprotetoras. Por outro lado, a inibição da Ciclooxygenase-2 (COX-2), a isoforma da enzima envolvida na resposta inflamatória, está ligada aos efeitos anti-inflamatórios e analgésicos dos AINEs. A falta de seletividade dos AINEs tradicionais para uma determinada isoforma da COX, é a razão pelo qual essas drogas são eficazes para o tratamento de estados inflamatórios e a dor associada, mas possuem elevada toxicidade gástrica.

A Indometacina, um inibidor da síntese de prostaglandinas, é um clássico representante dos AINES. Seu uso está associado com um aumento do risco de desenvolvimento de úlceras no trato gastrointestinal e suas complicações, assim como os outros AINEs (SZABO et al., 1985; SCHOENFELD et al., 1999). Lesões experimentalmente induzidas por indometacinas são consideradas ferramentas de valor para o estudo da patogênese da ulceração aguda da mucosa gástrica e como teste de novas substâncias com potencial atividade gastroprotetora (SZABO et al., 1985; ALAM et al., 2009).

A patogênese das lesões gástricas induzidas por AINEs, era associada, até bem pouco tempo, apenas com a inibição da COX-1, responsável pela síntese das prostaglandinas associadas à gastroproteção. Contudo, a ação lesiva à mucosa gástrica de drogas inibidoras altamente específicas para a COX-1 (SC-570), é consideravelmente menor e com características diferentes das lesões induzidas por indometacina ou ibuprofeno, drogas que inibem ambos os tipos 1 e 2 da COX. Na realidade a COX-2, parece ser expressa em resposta a inibição da COX-1; assim em situações normais a administração de inibidores seletivos de COX-2 apresentam pouca ou nenhuma toxicidade gástrica, porém a inibição da COX-1 e COX-2 ao mesmo tempo por drogas seletivas diferentes produzem grandes lesões gástricas com

semelhantes características daquelas produzidas pelos AINEs tradicionais não seletivos. Esses achados sugerem que ambos os tipos de COX devem estar suprimidas para que ocorram as lesões gástricas características dos AINEs (WALLACE et al., 2000; TANAKA et al., 2001; TANAKA et al., 2002).

Na realidade, no desenvolvimento das úlceras gástricas associadas aos AINEs, a inibição da COX-2 está relacionada com o aumento da aderência de leucócitos ao endotélio vascular local, enquanto a inibição da COX-1 está ligada à diminuição do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica (WALLACE et al., 2000). Essas lesões estão relacionadas com, aumento nos marcadores de infiltração de neutrófilos, e intensa geração de radicais livres (SULEYMAN et al., 2009).

Em seres humanos, quando observadas por endoscopia as lesões induzidas por AINEs se mostram como hemorragias sub-epiteliais, erosões e úlceras (LAINE, 2002). Em animais, as lesões induzidas experimentalmente podem se apresentar como petéquias, hemorragias, edemas, erosões, úlceras e perfurações (SZABO, 1985).

1.2.6. Tratamento farmacológico das úlceras gástricas

Pela significância que a infecção por *H. pylori* representa na patogenia e na epidemiologia das úlceras péptica a erradicação desta bactéria é considerada a abordagem mais correta. Para tanto, o uso de combinações entre antibióticos aliados a drogas que suprimem a secreção de ácido tem sido empregado com elevada taxa de cura das infecções. O uso de antibióticos sem associação com drogas que diminuem a acidez estomacal está associada a falhas na erradicação do *H. pylori* (HOOGERWERF & PARICHA, 2006).

As combinações de antibióticos que comumente são utilizadas associam claritromicina, amoxicilina, metronidazol e subsalicilato de bismuto. No Brasil a Federação Brasileira de Gastroenterologia (F.B.G) recomenda ainda o uso de furazolidona, levofloxacina e tetraciclina em seus esquemas padrões de tratamento, sempre associados a drogas inibidoras da secreção ácida (COELHO et al., 2005; HOOGERWERF & PASRICHA, 2006).

As drogas que inibem a secreção de ácido gástrico pertencem a duas classes principais de drogas: os inibidores da bomba de prótons (I.B.P) e antagonistas dos receptores H₂ de histamina.

Essas drogas inibem a secreção ácida em diferentes pontos: a estimulação das células parietais pela ação da histamina é abolida na presença de antagonistas H_2 , enquanto os I.B.P. agem inativando irreversivelmente a enzima H^+/K^+ -ATPase (bomba de prótons) que é o mecanismo pelo qual a célula parietal secreta o ácido na luz do estomago (SCHUBERT & PEURA, 2008) (Figura 1).

Dessa forma, os inibidores da secreção de ácido são responsáveis pela cicatrização e alívio dos sintomas das úlceras gástricas enquanto a terapia antibiótica visa erradicar a infecção por *H. pylori*.

Nos pacientes que desenvolvem úlceras gástricas em decorrência do uso de AINEs, a conduta ideal seria suspender o tratamento; entretanto, pode-se considerar a troca da medicação anti-inflamatória tradicional por drogas seletivas da COX-2. A utilização de I.B.P., antagonistas de receptores H_2 e misoprostol (análogo de PGs) durante o uso de AINEs permite a cicatrização das lesões em até 90% (tratados com I.B.P.) ou 75% (tratados com antagonistas receptores H_2) (LANZA, 1998).

1.3. PARTE III

1.3.1 Drogas de origem natural, atividade gastroprotetora, antinociceptiva e anti-inflamatória

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (VIEGAS et al., 2006). Até o início do século passado, cerca de 90% dos medicamentos disponíveis compreendiam plantas medicinais (LAPA, 2000).

A prospecção farmacológica de moléculas de origem natural tem se consagrado ao longo dos anos. Hoje, drogas com uso estabelecido na medicina ocidental foram obtidas diretamente de vegetais como é o caso da morfina, digoxina, digitoxina, vinblastina e vincristina. Outras drogas tiveram sua inspiração química a partir de moléculas naturais e sofreram modificações estruturais para se eliminar efeitos adversos ou aumentar sua potencia, como é caso da metformina derivada da galegina, amiodarona e verapamil derivados do khellin, tenoposídeo da podofilotoxina e oxicodona da morfina (FABRICANT & FARNSWORTH, 2001).

Além da importância de se descobrir novas moléculas promissoras para o tratamento das doenças, as pesquisas com produtos naturais visam, também, investigar as informações de origem tradicional, “popular”, com o intuito de comprovar esses conhecimentos para que se possam utilizar plantas e extratos como ferramentas para garantir o acesso à saúde, principalmente em populações carentes.

Hoje cerca de 65-80% da população mundial nos países em desenvolvimento, devido à pobreza e a falta de acesso à medicina moderna, dependem essencialmente de plantas para os seus cuidados de saúde primários. No entanto, poucas plantas têm sido cientificamente estudadas para a avaliação da sua qualidade, segurança e eficácia. (CALIXTO, 2005). Essa falta de acesso de boa parte da população mundial a medicamentos modernos e industrializados deve ser visto como um estímulo à comunidade acadêmica para que as plantas sejam estudadas e avaliadas por métodos científicos, principalmente aquelas relacionadas com o conhecimento tradicional, no sentido de encontrar alternativas eficazes para as doenças e consolidar o conhecimento popular.

Especialização nas áreas relacionadas com o desenvolvimento de fitoterápicos, incluindo química orgânica, farmacologia pré-clínica, farmacologia clínica e ciências farmacêuticas, aumentou drasticamente nos últimos anos no Brasil. (CALIXTO, 2005) Esse interesse cada vez maior em se buscar novas moléculas com inspiração em produtos vegetais deve cada vez mais ser intensificado, pois há menos de 10 anos, apenas 6% das espécies de plantas tinham sido alvo de testes buscando atividades biológicas (VERPOORTE, 2000) e Soejarto (1996) cita que, na data de sua publicação, apenas 15-17% das espécies vegetais tinham sido alvo de algum estudo.

O uso de extratos de plantas medicinais no tratamento de doenças é disseminado no Brasil. No país, existe uma rica e vasta prática de medicina tradicional que pode ser parcialmente explicado por sua população multiétnica (FARNSWORTH & SOEJARTO, 1991) e por uma grande diversidade natural de plantas.

A prospecção de moléculas de origem natural em modelos de nocicepção e inflamação têm retornado resultados muito positivos tanto no contexto de moléculas extraídas de plantas sem nenhuma descrição prévia de utilização como analgésico, como no sentido de validar as informações obtidas da comunidade acerca do “uso popular” de plantas com fins medicinais (SANTOS et al., 1999; VIANA et al., 2003; PENIDO et al., 2006; RAO et al., 2007; RAO 2008 et al., AKKOL et al., 2009; ARAÚJO et al., 2009).

Estudos evidenciando atividades antinociceptiva e/ou anti-inflamatória de produtos naturais continuam sendo publicados, e atraindo atenção da comunidade científica e das indústrias farmacêuticas, o que mostra que mesmo após os avanços do conhecimento químico e biológico e dos altos investimentos da indústria químico-farmacêutica em desenvolver novos analgésicos e anti-inflamatórios os produtos de origem natural ainda são vistos como alternativas promissoras às tradicionais drogas usadas nos estados inflamatórios e dolorosos. No Brasil pode-se destacar o medicamento fitoterápico Acheclam®, produto desenvolvido por Ache® Laboratórios Farmacêuticos S/A, em parceria com a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), UNIFESP, PUC-Campinas e Unicamp, a partir do extrato oleoso da *Cordia verbenacea*, indicado para o tratamento da dor associado a tendinite crônica e dores miofaciais. Esse produto consumiu R\$ 5,00 milhões em pesquisas, e apenas no ano de 2007 vendeu R\$ 10,33 milhões (GAZETA MERCANTIL, 2008), o que ressalta a importância de não considerar as atividades biológicas de produtos de origem natural apenas curiosidade acadêmica.

Um ponto a favor dos produtos de origem natural que exibem atividades antinociceptiva e/ou anti-inflamatória, é que, ao contrário dos anti-inflamatórios tradicionais, essas substâncias naturais geralmente não exibem toxicidade gástrica, ao invés disso, algumas delas possuem atividade gastroprotetora.(PETROVIĆ et al., 2008; ZDUNIĆ et al., 2009; SILVA et al., 2009)

Apesar dos progressos no desenvolvimento de medicamentos eficazes no combate as úlceras pépticas, o reino vegetal pode fornecer fontes úteis de novos compostos com atividade anti-úlceras, seja para o desenvolvimento de formas farmacêuticas ou, simplesmente, para que essas substâncias encontradas na natureza sejam incorporadas como complementação alimentar. (LIMA et al., 2008).

Ao longo do tempo, vários trabalhos têm sido publicados descrevendo atividade antiulcerogênica de substâncias ou extratos obtidos de plantas das mais variadas espécies, em modelos animais de lesões gástricas agudas e crônicas (MORAES et al., 2009; MOLEIRO et al., 2009; SILVA et al., 2009), nesse sentido moléculas de estruturas de classes químicas marcadamente diferente têm se demonstradas promissoras alternativas terapêuticas.

É grande o número de trabalhos que descrevem e estudam ações de proteção gástrica de extratos ou moléculas isoladas de plantas. Esses estudos revelam que a gastroproteção desses produtos está associada a mecanismos farmacológicos muito diferentes mesmo dentro de uma mesma classe de moléculas, e muitas vezes exibem ações em mais de um alvo farmacológico. Nesse contexto, o ferruginol e o ácido centipédico, dois diterpenos naturais, que possuem atividade gastroprotetora, exibem diferenças no modo como agem biologicamente, por exemplo, o ácido centipédico tem como um dos seus mecanismos de ação o envolvimento do metabolismo do óxido nítrico, já o ferruginol parece exercer sua ação gastroprotetora pela diminuição na secreção de ácido gástrico e aumento na síntese de prostaglandinas (ARECHE et al., 2008; GUEDES et al., 2008).

Essas observações exemplificam o quanto é importante não apenas descrever um efeito potencialmente benéfico de um produto de origem natural, sendo importante estudá-lo e caracterizá-lo individualmente.

1.3.2 (-)- α -bisabolol

(-)- α -bisabolol (6-methyl-2-(4-methylcyclohex-3-en-1-yl)hept-5-en-2-ol) é um álcool sesquiterpênico natural, opticamente ativo obtido por destilação direta de óleos essenciais de plantas. A fonte mais comumente utilizada é a camomila, *Matricaria chamomilla* (REYNOLDS, 1996). No entanto, existem outras fontes onde o (-)- α -bisabolol pode ser extraído, por exemplo, de espécies dos gêneros vegetais *Peperomia* e *Vanillosmopsis*. (VICHNEWSKI et al., 1989; de LIRA et al., 2009).

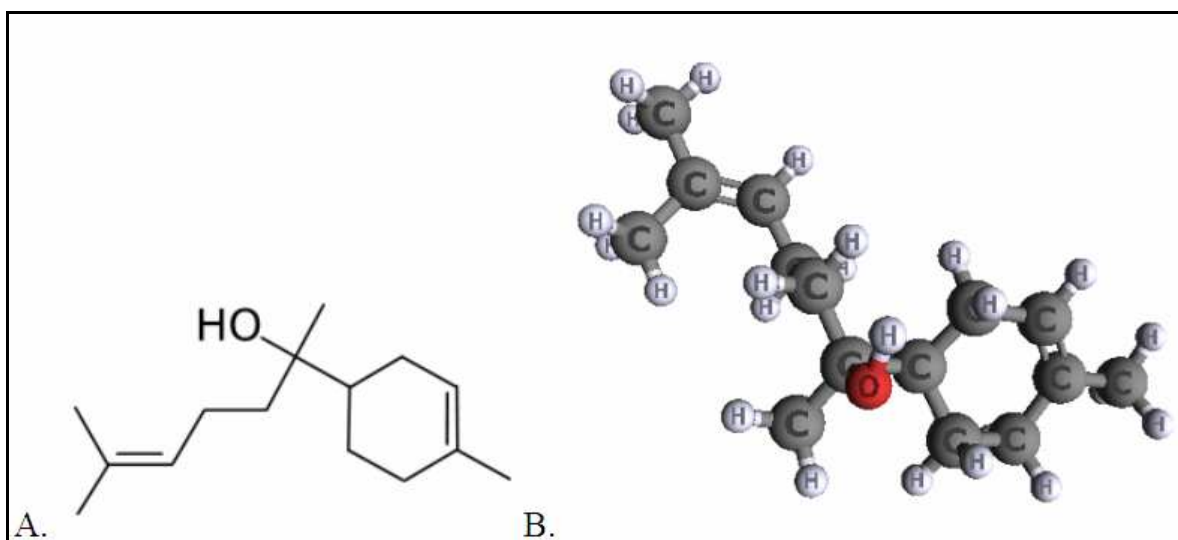


FIGURA 4. Estrutura química bidimensional(A) e tridimensional(B) do (-)- α -bisabolol.

(-)- α -bisabolol têm gerado considerável interesse econômico, uma vez que possui uma delicada fragrância floral e tem sido relatado atividades anti-sépticas, antibacteriana, e antioxidante (FROSCH, 1987; TORRADO et al., 1995; MCANDREW, 1992; SALUSTIANO, 2006). A indústria química e farmacêutica atualmente utiliza o (-)- α -bisabolol em várias formulações, principalmente cosméticas como loções pós-barba, hidratantes, emulsões para pele sensíveis e cremes infantis.

Comprovando as suas atividades anti-sépticas e corroborando com o seu uso comercial, um estudo realizado por Brehm-Steichen & Jonhson (2003) mostrou que alguns sesquiterpenóides, inclusive o (-)- α -bisabolol, apresentam o efeito de aumentar a permeabilidade bacteriana a agentes antimicrobianos.

A literatura cita que o (-)- α -bisabolol possui marcada ação anti-inflamatória, contudo, esses trabalhos tratam essencialmente de estudos com plantas contendo (-)- α -bisabolol, (MORENO, 1992; BRAGA et al., 2009). Não sendo encontrados estudos da droga isolada em modelos tradicionais de inflamação e dor.

Levando em consideração a utilização comercial do (-)- α -bisabolol, sua segurança elevada e eficácia comprovada quanto a sua atividade anti-séptica e antimicrobiana, torna-se extremamente relevante à investigação do (-)- α -bisabolol quanto às suas citações sobre a atividade anti-inflamatória já que há uma busca incessante de novos fármacos mais eficazes e seguros.

Dessa forma, decidimos avaliar o potencial anti-inflamatório e antinociceptivo do (-)- α -bisabolol, em modelos padronizados em camundongos

Em recente trabalho, Leite et al. (2008) mostraram um efeito gastroprotetor de um óleo essencial contendo (-)- α -bisabolol e outras substâncias em sua composição em modelo de úlcera induzida por etanol em camundongos. No entanto, os efeitos da administração isolada de (-)- α -bisabolol em modelos de lesão gástrica induzidas pelo etanol e indometacina e os seus mecanismos não foram investigados.

Considerando que muitos compostos extraídos de óleos essenciais podem apresentar ações gastroprotetoras, decidimos neste estudo avaliar a ação gastroprotetora do (-)- α -bisabolol isolado nos modelos de lesão gástrica induzida em camundongos e estudar os mecanismos farmacológicos envolvidos.

Essas investigações são de extrema relevância, pois busca comprovar dados da literatura e gerar possíveis novas aplicabilidades deste composto de origem natural já em uso pela indústria químico-farmacêutica.

2. OBJETIVOS.

2.1. Geral.

O principal objetivo deste trabalho é avaliar o potencial farmacológico do (-)- α -bisabolol em modelos padronizados de nocicepção, inflamação e úlcera em camundongos.

2.2. Específicos.

- Avaliar o efeito antinociceptivo do (-)- α -bisabolol nos modelos animais de formalina, placa quente e contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos;
- Avaliar o efeito anti-inflamatório do (-)- α -bisabolol nos modelos de edema de pata induzido por carragenina e dextrano em camundongos;
- Avaliar o efeito anti-inflamatório do (-)- α -bisabolol nos modelos de edema de pata induzido por histamina e 5-HT em camundongos;
- Avaliar os efeitos do (-)- α -bisabolol sobre as lesões gástricas utilizando os modelos de úlcera gástrica induzida por etanol e por indometacina em camundongos;
- Avaliar o envolvimento das prostaglandinas (PGs), dos canais de potássio-ATP-dependentes e do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto.
- Avaliar o envolvimento da glutathiona reduzida (GSH) no efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol nos modelos de úlcera induzida por etanol absoluto e indometacina

3. MATERIAIS E MÉTODOS.

3.1. Animais.

Foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*) variedade *Swiss*, adultos, machos, pesando entre 24-32g, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, mantidos em caixas de propileno 26 ± 2 °C, com ciclos claro/escuro de 12 em 12 horas, recebendo ração padrão e água “ad libitum”. Os animais foram colocados em jejum de sólidos de 10-16 horas, antes da realização de cada experimento em que a via oral foi utilizada para a absorção do fármaco.

3.2. Drogas e Reagentes

TABELA 1. Drogas e reagentes utilizados durante os procedimentos experimentais.

Drogas/Reagentes	Procedência
(-)-α-bisabolol	Puritta óleos essenciais [®]
5-HT	Sigma [®] , U.S.A.
Ácido Acético	Vetec [®] , Brasil
Ácido Clorídrico.	Vetec [®] , Brasil.
Ácido ditio bis-2-nitrobenzóico	Sigma, [®] U.S.A.
Ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico (EDTA)	Reagen [®] , Brasil.
Ácido tricloroacético (TCA)	Vetec [®] , Brasil.
Albumina sérica bovina	Sigma [®] , U.S.A
Carbonato de sódio (Na₂CO₃)	Reagen [®] , Brasil
Carragenina	Sigma [®] , U.S.A.
Ciproeptadina	Sigma [®] , U.S.A.
Dextrano	Sigma [®] , U.S.A.
Diazepam	Cristália [®] , Brasil.
Diazóxido	Sigma [®] , U.S.A.
Etanol P.A.	Merck [®] , Alemanha.
Formaldeído P.A	Reagen [®] , Brasil.
Glibenclamida	Biossintética [®] , Brasil.

Glutaciona reduzida	Sigma [®] , U.S.A.
Hidróxido de sódio	Vetec [®] , Brasil.
Histamina	Sigma [®] , U.S.A.
Indometacina	Sigma [®] , U.S.A.
L-arginina	Sigma [®] , U.S.A.
N-acetil cisteína	União química [®] , Brasil.
L-NAME(N^G-Nitro-L-arginina-metiléster)	Sigma [®] , U.S.A.
Sulfato de morfina	Cristália [®] Brasil.
Sulfato de Cobre	Reagen [®] , Brasil.
Cloridrato de ranitidina	União química [®] , Brasil.
Reagente de Folin	QEEL [®] , Brasil.
Tris	USB [®] , USA
Tween 80	Sigma [®] , U.S.A.

TABELA 1. Drogas e reagentes utilizados durante os procedimentos experimentais.

3.3. Atividade antinociceptiva

3.3.1. Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

Camundongos Swiss machos, com peso de 24-32g, divididos em 4 grupos de animais, foram tratados com veículo (3% Tween 80 em água destilada) ou (-)- α -bisabolol (25 e 50 mg/kg). Um grupo tratado com Indometacina (10 mg/kg; v.o.) foi usado como padrão positivo. Esses tratamentos foram realizados por via oral (v.o.). Após 60 minutos, os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético 0,6% (10mL/Kg). Decorridos 10 minutos da administração do ácido acético, o número de contorções abdominais foi registrado, para cada animal, durante um período de 20 minutos. Uma contorção foi identificada como uma extensão das patas traseiras, acompanhada de constrição do abdômen (KOSTER et al., 1959) (**Figura 5**).

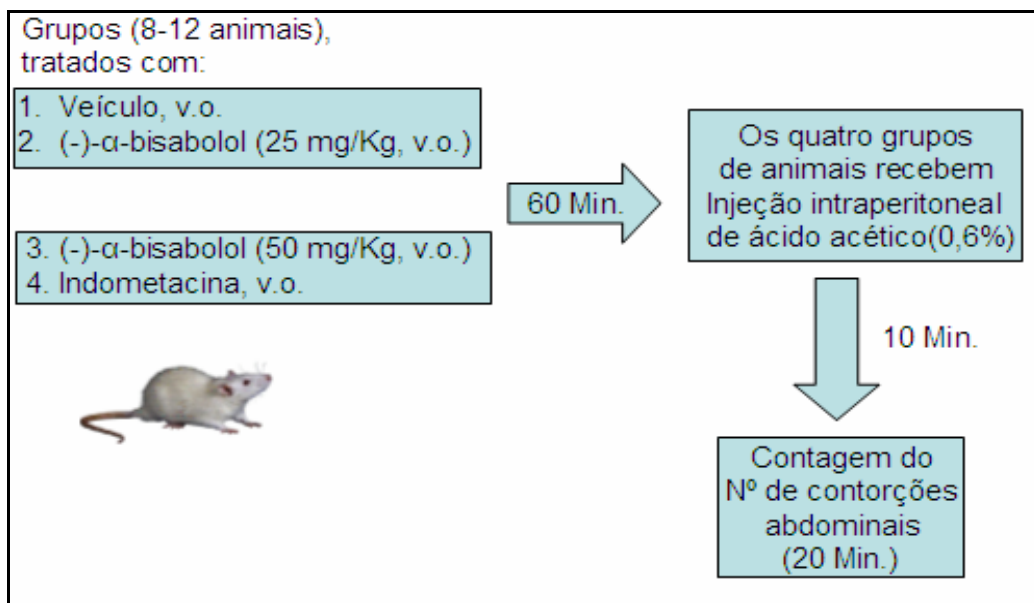


FIGURA 5. Representação esquemática do modelo de nociceção visceral induzida por ácido acético.

3.3.2. Teste da formalina.

Camundongos Swiss machos, com peso de 24-32g, divididos em 4 grupos de animais, foram tratados com veículo (Tween 80, 3% em água destilada) ou (-)- α -bisabolol (25 e 50 mg/kg). Um grupo tratado com Morfina (7,5 mg/kg) foi usado como padrão positivo. Esses tratamentos foram realizados por via oral (v.o.), a exceção da morfina, administrada via intraperitoneal (i.p). Após 30 minutos (i.p.) ou 60 minutos (v.o.) em relação a estes tratamentos, os animais receberam uma injeção intraplantar de formalina 1% na pata direita traseira (20 μ L). O tempo de lambertura da pata foi registrado, em segundos, de 0-5 min (1^a Fase) e 20-25 min (2^a. Fase) após a administração da formalina (HUNSKAAR & HOLE, 1987).

3.3.3. Teste da placa quente

Camundongos Swiss machos, com peso de 24-32g, divididos em 4 grupos, foram pré-selecionados pela passagem individual na placa quente mantida a uma temperatura de $51 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Aqueles que mostraram tempo de reação superior a 20 segundos, foram descartados. Os camundongos selecionados foram postos na placa quente e tiveram o tempo de reação (saltar ou lambr as patas) registrado antes e 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de (-)- α -bisabolol (25 e 50mg/Kg), morfina (7,5 mg/Kg) e veículo (3% de Tween 80 em água

destilada). Estes tratamentos foram feitos por via oral, a exceção da morfina, administrada via intraperitoneal (i.p) (EDDY & LEIMBACH, 1953).

3.3.4 Avaliação da coordenação motora (teste da barra giratória)

O teste da barra giratória (*rota rod*) mede o efeito do relaxamento muscular ou incoordenação motora produzidos por drogas nos animais (CARLINI & BURGOS, 1979). Este experimento foi realizado para excluir a possibilidade dos parâmetros observados nos experimentos que avaliaram a atividade antinociceptiva terem sido influenciados por alterações na coordenação motora dos animais. Para este teste, os camundongos foram tratados com veículo (Tween 80, 3% em água destilada), (-)- α -bisabolol 25 ou 50 mg/Kg e diazepam 2 mg/Kg. Sessenta minutos após, foram colocados com as quatro patas sobre uma barra de 2,5 cm de diâmetro, elevada a 25 cm do piso, em uma rotação de 12 rpm, por um período de 1 minuto. Foram registrados o número de quedas, com três reconduções, no máximo (DUNHAM & MIYA, 1957).

3.4. Atividade anti-inflamatória

3.4.1. Edema de pata induzido por carragenina

Camundongos Swiss machos, com peso de 24-32g, divididos em 4 grupos de animais, foram tratados com veículo (3% Tween 80 em água destilada) ou (-)- α -bisabolol (50, 100 e 200 mg/kg). Um grupo tratado com Indometacina (10 mg/kg; v.o.) foi usado como padrão positivo. Esses tratamentos foram realizados por via oral (v.o). Após 60 minutos os animais receberam uma injeção intraplantar de carragenina 1% (20 μ L) para indução do edema na pata direita traseira. Foi registrado o volume da pata antes e nos tempos de 1h, 2h, 3h e 4h. após a administração de carragenina (WINTER et al., 1962; HENRIQUES et al., 1987).

O volume do edema em mililitros (mL) foi registrado através de um Pletismógrafo (UGO BASILE, Itália). A pata posterior direita do animal foi submersa até a junção tíbio-tarsal, na câmara de leitura do aparelho. O volume de líquido deslocado foi registrado digitalmente e que corresponde ao volume da pata. Os resultados foram expressos como a diferença de volume entre a pata que recebeu a carragenina em uma das horas citadas (1h, 2h,

3h e 4h) e o volume da pata no chamado tempo zero (onde ainda não foi injetada a carragenina).

3.4.2. Edema de pata induzido por dextrano

Camundongos *Swiss* machos, com peso de 24-32g, divididos em 4 grupos de animais foram tratados com veículo (3% Tween 80 em água destilada) ou (-)- α -bisabolol (100 e 200 mg/kg). Um grupo tratado com ciproetadina (10 mg/kg) foi utilizado como padrão positivo. Esses tratamentos foram realizados por via oral (v.o.). Após 60 minutos, os animais receberam uma injeção intraplantar de dextrano 0,15% (20 μ L) para indução do edema na pata direita traseira. Foi registrado o volume da pata antes e nos tempos de 1h, 2h, 3h e 4h após a administração de dextrano (WINTER et al., 1962).

O volume do edema em mililitros (mL) foi registrado através de um Pletismógrafo (UGO BASILE, Itália), como descrito anteriormente.

Os resultados foram expressos como a diferença de volume entre a pata que recebeu o dextrano em uma das horas citadas (1h, 2h, 3h e 4h) e o volume da pata no chamado tempo zero (antes da injeção intraplantar de dextrano).

3.4.3. Edema de pata induzido por Histamina

Camundongos *Swiss* machos, com peso de 24-32g, divididos em 3 grupos de animais foram tratados com veículo (3% Tween 80 em água destilada) ou (-)- α -bisabolol (100 e 200 mg/kg). Esses tratamentos foram realizados por via oral (v.o.). Após 60 minutos, os animais receberam uma injeção intraplantar de histamina 200 μ g/pata (20 μ L) para indução do edema na pata direita traseira. Foi registrado o volume da pata antes e nos tempos de 15, 30, 60 e 90 minutos após a administração de histamina.

O volume do edema em mililitros (mL) foi registrado através de um Pletismógrafo (UGO BASILE, Itália). Como descrito anteriormente.

Os resultados foram expressos como a diferença de volume entre a pata que recebeu a histamina em um dos tempos citados (15, 30, 60 e 90 Min.) e o volume da pata no chamado tempo zero (antes da injeção intraplanta de histamina).

3.4.4. Edema de pata induzido por 5-HT

Camundongos *Swiss* machos, com peso de 24-32g, divididos em 3 grupos de animais foram tratados com veículo (3% Tween 80 em água destilada) ou (-)- α -bisabolol (100 e 200 mg/kg). Esses tratamentos foram realizados por via oral (v.o.). Após 60 minutos (v.o.), os animais receberam uma injeção intraplantar de 5-HT 200 μ g/pata (20 μ L) para indução do edema na pata direita traseira. Foi registrado o volume da pata antes e nos tempos de 30 e 60 min. após a administração de 5-HT (COLE, 1994; LEAL et al., 2008).

O volume do edema em mililitros (mL) foi registrado através de um Pletismógrafo (UGO BASILE, Itália). Como descrito anteriormente.

Os resultados foram expressos como a diferença de volume entre a pata que recebeu 5-HT em um dos tempos citados (30 e 60 Min.) e o volume da pata no chamado tempo zero (antes da injeção intraplanta de 5-HT).

3.5. Atividade antiulcerogênica do (-)- α -bisabolol

3.5.1. Úlcera gástrica induzida por etanol absoluto.

Para avaliação de uma possível atividade antiulcerogênica de (-)- α -bisabolol foi utilizado o modelo de úlcera gástrica induzido por etanol segundo o método de ROBERT et al., (1979). Camundongos *Swiss* machos, com peso de 24-32g, divididos em 4 grupos de animais, foram tratados com veículo (3% Tween 80 em água destilada), (-)- α -bisabolol (100 e 200 mg/kg) ou Ciproptadina (10 mg/Kg), utilizada como droga de referência. Esses tratamentos foram realizados por via oral (v.o.). Após 60 minutos do tratamento com as drogas, cada animal recebeu 0,2 mL por via oral (v.o) de etanol absoluto (etanol_{abs}). Trinta minutos depois os animais foram sacrificados, os estômagos foram retirados, abertos pela grande curvatura, lavados com salina 0,9% e comprimidos entre dois vidros de relógio para melhor visualização. As áreas totais e áreas lesionadas dos estômagos (face glandular) foram determinadas por planimetria, através do programa de computador *ImageJ*. A área lesada foi expressa em termos de percentagem em relação à área total do corpo gástrico (**Figura 6**).

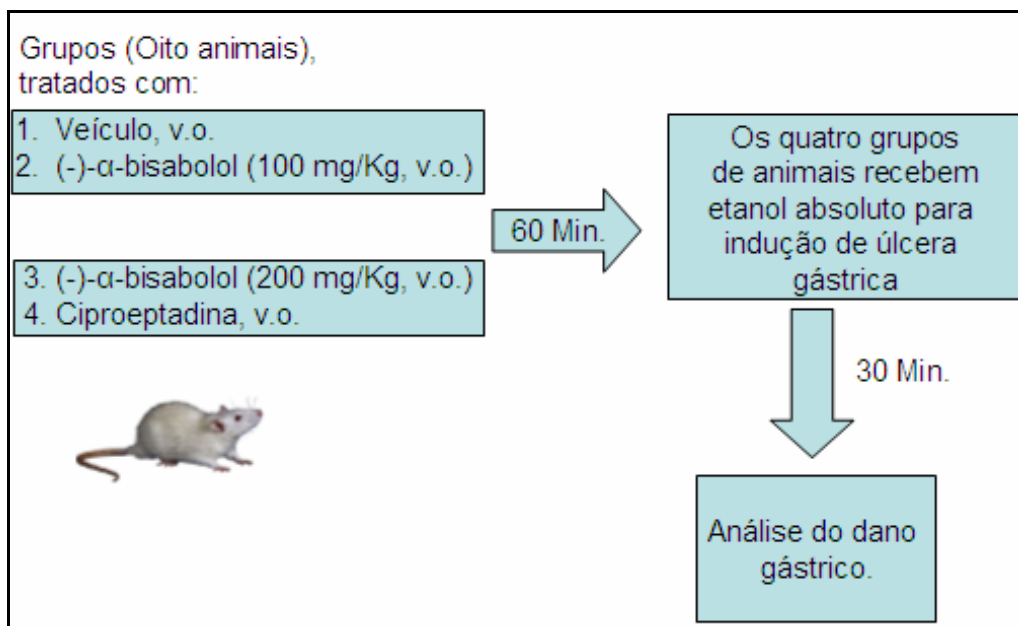


FIGURA 6. Representação esquemática do modelo de úlcera induzida por etanol absoluto.

3.5.2. Avaliação do envolvimento do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto.

Camundongos *Swiss* machos, com peso de 24-32g, divididos em 6 grupos de animais foram tratados com veículo (3% Tween 80 em água destilada v.o.), (-)- α -bisabolol (200 mg/kg, v.o.), L-NAME* (10 mg/Kg, i.p) ou L-arginina* (600 mg/Kg, i.p.). Após 60 minutos do tratamento via oral (v.o.) ou 30 minutos do tratamento via intraperitoneal (i.p), foi administrado etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.).

Um grupo de animais recebeu L-NAME* (10 mg/Kg, i.p) 15 minutos antes da administração de (-)- α -bisabolol (200 mg/Kg, v.o.), e após 60 minutos, esses animais foram tratados com etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.).

Outro grupo de animais recebeu L-NAME* (10 mg/Kg, i.p) 15 minutos antes da administração de L-arginina (600 mg/Kg, i.p.), e após 30 minutos, esses animais foram tratados com etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.).

Trinta minutos após o tratamento com etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.), os animais foram sacrificados, tiveram seus estômagos retirados e analisados conforme descrito anteriormente (**Figura 7**).

*

L-NAME: inibidor não seletivo das enzimas Oxido Nítrico Sintase (NOS). L-arginina: aminoácido precursor da síntese de óxido nítrico(NO)

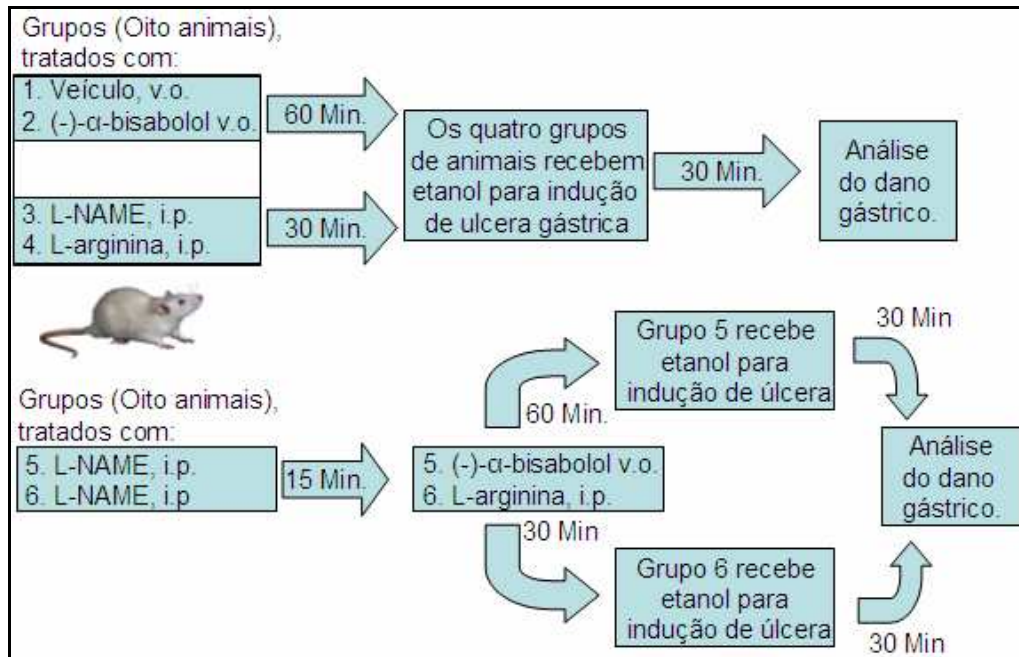


FIGURA 7. Representação esquemática do procedimento experimental utilizado para avaliar o efeito do óxido nítrico (NO) na gastroproteção do (-)-α-bisabolol.

3.5.3. Avaliação do envolvimento dos Canais de K^+ -ATP-dependentes (K^+_{ATP}) no efeito gastroprotetor do (-)-α-bisabolol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto.

Camundongos *Swiss* machos, com peso de 24-32g, divididos em 5 grupos de animais foram tratados com veículo (3% Tween 80 em água destilada, v.o.), (-)-α-bisabolol (200 mg/kg, v.o.) ou diazóxido* (DZO) (3 mg/Kg, i.p). Após 60 minutos do tratamento via oral (v.o.) ou 30 minutos do tratamento via intraperitoneal (i.p), foi administrado etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.).

Um grupo de animais recebeu glibenclamida* (10 mg/Kg, i.p) 15 minutos antes da administração de (-)-α-bisabolol (200 mg/kg, v.o.), e após 60 minutos esses animais foram tratados com etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.).

Outro grupo de animais recebeu glibenclamida* (10 mg/Kg, i.p), 15 minutos antes da administração de DZO (3 mg/Kg, i.p), e após 30 minutos, esses animais receberam etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.).

Trinta minutos após o tratamento com etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.), os animais foram sacrificados, tiveram seus estômagos retirados e analisados conforme descrito anteriormente (**Figura 8**).

*

Diazóxido: droga capaz de abrir canais de K^+_{ATP} . Glibenclamida: droga capaz de fechar K^+_{ATP}

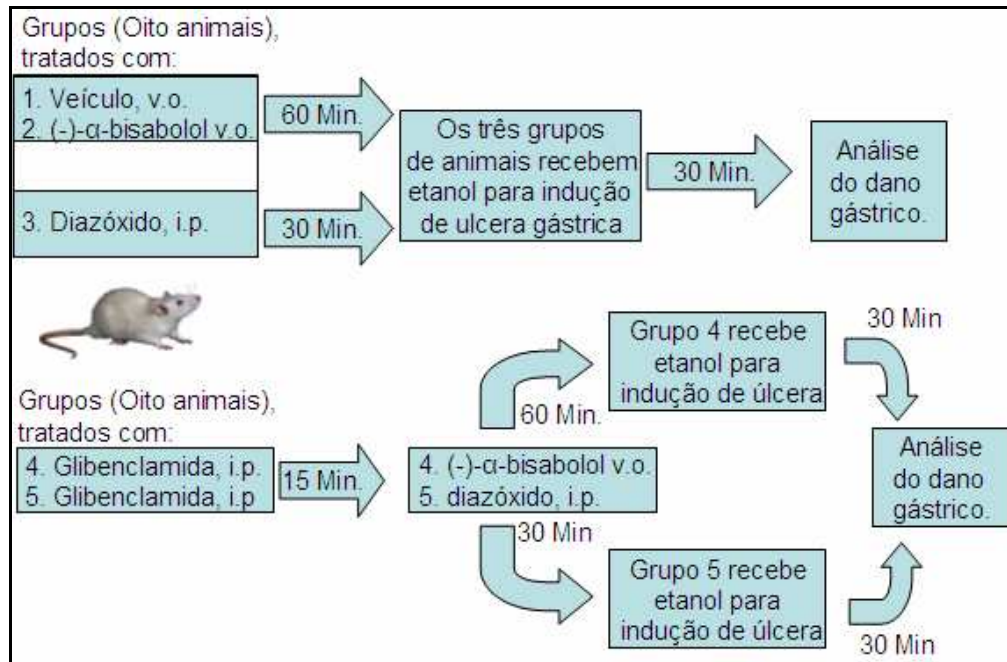


FIGURA 8. Representação esquemática do procedimento experimental utilizado para avaliar o efeito dos K^+_{ATP} na gastroproteção do $(-)\text{-}\alpha\text{-bisabolol}$.

3.5.4. Avaliação do envolvimento da síntese de prostaglandinas no efeito gastroprotetor do $(-)\text{-}\alpha\text{-bisabolol}$ no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto.

Camundongos *Swiss* machos, com peso de 24-32g, divididos em 4 grupos de animais foram tratados com veículo (3% Tween 80 em água destilada, v.o.), $(-)\text{-}\alpha\text{-bisabolol}$ (200 mg/kg, v.o.) ou Indometacina (10 mg/Kg, v.o.). Após 60 minutos desses tratamentos foi administrado $\text{etanol}_{\text{abs}}$ (0,2 mL/animal, v.o.).

Outro grupo de animais foi pré-tratado com Indometacina (10 mg/Kg, v.o.), 2h antes da administração de $(-)\text{-}\alpha\text{-bisabolol}$ (200 mg/kg, v.o.), e após 60 minutos, esses animais receberam $\text{etanol}_{\text{abs}}$ (0,2 mL/animal, v.o.)

Trinta minutos após o tratamento com $\text{etanol}_{\text{abs}}$ (0,2 mL/animal, v.o.), os animais foram sacrificados, tiveram seus estômagos retirados e analisados conforme descrito anteriormente.

3.5.5. Úlcera gástrica induzida por indometacina

Camundongos *Swiss* machos, com peso de 24-32g, divididos em 3 grupos de animais foram tratados com veículo (3% Tween 80 em água destilada, v.o.) ou $(-)\text{-}\alpha\text{-bisabolol}$ (100 mg/Kg). Um grupo tratado com ranitidina (25 mg/kg; v.o.) foi usado como padrão positivo.

Esses tratamentos foram realizados por via oral (v.o.). Após 60 minutos, os animais receberam indometacina 20mg/Kg, v.o., preparada com 0,5% de carboximetilcelulose e 8 horas depois, os animais foram sacrificados. De acordo com BHARGAVA, (1973), os estômagos foram retirados, instilados com formalina 5% por 15 minutos, abertos ao longo da grande curvatura, lavados em salina e inspecionados para atribuições de escores de acordo com a **Tabela 2.** (CAMPOS, 2008; SZABO et al., 1985)

TABELA. 2. Escores de lesão gástrica

Perda de pregas	1 ponto
Descoloração da mucosa	1 ponto
Edema	1 ponto
Hemorragias	1 ponto
Número de petéquias	
• Até 10	2 pontos
• Mais de 10	3 pontos
Intensidade da ulceração	
• Úlcera ou erosão de até 1mm	N x 2 pontos
• Úlcera ou erosão maiores que 1mm	N x 3 pontos
• Úlcera perfurada	N x 4 pontos

(SZABO et al., 1985).

3.5.6. Avaliação do envolvimento da glutathiona (GSH) reduzida na gastroproteção do (-)- α -bisabolol nas úlceras induzidas por etanol e Indometacina.

Para avaliação das alterações no conteúdo gástrico de glutathiona reduzida foi realizada a medida desse conteúdo de acordo com o método descrito por Sedlak e Lindsay (1988) com algumas modificações. Para avaliar o papel do GSH nas lesões gástricas induzidas por etanol os animais foram inicialmente divididos em dois grupos: ulcerados e não-ulcerados. Esses grupos iniciais foram subdivididos em três grupos, tratados com: (-)- α -bisabolol (200 mg/kg, v.o.), N-acetyl cisteína (750 mg/Kg, v.o.) ou veículo (3% de tween 80 em água destilada, v.o.). Os animais do grupo ulcerados receberam etanol 60 minutos após os tratamentos, enquanto o grupo não-ulcerado recebeu solução salina (0,9%). Trinta minutos após, os animais foram sacrificados para a medição do conteúdo gástrico de GSH. Foi retirado o segmento glandular de cada estômago e feito homogenato a 10% em solução gelada de EDTA

0,02M. Aliquotas de tecido (400 µl) homogeneizado foi misturado com 320 µl de água destilada e 80 µl de ácido tricloroacético (50%) em tubos de vidro e centrifugados a 3500 rpm por 15 min. Subseqüentemente, o sobrenadante (400 µl) foi misturado com 800 µl de solução tampão Tris-HCL (0,4 M, pH 8,9) e 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB; 0,01 M) foi adicionado. Depois de agitado a mistura reacional por 3 minutos foi medida a absorvância em 412 nm, 5 min após a adição de DTNB contra o branco sem homogenato. Os valores de absorvância foram extrapolados de uma curva padrão de glutatona e os resultados foram expressos em µg GSH/g de proteína.

Em outro ensaio, quatro grupos de animais foram tratados com as seguintes substâncias: (-)- α -bisabolol (100 e 200 mg/Kg, v.o.), N-acetil cisteína (750 mg/Kg, v.o.) ou veículo (3% de tween 80 em água destilada, v.o.). Esses animais tiveram lesões induzidas por indometacina (20 mg/Kg, v.o.) como descrito anteriormente. Oito horas após, foram sacrificados e o conteúdo gástrico de GSH foi medido pelo método descrito acima.

3.5.7. Dosagem de proteínas no tecido gástrico

Desde que os resultados da quantificação gástrica de GSH foram dados em µg GSH/g de proteína, foi necessário realizar a dosagem de proteína.

A quantidade de proteína em homogenatos de estomago foi determinada a 25°C utilizando albumina sérica bovina como padrão, de acordo com o método previamente descrito por Lowry et al. (1951), que emprega duas reações de formação de cor para analisar a concentração protéica fotometricamente. Inicialmente é feita uma reação de biureto de baixa eficiência na qual os íons de cobre alcalino produzem uma cor azulada na presença de ligações peptídicas. Esta cor azulada é característica de todas as proteínas e fornece uma cor básica de fundo para a próxima etapa de ensaio.

Depois o método emprega uma mistura complexa de sais inorgânicos, o reagente Folin-Ciocalteau, que produz uma cor verde azulada intensa na presença de tirosina ou triptofano livres ou ligados às proteínas. Como as quantidades desses dois aminoácidos são geralmente constantes nas proteínas solúveis, com poucas exceções, a cor das reações (verde-azulada) é indicativa da presença de proteína e a intensidade da cor proporcional à concentração. Esta coloração é medida em 750 nm.

Foram utilizados os seguintes reagentes no procedimento experimental:

- Homogenatos dos tecidos gástricos
- Solução de Na₂CO₃ a 2% em NaOH.

- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 0,5% Citrato de sódio 1%.
- Reagente de Folin-Ciocalteu 1:1 em água bidestilada
- Solução de albumina sérica bovina

As medições espectrofotométricas foram realizadas através de um espectrofotômetro Beckman DU Califórnia, U.S.A.

3.6. Análise estatística.

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M). Os dados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA), utilizando o teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc* ou pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunns, conforme a tipo dos dados analisados. Em todas as análises, considerou-se estatisticamente significativo valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS.

4.1 Atividade antinociceptiva.

4.1.1. Avaliação do potencial antinociceptivo do (-)- α -bisabolol no modelo de contorções induzidas por ácido acético.

A administração intraperitoneal de ácido acético 0,6 % nos animais tratados previamente apenas com veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.) foi efetiva em produzir um alto número de contorções abdominais ($22,57 \pm 2,58$). O grupo de animais que recebeu tratamento prévio com indometacina 10 mg/Kg, v.o., droga antiinflamatória não-esteróide, usada como padrão positivo, demonstrou uma diminuição significativa do número de contorções abdominais ($11,62 \pm 1,23$, $p < 0,001$), assim como o (-)- α -bisabolol nas doses de 25 mg/Kg, v.o. ($10,23 \pm 1,33$, $p < 0,001$) e 50 mg/Kg, v.o. ($8,06 \pm 0,985$, $p < 0,001$). Os resultados são expostos na **Figura 9 e Tabela 3**.

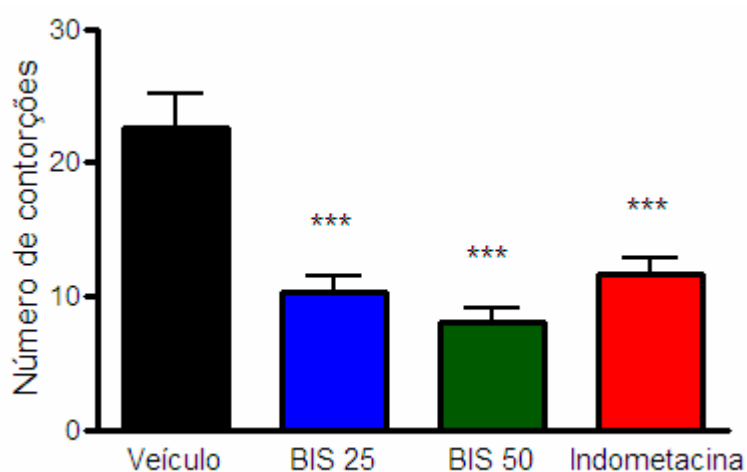


FIGURA 9. Efeito do (-)- α -bisabolol (BIS) sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. O gráfico mostra a média \pm E.P.M. do número de contorções durante o teste. Os animais foram previamente tratados com BIS nas doses de 25 e 50 mg/Kg, v.o, Veículo (Tween 80, 3% em água destilada v.o) ou Indometacina 10 mg/Kg v.o., 60 min. antes de receberem uma injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6%. O número de contorções foi contado decorrido 10 min. da administração de ácido acético, durante 20 min. Foram utilizados grupos de 8-12 animais. *** $p < 0,001$ vs Veículo (ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*).

TABELA 3. Efeito do (-)- α -bisabolol no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético

Grupo	Número de Contorções	Redução (%)
Veículo	22,57 \pm 2,58	-
BIS 25	10,23 \pm 1,33***	54,68
BIS 50	8,06 \pm 0,985***	64,56
INDO 10	11,62 \pm 1,23***	48,52

Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de contorções durante o teste. Os animais foram previamente tratados com (-)- α -bisabolol nas doses de 25 e 50 mg/Kg, v.o., (BIS 25 e BIS 50) veículo (Tween 80, 3% em água destilada v.o) ou Indometacina 10 mg/Kg, (INDO 10), 60 min. antes de receberem uma injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6%. O número de contorções foi contado após 10 min. da administração de ácido acético. Foram utilizados grupos de 8-12 animais. *** $p < 0,001$ vs Veículo.(ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*).

4.1.2 Avaliação do potencial antinociceptivo do (-)- α -bisabolol no modelo de nociceção térmica na placa quente

Os grupos de animais que receberam veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.) ou (-)- α -bisabolol nas doses 25 e 50 mg/Kg, v.o. não tiveram diferenças entre si quanto ao tempo de latência para exibir comportamento nociceptivo nos tempos em que foram observados. O tratamento com morfina 7,5 mg/Kg, droga de referência, foi capaz de aumentar significativamente ($p < 0,001$) o tempo de latência para o início da nociceção em todos os tempos observados em relação ao grupo tratado apenas com veículo. Os resultados podem ser vistos na **Figura 10** e **Tabela 4**.

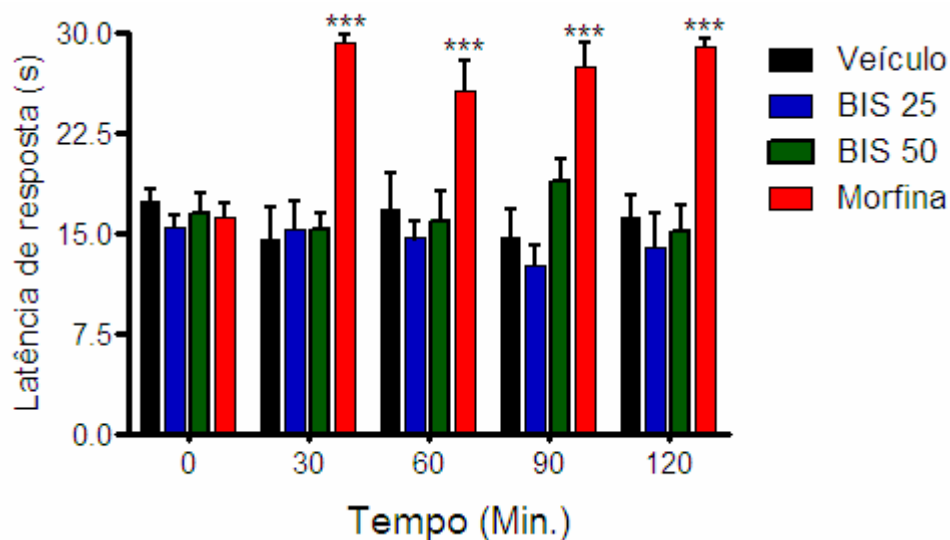


FIGURA 10. Efeito do (-)- α -bisabolol (BIS) sobre o tempo de latência de resposta ao estímulo térmico da placa quente. Os valores representam a média \pm E.P.M do tempo necessário para os animais exibirem respostas frente ao estímulo térmico, registrados antes (tempo zero) e nos tempos 30, 60, 90 e 120 Min. após os tratamentos com BIS nas doses de 25 e 50 mg/Kg, v.o., veículo (Tween 80, 3% em água destilada v.o) ou Morfina 7,5 mg/Kg, i.p. A resposta consiste em saltar ou lamber a pata traseira após serem postos na placa aquecida ($51 \pm 0,5$ °C). Foram utilizados 8 animais por grupo.*** $p < 0,001$ vs Veículo (ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*)

TABELA 4. Efeito do (-)- α -bisabolol (BIS) no teste de nociceção térmica da placa quente.

Grupo	Tempo de Resposta ao estímulo			
	0 min	30 Min.	60 Min.	90 Min.
Veículo, v.o	17,86 \pm 0,99	14,49 \pm 2,59	16,79 \pm 2,70	14,75 \pm 2,11
BIS 25	15,41 \pm 0,99	15,28 \pm 2,21	14,64 \pm 1,24	11,15 \pm 1,01
BIS 50	16,48 \pm 1,51	15,25 \pm 1,25	15,99 \pm 2,23	19,40 \pm 1,87
MORF 7,5	16,15 \pm 1,04	29,28 \pm 0,62*	25,71 \pm 2,28**	27,5 \pm 1,84***

Os valores representam a média \pm E.P.M do tempo necessário para os animais exibirem respostas frente ao estímulo térmico, registrados antes e nos tempos 30, 60 90 e 120 Min. após os tratamentos com BIS nas doses de 25 e 50 mg/Kg, v.o., veículo (Tween 80, 3% em água destilada v.o) ou Morfina 7,5 mg/Kg, i.p. (MORF 7,5). A resposta consiste em saltar ou lambe a pata traseira após serem postos na placa aquecida (51 \pm 0,5 °C). Foram utilizados 8 animais por grupo. ***p<0,001 vs Veículo (ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*).

4.1.3. Avaliação do potencial antinociceptivo do (-)- α -bisabolol no modelo de nocicepção induzida pela formalina.

Os animais que receberam apenas veículo (Tween 80, 3% em água destilada) ($74,33 \pm 7,63$ s) previamente à administração intraplantar de formalina exibiram comportamento nociceptivo de lambedura da pata semelhante ao observado pelos animais que foram tratados previamente com (-)- α -bisabolol nas doses de 25 mg/Kg ($79,75 \pm 5,56$ s) ou 50 mg/Kg ($76,14 \pm 6,55$ s) na primeira fase do teste, ou seja, 0 - 5 minutos. O pré-tratamento com Morfina 7,5 mg/Kg, i.p. foi capaz de reduzir com significância o tempo de lambedura da pata nos animais do grupo que a receberam ($29,86 \pm 1,18$ s, $p < 0,001$) na primeira fase do teste (**Figura 11 e Tabela 5**).

Na segunda fase do teste, ou seja, 20-25 min. após a aplicação de formalina, o pré-tratamento com (-)- α -bisabolol nas doses de 25 mg/Kg ($4,125 \pm 2,924$ s, $p < 0,001$) ou 50 mg/Kg ($4,250 \pm 2,651$ s, $p < 0,001$) foi efetivo em diminuir o tempo de lambedura comparado aos animais que receberam apenas veículo ($58,50 \pm 5,76$ s). (**Figura 12 e Tabela 6**)

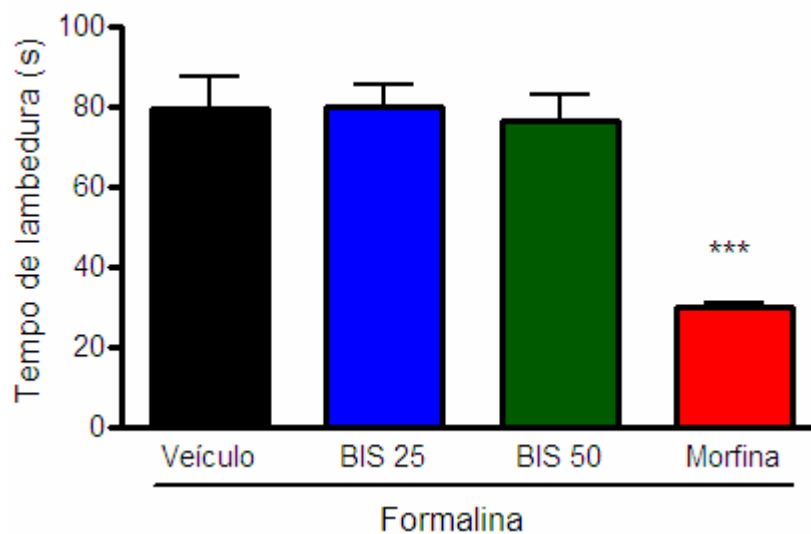


FIGURA 11. Efeito do (-)- α -bisabolol (BIS) sobre o tempo de lambedura da pata direita traseira no modelo de nocicepção induzida pela formalina em camundongos, na primeira fase do teste. Os valores no gráfico representam a média \pm E.P.M do tempo de lambedura da pata direita traseira após a aplicação de formalina 1%. Os animais foram previamente tratados com BIS nas doses de 25 e 50 mg/Kg, v.o. ou veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.) 60 minutos antes de receberem injeção intraplantar de formalina 1%. Um grupo recebeu Morfina 7,5 mg/Kg, i.p 30 minutos antes da injeção de formalina 1%. O tempo de lambedura foi registrado no intervalo de 0-5 minutos após a aplicação de formalina. Foram utilizados 8 animais por grupo. $p < 0,001$ vs Veículo (ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*)

TABELA 5. Efeito do (-)- α -bisabolol sobre a 1ª fase da nocicepção induzida por formalina.

Grupo	Tempo de Lamberdura(s)	Redução (%)
Veículo, v.o.	74,33 \pm 7,63	-
BIS 25.	79,75 \pm 5,56	-
BIS 50.	76,14 \pm 6,55	-
MORF 7,5 mg/Kg, i.p	29,86 \pm 1,18***	59,83

Os valores representam a média \pm E.P.M do tempo de lamberdura da pata direita traseira após a aplicação de formalina 1%. Os animais foram previamente tratados com(-)- α -bisabolol nas doses de 25 e 50 mg/Kg, v.o. (BIS 25 e BIS 50) ou veículo (Tween 80, 3% em água destilada) 60 min antes e Morfina 7,5 mg/Kg, i.p. (MORF 7,5), 30 min. antes injeção de formalina 1%. O tempo de lamberdura foi registrado no intervalo de 0-5 min. após a aplicação de formalina. Foram utilizados 8 animais por grupo. $p < 0,001$ vs Veículo (ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*)

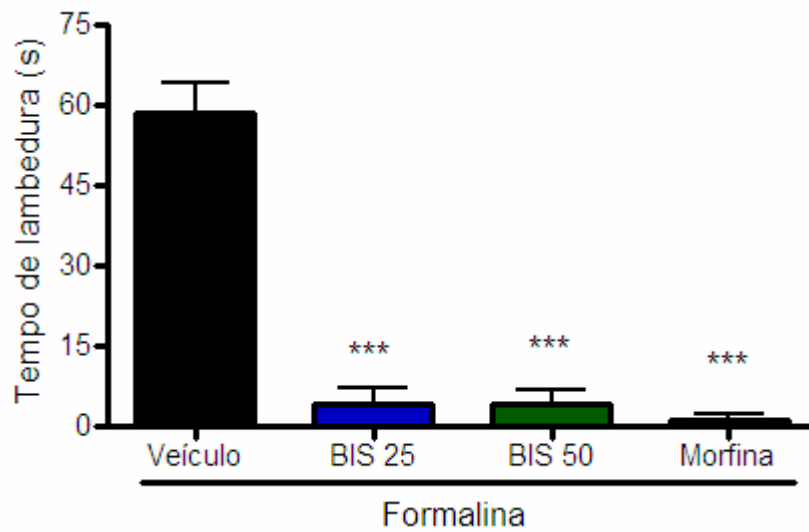


FIGURA 12. Efeito do (-)- α -bisabolol (BIS) sobre o tempo de lambedura da pata direita traseira no modelo de nocicepção induzida pela formalina em camundongos, na segunda fase do teste. Os valores no gráfico representam a média \pm E.P.M do tempo de lambedura da pata direita traseira após a aplicação de formalina 1%. Os animais foram previamente tratados com BIS 25 e 50 mg/Kg, v.o. ou veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.) 60 min antes e Morfina 7,5 mg/Kg, i.p 30 min. antes de receberem injeção intraplantar de formalina 1%. O tempo de lambedura foi registrado no intervalo de 20-25 min. após a aplicação de formalina. Foram utilizados 8 animais por grupo. $p < 0,001$ vs Veículo (ANOVA e Student-Newman-Keuls)

TABELA 6. Efeito do (-)- α -bisabolol sobre a 2^a fase da nocicepção induzida por formalina.

Grupo	Tempo de lambedura(s)	Redução (%)
Veículo, v.o.	58,50 \pm 5,755	-
BIS 25	4,125 \pm 2,92***	92,95
BIS 50	4,250 \pm 2,65***	92,74
MORF 7,5	1,286 \pm 0,99***	97,80

Os valores representam a média \pm E.P.M do tempo de lambedura da pata direita traseira após a aplicação de formalina 1%. Os animais foram previamente tratados com (-)- α -bisabolol 25 e 50 mg/Kg, v.o. (BIS 25 e 50) ou veículo (Tween 80, 3% em água destilada) 60 minutos antes e Morfina 7,5 mg/Kg, i.p. (MORF 7,5), 30 minutos antes da injeção de formalina 1%. O tempo de lambedura foi registrado no intervalo de 20-25 min. após a aplicação de formalina. Foram utilizados 8 animais por grupo. $p < 0,001$ vs Veículo (ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*)

4.1.4. Avaliação da coordenação motora

O teste da barra giratória não registrou diferença significativa ($p > 0,05$) no número de quedas entre os grupos tratados com veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.) ou (-)- α -bisabolol 25 e 50 mg/Kg, v.o. Os animais tratados com diazepam 2 mg/Kg, i.p. demonstraram maior dificuldade em se manter na barra giratória, exibindo um número de quedas significativamente ($p < 0,001$) maior. **Tabela 7.**

TABELA 7. Efeito do (-)- α -bisabolol sobre o número de quedas no teste da barra giratória

Grupo	Número de quedas
Veículo, v.o.	0,63 (0-1)
(-)- α -bisabolol 25 mg/Kg	0,50 (0-1)
(-)- α -bisabolol 50 mg/Kg	0,75 (0-1)
Diazepam	2,63 (2-3)***

Os valores representam a média e, entre parênteses, os valores mínimo e máximo para cada grupo. Os animais foram previamente tratados com veículo (Tween 80, 3% em água destilada), (-)- α -bisabolol 25 e 50 mg/Kg e Diazepam 2 mg/Kg. *** $p < 0,001$ Kruskal-Wallis e Dunns, *post hoc*.

4.2. Atividade anti-inflamatória.

4.2.1. Avaliação do efeito anti-inflamatório do (-)- α -bisabolol no modelo de edema de pata induzido por carragenina.

Os animais que receberam injeção intraplantar de carragenina 1% (20 μ L) na pata direita traseira tiveram indução de edema, verificado pelo aumento no volume das patas que receberam o estímulo em diferentes intervalos de tempo. O grupo de animais pré-tratados apenas com veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.) apresentou edemas significativamente maiores quando comparado com os grupos tratados com (-)- α -bisabolol 100 e 200 mg/Kg, v.o. ou Indometacina 20 mg/Kg, v.o. nos tempos correspondentes. Esses tratamentos foram capazes de diminuir o edema associado à injeção de carragenina, em todos os tempos observados, Como mostrado pela **Figura 13 e Tabela 8**.

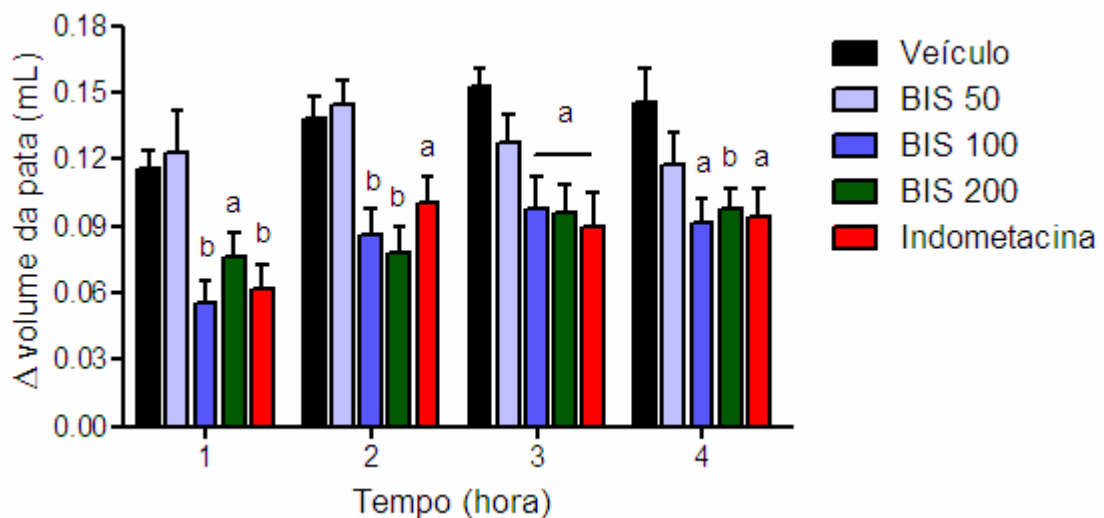


FIGURA 13. Efeito do (-)- α -bisabolol (BIS) contra o edema de pata induzido por carragenina. O gráfico mostra a média \pm E.P.M. da diferença (Δ) do volume da pata em mL (Volume do edema) em relação ao tempo zero. Os Animais receberam: Veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.), BIS nas doses de 50, 100 e 200 mg/Kg, v.o. ou indometacina 20 mg/Kg (INDO), v.o. 1h antes da indução dos edemas pela administração de carragenina 1% (20 μ L). Foram realizadas medidas dos volumes das patas nos tempos zero, 60, 120, 180 e 240 minutos após a administração de carragenina.; ^bp<0,05, ^ap<0.01 vs veículo no mesmo tempo (ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*).

TABELA 8. Efeito do (-)- α -bisabolol(BIS) frente ao edema de pata induzido por carragenina.

Grupo	Δ Volume da pata (mL)			
	60 Min.	120 Min.	180 Min.	240 Min.
Veículo, v.o.	0,116 \pm 0,008	0,138 \pm 0,011	0,153 \pm 0,008	0,146 \pm 0,015
BIS 50	0,123 \pm 0,018	0,145 \pm 0,011	0,127 \pm 0,013	0,118 \pm 0,014
BIS 100	0,056 \pm 0,001** (51,73)	0,086 \pm 0,011** (37,69)	0,106 \pm 0,014* (30,72)	0,091 \pm 0,011* (37,93)
BIS 200	0,076 \pm 0,011* (34,49)	0,078 \pm 0,012** (43,48)	0,103 \pm 0,013* (32,68)	0,097 \pm 0,009** (33,57)
INDO	0,062 \pm 0,011** (46,56)	0,101 \pm 0,011* (26,82)	0,090 \pm 0,016* (41,18)	0,094 \pm 0,012* (35,62)

Os valores são expressos como média \pm E.P.M. da diferença (Δ) do volume da pata em mL (Volume do edema). Os valores entre parênteses representam a porcentagem de inibição do edema em relação ao grupo que recebeu apenas veículo. Veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.), (-)- α -bisabolol (BIS) nas doses de 50, 100 e 200 mg/Kg, v.o., ou Indometacina (INDO) 20 mg/Kg foram administrados 60 min. antes da injeção intraplantar de carragenina. Foram utilizados 8 animais por grupos. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs controle (ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*).

4.2.2. Avaliação do efeito anti-inflamatório do (-)- α -bisabolol no modelo de edema de pata induzido por dextrano.

Os animais que receberam injeção intraplantar de dextrano 0,15% (20 μ L) na pata direita traseira tiveram indução de edema, verificado pelo aumento no volume das patas que receberam o estímulo em diferentes intervalos de tempo. O grupo de animais pré-tratados apenas com veículo (3% tween 80 em água destilada, v.o.) apresentou edemas significativamente ($p < 0,05$) maiores que os demais grupos tratados com (-)- α -bisabolol 100 e 200 mg/Kg, v.o. ou Ciproeptadina 10 mg/Kg, v.o. Esses tratamentos foram capazes de diminuir o edema associado à injeção intraplantar de dextrano, em todos os tempos observados (**Figura 14 e Tabela 9**).

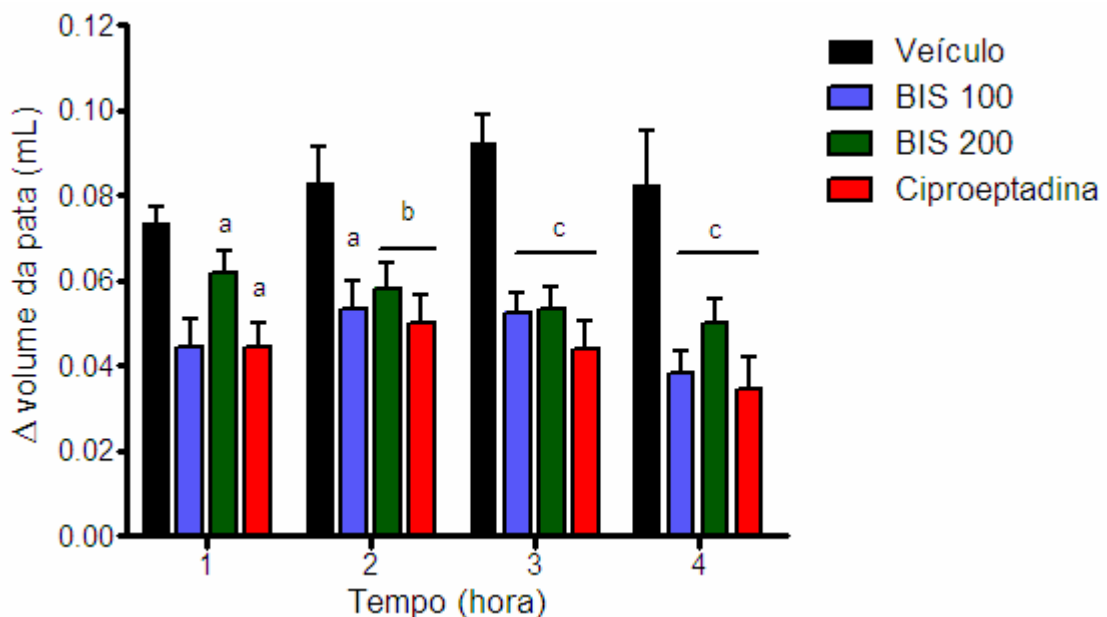


FIGURA 14. Efeito do (-)- α -bisabolol(BIS) contra edema de pata induzido por Dextrano. O gráfico mostra a média \pm E.P.M. da diferença (Δ) do volume da pata em mL (Volume do edema) em relação ao tempo zero. Os Animais receberam: Veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.), BIS nas doses de 100 e 200 mg/Kg, v.o. ou Ciproeptadina 10 mg/Kg, v.o. (CIP) 1h antes da indução dos edemas pela administração intraplantar de dextrano 0,15% (20 μ L). Foram realizadas medidas dos volumes das patas nos tempos zero, 60, 120, 180 e 240 minutos após a administração de Dextrano. ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$ vs Veículo nos respectivos tempos (ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*)

TABELA 9. Efeito do (-)- α -bisabolol(BIS) frente ao edema induzido por dextrano.

Grupo	Δ Volume da pata (mL)			
	60 Min.	120 Min.	180 Min.	240 Min.
Veículo, v.o	0,068 \pm 0,006	0,083 \pm 0,007	0,091 \pm 0,006	0,087 \pm 0,012
BIS 100	0,044 \pm 0,006* (35,30)	0,053 \pm 0,006** (36,15)	0,053 \pm 0,005*** (41,76)	0,038 \pm 0,005*** (56,33)
BIS 200	0,062 \pm 0,005 (8,83)	0,058 \pm 0,006* (30,12)	0,053 \pm 0,005*** (41,76)	0,050 \pm 0,006*** (42,53)
CIPRO 10	0,044 \pm 0,006* (35,30)	0,050 \pm 0,006** (39,76)	0,044 \pm 0,007*** (51,65)	0,034 \pm 0,008*** (66,00)

Os valores são expressos como média \pm E.P.M. da diferença (Δ) do volume da pata em mL (Volume do edema). Os valores entre parênteses indicam a porcentagem de redução do edema em relação com grupo que recebeu apenas veículo. BIS nas doses de 100 e 200 mg/Kg, v.o., veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.) ou Ciproptadina (CIPRO)10 mg/Kg, v.o. foram administrados 60 min. antes da injeção intraplantar de dextrano. Foram utilizados 8 animais por grupos. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs Veículo (ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*).

4.2.3. Avaliação do efeito anti-inflamatório do (-)- α -bisabolol no modelo de edema de pata induzida por histamina.

Os animais que receberam injeção intraplantar de histamina (200 μ g/pata; 20 μ L) na pata direita traseira tiveram indução de edema, verificado pelo aumento no volume das patas que receberam o estímulo em diferentes intervalos de tempo. O grupo de animais pré-tratados com (-)- α -bisabolol nas doses de 100 ou 200 mg/Kg, v.o. não tiveram diferença estatística ($p > 0,05$) quando comparado ao veículo (3% tween 80 em água destilada, v.o.), demonstrando que o (-)- α -bisabolol não é efetivo em reduzir o edema de pata induzido por histamina. Foram utilizados 6-8 animais por grupos (**Figura 15 e Tabela 10**).

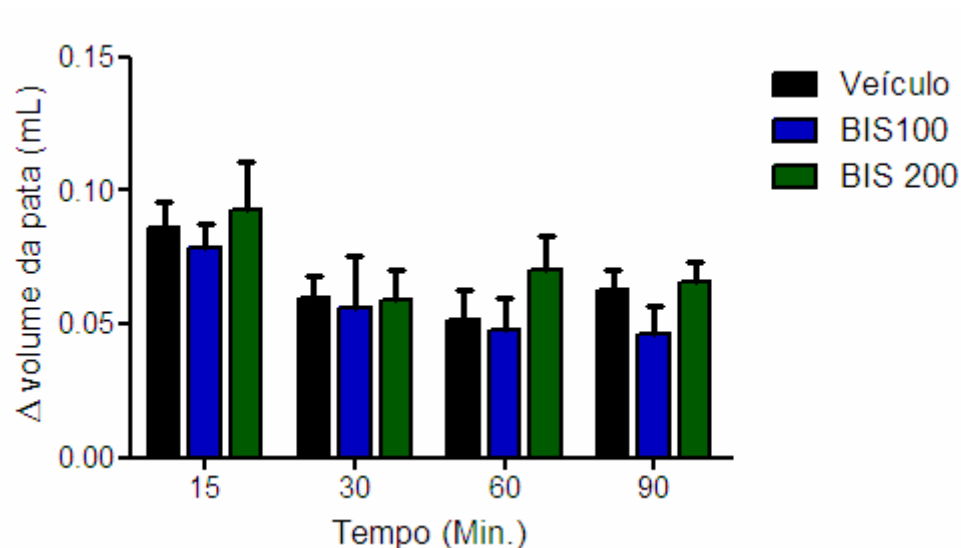


FIGURA 15. Efeito do (-)- α -bisabolol (BIS) frente ao edema de pata induzido por histamina. O gráfico mostra a média \pm E.P.M. da diferença(Δ) do volume da pata em mL (Volume do edema) em relação ao tempo zero. Os Animais receberam: Veículo (Tween 80, 3% em água destilada. v.o.), BIS nas doses de 100 ou 200 mg/Kg, v.o. 1h antes da indução dos edemas pela administração de histamina (200 μ g/pata). Foram realizadas medidas dos volumes das patas nos tempos zero, 15, 30, 60 e 90 minutos após a administração de histamina.

TABELA 10. Efeito do (-)- α -bisabolol(BIS) frente ao edema induzido por histamina

Grupo	Δ Volume da pata (mL)			
	15 Min.	30 Min.	60 Min.	90 Min.
Veículo	0,086 \pm 0,010	0,059 \pm 0,008	0,051 \pm 0,012	0,063 \pm 0,008
BIS 100	0,079 \pm 0,009	0,056 \pm 0,019	0,048 \pm 0,013	0,046 \pm 0,010
BIS 200	0,093 \pm 0,018	0,059 \pm 0,012	0,070 \pm 0,013	0,054 \pm 0,014

Os valores são expressos como média \pm E.P.M. da diferença (Δ) do volume da pata em mL (Volume do edema). BIS nas doses de 100 e 200 mg/Kg, v.o., ou veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.) foram administrados 60 min. antes da injeção intraplantar de histamina (200 μ g/pata). Foram utilizados 6-8 animais por grupos.

4.2.4 Avaliação do efeito anti-inflamatório do (-)- α -bisabolol no modelo de edema de pata induzida por 5-HT.

Os animais que receberam injeção intraplantar de 5-HT (200 μ g/pata; 20 μ L) na pata direita traseira tiveram indução de edema, verificado pelo aumento no volume das patas que receberam o estímulo em diferentes intervalos de tempo. O grupo de animais pré-tratados com (-)- α -bisabolol na dose de 200 mg/Kg, v.o. conseguiu diminuir o volume do edema quando comparado ao veículo (3% tween 80 em água destilada, v.o.), dessa forma o (-)- α -bisabolol na dose de 200 mg/Kg foi efetivo em reduzir o edema de pata induzido por 5-HT nos tempos observados. Foram utilizados 6-8 animais por grupos (**Figura 16 e Tabela 11**).

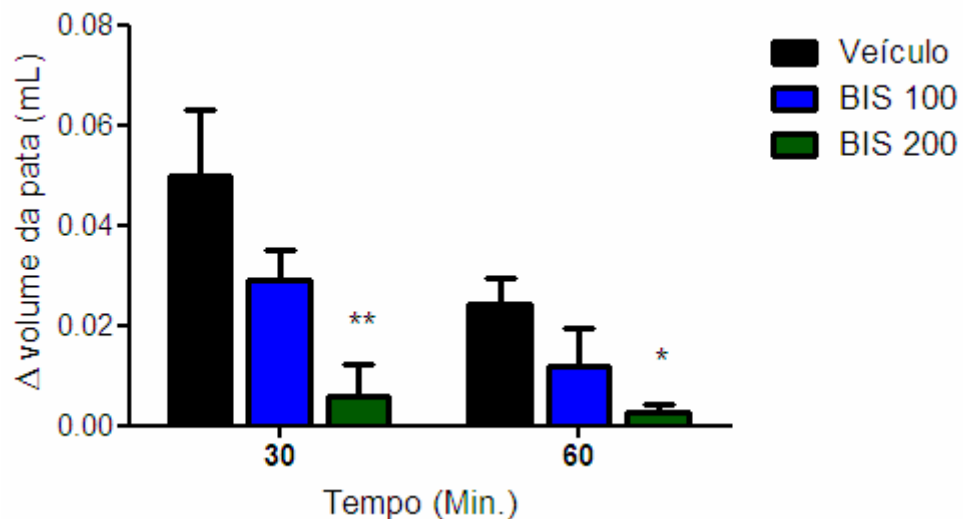


FIGURA 16. Efeito do (-)- α -bisabolol (BIS) frente ao edema de pata induzido por 5-HT. O gráfico mostra a média \pm E.P.M. da diferença (Δ) do volume da pata em mL (Volume do edema) em relação ao tempo zero. Os Animais receberam: Veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.), BIS nas doses de 100 ou 200 mg/Kg, v.o. 1h antes da indução dos edemas pela administração de 5-HT (200 μ g/pata). Foram realizadas medidas dos volumes das patas nos tempos zero, 30 e 60 minutos após a administração de 5-HT. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs Veículo nos respectivos tempos (ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*).

TABELA 11. Efeito do (-)- α -bisabolol(BIS) no edema induzido por 5-HT.

Grupo	Δ Volume da pata (mL)	
	30 Min.	60 Min.
Veículo	0,050 \pm 0,013	0,024 \pm 0,005
BIS100	0,029 \pm 0,006	0,012 \pm 0,008
BIS 200	0,006 \pm 0,006**	0,003 \pm 0,002*

Os valores são expressos como média \pm E.P.M. da diferença(Δ) do volume da pata em mL (Volume do edema). (-)- α -bisabolol (BIS) nas doses de 100 e 200 mg/Kg, v.o., ou veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.) foram administrados 60 min. antes da injeção intraplantar de 5-HT (200 μ g/pata). Foram utilizados 6-8 animais por grupos. * p <0,05; ** p <0,01 vs Veículo (ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*).

4.3. Atividade gastroprotetora.

4.3.1. Avaliação do efeito do (-)- α -bisabolol frente às lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.

A administração de etanol absoluto aos animais que foram previamente tratados apenas com veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.), produziu grande porcentagem de área ulcerada ($26,1 \pm 1,63$ %). A área ulcerada pelo etanol foi significativamente diminuída com a administração prévia de (-)- α -bisabolol nas doses de 100 mg/Kg, v.o. ($9,59 \pm 1,61$ %, $p < 0,001$) e 200 mg/Kg, v.o. ($2,09 \pm 0,65$ %, $p < 0,001$) quando comparado ao grupo tratado apenas com veículo, assim como a ciproeptadina 10 mg/Kg, v.o., droga antagonista dos receptores de histamina e 5-HT, usada como droga de referência, foi capaz de diminuir a área gástrica lesionada ($4,11 \pm 0,61$ %, $p < 0,001$) em comparação ao grupo tratado com veículo ($26,1 \pm 1,63$) (**Figura 17 e Tabela 12**).

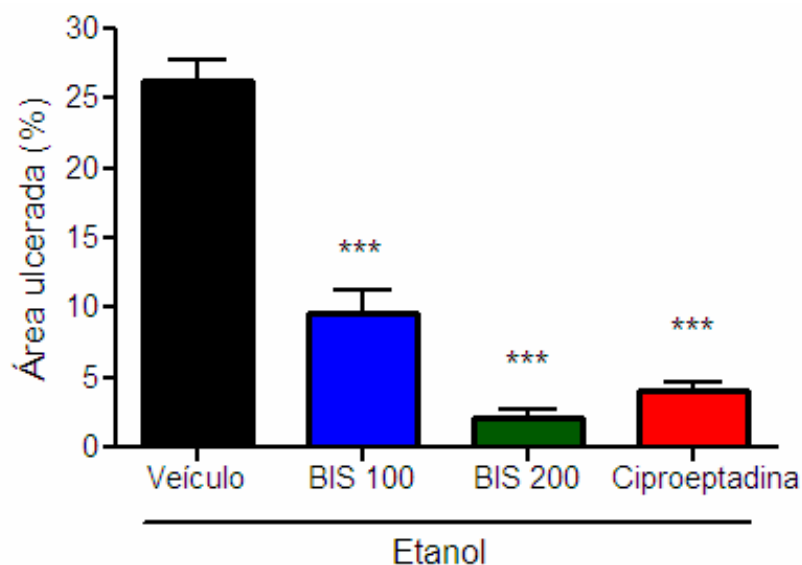


FIGURA 17. Efeito do (-)- α -bisabolol (BIS) sobre a área ulcerada associada a lesão gástrica por Etanol. Os valores representam a média \pm E.P.M. da porcentagem de área gástrica ulcerada. A área ulcerada foi medida 30 minutos após a administração de etanol absoluto (0,2 ml/animal). Veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o), BIS 100 e 200 mg/Kg, v.o e Ciproeptadina (CIP), 10 mg/Kg, v.o foram administrados 1h antes dos animais receberem Etanol absoluto. Foram utilizados oito animais por grupo. *** $p < 0,001$ vs Veículo (ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*).

TABELA 12. Efeito do (-)- α -bisabolol sobre as lesões gástricas induzida por etanol.

Grupo	Área ulcerada	Redução (%)
Veículo, v.o.	26,1 \pm 1,626	-
BIS 100	9,590 \pm 1,611***	63,26
BIS 200	2,088 \pm 0,6459***	92,01
CIP 10	4,108 \pm 0,6108***	84,26

A tabela mostra os valores em porcentagem de área gástrica ulcerada expressos como média \pm E.P.M. Veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o), BIS 100 e 200 mg/Kg, v.o e Ciproeptadina (CIP), 10 mg/Kg, v.o., foram administrados 60 minutos antes da administração de Etanol absoluto (0,2 mL/ animal). Os animais foram sacrificados 30 min. após a administração de etanol. Foram utilizados oito animais por grupos. ***p<0,001 vs veículo. (ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*).

4.3.2. Avaliação do envolvimento do Óxido Nítrico (NO) no efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto

A administração de etanol absoluto aos animais que foram previamente tratados apenas com veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.) produziu grande porcentagem de área gástrica ulcerada ($26,10 \pm 1,63$ %). A área gástrica ulcerada pelo etanol foi significativamente diminuída com a administração prévia de (-)- α -bisabolol 200 mg/Kg, v.o. ($2,09 \pm 0,65$ %, $p < 0,001$) e L-arginina 600 mg/Kg, i.p. ($4,99 \pm 1,63$ %, $p < 0,001$) quando comparado ao grupo tratado apenas com veículo. O grupo que recebeu L-NAME 10 mg/Kg, i.p. previamente a administração de etanol exibiu aumento na área gástrica ulcerada ($37,73 \pm 2,76$ %, $p < 0,001$). O efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol 200 mg/Kg não foi revertido pela administração prévia de L-NAME 10 mg/Kg, i.p, um inibidor da síntese de NO, ($4,12 \pm 0,89$ %). A administração de L-NAME reverteu o efeito gastroprotetor da L-arginina na dose de 600 mg/Kg, i.p. ($24,85 \pm 2,528$ %, $p < 0,001$) (**Figura 18 e Tabela 13**).

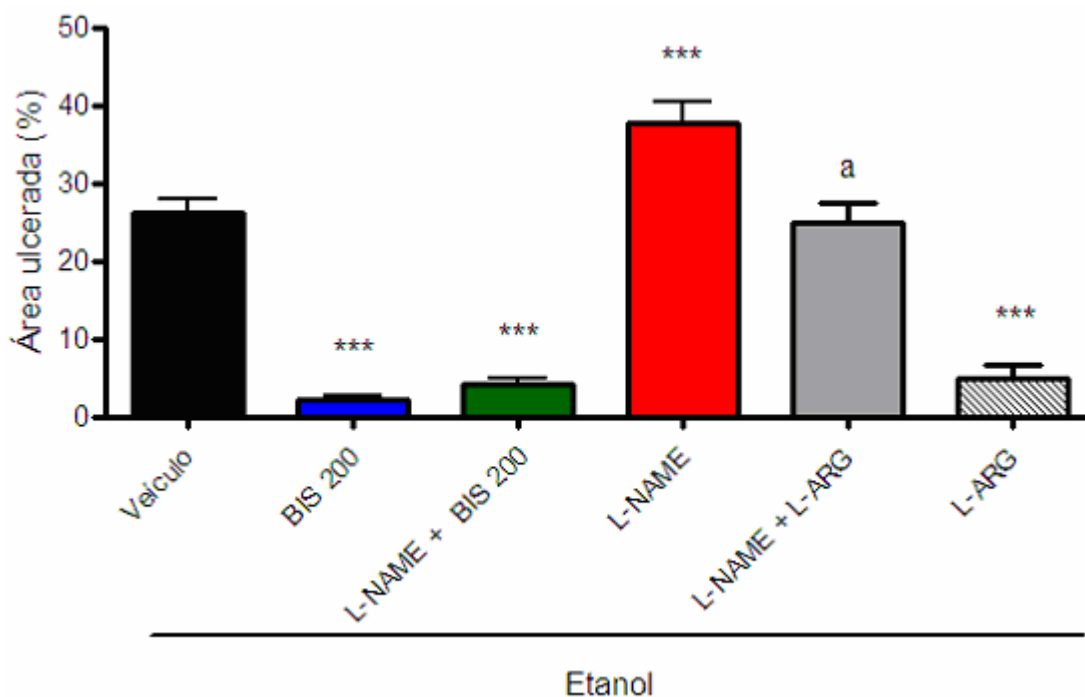


FIGURA 18. Envolvimento do Óxido Nítrico(NO) no efeito gastroprotetor associado ao (-)- α -bisabolol(BIS) em modelos de úlcera induzida por etanol absoluto em camundongos. Os valores no gráfico representam a média \pm E.P.M. de área gástrica ulcerada. Os animais foram tratados previamente, 60 min., por via oral, com Veículo (Tween 80, 3% em água destilada) ou BIS 200 mg/Kg. L-Arginina 600 mg/Kg, i.p. ou L-NAME 10 mg/Kg, i.p. foram administrados 30 min. antes da administração de etanol absoluto. L-NAME foi administrado 15 min. antes nos animais que receberam BIS 200 mg/Kg (Grupo L-NAME + BIS 200) ou L-Arginina (Grupo L-NAME + L-Arginina). Os animais foram sacrificados 30 min após a indução de úlcera. Foram utilizados grupos de 8 animais. *** $p < 0,001$ vs Veículo ^a $p < 0,001$ vs L-Arginina ou L-NAME.(ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*)

TABELA 13. Avaliação do envolvimento do Óxido Nítrico (NO) no efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto

Grupo	Área ulcerada
Veículo	26,21 \pm 1,63
BIS 200	2,09 \pm 0,65 ***
L-NAME 10 + BIS 200	4,12 \pm 0,89***
L-NAME 10	37,73 \pm 2,76***
L-NAME 10 + L-ARG 600	24,85 \pm 2,53 ^a
L-ARG 600	4,99 \pm 1,63***

Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. de área gástrica ulcerada. Os animais foram tratados previamente, 60 min. antes, por via oral, com veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.) ou (-) α -bisabolol (BIS) 200 mg/Kg. L-NAME 10 mg/Kg, i.p. ou L-Arginina (L-ARG) 600 mg/Kg, i.p., foram administrados 30 min. antes da administração de etanol absoluto. L-NAME foi administrado 15 min. antes dos animais receberem (-) α -bisabolol (Grupo L-NAME + (-) α -bisabolol 200) ou L-Arginina (Grupo L-NAME + L-Arginina). Os animais foram sacrificados 30min após a indução de úlcera. Foram utilizados grupos de 8 animais. ***p<0,001 vs Veículo ^ap< 0,001 vs L-NAME ou L-Arginina.(ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*)

4.3.3 Avaliação do envolvimento dos Canais de K^+ -ATP-dependentes(K^+_{ATP}) no efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto.

A administração de etanol absoluto aos animais que foram previamente tratados apenas com veículo (3% Tween 80 em água destilada), v.o., produziu grande porcentagem de área ulcerada ($28,74 \pm 0,77$ %). A área ulcerada pelo etanol foi significativamente diminuída com a administração prévia de (-)- α -bisabolol 200 mg/Kg, v.o. e Diazóxido 3 mg/Kg, i.p. ($4,9 \pm 0,543$ %, $p < 0,001$) e ($6,73 \pm 7,82$ %, $p < 0,001$) respectivamente quando comparado ao grupo tratado apenas com veículo. A gastroproteção do (-)- α -bisabolol não foi revertida pela administração prévia de Glibenclamida 10 mg/Kg, i.p, droga bloqueadora de K^+_{ATP} ($6,29 \pm 0,955$ %). Inversamente, a gastroproteção do diazóxido foi revertida pela ação da Glibenclamida ($28,69 \pm 0,92$ %, $p < 0,001$) (**Figura 19 e Tabela 14**).

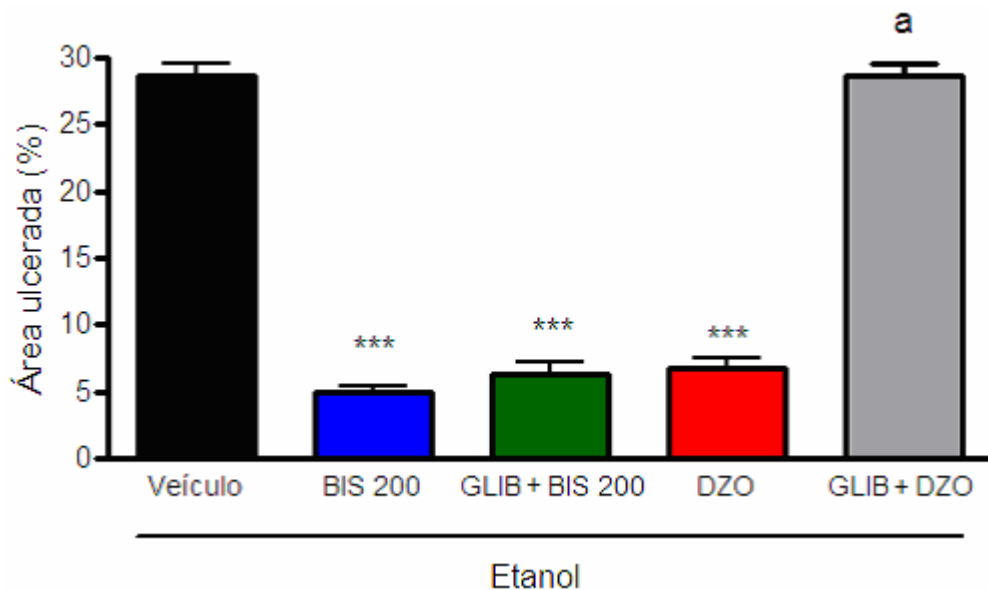


FIGURA 19. Envolvimento dos canais de potássio ATP-dependentes(K^+_{ATP}) na gastroproteção induzida por (-)- α -bisabolol(BIS) no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em camundongos. Os valores no gráfico representam a média \pm E.P.M. da porcentagem de área gástrica ulcerada. Foram previamente administrados 60 Min. antes da administração de etanol por via oral BIS 200 mg/Kg, ou Veículo (Tween 80, 3% em água destilada). Diazóxido (DZO) 3 mg/Kg, i.p. foi administrado 30 Min. antes dos animais receberem etanol. Glibenclamida (GLIB) 10 mg/Kg, i.p. foi administrada 15 min. antes da administração de BIS 200 mg/Kg (Grupo GLIB + BIS 200) ou DZO (Grupo GLIB + DZO). Os animais foram sacrificados 30 min. após a indução de úlcera. Foram utilizados grupos de 8 animais. *** $p < 0,001$ vs Veículo ^a $p < 0,001$ vs DZO.(ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*)

TABELA 14. Envolvimento dos canais de potássio ATP-dependentes(K^+_{ATP}) na gastroproteção induzida por (-)- α -bisabolol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto

Grupo	Área ulcerada
Veículo	28,74 \pm 0,50
BIS 200	4,90 \pm 0,5432***
GLIB 10 + BIS 200mg	6,29 \pm 0,955***
DZO 3	6,73 \pm 0,82***
GLIB 10 + DZO 3	28,69 \pm 0,92 ^a

Os valores de área gástrica ulcerada estão expressos na forma de média \pm E.P.M.. (-)- α -bisabolol (BIS) 200mg/Kg, v.o ou veículo, v.o (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.) foram administrados 60 min. antes da administração de etanol. Diazóxido (DZO) i.p. foi dado 30 min. antes dos animais receberem etanol. Glibenclamida (GLIB) 10mg/Kg, i.p foi administrada 15 min. antes da administração de (-)- α -bisabolol (Grupo Glibenclamida + (-)- α -bisabolol) ou diazóxido (Grupo Glibenclamida + Diazóxido). Os animais foram sacrificados 30 min após os tratamentos com Etanol. ***p< 0,001 vs Veículo ^ap< 0,001 vs Diazóxido.(ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*).

4.3.4. Avaliação do envolvimento da síntese de prostaglandinas no efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto.

A administração de etanol absoluto aos animais que foram previamente tratados apenas com veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.) produziu grande porcentagem de área ulcerada ($23,78 \pm 2,14$ %). A área ulcerada pelo etanol foi significativamente diminuída com a administração prévia de (-)- α -bisabolol 200 mg/Kg, v.o. ($2,09 \pm 0,65$ %, $p < 0,001$) quando comparado ao grupo tratado apenas com veículo. A gastroproteção do (-)- α -bisabolol não foi revertida pela administração prévia de Indometacina 10 mg/Kg, v.o, inibidor da síntese de prostaglandinas. ($5,23 \pm 1,30$ %, $p < 0,001$) (**Figura 20 e Tabela 15**).

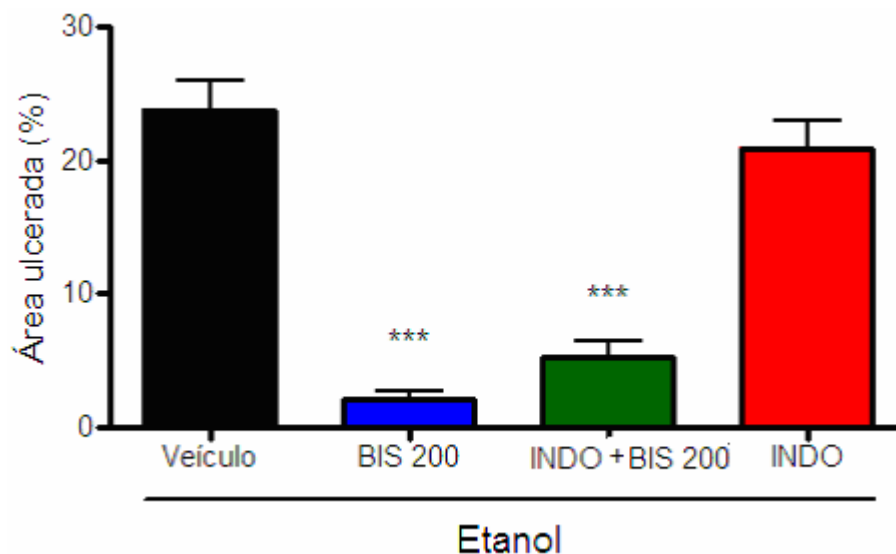


FIGURA 20. Envolvimento da síntese de prostaglandinas no efeito gastroprotetor associado ao (-)- α -bisabolol (BIS) no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em camundongos. Os valores no gráfico representam a média \pm E.P.M da porcentagem de área gástrica ulcerada. Os animais foram previamente tratados com veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.), BIS 200 mg/Kg, v.o. ou Indometacina (INDO) 10 mg/Kg, v.o. 60 min. antes da administração de etanol absoluto, o Grupo INDO + BIS 200 recebeu Indometacina 2h. antes da administração de (-)- α -bisabolol 200 mg/Kg. Foram utilizados grupos de 8 animais que foram sacrificados 30 minutos após a administração de etanol. *** $p < 0,001$ vs Veículo.(ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*).

TABELA 15. Envolvimento da síntese de prostaglandinas no efeito gastroprotetor associado ao (-)- α -bisabolol no modelo de úlcera induzida por etanol.

Grupo	Área ulcerada
Veículo	23.78 \pm 2.14
BIS 200	2.09 \pm 0.65***
INDO 10 + BIS 200	5.23 \pm 1.30***
INDO 10	20.93 \pm 1.99

Os valores no gráfico representam a média \pm E.P.M da porcentagem de área gástrica ulcerada. Os animais foram previamente tratados com veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.), (-)- α -bisabolol (BIS) 200 mg/Kg, v.o. ou Indometacina (INDO) 10 mg/Kg, v.o. 60 min. antes da administração de etanol absoluto, o grupo Indometacina + (-)- α -bisabolol recebeu Indometacina 2h. antes da administração de (-)- α -bisabolol 200 mg/Kg. Foram utilizados grupos de 8 animais que foram sacrificados 30 minutos após a administração de etanol. *** $p < 0,001$ vs Veículo.(ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*).

4.3.5. Avaliação do efeito do (-)- α -bisabolol frente às lesões gástricas induzidas por indometacina em camundongos.

A administração de indometacina 20 mg/Kg, v.o., aos animais previamente tratados apenas com veículo evidenciou grande escores de lesão gástrica. A administração prévia de (-)- α -bisabolol 100 mg/Kg foi capaz de diminuir significativamente os escores de lesão gástrica em relação aos animais tratados apenas com veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.). Ranitidina, 25 mg/Kg, v.o. droga antagonista dos receptores de histamina H₂, usada como padrão, diminuiu com significância os escores de lesão gástrica quando comparado ao grupo tratado apenas com veículo (**Figura 21 e Tabela 16**).

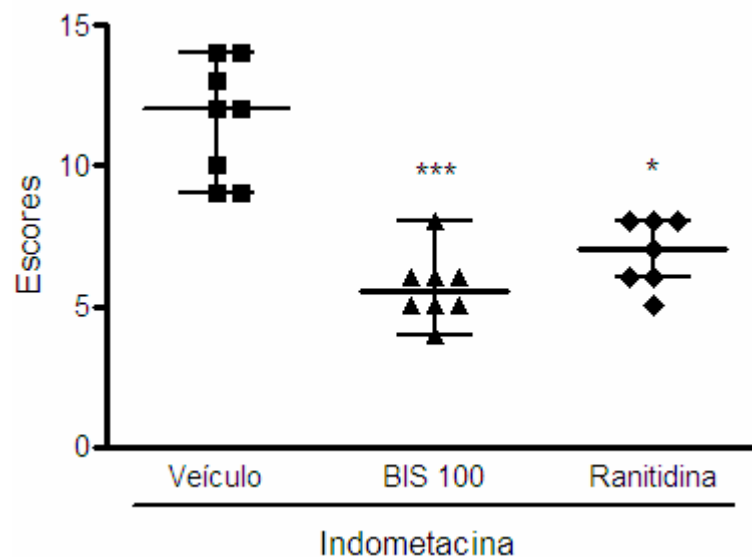


FIGURA 21. Efeito do (-)- α -bisabolol(BIS) frente a lesões gástricas induzidas por Indometacina. O gráfico mostra a mediana e os valores individuais relativo ao índice de lesão gástrica proposto por SZABO et al. (1985). Os Animais receberam por via oral: Veículo (Tween 80, 3% em água destilada), BIS 100 mg/Kg ou Ranitidina 25 mg/Kg, 60 min. antes da indução das lesões gástrica pela administração de indometacina. Oito horas depois, os animais foram sacrificados, tiveram seus estômagos retirados e aberto para a determinação dos escores. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs Veículo (Kruskal-Wallis e Dunns como teste *post hoc*).

TABELA 16. Efeito do (-)- α -bisabolol sobre as lesões gástricas induzida por indometacina.

Grupo	Escore
Veículo	12 (9-14)
BIS 100	5,5 (4-8)***
RANIT 25	7 (5-8)*

Os valores expressam a mediana, com os valores mínimos e máximos entre parênteses, dos escores de lesão gástrica. Foram administrados por via oral: Veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.), (-)- α -bisabolol (BIS) 100 mg/Kg ou ranitidina (RANIT) 25 mg/Kg 60 min. antes da indução das lesões gástrica pela administração de indometacina. Oito horas depois, os animais foram sacrificados, tiveram seus estômagos retirados e aberto para a determinação dos escores de acordo com a TABELA 2. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs Veículo (Kruskal-Wallis e Dunns como *post hoc* teste).

4.3.6 Avaliação do envolvimento da glutathiona reduzida (GSH) no efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto.

A administração de etanol diminuiu a quantidade gástrica de GSH nos animais tratados previamente apenas com o veículo (Tween 80, 3%, em água destilada) ($61,62 \pm 7,6 \mu\text{g/g}$ proteína). O pré-tratamento com (-)- α -bisabolol 200 mg/Kg foi capaz de atenuar essa diminuição no conteúdo gástrico de GSH ($117,8 \pm 13,95 \mu\text{g/g}$ proteína, $p < 0,05$) assim como a N-acetil cisteína, um conhecido precursor de GSH ($144,1 \pm 29,12 \mu\text{g/g}$ proteína, $p < 0,01$) (**Figura 22 e Tabela 17**).

Os animais que não receberam etanol (não-ulcerados) tratados com (-)- α -bisabolol 200 mg/Kg ($148,58 \pm 7,91 \mu\text{g/g}$ proteína) não demonstraram diferença significativa em relação ao grupo tratado apenas com veículo ($151,39 \pm 11,01 \mu\text{g/g}$ proteína), diferente do grupo tratado com N-acetil cisteína que exibiu um aumento significativo no conteúdo gástrico de GSH ($318,18 \pm 45,58 \mu\text{g/g}$ proteína, $p < 0,01$) (**Figura 23 e Tabela 18**).

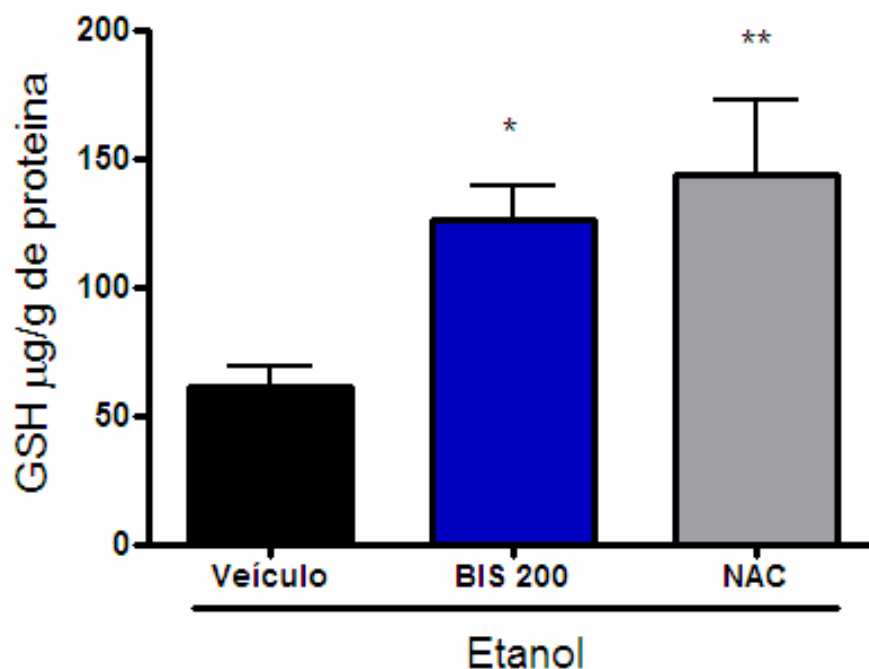


FIGURA 22. Avaliação do envolvimento da glutathiona reduzida (GSH) no efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol (BIS) no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto. Os valores representam a média \pm E.P.M., para os níveis gástricos de GSH nos animais que receberam etanol absoluto. Foram dosados os níveis de GSH trinta minutos após administração de Etanol Absoluto. Veículo 80 (Tween 80, 3% em água destilada), (-)-bisabolol (BIS, 200mg/Kg, v.o) e N-acetilcisteína (NAC, 750 mg/Kg, v.o) foram administrados uma 1h antes de receberem etanol. * $p < 0,01$ ** $p < 0,001$ vs Veículo.(ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*).

TABELA 17. Envolvimento da glutathiona reduzida (GSH) no efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol frente as lesões gástricas induzidas por etanol.

Grupo	Glutathiona(μg/g proteína)
Veículo + Etanol	61,62 \pm 7,60
BIS 200 + Etanol	117,80 \pm 13,95*
NAC 750 + Etanol	144,10 \pm 29,12**

Os valores representam a média \pm E.P.M., para os níveis gástricos de GSH. Foram dosados os níveis de GSH trinta minutos após administração de Etanol absoluto. Veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.), (-)- α -bisabolol (BIS) 200mg/Kg, v.o e N-acetil cisteína (NAC) 750 mg/Kg, v.o foram administrados 60 min. antes de receberem etanol. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs Veículo.(ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*).

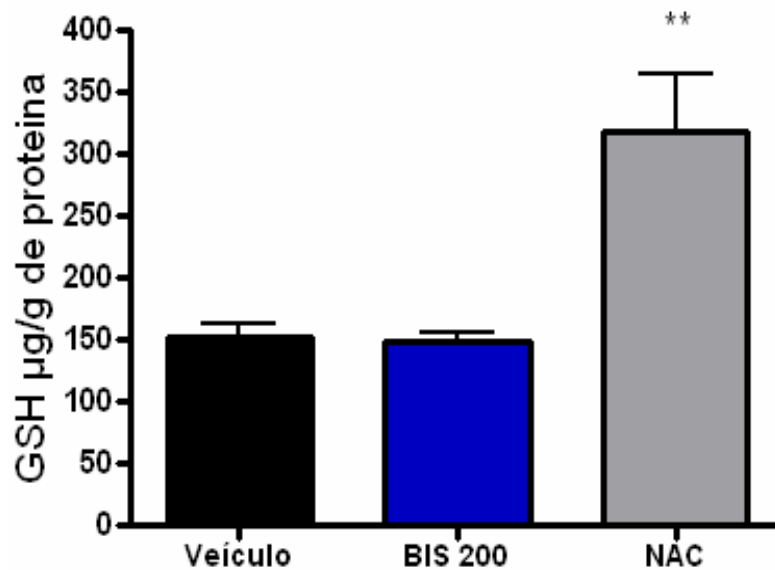


FIGURA 23. Avaliação do envolvimento da glutathiona reduzida (GSH) no efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol (BIS). Os valores representam a média \pm E.P.M., para os níveis gástricos de GSH no animais sem dano gástrico (que não receberam etanol absoluto). Foram dosados os níveis de GSH 1h após administração dos respectivos tratamentos: Veículo (Tween 80, 3% em água destilada), BIS 200mg/Kg, v.o. e N-acetil cisteína (NAC), 750 mg/Kg, v.o. ** $p < 0,001$ vs Veículo.(ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*).

TABELA 18. Envolvimento da glutathiona reduzida (GSH) no efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol.

Grupos	Glutathiona(µg/g proteína)
Veículo	151,39 \pm 11.01
BIS 200	148,58 \pm 7.91
NAC 750	318,18 \pm 45.58 **

Os valores representam a média \pm E.P.M., para os níveis gástricos de GSH nos animais não-ulcerados. Foram dosados os níveis de GSH 1h após administração dos respectivos tratamentos: Veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.), (-)-bisabolol (BIS) 200mg/Kg, v.o., e N-acetil cisteína (NAC) 750 mg/Kg, v.o. ** $p < 0,01$ vs Veículo.(ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*).

4.3.7. Avaliação do envolvimento da glutatona reduzida (GSH) no efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol no modelo de úlcera induzida por Indometacina.

O pré-tratamento com (-)- α -bisabolol 100 ou 200 mg/Kg foi capaz de atenuar a diminuição no conteúdo gástrico de GSH ($99,03 \pm 5,34 \mu\text{g/g}$ proteína, $p < 0,05$) e ($112,48 \pm 11,62 \mu\text{g/g}$ proteína, $p < 0,01$) respectivamente, em comparação com os animais que receberam apenas veículo ($66,45 \pm 3,54 \mu\text{g/g}$ proteína). N-acetil cisteína, um conhecido precursor de GSH, foi capaz de atenuar a depleção de GSH ($160,61 \pm 11,78 \mu\text{g/g}$ proteína, $p < 0,001$) frente ao dano gástrico associado a indometacina. (Figura 24 e Tabela 19).

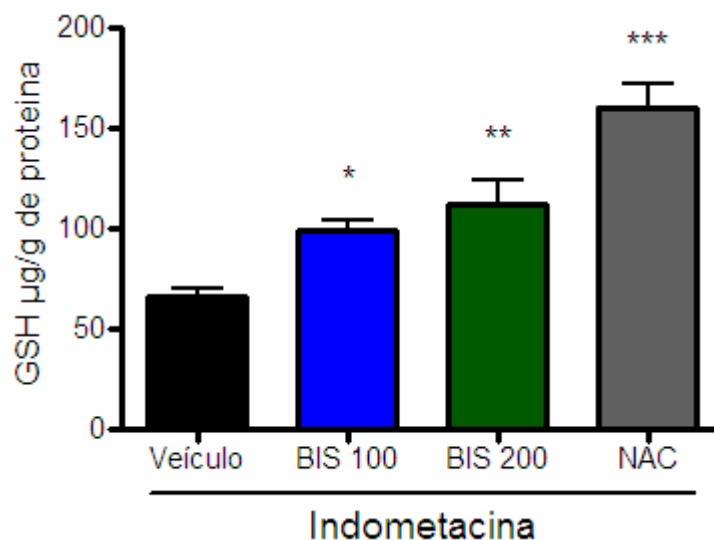


FIGURA 24. Avaliação do envolvimento da glutatona reduzida (GSH) no efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol(BIS) no modelo de úlcera induzida por Indometacina. Os valores representam a média \pm E.P.M., para os níveis gástricos de GSH nos animais que receberam indometacina 20 mg/Kg. Foram dosados os níveis de GSH 8 horas após a administração de indometacina. Veículo (Tween 80, 3% em água destilada), BIS 100 e 200 mg/Kg, v.o e N-acetil cisteína 750 mg/Kg, v.o (NAC) foram administrados 60 Min. antes de receberem indometacina. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, $p < 0,001$ vs Veículo.(ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*).

TABELA 19. Envolvimento da glutathiona reduzida (GSH) no efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol frente as lesões gástricas induzidas por indometacina.

Grupo	GSH ($\mu\text{g/g}$ proteína)
Veículo, v.o.	66,45 \pm 3,54
BIS 100	99,03 \pm 5,34*
BIS 200	112,48 \pm 11,625**
NAC 750	160,61 \pm 11,78***

Os valores representam a média \pm E.P.M., para os níveis gástricos de GSH. Foram dosados os níveis de GSH 8h após administração de indometacina. Os animais foram tratados previamente com: Veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.), (-)- α -bisabolol (BIS) 100 e 200 mg/Kg, v.o ou N-acetil cisteína (NAC) 750 mg/Kg, v.o. 60 min. antes de receberem indometacina. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs Veículo. (ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*).

5. DISCUSSÃO

Vários modelos animais para o estudo da dor e inflamação têm sido descritos ao longo do tempo. Tradicionalmente tem se utilizado de modelos animais para se estudar mecanismos patológicos e características no desenvolvimento e resolução da dor e inflamação, bem como avaliar possíveis atividades antinociceptivas e antiinflamatórias de novas substâncias, marcadamente drogas de origem natural (WOOLFE & MACDONALD, 1944; HUNSKAAR et al., 1985; PINTO et al., 2008; LOPES et al., 2009).

Os modelos utilizados na triagem de moléculas com potencial antinociceptivo comumente baseiam-se na observação da resposta animal frente à utilização de estímulos de diversos tipos e duração, dessa forma, os modelos experimentais utilizados no estudo da dor são divididos em três categorias: os que utilizam estímulos mecânicos, térmicos e químicos (ALMEIDA & OLIVEIRA, 2006).

Para avaliar o potencial antinociceptivo do (-)- α -bisabolol nas doses de 25 e 50 mg/Kg, foi utilizado, como ponto de partida, o teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, como descrito inicialmente por Koster et al. (1959). Os animais submetidos à injeção intraperitoneal de uma solução de ácido acético exibem comportamento alterado constituído por uma onda de constrição e alongamento passando caudalmente, ao longo da parede abdominal, por vezes acompanhados de torção do tronco e seguido pela extensão dos membros (WENDE & MARGOLIN, 1956; COLLIER, 1968).

Esse modelo de dor visceral tem sido muito utilizado desde seu desenvolvimento para demonstrar atividade antinociceptiva de vários compostos, desde extratos e substâncias isoladas a drogas com conhecida ação sobre a modulação da dor como a morfina, codeína e petidina (WENDY & MARGOLIN, 1956; ARAGÃO et al., 2007; VILELA et al., 2009). O ácido acético causa a liberação de mediadores endógenos como PGE₂ e PGF_{2 α} , histamina, bradicinina e serotonina, (DERAEDT et al., 1980 & LEI GUO, 2008), além de estimular as terminações nervosas diretamente pela redução do pH (FRANÇA et al., 2001). Contudo, a inibição ou redução do número de contorções abdominais em resposta ao ácido acético é obtida com uma variedade muito grande de substâncias, agindo de diferentes maneiras, como por exemplo: anti-inflamatórios não-esteróides, anticolinérgicos, narcóticos, antihistamínicos bloqueadores de receptores H1 e H2, antivirais como a ribavirina e anticonvulsivantes

(COLLIER et al., 1968; STEPANOVIC-PETROVIC et al., 2008; ZANBOORI et al., 2008). Dessa forma, o teste é caracterizado pela baixa especificidade de resposta a um tipo específico de droga, além de sofrer influência de substâncias que comprometem a habilidade motora normal dos animais em teste.

No presente trabalho, no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, o (-)- α -bisabolol, nas doses de 25 e 50 mg/Kg, v.o. foi capaz de reduzir em 54,68 e 64,56 % o número de contorções, similarmente a indometacina na dose de 10 mg/Kg, um analgésico não esteroideal, usado como controle positivo. Baseando-se no fato que, o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético é sensível a drogas de ação central e periférica (TRONGSAKUL et al., 2003), e a outra grade variedade de drogas, é impossível, sem uma manipulação farmacológica adequada retirar maiores conclusões dos resultados deste teste. Destarte, a redução significativa da resposta ao estímulo algésico do ácido acético demonstra atividade antinociceptiva do (-)- α -bisabolol frente a nocicepção visceral.

O teste da placa quente tem sido utilizado para avaliação de drogas que agem, principalmente, por via central (GUPTA et al., 2005). Neste método, o tempo de latência para a observação do comportamento de lambedura ou salto/tentativa de salto do animal em resposta ao estímulo térmico gerado pela placa aquecida é utilizado como parâmetro para avaliação de atividade analgésica de determinado composto. Esses comportamentos são interpretados como resposta supra-espinhal, de integração cortical (ALMEIDA & OLIVEIRA, 2006).

Desde que o modelo de contorções induzidas pelo ácido acético é reconhecidamente inespecífico e responde tanto a drogas com ação central e periférica, animais tratados com (-)- α -bisabolol nas doses de 25 e 50 mg/Kg, foram submetidos ao teste da placa quente, buscando compreender, pelo menos em parte, como ocorre a antinocicepção do (-)- α -bisabolol.

Inverso aos resultados encontrados com a morfina 7,5 mg/Kg, i.p. os animais tratados com (-)- α -bisabolol não demonstraram nenhuma atividade em reduzir o tempo de latência para observação de comportamento nociceptivo frente ao estímulo térmico gerado pela placa quente. Dessa forma, o (-)- α -bisabolol não é eficaz na reversão de nocicepção de origem central.

Para uma melhor caracterização e estudo das ações analgésicas do (-)- α -bisabolol foi realizado o teste da formalina em camundongos como descrito por Hunskaar et al. (1985). Esse modelo é considerado um modelo de dor persistente, produzida pela injeção intraplantar da solução de formalina. Esse método pode ser dividido em duas fases onde, a primeira fase é observada durante os cinco primeiros minutos após a aplicação do estímulo nócico, formalina 1%, onde os animais exibem comportamento nociceptivo evidenciado pela lambertura da pata onde foi aplicada a injeção. A nocicepção nessa fase é resultado do estímulo químico direto de fibras aferentes nociceptivas mielinizadas e não mielinizadas, principalmente as fibras do tipo C, a qual pode ser suprimida por drogas analgésicas opioides como a morfina (HUNSKAAR et al., 1985; AMARAL et al., 2007)

Após essa primeira fase, segue-se um período de relativa ausência de comportamento indicativo de nocicepção que dura cerca de 10 minutos. A segunda fase inicia-se após cerca de 15 minutos da injeção de formalina e possui características distintas da primeira fase. Hunskaar & Hole (1987) observaram que drogas como morfina, codeína e orfenadrina, drogas de ação central, tinham ação ao diminuir o tempo de lambertura da pata dos animais em resposta a formalina tanto na primeira fase, como na segunda fase do teste. Do contrário, indometacina e naproxeno, exemplos de anti-inflamatórios não-esteróides diminuía a nocicepção apenas na segunda fase do teste, 20-30 minutos após a injeção intraplantar de formalina (HUNSKAAR & HOLE, 1987; ALMEIDA E OLIVEIRA, 2006). Assim, a primeira fase do teste é caracterizada pela ação direta sobre os nociceptores e ativação das fibras-C, sendo chamada de fase neurogênica, já a segunda fase é chamada de fase inflamatória, envolvendo liberação de mediadores locais; essa fase é sensível a drogas de ação periférica como AINEs e dexametasona.

No teste da formalina, o (-)- α -bisabolol não teve ação diferente dos animais controles, tratados apenas com veículo, durante a primeira fase do teste. Diferentemente a morfina exibiu grande efeito antinociceptivo durante a primeira e segunda fase do teste. Na segunda fase do teste o (-)- α -bisabolol nas doses de 25 e 50 mg/Kg foi efetivo ao reduzir em 92,95 e 92,74 %, respectivamente o tempo de lambertura da pata onde foi aplicado formalina.

Os resultados da primeira fase do teste da formalina concordam com os achados no teste da placa quente e sugere que o (-)-bisabolol não tem propriedade antinociceptiva de ação central, e, de acordo com os resultados encontrados na segunda fase do teste da formalina,

onde o composto teste demonstrou ser altamente efetivo em reduzir a nocicepção em relação ao controle, é possível sugerir fortemente que o (-)- α -bisabolol possui atividade antinociceptiva, ao influenciar a ação dos mediadores inflamatórios envolvidos na segunda fase do teste da formalina como, por exemplo: histamina, serotonina, prostaglandinas e bradicinina (DAÍ et al., 2002).

Os resultados obtidos com os testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético, nocicepção térmica da placa quente e teste bifásico da formalina, nos permite sugerir que o (-)- α -bisabolol tem ação antinociceptiva e que pode estar relacionada a alterações na síntese/degradação ou ação de algum mediador inflamatório. Assim, torna-se de suma importância caracterizar as ações antiinflamatórias do composto em estudo em modelos envolvendo diferentes agentes inflamatórios, para que possa ser mais bem caracterizada a farmacologia do (-)- α -bisabolol.

A inflamação aguda induzida pela injeção intraplantar, na pata traseira de roedores, de vários agentes flogísticos tem sido um procedimento amplamente utilizado para estudo e avaliação de agentes anti-inflamatórios (COLE et al., 1994). A carragenina é um agente inflamatório capaz de produzir edema na pata de roedores caracterizado pelo exudato aquoso contendo proteínas plasmáticas e extravasamento de neutrófilos e metabólitos do ácido araquidônico oriundos da via da Cicloxigenase e Lipoxigenase. (ZHANG et al., 2007). O edema de pata induzido por carragenina tem sido amplamente utilizado na investigação de agentes anti-inflamatórios, sendo talvez o modelo de edema mais bem estudado (EL-SHENAWY et al., 2002; COLE et al., 1994). Inicialmente há extravasamento de proteínas plasmáticas para o espaço intersticial, em seguida segue-se o extravasamento aquoso para o meio extravascular (GARCIA LEME et al., 1973).

O evento inflamatório subsequente à aplicação intraplantar de carragenina tem pico edematogênico máximo ao redor de 3h, e parece ser mais bem caracterizado em três fases de acordo com Di Rosa et al. (1971) onde a primeira fase seria mediada principalmente pela liberação local de histamina e serotonina (0 – 1,5 h), a segunda estaria relacionada à liberação de cininas e a terceira (2,5 – 6 horas após a aplicação de carragenina) estaria relacionada às ações das prostaglandinas. Além desses mediadores, existe importante participação de substância P, óxido nítrico, infiltração de neutrófilos e produção de radicais livres derivados

como hidroxil e superóxido estando todos ligados à formação de edema pela carragenina (DAWSON et al., 1991; GILLIGAN et al., 1994; SALVEMINI et al., 1996).

No presente trabalho, o (-)- α -bisabolol foi capaz de reduzir o edema induzido por carragenina em relação aos controles em todos os tempos, medidos a cada hora, durante quatro horas, assim como a indometacina. Esses resultados confirmam a atividade antiinflamatória do (-)- α -bisabolol corroborando com os resultados obtidos na segunda fase do teste da formalina.

Vários trabalhos mostram que o pré-tratamento com AINEs, antihistaminicos, antagonistas de serotonina, zafirlukast, um antagonista de receptores de leucotrienos, inibidores da síntese de NO e melatonina são capazes de atenuar a formação de edema induzido por carragenina (GARCIA LEME et al., 1973; JAIN et al., 2001; EL-SHENAWY et al., 2002), por mecanismos diferentes, confirmando que a resposta inflamatória a esse agente flogístico é multifatorial e responde a diversas classes de drogas. Assim, não é possível associar diretamente a ação do (-)- α -bisabolol a um mediador inflamatório específico. Com base nestas considerações, foi avaliado o efeito da droga teste nos modelos de edema induzido por dextrano, serotonina e histamina na tentativa de se aproximar da ação específica do (-)- α -bisabolol.

O edema produzido pela administração intraplantar de dextrano é desenvolvido pela liberação de mediadores vasoativos de mastócitos. Este edema possui exudato pobre em proteínas e neutrófilos, e não é revertido pela administração de AINEs. Os principais mediadores desse tipo de edema são histamina e serotonina, e, portanto, dessa forma, as drogas de referencia nesse ensaio são drogas que atuam sobre esses transmissores locais (LO et al., 1982). Os resultados do presente trabalho mostraram que o (-)- α -bisabolol foi efetivo em reverter o edema induzido por dextrano em todos os tempos medidos, semelhante à ciproeptadina, droga de referência utilizada. Dessa forma é possível associar em algum grau a atividade antiedematogênica da droga com a interferência na síntese/liberação ou bloqueio das ações da histamina e/ou 5-HT.

Dando sequência às investigações, para que fosse avaliado a influencia da histamina e serotonina, diretamente, foram realizados edemas induzidos por injeção intraplantar dessas substâncias. Essas substâncias desempenham importante papel na alteração do tônus e

permeabilidade vascular, contribuindo para o extravasamento de fluídos. O (-)- α -bisabolol não conseguiu reverter o edema induzido pela administração intraplantar de histamina, sugerindo que a histamina não está diretamente relacionada à atividade antiedematogênica/antiinflamatória do (-)- α -bisabolol nas doses utilizadas.

Do contrário, (-)- α -bisabolol foi efetivo em reduzir o edema induzido pela aplicação de 5-HT, sugerindo que o (-)- α -bisabolol interfere nas ações desse transmissor. De fato, Cole et al. (1994) mostrou que drogas bloqueadoras dos receptores de 5-HT reduzem a formação de edema formado pela 5-HT, e que este efeito é mais evidente com os bloqueadores específicos de receptores 5-HT₂. Porém outras drogas como antagonistas de receptores dopaminérgicos do tipo 2 e ioimbina também reduzem em certo grau o edema induzido por 5-HT. Assim, mesmo que o (-)- α -bisabolol tenha reduzido o edema induzido por 5-HT, não se pode excluir, baseado nesse estudo, a sua interferência com outros mediadores como noradrenalina e dopamina.

LEITE et al. (2008) verificaram atividade gastroprotetora de um óleo essencial extraído da casca de *Vanillosmopsis arborea* contendo (-)- α -bisabolol em sua composição no modelo de úlcera induzida por etanol. No entanto, é muito importante descrever a verdadeira atividade desta substância pura utilizando modelos de lesões gástricas, principalmente em relação aos estudos de mecanismos de ação desde que em óleos essenciais várias substâncias diferentes estão presentes em sua composição.

Sabe-se que vários mecanismos parecem estar relacionados com a produção de úlcera gástrica, e desta forma não é possível sugerir um único mecanismo para explicá-la. Com base nisso, a fim de investigar o efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol, diferentes ferramentas farmacológicas foram utilizados no decorrer deste trabalho.

A administração intragástrica de etanol constitui um modelo clássico de indução de lesões gástricas em animais utilizado para o estudo fisiopatológico e para a prospecção de novas moléculas (KWIECIEN et al., 2002; KONTUREK et al., 1998; KONTUREK et al., 2001). A gênese das lesões gástricas induzidas por etanol é de origem multifatorial; está associada a uma diminuição na quantidade de muco gástrico, com o comprometimento da capacidade da barreira mucosa em evitar a re-difusão de íons H⁺ (DAVENPORT, 1969), e com a produção significativa de radicais livres levando a um aumento da peroxidação lipídica, que, por sua vez, provoca danos às células e membranas celulares (KHAZAEI & SALEHI,

2006). O resultado é a formação de lesões que se apresentam na forma de necrose, congestão, erosão e hemorragias da parede do estômago (SZABO, 1985; AL-HARBI et al., 1997; ALQASOUMI et al., 2009).

As lesões gástricas induzidas por etanol têm como provável ponto de partida a capacidade do etanol penetrar rapidamente na mucosa, e causar direta ou indiretamente, pela liberação de produtos vasoativos, lesão endotelial em capilares superficiais e vênulas profundas. O dano vascular resulta, então, em aumento da permeabilidade vascular e diminuição do fluxo sanguíneo levando à paralisação circulatória completa em capilares superficial 1-2 minutos após administração intragástrica de etanol concentrado (SZABO et al., 1985; SZABO et al., 1987).

Tem sido relatado a influencia de vários fatores no desenvolvimento das lesões gástricas associado ao etanol. Szelenyi & Brune (1988) mostraram a marcada influência da formação de radicais livres para desenvolvimento de lesões, observando que a redução da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) provoca grande aumento nos danos em resposta ao etanol. No mesmo estudo, foi relatado que compostos com propriedades de seqüestrar radicais livres como dimetilsulfóxido e compostos sulfidrílicos são efetivos ao impedir ou diminuir o dano sobre a mucosa gástrica após a administração de etanol.

O presente trabalho mostrou que a administração intragástrica de etanol aos animais produziu grandes áreas de ulceração nos estômagos dos animais analisados. A administração de (-)- α -bisabolol 100 e 200 mg/kg, v.o. previamente à administração de etanol foi efetiva em diminuir substancialmente as áreas lesionadas em resposta ao etanol. Dessa forma, demonstramos indubitavelmente o potencial gastroprotetor do (-)- α -bisabolol nas doses utilizados frente ao estímulo necrosante do etanol. Ademais, esses resultados nos permitem associar, pelo menos em parte, que o efeito gastroprotetor encontrado por Leite et al. (2009) está ligado à presença de (-)- α -bisabolol na constituição do óleo essencial utilizado.

O dano gástrico causado pelo etanol pode ser atenuado por algumas substâncias, por mecanismos diferentes, como dito anteriormente. Wong et al. (1990) sugeriram fortemente que a 5-HT tem um importante envolvimento na formação de úlcera induzida por etanol. De fato, o autor verificou que a administração prévia de 5-HT piora as lesões gástricas induzidas pelo etanol e que o tratamento com metisergida, um antagonista dos receptores 5-HT, reverte

o efeito lesivo do etanol. Esse efeito protetor da metisergida seria associado a sua capacidade de aumentar o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica, impedindo a estase sanguínea gerada pelo etanol. Confirmando esses dados, Ohta et al. (1999) demonstraram a capacidade da ciproptadina, um antagonista misto dos receptores de 5-HT e H1, em aumentar o fluxo sanguíneo gástrico e reduzir a lesão gástrica aguda induzida por outras drogas, como o composto 48/80.

Assim, durante procedimento experimental de indução de úlcera pelo etanol para avaliar a atividade gastroprotetora do (-)- α -bisabolol, foi utilizado a ciproptadina na dose de 10 mg/Kg v.o. como droga de referência capaz de diminuir as áreas lesadas pelo etanol. Os resultados obtidos confirmaram a ação gastroprotetora da ciproptadina frente ao modelo de úlcera induzida por etanol.

Sabe-se, que anti-inflamatórios não-esteróides (AINEs), como a indometacina, produz danos gastrintestinais principalmente em consequência da diminuição de prostaglandinas gastroprotetoras através da inibição da ciclooxigenase (COX). Estas prostaglandinas reforçam fatores defensivos como a produção de muco, o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica e diminuição da secreção ácida (LANZA et al., 1995).

Prostaglandinas (PGs), como descrito anteriormente, desempenham um papel importante na citoproteção gástrica (MATSUDA & YOSHIKAWA 1999). Sabe-se que a PGE2 e PGI2 no estômago, são capazes de diminuir a secreção ácida, a produção de pepsina, e causar dilatação no músculo liso vascular (COHEN, 1987). Foi também proposto que algumas das ações das prostaglandinas, como a vasodilatação, pode ser devido a ativação de canais de K^+ _{ATP} através da proteína quinase A (PKA) (EGUCHI et al., 2007).

A indometacina tem sido comumente utilizada como substância produtora de dano gástrico em protocolos experimentais tanto para o estudo de mecanismos fisiopatológicos como para testes de drogas com potencial antiulcerogênico. A inibição da produção de prostaglandinas e conseqüentemente o enfraquecimento de diversos fatores defensivos para mucosa gástrica que tem seus efeitos atribuídos ou facilitados pelas PGs é o mecanismo pelo qual a indometacina e os demais AINEs produzem úlceras gástricas (DE SOUZA et al., 2002).

Subjacente a superfície epitelial do estômago há uma densa rede de capilares. Além de fornecer nutrientes e oxigênio para o epitélio, a microcirculação também remove, dilui e neutraliza as substâncias tóxicas que são difundidas da luz para a mucosa. Quando o epitélio está danificado, a microcirculação também desempenha um papel crítico na criação de um microambiente tornando-o um local mais propício para a reparação do dano (WALLACE & GRANGER, 1996). Os AINES podem reduzir o fluxo sanguíneo da mucosa em uma variedade de espécies animais, incluindo seres humanos (VIGNERI et al., 1992). Comprometendo desta forma as importantes funções da microcirculação gástrica.

Além disso, a ingestão de AINEs está associada com um aumento da absorção de sacarose luminal (SUTHERLAND et al, 1994) sugerindo que uma perda da função da barreira da mucosa gástrica pode ocorrer como consequência da isquemia e dano. Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar a redução no fluxo sanguíneo causada pelos AINEs. Em primeiro lugar, é a inibição direta da síntese de prostaglandinas vasodilatadoras (VIGNERI et al., 1992). Foi também relatado que essas drogas são capazes de induzir espasmos da musculatura lisa gástrica (PIASECKI & THRASIVOULOU, 1993) e assim induziriam isquemia por compressão direta da vasculatura (TREVETHICK et al., 1995).

Lee et al. (1992) demonstraram que as lesões associadas ao tratamento com AINEs são dependentes de processos envolvendo o recrutamento e ativação de neutrófilos, verificando que animais com neutropenia profunda induzida são refratários às lesões induzidas por AAS. Wallace et al. (2000) encontraram resultados interessantes em que foi verificado que a adesão de neutrófilo às vênulas mesentéricas gástricas está aumentada no tratamento com indometacina e celecoxib, inibidor seletivo da COX-2, mas não pelo SC-560, inibidor seletivo de COX-1; enquanto o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica está diminuído pela ação da indometacina e SC-560, mas não celecoxib. Estes dados indicam que redução no fluxo sanguíneo da mucosa gástrica é devido à inibição da COX-1, enquanto que a aderência de neutrófilo ao endotélio vascular é devido à inibição da COX-2. Dessa forma tanto a COX-1 quanto a COX-2 estão associadas ao dano gástrico induzido por AINEs.

Para caracterizar a possível ação gastroprotetora do (-)- α -bisabolol frente aos danos gástricos induzidos pelos AINEs, foi utilizado o modelo de Bhargava et al. (1973). Os resultados do tratamento prévio com (-)- α -bisabolol, 100 mg/Kg, v.o. no modelo de lesões gástricas induzida por indometacina, mostraram que, à semelhança da ranitidina 25 mg/Kg,

v.o., o (-)- α -bisabolol foi eficaz, em proteger a mucosa gástrica contra a lesão induzida pela indometacina. No entanto, apesar da indometacina ser um AINE, supressor da síntese de PGs, estes resultados não significam necessariamente que a ação protetora da droga é, de fato, diretamente ligada ao aumento na síntese ou diminuição do metabolismo das PGs, visto que o desenvolvimento, ou proteção, desse tipo lesão depende de vários fatores. Destarte, drogas antissecretórias conhecidas como antagonistas dos receptores de histamina H₂, como ranitidina, são freqüentemente usadas como droga de referência neste modelo, devido a uma redução das lesões gástricas através da diminuição da secreção ácida (ADEYEMI et al., 2005). Da mesma maneira, substâncias com diferentes propriedades podem ser efetivas ao reverter o dano gástrico induzido por indometacina, de diversas formas, por exemplo, o ácido ascórbico reduz as lesões induzidas por AINEs ao aumentar as defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas (KOC et al., 2008), a leptina que reduz o infiltrado de neutrófilos (MOTAWI et al., 2008) e o Sildenafil capaz de aumentar a disponibilidade de NO (AYDINLI et al., 2007).

Nesse contexto, o presente trabalho descreve pela primeira vez, a ação antiulcerogênica do (-)- α -bisabolol frente aos modelos de úlcera aguda utilizando indometacina e etanol em camundongos. Neste sentido, então, a fim de investigar o papel das prostaglandinas sobre o efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol no modelo de úlcera induzida por etanol, os camundongos foram pré-tratados com indometacina. Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento com indometacina não foi capaz de reverter o efeito protetor de (-)- α -bisabolol, sugerindo que o aumento da síntese de prostaglandinas provavelmente não está envolvido em sua ação gastroprotetora.

A capacidade da glibenclamida, droga antidiabética da classe das sulfoniluréias que fecham os canais de potássio dependente de ATP (K^+_{ATP}), e o diazóxido um vasodilatador que abre os canais K^+_{ATP} , de alterar os efeitos gastroprotetores de algumas drogas tem sido aceita como evidência para sugerir o envolvimento desses canais na fisiologia das funções gástricas (SAKAI et al., 1999). Neste sentido, Eguchi et al. (2007) demonstraram que prostaglandinas endógenas são capazes de agir como ativadores dos canais K^+_{ATP} , sugerindo pelo, menos em parte, que as ações de gastroproteção das prostaglandinas estão ligadas a esse mecanismo.

Com base nestes dados, e objetivando investigar o envolvimento do K^+_{ATP} , neste trabalho foi realizado tratamento prévio com glibenclamida para avaliar sua influência sobre a

ação gastroprotetora do (-)- α -bisabolol. Os dados não mostraram diferença na gastroproteção do (-)- α -bisabolol, quando os animais foram previamente tratados com esta droga, sugerindo que os canais de potássio dependente de ATP (K^+_{ATP}) parecem não estar envolvidos com o efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol. Assim, a combinação destes resultados com os resultados obtidos acima indicam que o efeito de protetores sobre a mucosa gástrica do (-)- α -bisabolol em modelos de úlcera induzida por etanol parecem ser independentes de prostaglandinas e K^+_{ATP} .

O óxido nítrico é considerado como mediador crucial na defesa da mucosa gastrintestinal (MUSCARÁ & WALLACE, 1999). Kato et al. (1998) demonstraram o efeito inibitório do NO sobre a produção de ácido gástrico e BERG et al. (2004) utilizando técnicas de imunohistoquímica encontraram células contendo NOS endotelial em íntimo contato com as células parietais gástricas secretoras de ácido, sugerindo pelo menos em parte, que a secreção ácida seja mediada pela secreção parácrina de NO. O óxido nítrico está envolvido na manutenção do fluxo sanguíneo basal da microcirculação gástrica e no aumento deste fluxo em repostas a estímulos como a pentagastrina e o ácido gástrico (GUTH, 1992). Brown et al. (1993) utilizando células isoladas da mucosa gástrica, determinaram que o NO e o aumento da concentração de GMPc nestas células estão associados ao aumento da secreção de bicarbonato pela epitélio gástrico.

Foi demonstrado que substâncias exógenas doadoras de NO como o S-nitro-N-acetilpenicilamina (SNAP) e o nitroprussiato de sódio são capazes de contribuir com a proteção gástrica, aumentando a produção de muco e secreção de bicarbonato, bem como pela diminuição da aderência dos leucócitos ao endotélio vascular (MUSCARÁ & WALLACE, 1999).

Uma importante classe de novas drogas tem usado as propriedades gastroprotetoras do NO para diminuir a toxicidade dos AINEs sobre a mucosa gastroduodenal. Tratam-se dos NO-AINEs que são derivados de drogas antiinflamatórias inibidoras da COX e, conseqüentemente, da síntese de PGs, capazes de liberar NO por prolongados períodos de tempo e assim prevenir os efeitos adversos associados ao uso desses anti-inflamatórios sem alterar a eficácia do composto original (WALLACE & DEL SOLDATO, 2003).

Com base nestas considerações, no presente trabalho, foi avaliado também o envolvimento do NO, entre os possíveis mecanismos de proteção gástrica associados ao (-)- α -bisabolol no modelo de úlcera induzida pelo etanol.

Tem sido bem relatado que o NO é capaz de atenuar as lesões gástricas induzidas pelo etanol (MACNAUGHTON, 1989 & MASUDA, 1995). MASUDA et al. (1995) mostraram que as drogas que bloqueiam a síntese de NO agravam micro e macroscopicamente as lesões associadas ao etanol aplicado intragastricamente e reduzem o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica tanto em situação fisiológica quanto agravando as alterações na hemodinâmica gástrica induzida pelo etanol. Estes efeitos eram antagonizados pela administração de L-arginina, sugerindo assim que a modulação da microcirculação gástrica pelo NO é responsável em parte pela sua gastroproteção frente ao etanol. No presente trabalho o L-NAME piorou drasticamente as úlceras induzida por etanol e esse efeito foi revertido pela presença de L-arginina na dose de 600 mg/Kg.

De fato, já foi demonstrado que compostos como o sildenafil, inibidor seletivo da enzima fosfodiesterase que degrada GMPc, gerado em resposta ao NO intracelular, possui ação gastroprotetora contra as lesões induzidas por etanol em modelos animais. A administração de L-NAME anula seu efeito protetor, enquanto a administração conjunta de L-NAME e L-Argina restaura o efeito gastroprotetor do sildenafil sobre a mucosa gástrica, sendo possível, então, associar a síntese de NO ao seu efeito (MEDEIROS et al., 2008).

A utilização de inibidores da síntese de NO, como L-NAME, tem sido feita extensamente para avaliar o efeito da via de síntese do NO sobre o efeito gastroprotetor de várias drogas (LEITE et al., 2008; GUEDES et al., 2008; CAMPOS et al., 2008). Neste sentido, no presente trabalho, a administração prévia de L-NAME, um conhecido inibidor competitivo não-seletivo da NOS, não foi capaz de alterar a proteção gástrica associada ao (-)- α -bisabolol, que, foi efetivo ao diminuir a área associada às úlceras gástricas induzidas por etanol, em comparação aos controles, mesmo quando a síntese de NO estava suprimida.

Baseando-se nos dados expostos e na manipulação farmacológica realizada com o (-)- α -bisabolol e o L-NAME, os resultados deste trabalho levam-nos a sugerir que a gastroproteção exibida pelo (-)- α -bisabolol frente ao etanol é NO independente, desde que seu

efeito foi o mesmo tanto em animais sem influência na síntese natural de NO (sem L-NAME), quanto em animais que tiveram sua síntese suprimida (tratados com L-NAME).

Muita atenção tem sido destinada aos efeitos protetores de drogas antioxidantes em vários órgãos e sistemas. No estômago, o etanol é capaz de causar peroxidação lipídica, e inibição de enzimas com atividade antioxidante como Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT) (INEU et al., 2008). Outros estudos confirmam o papel central de radicais livres no desenvolvimento do dano gástrico associado ao etanol. Como dito anteriormente, potentes *scavengers* (seqüestradores) de radicais hidroxilas como, tiocianato e tiourea, são eficazes para proteger a mucosa gástrica contra os efeitos nocivos do etanol (SZELENYI & BRUNE, 1988).

A glutathiona reduzida (GSH) se encontra em grandes concentrações na mucosa gástrica se inserindo como um dos fatores defensivos deste tecido com grande importância na redução do estresse oxidativo, por eliminar radicais livres, reduzir os peróxidos e se complexar com compostos eletrofílicos de maneira a proteger estruturas celulares protéicas, DNA e lipídeos, além de proteger a célula de outros produtos tóxicos (HAYES & MCLELLAN, 1999; KIMURA et al., 2001). A enzima GSH peroxidase é capaz de detoxificar peróxidos de lipídios e radicais peróxidos na mucosa gástrica, através da formação de Glutathiona Oxidada (GSSG) a partir de GSH. Citotoxinas também podem ser eliminadas pela conjugação de GSH catalisada pela Glutathiona-S-transferase. Outros achados revelaram que ocorre diminuição de GSH paralelo ao aumento da atividade de GSSG na mucosa gástrica e dessa forma, o aumento do estresse oxidativo pode ser um dos primeiros mecanismos de lesão da mucosa (SZABO, 1984; SZABO et al., 1987; NAGY et al., 2007).

A literatura mostra que o etanol, entre outras ações, é capaz de depletar as concentrações de GSH. Vários estudos têm demonstrado a eficácia de extratos e substâncias isoladas de plantas com atividade antioxidante que são efetivos em proteger a mucosa gástrica contra as lesões causadas pelo etanol e indometacina (ARECHE et al., 2008; KARAKUS et al., 2009). De fato, compostos contendo sulfidril são conhecidos por prevenir o desenvolvimento do dano induzido por etanol na mucosa gástrica. Pelo menos em parte esse efeito é devido à neutralização de radical hidroxila (SZABO et al., 1981; SALIM, 1990).

Já está bem descrito que as lesões causadas pela indometacina no tecido gástrico estão ligadas à produção de espécies reativas de oxigênio (E.R.O) e comprometimento das defesas

antioxidantes endógenas (NAITO et al., 1998; TAKEUCHE et al., 1991; HALICE et al., 2007). Koc et al. 2008 relataram que a indometacina de fato é responsável pela diminuição da atividade das enzimas Glutationa Peroxidase (GSH-px) e SOD, pela diminuição da concentração de GSH, excessiva peroxidação lipídica e aumento nos níveis de mieloperoxidase no tecido gástrico de animais.

A importância da manutenção de quantidades adequadas de GSH na proteção do tecido gástrico foi demonstrada por alguns pesquisadores (NAGY et al., 2007). Strubelt & Hoppenkamps (1983) e Szabo (1984), demonstraram que a administração exógena de compostos sulfidrílicos, tais como L-cisteína, N-acetil-L-cisteína, cisteamina, penicilamina e GSH exercem proteção dose-dependente contra as lesões na mucosa gástrica induzidas por etanol em rato. Por outro lado, a administração de compostos bloqueadores de grupamentos sulfidrílicos como N-etilmaleimida é capaz de reverter os efeitos protetores de compostos tióis e PG (SZABO et al., 1987 & SZABO, 1987), mostrando, de fato, que o aumento da concentração de compostos sulfidrílicos e formação de GSH constituem mecanismos de defesa contra as lesões induzidas por etanol.

Como demonstrado anteriormente o etanol diminui o conteúdo gástrico de GSH, bem como, favorece o aumento excessivo da peroxidação. Alguns estudos também evidenciaram os efeitos gastroprotetores da glutatona reduzida (GSH) (SZABO, 1981) e que compostos doadores de grupamentos sulfidrílicos como N-acetil cisteína são capazes de diminuir as lesões gástricas induzidas por etanol (GUEDES et al., 2008). Levando em conta todas estas considerações decidimos avaliar o envolvimento do metabolismo do GSH sobre o efeito protetor gástrico associado ao (-)- α -bisabolol. Da mesma forma que trabalhos anteriores conduzidos por Szabo et al. (1981), Strubelt & Hoppenkamps (1983), Guedes et al. (2008) e Shine et al. (2009), nosso estudo mostrou que o etanol reduziu significativamente o conteúdo gástrico de glutatona, em comparação com os animais que não receberam etanol, enquanto que a administração prévia de (-)- α -bisabolol foi capaz de atenuar a depleção de GSH causada pelo etanol. No entanto, a administração de (-)- α -bisabolol não foi capaz de aumentar o conteúdo gástrico de GSH em animais sem tratamento intragástrico de etanol (sem indução de úlceras), em comparação ao grupo controle tratado com solução fisiológica. Por outro lado, nossos estudos mostraram que a NAC, um aminoácido precursor da síntese de GSH, foi responsável por um aumento de GSH no estômago de animais sem indução de úlcera em comparação aos animais controles.

Como citado anteriormente a indometacina diminui a concentração gástrica de GSH (BILIÇI et al., 2008; ODABASOGLUA et al., 2006), similarmente a esses trabalhos, os nossos resultados mostraram que as lesões induzidas por indometacina são acompanhadas da redução do conteúdo gástrico de GSH. Nos também mostramos que a administração prévia de (-)- α -bisabolol foi capaz de elevar os níveis de GSH em animais que tiveram lesões induzida por indometacina em relação aos animais que receberam apenas veículo. Estes resultados juntos sugerem que os efeitos promovidos pelo (-)- α -bisabolol de proteção gástrica frente aos danos gerados por indometacina estão associados à diminuição da degradação do GSH pela indometacina.

Assim, os resultados do presente trabalho sugerem enfaticamente que o efeito gastroprotetor do (-)- α -bisabolol está relacionado à capacidade de diminuir o decréscimo do conteúdo gástrico de GSH causado pelo etanol e pela indometacina, aumentando assim a sua disponibilidade gástrica. De fato, o (-)- α -bisabolol não parece aumentar a síntese endógena de GSH, desde que, além do fato de não ser um composto precursor da síntese de GSH, os nossos resultados mostraram que administração de (-)- α -bisabolol não aumenta as concentrações de GSH em estômagos de animais sem lesões gástricas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O (-)- α -bisabolol foi testado em relação a sua atividade farmacológica em modelos de nocicepção, inflamação e úlcera. Os resultados obtidos neste estudo nos permitem levantar as seguintes considerações:

- O (-)- α -bisabolol nas doses de 25 e 50 mg/Kg possui atividade antinociceptiva, evidenciada nos testes de contorções induzidas pelo ácido acético e na segunda fase do teste da formalina.
- O efeito antinocicetivo do (-)- α -bisabolol não sofre influência de alteração na capacidade motora dos animais nas doses de 25 e 50 mg/Kg, como avaliado no teste da barra giratória.
- A atividade antinociceptiva parece não estar relacionada com mecanismos centrais, pois não houve qualquer efeito sobre o teste da placa quente.
- O (-)- α -bisabolol possui ação anti-inflamatória caracterizada por sua ação na segunda fase do teste da formalina juntamente com a capacidade marcante em reduzir os edemas de pata induzidos por carragenina, dextrano e 5-HT.
- A atividade anti-inflamatória do (-)- α -bisabolol parece estar relacionada com as suas ações sobre a 5-HT, pois foi capaz de reduzir o edema induzido por esta substância.
- A atividade anti-inflamatória do (-)- α -bisabolol parece não estar diretamente relacionada com a histamina.
- O (-)- α -bisabolol possui ação gastroprotetora nos modelos de lesões gástricas induzidas por etanol e indometacina.
- A ação gastroprotetora do (-)- α -bisabolol se deve, pelo menos em parte, a uma ação anti-oxidante, evidenciada pela capacidade de reduzir a depleção de GSH causada pelo etanol e indometacina.

7. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho indicam que (-)- α -bisabolol possui atividade antinociceptiva periférica e ação anti-inflamatória que, pelo menos em parte, parece estar relacionada com as suas ações sobre a serotonina. O composto também exibiu um importante efeito gastroprotetor evidenciado por sua ação antioxidante no tecido gástrico.

8. REFERÊNCIAS

Aché vai exportar para os EUA. **GAZETA MERCANTIL**. DISPONÍVEL EM: <<http://www.redetec.org.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=60088&isriointel i=true&sid=145>> Acessado em: 26 de junho de 2009. 20:30.

ADEYEMI, E.O.; et al. Mechanisms of action of leptin in preventing gastric ulcer. **World J Gastroenterol**. v. 11, n.27, p. 4154-4160, 2005.

AKKOL, E. K.; GUVENC, A.; YESILADA, E. A comparative study on the antinociceptive and anti-inflammatory activities of five *Juniperus* taxa, **Journal of Ethnopharmacology**. In Press, Uncorrected Proof, Available online 8 June 2009, ISSN 0378-8741, DOI: 10.1016/j.jep.2009.05.031.

ALAM. S.; ASAD, M.; ASDAQ, S.M.; PRASAD, V.S. Antiulcer activity of methanolic extract of *Momordica charantia* L. in rats. **J Ethnopharmacol**. v.123,p 464–469, 2009.

Al-Harbi M.M., Qureshi S., Raza M., Ahmed M.M., Afzal M., Shah A.H. Gastric antiulcer and cytoprotective effect of *Commiphora molmol* in rats. **J Ethnopharmacol**. v. 55, p. 141-150, 1997.

ALLEN, A.; FLEMSTRO, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **Am J Physiol Cell Physiol**. v. 288, p. 1–19, 2005.

ALMEIDA, F.R.C & OLIVEIRA F.S. Avaliação de drogas analgésicas de ação central. In: *Psicofarmacologia: Fundamentos Práticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 179-188, 2006.

ALQASOUMI, S.; et al. Rocket “*Eruca sativa*”: A salad herb with potential gastric anti-ulcer activity. **World J Gastroenterol**. v. 15, n. 16, p. 1958–1965, 2009.

AMARAL, J.F. et al. Antinociceptive Effect of the Monoterpene R-(+)-Limonene in Mice Biol. **Pharm Bull**. v. 30, p. 1217-1220, 2007.

ARAGÃO, G.F.; et al. Analgesic and anti-inflammatory activities of the isomeric mixture of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **J Herb Pharmacother**. v. 7, n. 02, p. 31-47. 2007.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice. A review. **Anim. Behav.**, v. 21, p. 205-35, 1973.

ARECHE, C. et al. Gastroprotective activity of ferruginol in mice and rats: effects on gastric secretion, endogenous prostaglandins and non-protein sulfhydryls. **J Pharm Pharmacol**. v. 60, n. 02, p. 245-251, 2008.

AYDINLI, B.; et al. The role of sildenafil citrate in the protection of gastric mucosa from nonsteroidal antiinflammatory drug-induced damage. **Ulus Travma Acil Cerrahi Derg**. v.13, n. 04, p. 268-73, 2007.

AZERKAN, L. et al. Characterization of oxyntic glands isolated from the rat gastric mucosa. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**. v. 28, n. 02, p. 349-357, 2001.

BAZZOLI, F.; DE LUCA, L.; GRAHAM, D.Y. Helicobacter pylori infection and the use of NSAIDs. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**. v. 15, n. 05, p. 775-785, 2001.

BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the nociception and paw edema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Res.**, v. 924, p. 219-228, 2002.

BERG, A. et al. Nitric oxide-an endogenous inhibitor of gastric acid secretion in isolated human gastric glands. **BMC Gastroenterology**. v. 4, p. 16, 2004.

BHARGAVA, K.P.; GUPTA, M.B.; TANGRI, K.K. Mechanism of ulcerogenic activity of indomethacina and oxyphenbutazone. **European Journal of Pharmacology**, v. 22, p. 191-195, 1973.

BILICI, D. et al. Melatonin prevents ethanol-induced gastric mucosal damage possibly due to its antioxidant effect. **Digestive Diseases and Sciences**. v. 47, n. 04, p. 856-861, 2002.

BILIÇI, M. et al. Protective Effect of Mirtazapine on Indomethacin-Induced Ulcer in Rats and Its Relationship with Oxidant and Antioxidant Parameters. **Digestive Diseases and Sciences**. v. 54, p. 1868-1875, 2009.

BITTENCOURTI, P.F.S. et al. Úlcera péptica gastroduodenal e infecção pelo Helicobacter pylori na criança e adolescente. **J. Pediatr.** v. 82, n. 05, p. 325-334, 2006.

BLASER, M.J. Intrastrain differences in Helicobacter pylori: a key question in mucosal damage? **Ann Med.** v. 27, p. 559-563, 1995.

BLECKER, U. Helicobacter pylori-associated gastroduodenal disease in childhood. **J La State Med Soc.** v. 150, p. 419-29, 1998.

BOTTING, R.M. Inhibitors of cyclooxygenases: Mechanisms, selectivity ad uses. **Journal of physiology and pharmacology**. v. 57, p. 113-112, 2006.

BOURA, A.L.A.; SVOLMANIS, A.P. Converting enzyme inhibition in the rat by captopril is accompanied by potentiation of carrageenin-induced inflammation. **Br J Pharmacol.**, v. 82, p. 3-8, 1984.

BRAGA, P.C. et al. Antioxidant activity of bisabolol: inhibitory effects on chemiluminescence of human neutrophil bursts and cell-free systems. **Pharmacology**. v. 83, n. 02, p. 110-115, 2009.

BREHM-STECHER, B.F.; JOHNSON, E.A. Sensitization of Staphylococcus aureus and Escherichia coli to Antibiotics by the Sesquiterpenoids Nerolidol, Farnesol, Bisabolol and Apritone. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 3357-3360, 2003.

BRENNAN, F.; CARR D.B.; COUSINS, M. Pain Management: A Fundamental Human Right. **Anesth Analg.**, v. 105, p. 205-221, 2007.

BROWN, F. et al. Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells J. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.**, v. 265, p. 418-422, 1993.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **J Ethnopharmacol.** v.100,p 131-134. 2005.

CAMPOS, D.A. et al. Gastroprotective effect of a flavone from *Lonchocarpus araripensis* Benth. (Leguminosae) and the possible mechanism. **J Pharm Pharmacol.** v. 60, n. 3, p. 391-397, 2008.

CARLINI, E.A. et al. Pharmacology of Lemon-grass (*Cymbopogon citratus* Stapf). Effects of teas prepared from leaves on laboratory-animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 17, p. 37-64, 1986.

CARLINI, E.A.; BURGOS, V. Screening farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam e o clorobenzapam. **Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria**, v. 1, p. 25-31, 1979.

CERVERO, F.; LAIRD, J.M. Visceralpain. **Lancet**, v. 19, p. 2145-2148, 1999.

CHANDRASEKHARAN, N.V. et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 99, p. 3926-31, 2002.

CHILDERS, S.R. Opioid receptor: pinning down the opiate targets. **Curr. Biol.** v. 7, p. 695-697, 1997.

CNUBBEN, N.H.P. et al. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology.** v. 10, p. 141-152, 2001.

COELHO, L.G.V.; ZATERKA, S. II Consenso Brasileiro sobre *Helicobacter pylori*. **Arq. Gastroenterol.**, São Paulo, v. 42, n. 2, June 2005 . DISPONÍVEL EM: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-28032005000200012&lng=en&nrm=iso>. ACESSO EM: 06 jul. 2009. doi: 10.1590/S0004-28032005000200012

COHEN, M.M. Role of endogenous prostaglandins in gastric secretion and mucosal defense. **Clinical and Investigative Medicine.** v. 10, n. 3, p. 226–231, 1987.

COLE, H.W., et al. Serotonin-induced paw edema in the rat: pharmacological profile. **Gen Pharmacol.** v.26, p 431-416, 1995.

COLLIER, H.O.J.; et al. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in mouse. **Br. J. Pharm.** v. 32, p 295-310, 1968.

COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In: CONTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T.; ROBBINS. Pathologic basis of disease. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999.

CORRAO, G. et al. A meta-analysis of alcohol consumption and the risk of 15 diseases. **Preventive Medicine**, v. 38, p. 613-619, 2004.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. T. Robbins & Cotran, **Patologia - Bases Patológicas das Doenças – 7^a Ed.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2005

CRAMPTON, J.R.; GIBBONS, L.C.; REES, W.D.W. Effect of luminal pH on the output of bicarbonate and PGE₂ by normal human stomach. **Gut**. v. 28, p. 1291–1295, 1987.

CUNHA F.M., Additional evidence for the anti-inflammatory and antiallergic

DAWSON, J. et al. Comparative study of the cellular, exudative and histological responses to carrageenan, dextran and zymosan in the mouse. **Int J Tissue React**. v. 13, p. 171-185, 1991.

DE ANDRADE, S.F. et al. Evaluation of the antiulcerogenic activity of *Maytenus robusta* (Celastraceae) in different experimental ulcer models. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 113, n. 02, p. 252-257, 2007.

DE LIRA, P.N. et al. Essential oil composition of three *Peperomia* species from the Amazon, Brazil. **Nat Prod Commun**. v. 4, n. 03, p. 427-30, 2009.

DE SOUZA, G.E. et al. A comparative study of the antipyretic effects of indomethacin and dipyrrone in rats, **Inflammation Research** v. 51, p. 24–32, 2002.

DERAEDT, R.; et al. Inhibition of prostaglandins biosynthesis by non-narcotic analgesic drugs. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther**. v. 224, p 30-42, 1976.

DI ROSA, M., et al. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J Pathol**. v.104, p 15–29. 1971.

DICKENSON, A.; BESSON, J.M. The pharmacology of pain. Berlin: Springer, 1997.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br J Anaesth**, v. 75, p. 125-131, 1995.

DUBOIS, R.W.; MELMED, G.Y.; HENNING, J.M.; LAINE, L. Guidelines for the appropriate use of non-steroidal anti-inflammatory drugs, cyclo-oxygenase-2-specific inhibitors and proton pump inhibitors in patients requiring chronic anti-inflammatory therapy. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 19, p. 197-208, 2004.

DUFRESNE, M.; SEVA, C.; FOURMY, D. **Cholecystokinin and Gastrin Receptors** **Physiol Rev**. v.86, p. 805-847, 2006.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficits in rats and mice. **J. Am. Pharm. Assoc.**, v. 46(3), p. 208, 1957.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G.; Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 39, n. 04, p. 343-350, 2003.

EASTWOOD, G.L. Epithelial renewal in gastroduodenal mucosal injury. In: HARMON, J.W. (Ed.) **Basic Mechanisms of Gastrointestinal Mucosal Cell Injury**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1981.

EASTWOOD, G.L.; QUIMBY, G.F. Effect of chronic aspirin ingestion on epithelial proliferation in rat fundus, antrum, and duodenum. **Gastroenterology**.v. 82, p. 852-856; 1982.

EDDY, N.B.; LEIMBACH, D.J. Synthetic analgesics. Iidithienyl – butenyl and dithienylbutylamines. **J. Pharmac. Exp. Ther.**, v. 107, p. 385-393, 1953.

EGUCHI, S.; et al. Effects of prostaglandin E1 on vascular ATP-Sensitive potassium channels. **J Cardiovasc Pharmacol**. v. 50, n. 06, p. 686-691, 2007.

EL-SHENAWY, S.M.;. Studies on the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of melatonin in the rat. **Pharmacol Res**. v.463, p. 235-43, 2002.

FABRICANT D.S; FARSWORTH N.R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environ Health Perspect** v.109, p. 69–75, 2001. DISPONÍVEL EM <<http://ehpnet1.niehs.nih.gov/docs/2001/suppl-1/69-75fabricant/abstract.html>> Acesso em: 28 de jun. 2009.

FÄNDRIKS, L.; JÖNSON, C. Vagal and sympathetic control of gastric and duodenal bicarbonate secretion. **J Intern Med Suppl**. v. 732, p. 103-107, 1990.

FARMER, S.G.; BURCH, R.M. Biochemical and molecular pharmacology of kinin receptors. **Annu. Ver. Pharmacol. Toxicol**. v.32, p. 511, 1992.

FARNSWORTH, N.R.; SOEJARTO, D.D. Global importance of medicinal plants, in: AKERELE, O.; HEYWOOD, V.; SYNGE, H. (EDS), **Conservation of medicinal plants**. Cambridge University Press, Cambridge p. 25–51, 1991.

FATTMAN, C. L.; SCHAEFER, L. M.; OCRY, T. D. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, n. 03,p. 236-256, 2003.

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DE GASTROENTEROLOGIA. DISPONÍVEL EM <<http://www.fbg.org.br>>. ACESSO EM: 28 Jun. 2009.

FERNANDES, D.; DA SILVA-SANTOS, J.E.; ASSREUY, J. Nitric oxide-induced inhibition of mouse paw edema: involvement of soluble guanylate cyclase and potassium channels. **Inflamm Res**. v. 51, p. 377-384, 2002.

FERREIRA S.H.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hiperalgesia. **Br J Pharmacol**. v.110, p. 1227, 1993.

FERREIRA, S.H. Peripheral analgesia: mechanism of the analgesic action of aspirin-like drugs and opiate-antagonists. **Br J Clin Pharmacol.** v.10, n. 2, p. 237S-245S, 1980.

FESHARAKI, M. et al. Reactive oxygen metabolites and anti-oxidative defenses in aspirin-induced gastric damage in rats: Gastroprotection by Vitamin E. *Pathophysiology.* v. 13, n. 04, p. 237-243, 2006.

FOEGH, M.L; RAMWELL, P.W. Os eicosanóides: prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e compostos relacionados. In: Katzung, B.G. **Farmacologia: básica e clínica.** 9ª Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. p. 252-263, 2005.

FRANÇA, D.S.; et al. B Vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. **Eur J Pharmacol.** v. 421, n. 03, p. 157-164, 2001.

FRIEDMAN, G.D.; SIEGELAUB, A.B.; SELTZER, C.C. Cigarettes, alcohol, coffee and peptic ulcer. **New England Journal of Medicine.** v. 290, p. 469-473, 1974.

FROSCH, F. Bioactive substances from BASF for cosmetics. *Plusce, Srodki Piorace, Kosmet* v.31, p. 144-147, 1987.

GANNON, B. et al. Mucosal microvascular architecture of the fundus and body of the human stomach. **Gastroenterology.** v. 86, p. 866-875, 1984.

GARCIA-LEME, J.; et al. Pharmacological analysis of the acute inflammatory process induced in the rat's paw by local injection of carrageenin and by heating. **Br J Pharmacol.** v. 48, p. 88-96, 1973

GIBALDI, M. Helicobacter pylori and gastrointestinal disease **J. Clin. Pharmacol.** v. 35, p. 647-654, 1995.

GILLIGAN, J.P., et al. Modulation of carragenin hind paw oedema by substance P. **Inflammation.** v.18, p 285-292, 1994.

GOTTFRIED, E.B.; KORSTEN, M.A.; LIEBER, C.S. Alcohol-induced gastric and duodenal lesions in man. **American Journal of Gastroenterology.** v. 70, n. 06, p. 587-592, 1978.

GRAHAM, D.Y. Campylobacter pylori and peptic ulcer disease. **Gastroenterology.** v. 96, n. 02, p. 615-625, 1989.

GRIFFITH, O.W. Biological and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. **Free Rad. Biol. Med.** v. 27, p. 922-935, 1999.

GUEDES, M.M. et al. Gastroprotective mechanisms of centipedic acid, a natural diterpene from *Egletes viscosa* LESS. **Biol Pharm Bull.** v. 31, n. 07, p. 1351-1355, 2008.

GUPTA, M.; MAZUMDER, U.K.; SAMBATH KUMAR, R.; GOMATHI, P.; RAJESHWAR, Y.; KAKOTI, B.B.; TAMIL SELVEN, V. Anti-inflammatory, analgesic

and antipyretic effects of methanol extract from *Bauhinia racemosa* stem bark in animal models, **J Ethnopharmacol.** v. 98, n. 03, p. 267-273, 2005.

GUTH, P.H. Current concepts in gastric microcirculatory pathophysiology. **Yale J Biol Med.** v. 65, p. 677-688, 1992.

HAAS, H.L.; SERGEEVA, O.A.; SELBACH, O. Histamine in the nervous system. **Physiol Rev.** v. 88, p. 1183-241. 2008.

HALICI, Z.; DENGIZ, G.O.; ODABASOGLU, F.; SULEYMAN. H.; CADIRCI. E.; HALICI, M. Amiodarone has anti-inflammatory and anti-oxidative properties: an experimental study in rats with carrageenan-induced paw edema. **Eur J Pharmacol.** v. 566, p. 215-221, 2007.

HAM, A.W. **Histologia.** 9ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

HAYES, J.D. & MCLELLAN, L.I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. **Free Radic Res.** v.4, 373-300, 1999.

HEIDLAND, A., et al. The contribution of Rudolf Virchow to the concept of inflammation: what is still of importance? **J Nephrol.** v.19, p. 102-109, 2006.

HENRIQUES, M.G.M.O.; et al. Mouse paw edema. A new model for inflammation? **Brazilian J. Med. Biological Research,** v. 20, p. 243-249, 1987.

HERZ, A. Handbook of experimental pharmacology. Berlim: **Springer-Verlag.** 1993

HIRATA, E.S. O esvaziamento gástrico e a insuficiência renal crônica. **Rev. Bras. Anesthesiol.,** v. 57, 2007. DISPONÍVEL: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-70942007000400011&lng=en&nrm=iso>. ACESSO EM: 29 de junho 2009. doi: 10.1590/S0034-70942007000400011.

HOOGERWERF, W,A. & PASRICHA, P.J. Gastric acid pharmacotherapy's, peptic ulcer and gastroesophageal reflux disease. In; BRUNTON, L.L. **Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics.** 11ª New York: McGraw-Hill Companies, 2006.

HOUGH, L.B. et al. Antinociceptive activity of derivatives of improgran and burimamide. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 65, p. 61-6, 2000.

HUNSKAAR S, et al.; Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **J NEUROSCI METH** v.14, p. 69-76, 1985.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and noninflammatory pain. **Pain.** v. 30, p. 103-104, 1987.

ILIAS, E.J; KASSAB, P. Úlcera péptica perfurada: sutura ou gastrectomia? **Rev. Assoc. Med. Bras.** v. 51, n. 1, p. 5, 2005.

INEU, R.P. et al. Diphenyl diselenide reverses gastric lesions in rats: Involvement of oxidative stress. **Food and Chemical Toxicology**. v.46(9), P3023-3029, 2008.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN (IASP), 1979. Disponível em: <http://www.iasp-pain.org/terms-p.html>. Acesso em 12/07/2007

ISHIKAWA, T. et al. The GS-X Pump in Plant, Yeast, and Animal Cells: Structure, Function, and Gene Expression. **Bioscience Reports** v. 17, p. 189–207, 1997.

JAIN, N.K.; KULKARNI, S.K.; SINGH, A. Role of cysteinyl leukotrienes in nociceptive and inflammatory conditions in experimental animals. *Eur J Pharmacol*. v. 423, n. 01, p. 85-92, 2001.

JESSEL, T.M.; KELLY, D.D. Pain and analgesia. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. Principles of neural science. New York: Elsevier, p. 385-399, 1991.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001.

JUNQUEIRA, L.C.U. & CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KARAKUS. B., et al. The effects of methanol extract of *Lobaria pulmonaria*, a lichen species, on indometacin-induced gastric mucosal damage, oxidative stress and neutrophil infiltration. **Phytother Res**. v. 23, p 635-639, 2009.

KATO, S. et al. Role of nitric oxide in regulation of gastric acid secretion in rats: effects of NO donors and NO synthase inhibitor. **British Journal of Pharmacology**. v. 123, p. 839-846, 1998.

KATZUNG, B.G. Histamina, Serotonina e Alcalóides do esporão de centeio. In: KATZUNG, B.G. **Farmacologia: básica e clínica**. 9ª Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. p. 219-237, 2005.

KHAZAEI, M.; SALEHI, H. Protective effect of *falcaria vulgaris* extract on ethanol induced gastric ulcer in rat. **Iran J Pharmacol Ther**. v. 05, p. 43–46, 2006.

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

KOC, M.; IMIK, H.; ODABASOGLU, F. Gastroprotective and Anti-oxidative Properties of Ascorbic Acid on Indomethacin-induced Gastric Injuries in Rats. **Biol Trace Elem Res.**, v. 126, p. 222–236, 2008.

KONTUREK P.C.H. et al. Central and peripheral neural aspects of gastroprotective and ulcer healing effects of lipopolysaccharides. **J Physiol Pharmacol**. v. 52, p. 611-623, 2001.

KONTUREK, P.C. et al. Bacterial lipopolysaccharide protects gastric mucosa against acute injury in rats by activation of genes for cyclooxygenases and endogenous prostaglandins. **Digestion**. v. 59, p. 284-297, 1998.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed Proc.**, v. 18, p. 412-417, 1959.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. *Patologia – Bases Patológicas das Doenças*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

KUWAYAMA, H.; EASTWOOD, G. L. Effects of water immersion restraint stress and chronic indomethacin ingestion on gastric antral and fundic epithelial proliferation. **Gastroenterology**. v. 88, p. 362-365, 1985.

KWIECIEŃ, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S.J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. **J Physiol Pharmacol**. v. 53, n. 01, p. 39-50, 2002.

LAINE, L. The gastrointestinal effects of nonselective NSAIDs and COX-2-selective inhibitors. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**. v. 32, n. 03, p. 25-32, 2002.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside, **Gastroenterology**. v. 135, n. 01, p. 41-60, 2008.

LANZA, F.L. A guideline for the treatment and prevention of NSAID-induced ulcers. Members of the Ad Hoc Committee on Practice Parameters of the American College of Gastroenterology. **Am J Gastroenterol.**, v. 93, p. 2037-2046, 1998.

LANZA, L.L.; et al. Peptic ulcer and gastrointestinal hemorrhage associated with nonsteroidal anti-inflammatory drug use in patients younger than 65 years large health maintenance organization cohort study. **Archieve of International Medicine**. v. 155, n. 13, p. 1371-1377, 1995.

LAPA, A.J.; et al. *Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais*. São Paulo: UNIFESP/EPM. 2007.

LAPA, A. J.; et al. *Farmacologia e toxicologia de produtos naturais*. In: SIMÕES, C. M. O.; et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS / Ed. da UFSC, 2000.

LEAL, L.K.A.M. et al. Effects of amburoside A and isokaempferide, polyphenols from *Amburana cearensis*, on rodent inflammatory processes and myeloperoxidase activity in human neutrophils. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. v. 104, n. 03, p. 198-205, 2008.

LEI GUO, et al. Anti-inflammatory and analgesic potency of carboxyamidotriazole, a tumoristatic agent. **American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 325, p. 10-16, 2008.

- LEITE, G.O.; et al. Gastroprotective mechanism of *Vanillosmopsis arborea* bark essential oil. **Fitoterapia**. v. 80, n. 01, p. 77-80, 2008.
- LIMA, Z.P.; et al. Brazilian Medicinal Plant Acts on Prostaglandin Level and *Helicobacter pylori*. **J Med Food**. v. 11, N. 04, P. 701-708, 2008.
- LO, T.N.; ALMEIDA, A.P; BEAVAN, M.A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory response in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **J Pharmacol Exp Ther**. v. 221, p. 261-7, 1982.
- LOESER, J.D.; MELZAC, R. PAIN: AN OVERVIEW. **LANCET**, V.353, N.8, P. 1607-1609, 1999.
- LOPES, L.S. et al. Antinociceptive effect of topiramate in models of acute pain and diabetic neuropathy in rodents. **Life Sci**. v. 84, n. 03, p. 105-110, 2009.
- LORAM, L.C. et al. Cytokine Profiles During Carrageenan-Induced Inflammatory Hyperalgesia in Rat Muscle and Hind Paw. **The Journal of Pain** v. 8, p. 127-136, 2007.
- LOWRY, O.H.; et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**. v. 193, p 265-275, 1951.
- LU, U.; HOLMGREN, A. Selenoproteins, **J. Biol. Chem**. v.284(2), p 723-727, 2009.
- MACMICKING, J.; XIE, Q.; NATHA, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol**. v. 15, p. 323-50, 1997.
- MACNAUGHTON, W.K; CIRINO, G.; WALLACE, J.L. Endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) has protective actions in the stomach. **Life Sci.**, v. 45, p. 1869-1876, 1989.
- MAGGI, C.A. Pharmacology of the efferent function of primary sensory neurons. In: GEPPETTI, P.; HOLZER, P. (Eds) Neurogenic inflammation. London: CRC Press, 1996.
- MAJNO, G.; PALACE, G.E. Studies of inflammation. 1. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. **The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v. 11, p. 571-605, 1961.
- MARQUES, J.O. Dor: diagnóstico e tratamento. **Bases de Anatomia e Fisiopatologia**. São Paulo: Âmbito Editora, v. 1, n. 1, 2004.
- MARSHALL, B.J.; WARREN, J.R. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet**. v. 1, p. 1273-1275, 1983.
- MASUDA, E. et al. Endogenous Nitric Oxide Modulates Ethanol-Induced Gastric Mucosal Injury in Rats. **Gastroenterology**, v. 108, n. 01, p. 58-64, 1995.
- MATÉS, J.M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactiveoxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, p. 83-104, 2000.

MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Gastroprotections of escins Ia, Ib, IIa, and IIb on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. **Eur J Pharmacol.** v. 373, n. 01, p. 63–70, 1999.

MATTEI, R. et al. Guaraná (*Paulinea cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro. **J. Ethnopharmacology**, v. 60, p. 111-116, 1998.

McANDREW, B.A. Sesquiterpenoids: the lost dimension of perfumery. **Perfum Flavour.** v. 17, p. 1-17, 1992.

MCDONALD, D.M.; THURSTON, G.; BALUK, P. Endothelial gaps as sites for plasma leakage in inflammation. **Microcirculation**, v. 6, p. 7-22, 1999.

MCQUAID, K.R. Fármacos utilizados no tratamento de doenças gastrintestinais. In: KATZUNG, B.G. **Farmacologia: básica e clínica.** 9ª Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. p. 865-891, 2005.

MEDEIROS, J.V.; et al. Role of the NO/cGMP/K(ATP) pathway in the protective effects of sildenafil against ethanol-induced gastric damage in rats. **Br. J. Pharmacol.** v.153, p 721-727. 2008.

MERCER, D.W.; SMITH, G.S.; MILLER, T.A. Cyclooxygenase Inhibition Attenuates Cholecystokinin-Induced Gastroprotection. **Digestive Diseases and Sciences.** v. 43, n. 03, p. 468-475, 1998.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol**, v. 57, p. 161-164, 1999.

MOLEIRO, F.C. et al. Mouririelliptica: validation of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* effects. **J Ethnopharmacol.** v. 123, n. 03, p. 359-368, 2009.

MORAES, T.M. et al. Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: Role of prostaglandins and gastric mucus secretion. **Chem Biol Interact.** v. 180, n. 03, p. 499-505, 2009.

MORENO-FERNANDES, M.; ALVARES-PEREIRA, N.; GONÇALVES-PAULO, L.; Anti-inflammatory activity of copaíba balsam (*Copaifera cearensis*, Huber). **Rev Bras Farm.** v. 73, p. 53–56, 1992.

MOTAWI, T.K; ABD ELGAWAD H.M.; SHAHIN N.N. Gastroprotective effect of leptin in indomethacin-induced gastric injury. **J Biomed Sci.**, v. 15, n. 3, p. 405-412, 2008.

MOVAT, H.Z. **The Inflammatory Reaction.** Oxford: Elsevier, p. 49-71, 1985.

MUIR III, W.W. Anaesthesia and pain management in horses. **Equine veterinary education**, v. 10, n. 6, p. 335-340, 1998.

MUSCARÁ, M.N. & WALLACE, J.L. Nitric Oxide. V. therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. **Am J Physiol.** v. 276, p 1313-1316, 1999.

NAGY, L.; NAGATA, M.; SZABO, S. Protein and non-protein sulfhydryls and disulfides in gastric mucosa and liver after gastrototoxic chemicals and sucralfate: Possible new targets of pharmacologic agents. **World J Gastroenterol.**, v. 13, n. 14, p. 2053-2060, 2007.

NAITO, Y. et al. Role of oxygen radical and lipid peroxidation in indomethacin-induced gastric mucosal injury. **Dig Dis Sci.** v. 43, p. 30-34, 1998.

NONATO, F.R. et al. Antiinflammatory and antinociceptive activities of *Blechnum occidentale* L. extract. **J Ethnopharmacol.** v.125, p. 102-107, 2009.

ODABASOGLUA, F. et al. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. **J Ethnopharmacol.** v. 103, n. 01, p. 59-65, 2006.

OHTA, Y.; et al. Role of endogenous serotonin and histamine in the pathogenesis of gastric mucosal lesions in unanaesthetised rats with a single treatment of compound 48-80, a mast cell degranulator. **Pharmacol. Res.** v. 39, p. 79-84, 1999.

PENIDO, C. et al. Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. **Inflamm Res.** v. 55, p. 457-464, 2006.

PETROVIĆ, S.; et al. The antiinflammatory, gastroprotective and antioxidant activities of *Hieracium gymnocephalum* extract. **Phytother Res.**, v. 22, p 1548-1551, 2008

PIASECKI, C.K. & THRASIVOULOU, C. Spasm of gastric muscularis mucosae might play a key role in causing focal mucosal ischemia and ulceration. An experimental study in guinea pigs. **Dig Dis Sci.** v.38, p. 1183-1189, 1993.

PINTO, H.S.A. et al. Antinoceptive effect of triterpenoid alpha,beta-amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. **Phytomedicine.** v. 15, n. 08, p. 630-634. 2008.

PONGPIRIYADACHA, Y.; et al. Protective effects of polygodial on gastric mucosal lesions induced by necrotizing agents in rats and the possible mechanisms of action. **Biol Pharm Bull.** v.26, p 651-657, 2003.

PORTO, C.C. **Exame Clínico: Bases para a Prática Médica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 37-40, 2004.

QUEIROZ, D.M.; et al. Differences in distribution and severity of *Helicobacter pylori* gastritis in children and adults with duodenal ulcer disease. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.** v. 12, p. 178-81, 1991.

RAJA, S.; MEYER, R.A.; RINCKAMP, M.; CAMPBELL, J.N. Peripheral neural mechanism of nociception. In: WALL, P.D. & MELZACK, R. (Eds.). **Textbook of pain.** Edinburgh: Churchill Livingstone, p. 11-57, 1999.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia.**, 5^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003.

RAO, Y.K.; FANG, S.H.; TZENG, Y.M.. Antiinflammatory activities of flavonoids and a triterpene caffeate isolated from *Bauhinia variegata*. **Phytother Res.** v. 22, p. 957-962, 2008.

RAO, V.S. et al. Dragon's blood from *Croton urucurana* (Baill.) attenuates visceral nociception in mice. **J Ethnopharmacol.** v. 113, p. 357-360, 2007.

REYNOLDS, J.E.F. Martindale. **The extra pharmacopoeia** 31^a ed. Londres: The Pharmaceutical Press. 1996.

RIBEIRO, R.A. et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology.** v. 387, p.111-118, 2000.

ROBERT, A.; NÈZAMIS, J.E.; LANCASTER, C.; HAUCHAR, A.J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterology.** v.77, p. 433-443, 1979.

ROBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, K. Patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

ROLLAND, A.; FLEURETIN, J.; LANHERS, M.C.; YOUNOS, C.; MISLIN, R.; MORTIER, F. Behavioural effects of the American traditional plant *Eschscholzia californica*: sedative and anxiolytic properties. **Planta Med.**, v. 57, p. 212-216, 1991.

SACHS, G.; ZENG, N.; PRINZ, C. Physiology of isolated gastric endocrine cells. **Annual Review of Physiology.** v. 59, p. 243-256, 1997.

SAKAI, K.; AKIMA, M.; KATSUYAMA, I. Effects of Nicorandil on Experimentally Induced Gastric Ulcers in Rats: A Possible Role of K_{ATP} Channels. **Japanese Journal of Pharmacology.** v. 79, n. 01, p. 51-57, 1999.

SAKURADA T.; et al. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. **Neuropharmacology.** v. 31, p 1279-1285, 1992

SALIM, A.S. Role of oxygen-derived free radicals in mechanism of acute and chronic duodenal ulceration in the rat 1990. **Digest.Dis. Sci.** v.35, p. 73-79, 1990.

SALUSTIANO, M.E.; et al. Extratos de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish) na inibição in vitro de *Cylindrocladium scoparium* e de quatro espécies de ferrugens. **Cerne.** v. 12, n. 2, p. 189-193, 2006.

SALVEMINI, D.; et al. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **Br J Pharmacol.** v.118, p 829-838, 1996.

SANDKÜHLE, J. Models and Mechanisms of Hyperalgesia and Allodynia. **Physiol. Rev.**, v. 89, p. 707-758, 2009.

SANTOS, A.R; MIGUEL, O.G; YUNES, R.A; CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-N-propyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 289, p. 417-426, 1999.

SBED – Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor. 2005. Disponível em: <http://www.dor.org.br/dorimpactos.asp>. Acesso em 15/06/2007

SCHOENFELD, P.; KIMMEY, M.B.; SCHEIMAN, J.; BJORKMAN, D.; LAINE L. Review article: nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated gastrointestinal complications-guidelines for prevention and treatment. **Aliment. Pharmacol. Ther.** v. 13, p. 1273–1285, 1999.

SCHOUENBORG, J.; SJÖLUND, B.H. Activity evoked by A- and C-afferent fibers in rat dorsal horn neurons and its relation to a flexion reflex. **J Neurophysiol.** v. 50, p. 1108–1121, 1983.

SCHUBERT, M.L.; PEURA, D.A. Control of Gastric Acid Secretion in Health and Disease. **Gastroenterology.** v. 134, n. 07, p. 1842-1860, 2008.

SCHUBERT, M.L.; SHAMBUREK, R.D. Control of acid secretion. **Gastroenterol Clin North Am.** v. 19, n. 01, p. 1-25, 1990.

SCHUMACHER, M.A.; BASBAUM, A.I.; WAY, W.L. Analgésicos e antagonistas opióides. In: Katzung, B.G. **Farmacologia: básica e clínica.** 9ª Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. p. 416-432, 2005.

SHEPHERD, J.T.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-derived relaxing (EDRF) and contracting factors (EDCF) in the control of cardiovascular homeostasis: The pioneering observations. In: RUBANYI, G.M. **Cardiovascular Significance of endothelium-Derived Vasoactive Factors.** Nova Iorque: Futura Publishing Inc. p. 39-64, 1991.

SHERWOOD, LAURALEE. **Human Physiology - From Cells to Systems.** 5ª Ed. Books/Cole - Thomson Learning, 2004.

SHINE, V.J., et al., Gastric antisecretory and antiulcer activities of *Cyclea peltata* (Lam.) Hook. f. & Thoms. in rats. **J. Ethnopharmacol.** v. 125, p.350-255, 2009.

SHRESTHA, S. & LAU, D. **Gastric Ulcer.** MEDSCAPE, DISPONÍVEL EM: <<http://emedicine.medscape.com/article/175765-overview>> Acesso em: 28 de junho de 2009.

SHRESTHA, S. & LAU, D. **Gastric Ulcers.** DISPONÍVEL EM: <<http://emedicine.medscape.com/article/175765-overview>>. Acesso em 27 Jun. 2009.

SIHAM, M. et al. Studies on the antiinflammatory and antinociceptive effects of melatonin in the rat. **Pharmacological Research.** v. 46, n. 03, p. 235-243, 2002.

SILVA, A.B.L. et al. Avaliação do efeito antinociceptivo e da toxicidade aguda do extrato aquoso da *Hyptis fruticosa* Salmz. **Rev. bras. farmacogn.**, v.16, p. 475-479, 2006.

SILVA, M.I.; et al. Gastroprotective activity of isopulegol on experimentally induced gastric lesions in mice: investigation of possible mechanisms of action. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** v. 380, p. 233-245. 2009.

SLATTERY, J.; et al. Risks of gastrointestinal bleeding during secondary prevention of vascular events with aspirin-analysis of gastrointestinal bleeding during the UK-TIA trial. **Gut.** v. 37, n. 04, p. 509-511, 1995.

SOEJARTO, D.D. Biodiversity prospecting and benefit-sharing: perspectives from the field. **J Ethnopharmacol.** v.51, p 1-15. 1996.

SOLL, H.; WOLLIN, A. Histamine and cyclic AMP in isolated canine parietal cells. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v. 237, p. E444-E450, 1979.

SONNENBERG, A.; EVERHART, J.E.; The prevalence of self-reported peptic ulcer in the United States. **Am J Public Health.** v. 86, p. 200-205, 1996.

STEPANOVIC-PETROVIC, R.M.; et al. The antinociceptive effects of anticonvulsants in a mouse visceral pain model. **Anesth Analg.** v. 106, n. 6, p. 1897-1903, 2008.

STERANKA, L.R.; BURCH, R.M. Bradykinin antagonists in pains and inflammation. In: Burch RM (Eds) Bradykinin antagonists, Basic and Clinical Research. Marcel Dekker, New York, p. 191, 1991.

STRUBELT, O.; HOPPENKAMPS, R. Relations between gastric glutathione and the ulcerogenic action of non-steroidal antiinflammatory drugs. **Arch Int Pharmacodyn Ther.** v. 262, p. 268-278, 1983.

SUFFREDINI, A.F. New insight into the biology of the acute phase response. **Journal of Clinical Immunology**, v. 19, p. 203, 1999.

SULEYMAN, H. et al. Comparative study on the gastroprotective potential of some antidepressants in indomethacin-induced ulcer in rats. **Chemico-Biologica Interactions.** v.180(2), p 318-324, 2009.

SUTHERLAND, L.R. A simple, non-invasive marker of gastric damage: sucrose permeability. **Lancet.** v.23, p. 998-1000, 1994.

SZABO, S. et al. A quantification method for assessing the extent of experimental erosions and ulcers. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 13, p. 59-66, 1985.

SZABO, S. et al. Multiple mechanisms of cell injury in the gastric mucosa. **Fed Proc.** v. 46, p. 1152, 1987.

SZABO, S. Mechanisms of gastric mucosal injury and protection. **J Clin Gastroenterol.** v. 13, p. 21-34, 1991.

SZABO, S. Mechanisms of mucosal injury in the stomach and duodenum: time-sequence analysis of morphologic, functional, biochemical and histochemical studies. **Scandinavian Journal of Gastroenterology** v. 127, p. 21-28, 1987.

SZABO, S. Role of sulfhydryls and early vascular lesions in gastric mucosal injury. **Acta Physiol Hung.**v. 64, p. 203-214, 1984.

SZABO, S.; PIHAN, G.; DUPUY, D. The biochemical pharmacology of sulfhydryl compounds in strict mucosal injury and protection. In: SZABO, S.; MÓZSIK, G.Y. editors. *New Pharmacology of Ulcer Disease. Experimental and New Therapeutic Approaches.* p. 424-436, 1987.

SZABO, S.; TRIER, J.S.; FRANKEL, P.W. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. **Science.** v. 214, p. 200-202, 1981.

SZALLASI, A. Autoradiografic visualization and pharmacological characterization of vanilloid (capsaicin) receptors in several species including in man. **Acta Physiologica scandinavica**, v. 155, p. 1-68, 1999.

SZELENYI, I.; BRUNE, K. Possible role of oxygen free radicals in ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. **Dig Dis Sci.** v. 33, n. 07, p. 865-871, 1988.

TAKEUCHI, K. et al. Oxygen free radical and lipid peroxidation in the pathogenesis of gastric mucosal lesions induced by indomethacin in rats. **Digestion.** v. 49, p. 175-184, 1991.

TAMAGNO, E.; et al. Oxygen free radical scavenger properties of dehydroepiandrosterone. **Cell Biochem Funct.** v.16, p 57-63, 1998.

TANAKA, A. et al. Inhibition of both COX-1 and COX-2 is required for development of gastric damage in response to nonsteroidal antiinflammatory drugs. **J Physiol Paris.** v. 95, p. 21-27, 2001.

TANAKA, A. et al. Roles of COX-1 and COX-2 inhibition in nonsteroidal antiinflammatory drug-induced gastric damage in rats: relation to functional responses. **Aliment PharmacolTher.** v. 16, p. 90-101, 2002.

TARNAWSKI, A.S. Cellular and Molecular Mechanisms of Gastrointestinal Ulcer Healing. **Digestive Diseases and Sciences.** v. 50, n. 01, p. 24-33, 2005.

TAYLOR, D.N. & BLASER, M.J. The epidemiology of Helicobacter pylori infection. **Epidemiology Review.** v. 13, p. 42-59, 1991.

TEYSSSEN, T.; SINGER M.V. Alcohol-related diseases of the oesophagus and stomach, Alcohol-related Gastrointestinal Disease, **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.** v. 17, p. 557-573, 2003.

TORAB, F.C. et al. Perforated Peptic Ulcer: Different Ethnic, climatic and Fasting Risk Factors for Morbidity in Al-Ain Medical District, United Arab Emirates. **Asian journal of surgery.** v.32, n. 02, p. 95-101, 2009.

TORRADO, S. et al. Effect of dissolution profile and (-)-alpha-bisabolol on the gastrotoxicity of acetylsalicylic acid. **Pharmazie**. v. 50, p. 141–143, 1995.

TREVETHICK, M.A. et al. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug-induced gastric damage in experimental animals: Underlying pathological mechanisms. **Gen. Pharmac.** v.26, n.7, p. 1455-1459, 1995.

TRONGSAKUL, S.; et al. The analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activity of *Diospyros variegata* Kruz. **J Ethnopharmacol.** v. 85, n. 02, p. 221-225, 2003.

VERPOORTE, R. Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology. **J Pharm Pharmacol.** v. 52, p. 253–262, 2000.

VIANA, G.S.B.; BANDEIRA, M.A.; MATOS, F.J.A. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* allemão. **Phytomedicine**. v. 10, n. 2, p. 189-95, 2003.

VICHNEWSKI, W. et al. Sesquiterpene lactones and other constituents from *Eremanthus seidelli*, *E. goyazensis* and *Vanillosmopsis erythropappa*. **Phytochemistry**. v.28, p. 1441–1451, 1989.

VICHNEWSKI, W.; TAKAHASHI, A.M.; NASI, A.M.T. Sesquiterpene lactones and other constituents from *Eremanthus seidelli*, *E. goyazensis* and *Vanillosmopsis erythropappa*. **Phytochemistry**, v. 28, p. 1441–1451, 1989.

VIEGAS, J.R.; et al. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 29, 2006 . DISPONÍVEL EM: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000200025 &lng=en&nrm=iso>. ACESSO EM: jul. 2009. doi: 10.1590/S0100-40422006 000200025

VIGNERI, S. et al. Pathophysiology of the gastric microcirculation. **Ital J Gastroenterol.** v. 24, p. 22-30, 1992.

VILELA, F.C. et al. Evaluation of the antinociceptive activity of extracts of *Sonchus oleraceus* L. in mice. **J Ethnopharmacol.** (2009) DOI: 10.1016/j.jep.2009.04.037.

WALLACE, J. L. Gastric ulceration: critical events at the neutrophil-endothelium interface. **Can J Physiol Pharmacol.** v. 71, p. 98-102, 1993.

WALLACE, J.L. et al. NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. **Gastroenterology**. v. 119, p. 706-714, 2000.

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

WALLACE, J.L.; SOLDATO, P.D. The therapeutic potential of NO-NSAIDs **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 17, p. 11-20, 2003.

WAMBEBE, C. Influence of some agents that affect 5-hydroxy-tryptamine metabolism and receptors on nitrazepam-induced sleep in mice. **Braz. J. Pharmacol.**, v. 84, p. 185-91, 1985.

WEISMAN, S.M.; GRAHAM, D.Y. Evaluation of the benefits and risks of low-dose aspirin in the secondary prevention of cardiovascular and cerebrovascular events. **Arch Intern Med.** v. 162, p. 2197–2202, 2002.

WEISSMAN, G. Inflammation: historical perspectives. In: Gallin J.L. et al. (Eds): Inflammation: Basic principles and Clinical Correlates. New York: Raven Press, p. 5, 1992.

WENDE, C. & MARGOLIN, S. Analgesic test based upon experimentally induced acute abdominal pain in rats. **Fed Proc.** v. 15, p 494-499, 1956.

WILD, A.C.; MULCAHY, R.T. Regulation of γ -glutamylcysteine synthetase subunit gene expression: insights into transcriptional control of antioxidant defenses. **Free Rad. Res.**, v. 32, p. 281–301, 2000.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 3, p. 544-547, 1962.

Wong, S.H.; et al. The role of serotonin in ethanol-induced gastric glandular damage in rats. **Digestion.** v. 45 p. 52–60, 1990.

WOOLFE, G. & MACDONALD, A.D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride. **J. Pharm. Exp. Ther.** v. 80, p 300-307, 1944

YAKSH, T.L. et al. Intrathecal morphine inhibits substance P release from mammalian spinal cord in vivo. **Nature.** v. 286, p 155-157, 1980.

YAMAGUCHI, T. et al. Itch-associated response induced by intradermal serotonin through 5-HT₂ receptors in mice. **Neurosci Res.**, v. 35, p. 77-83, 1999.

YUAN, Y.; PADOL, I.T.; HUNT, R.H. Peptic ulcer disease today. **Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology.** v. 3, p. 80-89, 2006.

ZANBOORI, A.; TAMADDONFARD, E.; MOJTAHEDEIN, A.; Effect of chlorpheniramine and ranitidine on the visceral nociception induced by acetic acid in rats: role of opioid system. **Pak J Biol Sci.** v. 11, n. 20, p. 2428-2432, 2008.

ZDUNIĆ, G.; et al. Evaluation of Hypericum perforatum oil extracts for an antiinflammatory and gastroprotective activity in rats. **Phytother Res.** v. 23, p.1559-1564, 2009.

ZHANG, B.; et al. Analgesic and anti-inflammatory activities of a fraction rich in gaultherin isolated from gaultheria yunnanensis (FRANCH.) REHDER. **Biol Pharm Bull.** v. 30, n. 03, p. 465-9, 2007.

ZULLYT, B. et al. Antioxidant Mechanism is involved in the gastroprotective effects of ozonized sunflower oil in ethanol-induced ulcers in rats. **Mediators Inflamm.** v. 2007 p. 1-6, 2007.

8. ANEXO. Artigo Publicado em Revista indexada *Qualis B.*(CAPES).

Gastroprotection of (-)- α -bisabolol on acute gastric mucosal lesions in mice: the possible involved pharmacological mechanisms

Nayrton Flávio Moura Rocha^a, Edith Teles Venâncio^a, Brinell Arcanjo Moura^a, Maria Izabel Gomes Silva^a, Manoel Rufino Aquino Neto^a, Emiliano Ricardo Vasconcelos Rios^a, Damião Pergentino de Sousa^b, Silvânia Maria Mendes Vasconcelos^a, Marta Maria de França Fonteles^a, Francisca Cléa Florenço de Sousa^{a*}

^aDepartment of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Rua Cel. Nunes de Melo 1127, CEP 60430-270 Fortaleza, Brazil

^bDepartment of Physiology, Federal University of Sergipe, CEP 49100-000 São Cristóvão Sergipe, Brazil

Keywords

α -bisabolol,
essential oil,
gastric ulcer,
GSH

Received 10 October 2008;
revised 13 March 2009
accepted 23 March 2009

*Correspondence and reprints:
clea@ufc.br, cleaflorenco@
yahoo.com.br

ABSTRACT

(-)- α -Bisabolol is an unsaturated, optically active sesquiterpene alcohol obtained by the direct distillation essential oil from plants such as *Vanillosmopsis erythropappa* and *Matricaria chamomilla*. (-)- α -Bisabolol has generated considerable economic interest, since it possesses a delicate floral odor and has been shown to have anti-septic and anti-inflammatory activity. The aim of this work was to evaluate the gastroprotective action of (-)- α -bisabolol on ethanol and indomethacin-induced ulcer models in mice, and further investigate the pharmacological mechanisms involved in this action. The oral administration of (-)- α -bisabolol 100 and 200 mg/kg was able to protect the gastric mucosa from ethanol (0.2 mL/animal p.o.) and indomethacin-induced ulcer (20 mg/kg p.o.). Administration of L-NAME (10 mg/kg i.p.), glibenclamide (10 mg/kg i.p.) or indomethacin (10 mg/kg p.o.) was not able to revert the gastroprotection promoted by (-)- α -bisabolol 200 mg/kg on the ethanol-induced ulcer. Dosage of gastric reduced glutathione (GSH) levels showed that ethanol and indomethacin reduced the content of non-protein sulfhydryl (NP-SH) groups, while (-)- α -bisabolol significantly decreased the reduction of these levels on ulcer-induced mice, but not in mice without ulcer. In conclusion, gastroprotective effect on ethanol and indomethacin-induced ulcer promoted by (-)- α -bisabolol may be associated with an increase of gastric sulfhydryl groups bioavailability leading to a reduction of gastric oxidative injury induced by ethanol and indomethacin.

INTRODUCTION

Peptic ulcer is an injury of the gastric and duodenal mucosa which occurs where the epithelium is exposed to acid or pepsin [1]. Smoke, stress, alimentary deficiency and use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID), may increase the incidence of gastric ulcer [2].

Intragastric administration of ethanol to mice rapidly induces gastric mucosal lesions, which are commonly used to study both the pathogenesis and therapy of

human ulcerative disease. Ethanol rapidly penetrates the gastroduodenal mucosa causing membrane damage, exfoliation of cells and erosion. The subsequent increase in mucosal permeability, together with the release of vasoactive products from mast cells, macrophages, and other blood cells may lead to vascular injury, necrosis, and ulcer formation [3].

Indomethacin, a prostaglandin synthesis inhibitor, is a classic representative of NSAIDs. These drugs are commonly used to treat inflammatory states and reduce the

conditions of pain. However, their use is associated with an increased of the risk of ulcer development in the gastrointestinal tract and its complications (e.g. hemorrhages and perforations) [3,4]. Thus, gastric lesions experimentally induced by indomethacin are also considered to be a reliable tool to study the pathogenesis of acute stomach mucosal ulceration.

Diverse mechanisms are implicated in gastric damage. It is well described that nitric oxide (NO) facilitates the prevention and healing of injuries in the gastrointestinal tract. It is involved in the production of mucus and bicarbonate, in the regulation of capillary flow in the gastrointestinal tract wall, as a cytoprotective, anti-inflammatory, and in the completion of the protective effects of prostaglandins (PGs) in the stomach [5]. The majority gastric mucosal defense mechanisms are stimulated and/or facilitated by PGs, which seem to inhibit acid secretion; stimulate mucus, bicarbonate and phospholipid secretion; increase mucosal blood flow; as well as accelerate epithelial restitution and mucosal healing [6].

On the other hand, the release of oxygen-derived free radicals has recently received increasing attention as a possible pathogenic factor of gastric mucosal injury associated with water-immersion stress, anti-inflammatory drugs and ethanol-induced ulcer [7]. It is known that ethanol is able to deplete levels of non-protein sulfhydryls (SHs) compounds, such as reduced glutathione (GSH) in gastric tissue [8]. GSH is a tripeptide endogenous compound present in gastric tissue and provides gastroprotection by scavenging oxygen free radicals [9]. Therefore, depletion of gastric mucosal GSH may result in gastric damage by accumulation of free radicals.

The use of medicinal plant extracts in the treatment of diseases is widespread in Brazil. The country possesses a rich practice of traditional medicine, which can be partially explained by its multi-ethnic population [10] and by the extensive natural diversity of plants. (-)- α -Bisabolol is an unsaturated, optically active sesquiterpene alcohol obtained by the direct distillation essential oil from plants. The most common source utilized is the chamomile, *Matricaria chamomilla* [11]. However, there are others sources from which (-)- α -bisabolol can be extracted, for example, the Brazilian plant species *Vanillosmopsis erythropappa*, is a rich supply of this substance [12].

(-)- α -Bisabolol has generated considerable economic interest, since it possesses a delicate floral odor and has been shown to have anti-septic and anti-inflammatory activity [13–15]. In recent work, Leite *et al.* [16] showed a gastroprotective effect of essential oil with (-)- α -

bisabolol and others substances in composition in the 200 or 400 mg/kg doses on ethanol-induced ulcer model in mice. However, the effects of isolated (-)- α -bisabolol in gastric protection models such as ethanol and indomethacin-induced ulcer model and its mechanisms were not investigated. Considering that many compounds extracted from essential oils may presents gastroprotective actions, we decided in this study to evaluate the gastroprotective action of isolated (-)- α -bisabolol in ethanol and indomethacin-induced ulcer in mice and further investigate the pharmacological mechanisms involved in this action.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Swiss mice (20–30 g) were used in this study. Animals were kept in a temperature-controlled room at 26 °C with a 12-h light/dark cycle, with food and water *ad libitum*.

The study was approved by the Ethics Committee for Animal Experiments, Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceara, Ceará, Brazil. Studies were conducted in accordance with the National Institute of Health (NIH), Bethesda, USA.

Drugs

The following substances were used in the assay to evaluate the gastric protection of (-)- α -bisabolol and its pharmacological mechanisms: indomethacin, cyproheptadine, L-NAME and glibenclamide were purchased from Sigma Chem. Co.® (St Louis, MO, USA), N-acetylcysteine (NAC) from União Química® (São Paulo, SP, Brazil), and Ranitidine from Cristália® (São Paulo, SP, Brazil). (-)- α -Bisabolol (98% purity) was purchased from Puritta Óleos Essenciais® (Torrinha, SP, Brazil).

Study of anti-ulcer activity of (-)- α -bisabolol in ethanol-induced ulcer model

The acute gastric lesions were induced by intragastric application of absolute ethanol in accordance to previously established method [18]. Male Swiss mice were randomly divided in four groups and fasted for 15 h before the experiment, but had free access to water. Absolute ethanol (0.2 mL/animal *p.o.*) was administered orally to mice treated 1 h previously with vehicle (3% Tween 80 in distilled water, controls) and (-)- α -bisabolol (100 or 200 mg/kg), while cyproheptadine, a non-selective antagonist of 5-HT and histamine receptor

(10 mg/kg p.o.) was used as reference drug in this assay. These treatments were performed by gavage, with orogastric metal tube. Thirty minutes after the administration of ethanol, the mice were killed by cervical dislocation and the stomach was removed and opened along the greater curvature for examination. The total and injured stomach areas (glandular face) were measured by computer program IMAGEJ and expressed in terms of percent (%) of ulcerated gastric area.

Study of anti-ulcer action of (-)- α -bisabolol in indomethacin-induced ulcer

Male Swiss mice were randomly divided in four groups, treated orally with vehicle (controls), (-)- α -bisabolol (100 or 200 mg/kg p.o.) and ranitidine, a H₂ histamine receptor antagonist (25 mg/kg p.o.). Sixty minutes after, gastric ulcers were induced in all groups by indomethacin (20 mg/kg p.o.) suspended in 0.5% carboxymethylcellulose in distilled water. According to the method of Bhargava (1973) [17], 8 h after, the animals were killed by cervical dislocation; the stomachs were removed, immersed with formalin 5% during 15 min, opened by the great curvature and washed with saline solution for lesions examination. The degree of ulceration was graded according to an arbitrary scale by attribution of scores as presented in Table I [3].

Evaluation of the role of nitric oxide, ATP-dependent K⁺ channels (K_{ATP}⁺) and prostaglandins in gastroprotective effect of (-)- α -bisabolol on ethanol-induced ulcer model

To study the possible mechanism of action, separate experiments were conducted using the following drugs: L-NAME, an inhibitor of the NO synthase activity (10 mg/kg i.p.), glibenclamide, an antagonist of K_{ATP}⁺ (10 mg/kg i.p.) and indomethacin (10 mg/kg p.o.).

Table I Determination of score in indomethacin-induced ulcer [3].

	Scores
Injury	
Discoloration of mucosa	1
Edema	1
Hemorrhages	1
Number of petechia	
Until 10	2
More than 10	3
Intensity of ulceration	
Ulcers or erosion up to 1 mm	N × 2
Ulcers or erosion larger than 1 mm	N × 3
Perforated ulcers	N × 4

L-NAME and glibenclamide were administrated 30 min before receiving (-)- α -bisabolol (200 mg/kg p.o.), indomethacin (10 mg/kg p.o.) was administrated 2 h before. One hour later was applied absolute ethanol 0.2 mL in each animal. Thirty minutes after the administration of ethanol, the mice were killed and the stomach was removed for examination as previously described.

The doses for these drugs were selected based on our pilot experiments and on the published literature [16,19,20].

Evaluation of involvement of glutathione metabolism in the gastroprotective effects of (-)- α -bisabolol

To assess the changes in gastric mucosal amount of GSH (a non-protein SH) the content was measured according to the method described by Sedlak and Lindsay [21] with slight modifications. Briefly, (-)- α -bisabolol (200 mg/kg p.o.), N-acetylcysteine or vehicle (controls) were intragastrically administered to mice 1 h before administration of saline (healthy) or absolute ethanol 0.2 mL/animal (ulcerated). Thirty minutes after, the animals were sacrificed by cervical dislocation and their stomach removed. For the assay of GSH, glandular segment from each stomach was homogenized in ice-cold 0.02 M EDTA solution (at 10%). Aliquots (400 μ L) of tissue homogenate were mixed with 320 μ L of distilled water and 80 μ L of 50% (w/v) trichloroacetic acid (50%) in glass tubes and centrifuged at 3000 g for 15 min. Subsequently, supernatants (400 μ L) were mixed with 800 μ L Tris buffer (0.4 M, pH 8.9) and 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB; 0.01 M) was added. After shaking the reaction mixture during 3 min, its absorbance was measured at 412 nm within 5 min of the addition of DTNB against blank with no homogenate. The absorbance values were extrapolated from a glutathione standard curve and the GSH was expressed in μ g GSH/g of protein. In other assay, four animal groups were treated with following substances: (-)- α -bisabolol 100 and 200 mg/kg p.o., N-acetylcysteine 750 mg/kg p.o. (NAC), and vehicle (controls). These animals had gastric lesions induced by indomethacin 20 mg/kg p.o. as previously described, 8 h after were sacrificed and the gastric content of GSH was quantified as described above.

Statistical analysis

Values were expressed as mean \pm SEM. For statistical analysis one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Student–Newman–Keul's post hoc test was used. P values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Study of anti-ulcer activity of (-)- α -bisabolol in the ethanol-induced ulcer model

The administration of absolute ethanol produced lesions in the gastric mucosa which were reduced in the animals pretreated with (-)- α -bisabolol 100 mg/kg (BIS 100) (9.590 ± 1.611 ; $P < 0.001$), (-)- α -bisabolol 200 mg/kg (BIS 200) (2.088 ± 0.646 ; $P < 0.001$), or cyproheptadine 10 mg/kg (CYP) (4.108 ± 0.611 ; $P < 0.001$), as compared to controls (26.21 ± 1.626) (Figure 1).

Study of anti-ulcer action of (-)- α -bisabolol in indomethacin-induced ulcer

As demonstrated in Figure 2, the administration of indomethacin produced lesions in the gastric mucosa which were reduced in the animals pretreated with BIS 100 (5.625 ± 0.420 ; $P < 0.001$), BIS 200 (3.625 ± 0.420 ; $P < 0.001$), or ranitidine 25 mg/kg (6.857 ± 0.459 ; $P < 0.001$), as compared to controls (11.670 ± 0.760).

Evaluation of the role of nitric oxide metabolic pathway in the gastroprotective effects of (-)- α -bisabolol in the ethanol induced ulcer model

The results obtained with the pretreatment with L-NAME, an inhibitor of the NO synthase activity, on the gastroprotective effect of (-)- α -bisabolol are presented in Figure 3. In the control group, absolute ethanol produced gastric lesions (26.21 ± 1.626) and the gas-

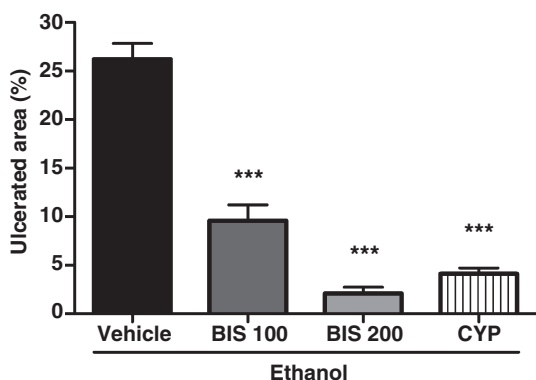


Figure 1 Effect of (-)- α -bisabolol 100, 200 mg/kg (BIS 100 and 200) and cyproheptadine 10 mg/kg (CYP), p.o. on percentage of ulcerated area in ethanol-induced ulcer model (ethanol 0.2 mL/animal p.o.). The results are mean \pm SEM for eight mice. Statistical comparison was performed using ANOVA followed by the Student–Neuman–Keul’s test. *** $P < 0.001$ in comparison with the control group (vehicle + ethanol).

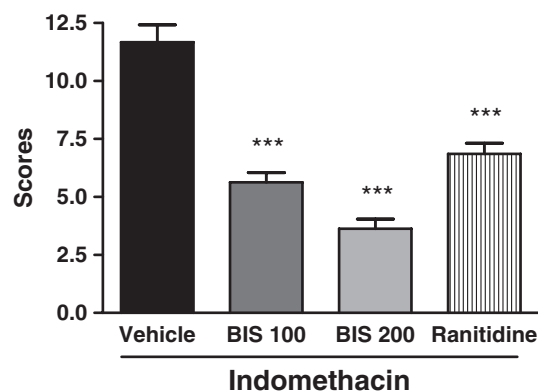


Figure 2 Effect of (-)- α -bisabolol 100, 200 mg/kg (BIS 100 and 200), and ranitidine 10 mg/kg on ulcer scores according to Szabo *et al.* [3] in indomethacin-induced ulcer model (indomethacin 20 mg/kg p.o.). The results are mean \pm SEM for eight mice. Statistical comparison was performed using ANOVA followed by the Student–Neuman–Keul’s test. *** $P < 0.001$ in comparison with the control group (vehicle + indomethacin).

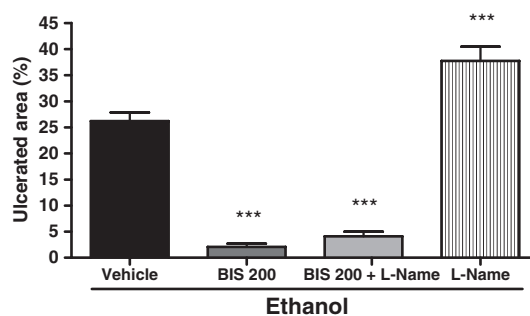


Figure 3 Effect of L-NAME 10 mg/kg, i.p. a nitric oxide competitive inhibitor, in the (-)- α -bisabolol 200 mg/kg p.o. (BIS 200) gastroprotection in ethanol-induced ulcer model (ethanol 0.2 mL/animal p.o.). The results are mean \pm SEM for eight mice. Statistical comparison was performed using ANOVA followed by the Student–Neuman–Keul’s test. *** $P < 0.001$ in comparison with the control group (vehicle + ethanol).

troprotective effect of (-)- α -bisabolol (2.088 ± 0.646 ; $P < 0.001$) was not reversed by previous administration of L-NAME 10 mg/kg (4.120 ± 0.893 ; $P < 0.001$).

Evaluation of the role of K_{ATP}^+ on the gastroprotective effects of (-)- α -bisabolol in the ethanol-induced ulcer model in mice

The effects of oral administration of (-)- α -bisabolol on ethanol-induced lesions in glibenclamide-pretreated mice are demonstrated in Figure 4. Pretreatment with K_{ATP}^+ antagonist, glibenclamide (10 mg/kg i.p.), did not sig-

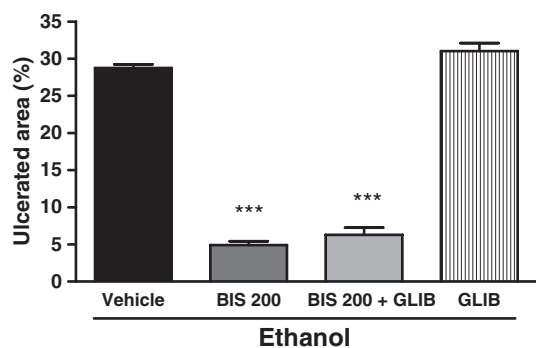


Figure 4 Effect of glibenclamide 10 mg/kg i.p. (GLIB), a K_{ATP}^+ antagonist in the (-)- α -bisabolol 200 mg/kg p.o. (BIS 200) gastroprotection in ethanol-induced ulcer model (ethanol 0.2 mL/animal p.o.). The results are mean \pm SEM for eight mice. Statistical comparison was performed using ANOVA followed by the Student–Neuman–Keul’s test. *** $P < 0.001$ in comparison with the control group (vehicle + ethanol).

nificantly decrease the gastroprotective effect of BIS 200 (6.288 ± 0.955 ; $P < 0.001$). On the hand, damage similar to controls (28.74 ± 0.498) was observed in mice pretreated alone with glibenclamide (31.020 ± 1.091).

Evaluation of involvement of prostaglandins in gastroprotective effects of (-)- α -bisabolol in ethanol induced ulcer model

The effects of pretreatment with indomethacin on the gastroprotective effect of (-)- α -bisabolol is shown in Figure 5. As described before, ethanol-induced ulcer was significantly reduced by pretreatment with (-)- α -

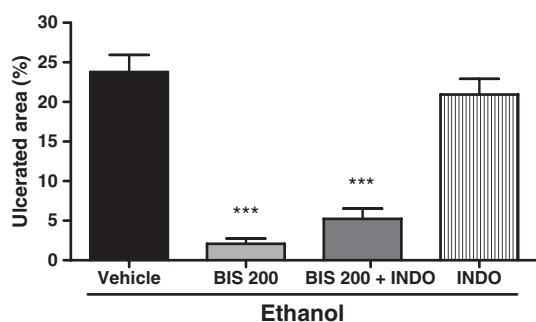


Figure 5 Effect of (-)- α -bisabolol 200 mg/kg p.o. (BIS 200) in ethanol-induced ulcer (ethanol 0.2 mL/animal p.o.) with pre-treatment with indomethacin, 10 mg/kg p.o. (INDO). The results are mean \pm SEM for eight mice. Statistical comparison was performed using ANOVA followed by the Student–Neuman–Keul’s test. *** $P < 0.001$ in comparison with the control group (vehicle + ethanol).

bisabolol 200 mg/kg (2.088 ± 0.646) and this effect was not reverted by previous indomethacin administration (5.229 ± 1.300). The group treated only with indomethacin (20.930 ± 1.987) before ethanol administration presented lesions similar to ethanol control group (23.780 ± 2.142).

Evaluation of involvement of glutathione metabolism in the gastroprotective effects of (-)- α -bisabolol

Figure 6 shows the influence of pretreatment with (-)- α -bisabolol and NAC on gastric GSH amount in healthy animals. Animals treated with NAC 750 mg/kg showed increased levels of GSH (318.182 ± 45.582 ; $P < 0.01$) and those treated with BIS 200 mg/kg presented no alteration of GSH content (148.576 ± 7.911) as compared to those that received only vehicle without induction of ulcer by ethanol (151.392 ± 11.005). However, the pretreatment with (-)- α -bisabolol and NAC caused a significant increase in the GSH amount (126.530 ± 12.895 ; $P < 0.05$ and 144.054 ± 29.115 ; $P < 0.01$) in ulcerated animals when compared to controls that received only vehicle before ethanol administration (61.616 ± 7.600) (Figure 7).

In the indomethacin-induced ulcer model, the pretreatment with (-)- α -bisabolol 100 and 200 mg/kg increased the GSH amount (99.027 ± 5.336 ; $P < 0.05$ and 112.484 ± 11.624 ; $P < 0.01$), respectively, as well *N*-acetylcysteine (160.610 ± 11.7791 ; $P < 0.001$)

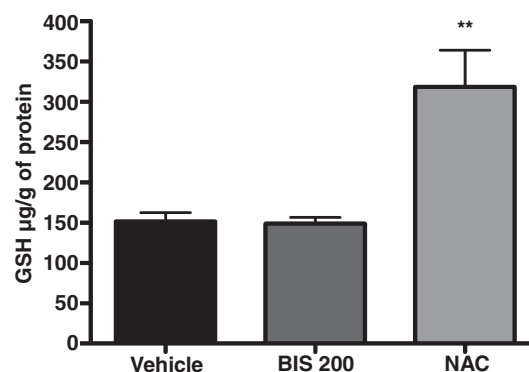


Figure 6 Effects of (-)- α -bisabolol 200 mg/kg, p.o (BIS 200) on production of gastric GSH in mice without ethanol treatment (healthy). *N*-Acetylcysteine 750 mg/kg p.o. (NAC), a precursor of GSH synthesis. The results are mean \pm SEM for eight mice. Statistical comparison was performed using ANOVA followed by Student–Neuman–Keul’s test. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ in comparison with control group (vehicle).

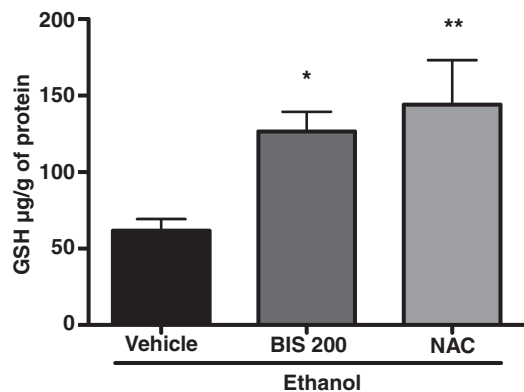


Figure 7 Effects of (-)- α -bisabolol 200 mg/kg p.o. (BIS 200) on production of gastric GSH in mice with ulcer induced by ethanol 0.2 mL/animal (ethanol). *N*-Acetylcysteine 750 mg/kg p.o. (NAC) is a precursor of GSH synthesis. Statistical comparison was performed using ANOVA followed by Student–Neuman–Keul’s test. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ in comparison with control group (vehicle + ethanol).

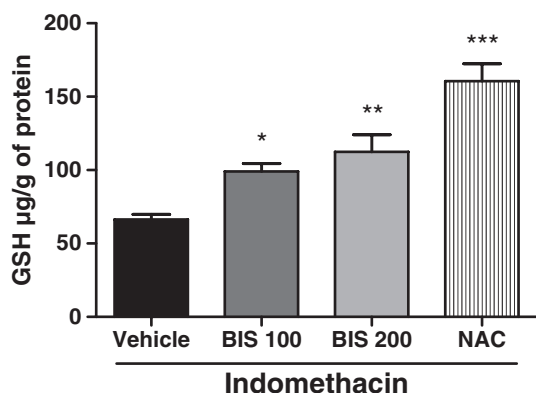


Figure 8 Effects of (-)- α -bisabolol 100 and 200 mg/kg p.o. (BIS 100 and 200) on production of gastric GSH in mice with ulcer induced by indomethacin 20 mg/kg p.o. (indomethacin). *N*-Acetylcysteine, 750 mg/kg p.o. (NAC), a precursor of GSH synthesis. The results are mean \pm SEM for eight mice. Statistical comparison was performed using ANOVA followed by Student–Neuman–Keul’s test. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ in comparison with control group (vehicle + indomethacin).

when compared with animals pretreated with vehicle only (66.446 ± 3.543) (Figure 8).

DISCUSSION

A recent study conducted with essential oil obtained from the bark of *Vanillosmopsis arborea*, which contains (-)- α -bisabolol, showed antiulcer activity in the ethanol-induced ulcer model [16]. As several substances are

present in essential oils it is important to determine which is the active component in order to study the mechanism of antiulcer activity. The present work describes for the first time, the antiulcer activity of (-)- α -bisabolol against both indomethacin and ethanol-induced ulcer in mice. Several mechanisms appear to be involved in the gastric ulcer production, and in this way it is not possible to suggest an only mechanism to explain it. Based in this, in order to investigate gastroprotective effects of (-)- α -bisabolol, different pharmacological tools were used in present study.

It is known, that NSAID, like indomethacin, produce gastrointestinal damage mainly as a consequence of the depletion of gastroprotective prostaglandins through the inhibition of cyclooxygenase (COX-1). These prostaglandins strengthen protective mechanisms such as mucus production, vasodilation and decreased acid secretion [22].

Prostaglandins, as described previously, play an important role in gastric cytoprotection [23]. It is known that PGE₂ and PGI₂ in the stomach are able to decrease acid secretion, the production of pepsin, and cause vasodilatation by relaxation of vascular smooth muscle [24]. It has been proposed that some actions of prostaglandins (e.g. vasodilation) may be due to the activation of K_{ATP}⁺ through protein kinase A (PKA) [25].

In the indomethacin-induced ulcer model, the results showed that, similarly to ranitidine, (-)- α -bisabolol was effective in protecting the gastric mucosa against lesions induced by NSAIDs. However, these results do not mean that the protective action of the drug is, in fact, directly linked to PGs synthesis or metabolism, since H₂ histamine receptor blockers such as ranitidine, are frequently used as reference drug in this model by decreasing gastric lesions through antisecretory actions [26].

Therefore, in order to investigate the role of prostaglandins in gastroprotective effects of (-)- α -bisabolol in the ethanol-induced ulcer model, mice were pretreated with indomethacin. Our results showed that pretreatment with indomethacin did not prevent the protective effect of (-)- α -bisabolol, suggesting that an increase in prostaglandin synthesis is probably not involved in its gastroprotective action.

The actions of glibenclamide, a sulphonylurea that closes the ATP-dependent potassium channels (K_{ATP}⁺), and diazoxide, a drug that opens the K_{ATP}⁺, to alter the gastroprotective effects of some drugs have been accepted as evidence to suggest the involvement of K_{ATP}⁺ in gastric functions [27]. Eguchi *et al.* [25] demonstrated that endogenous prostaglandins act as

activators of K_{ATP}^+ and this mechanism, at least in part, mediates gastroprotection. Based on these data, we also decided to investigate the involvement of the K_{ATP}^+ on the gastroprotective effects of (-)- α -bisabolol by previous treatment with glibenclamide. Our data showed no difference in the gastroprotective effects of (-)- α -bisabolol when the animals were previously treated with glibenclamide drug, suggesting that K_{ATP}^+ does not appear to be involved with the gastroprotective effect of (-)- α -bisabolol. These observations indicate that the gastroprotective effect of (-)- α -bisabolol in ethanol-induced ulcer appears not to be mediated by prostaglandins nor K_{ATP}^+ .

On the other hand, the gastric damage caused by ethanol may be due to several other mechanisms. Al-Harbi et al. [28] have suggested that stasis of gastric blood flow would contribute to development of hemorrhages, erosion and necrosis, as well as causing degranulation of mast cells. Another report [29] suggests that 5-HT displays an important role in the mechanism of ethanol-induced ulcer from the observation that methysergide, an antagonist of 5-HT receptors, decreased gastric lesions induced by ethanol. Confirming these data, Ohta et al. [30] showed that cyproheptadine, an antagonist of 5-HT and histamine receptors was able to increase gastric blood flow and reduce the acute gastric lesions induced by other drugs, such as 48/80 compound. Our results confirm the gastroprotective effect of cyproheptadine as demonstrated in the ethanol-induced ulcer model.

Nitric oxide has been implicated as having a role in gastric protection by increasing mucus production and bicarbonate secretion [31]. However, our results demonstrated that (-)- α -bisabolol was able to decrease gastric ulceration induced by ethanol as compared to controls, but this effect was not reversed by the previous administration of L-NAME, a known non-selective competitive inhibitor of nitric oxide synthase (NOS). This suggests, that the nitric oxide pathway is probably not involved with gastroprotection of (-)- α -bisabolol.

Other studies confirm the possible central role of superoxide and hydroxyl radicals in the development of ethanol-induced gastric mucosal damage [32]. It was also reported that potent hydroxyl radical scavengers such as dimethyl sulfoxide, thiocyanate, and thiourea, were effective in protecting the gastric mucosa against damaging effect of ethanol [32]. In fact, sulfhydryl-containing compounds are known to prevent the development of ethanol-induced gastric mucosal damage, at

least in part due to the neutralizing hydroxyl radical [33,34].

It was demonstrated previously that ethanol decreases the gastric content of GSH, as well as causing increased peroxidation [35]. According to this, some studies evidenced gastroprotective effects of reduced glutathione (GSH) [33] and the fact of sulfhydryl donor compounds as N-acetylcysteine are capable to decrease the gastric lesions induced by ethanol [19]. Taking this into account, we decided to evaluate the involvement of GSH metabolism in the gastroprotective effects of (-)- α -bisabolol. Our study showed that ethanol significantly reduced the gastric content of glutathione in comparison with mice that received no ethanol, while (-)- α -bisabolol was able to prevent this effect. However, the administration of (-)- α -bisabolol did not increase gastric GSH in animals without ethanol treatment (healthy), as compared to control group treated with saline. Conversely, our studies showed that NAC, an amino acid precursor of GSH synthesis, increases the GSH in the stomachs of healthy mice. Indomethacin has been shown to deplete the gastric content of GSH [36,37], and our results found that (-)- α -bisabolol was able to raise the levels of GSH in mice with indomethacin-induced ulcer compared to mice that received vehicle only. These results suggest that the gastroprotective effects promoted by (-)- α -bisabolol may be, at least in part, associated to with its antioxidant properties in the ethanol and indomethacin-induced ulcer model.

In conclusion, this study demonstrated a gastroprotective effect of (-)- α -bisabolol against both indomethacin and ethanol-induced ulcer in mice. This effect may be related to decreased GSH degradation, with a consequent increase in its bioavailability and strengthening of this defensive factor of gastric tissue.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the technical assistance of Ms M. Vilani Rodrigues Bastos and Dr David Woods for reviewing and adequacy of the manuscript to the English language. The work had the financial support from the Brazilian National Research Council (CNPq).

REFERENCES

- 1 de Andrade S.F., Lemos M., Comunello E., Noldin V.F., Filho V.C., Niero R. Evaluation of the antiulcerogenic activity of *Maytenus robusta* (Celastraceae) in different experimental ulcer models. *J. Ethnopharmacol.* (2007) 113 252–257.

- 2 Dubois R.W., Melmed G.Y., Henning J.M., Laine L. Guidelines for the appropriate use of non-steroidal anti-inflammatory drugs, cyclo-oxygenase-2-specific inhibitors and proton pump inhibitors in patients requiring chronic anti-inflammatory therapy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* (2004) **19** 197–208.
- 3 Szabo S., Trier J.S., Brown A., Schnoor J., Homan H.D., Bradford J.C. A quantitative method for assessing the extent of experimental gastric erosions and ulcers. *J. Pharmacol. Methods* (1985) **13** 59–66.
- 4 Schoenfeld P., Kimmey M.B., Scheiman J., Bjorkman D., Laine L. Review article: Nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated gastrointestinal complications-guidelines for prevention and treatment. *Aliment. Pharmacol. Ther.* (1999) **13** 1273–1285.
- 5 Muscara M.N., Mcknight W., Del Soldato P., Wallace J.L. Effect of a nitric oxide-releasing naproxen derivative on hypertension and gastric damage induced by chronic nitric oxide inhibition in the rat. *Life Sci.* (1998) **62** 235–240.
- 6 Hilário M.O.E., Terreri M.T., Len C.A. Antiinflatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. *J. Pediatr.* (2008) **82** 206–212.
- 7 Bilici D., Süleyman H., Banoğlu Z.N., Kiziltunç A., Avci B., Ciftcioğlu A., Bilici S. Melatonin prevents ethanol-induced gastric mucosal damage possibly due to its antioxidant effect. *Digest. Dis. Sci.* (2002) **47** 856–861.
- 8 Pongpiriyadacha Y., Matsuda H., Morikawa T., Asao Y., Yoshikawa M. Protective effects of polygodial on gastric mucosal lesions induced by necrotizing agents in rats and the possible mechanisms of action. *Biol. Pharm. Bull* (2003) **26** 651–657.
- 9 Maity S., Vedasiromoni J.R., Chaudhuri L., Ganguly D.K. Role of reduced glutathione and nitric oxide in the black tea extract-mediated protection against ulcerogen-induced changes in motility and gastric emptying in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* (2001) **85** 358–364.
- 10 Farnsworth N.R., Soejarto D.D. Global importance of medicinal plants, in: Akerele O., Heywood V., Synge H. (Eds), *Conservation of medicinal plants*. Cambridge University Press, Cambridge, 1991, pp. 25–51.
- 11 Reynolds J.E.F. Martindale. The extra pharmacopoeia. The Pharmaceutical Press, London, 1996.
- 12 Vichnewski W., Takahashi A.M., Nasi A.M.T., et al. Sesquiterpene lactones and other constituents from *Eremanthus seidelli*, *E. goyazensis* and *Vanillosmopsis erythropappa*. *Phytochemistry* (1989) **28** 1441–1451.
- 13 Frosch F. Bioactive substances from BASF for cosmetics. *Plusce Piorace Kosmet* (1987) **31** 144–147.
- 14 McAndrew B.A. Sesquiterpenoids: the lost dimension of perfumery. *Perfum Flavour* (1992) **17** 1–12.
- 15 Torrado S., Agis A., Jimenes M.E., Cadorniga R. Effect of dissolution profile and (-)-alpha-bisabolol on the gastrotoxicity of acetylsalicylic acid. *Pharmazie* (1995) **50** 141–143.
- 16 Leite G.O., Penha A.R., Fernandes C.N., Souza H.H.F., Costa J.G.M., Campos A.R. Gastroprotective mechanism of *Vanillosmopsis arborea* bark essential oil. *Fitoterapia* (2008) **80** 77–80.
- 17 Bhargava K.P., Gupta M.B., Tangri K.K. Mechanism of ulcerogenic activity of indomethacin and oxyphenbutazone. *Eur. J. Pharmacol.* (1973) **22** 191–195.
- 18 Robert A., Nezamis J.E., Lancaster C., Hanchar A.J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. *Gastroenterology* (1979) **77** 433–43.
- 19 Guedes M.M., Carvalho A.C.S., Lima A.F., et al. Gastroprotective mechanisms of centipedic acid, a natural diterpene from *Egletes viscosa* LESS. *Biol. Pharm. Bull.* (2008) **31** 1351–1355.
- 20 Peskar B.M., Ehrlich K., Peskar B.A. Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2002) **30** 969–974.
- 21 Sedlak J., Lindsay R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* (1968) **25** 192–205.
- 22 Lanza L.L., Walker A.M., Bortnichak E.A., Dreyer N.A. Peptic ulcer and gastrointestinal hemorrhage associated with nonsteroidal anti-inflammatory drug use in patients younger than 65 years. Large health maintenance organization cohort study. *Arch. Int. Med.* (1995) **155** 1371–1377.
- 23 Matsuda H., Li Y., Yoshikawa M. Gastroprotections of escins Ia, Ib, IIa, and IIb on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. *Eur. J. Pharmacol.* (1999) **373** 63–70.
- 24 Cohen M.M. Role of endogenous prostaglandins in gastric secretion and mucosal defense. *Clin. Invest. Med.* (1987) **10** 226–231.
- 25 Eguchi S., Kawano T., Tanaka K., et al. Effects of prostaglandin E1 on vascular ATP-sensitive potassium channels. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* (2007) **50** 686–691.
- 26 Adeyemi E.O., Bastaki S.A., Chandranath I.S., Hasan M.Y., Fahim M., Adem A. Mechanisms of action of leptin in preventing gastric ulcer. *World J. Gastroenterol.* (2005) **11** 4154–4160.
- 27 Sakai K., Akima M., Katsuyama I. Effects of nicorandil on experimentally induced gastric ulcers in rats: a possible role of K_{ATP} channels. *Jpn. J. Pharmacol.* (1999) **79** 51–57.
- 28 Al-Harbi M.M., Qureshi S., Raza M., Ahmed M.M., Afzal M., Shah A.H. Gastric antiulcer and cytoprotective effect of *Commiphora molmol* in rats. *J Ethnopharmacol.* (1997) **55** 141–150.
- 29 Wong S.H., Cho C.H., Ogle C.W. The role of serotonin in ethanol-induced gastric glandular damage in rats. *Digestion* (1990) **45** 52–60.
- 30 Ohta Y., Kobayashi T., Ishiguro I. Role of endogenous serotonin and histamine in the pathogenesis of gastric mucosal lesions in unanaesthetised rats with a single treatment of compound 48–80, a mast cell degranulator. *Pharmacol. Res.* (1999) **39** 79–84.
- 31 Muscara M.N., Wallace J.L. Therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* (1999) **276** 313–316.
- 32 Szelenyi I., Brune K. Possible role of oxygen free radicals in ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *Digest. Dis. Sci.* (1988) **33** 865–871.
- 33 Szabo A.S., Trier J.S., Frankel P.W. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. *Science* (1981) **214** 200–202.

- 34 Salim A.S. Role of oxygen-derived free radicals in mechanism of acute and chronic duodenal ulceration in the rat 1990. *Digest. Dis. Sci.* (1990) **35** 73–79.
- 35 Arun M., Asha V.V. Gastroprotective effect of *Dodonaea viscosa* on various experimental ulcer models. *J. Ethnopharmacol.* (2008) **118** 460–465.
- 36 Bilici M., Ozturk C., Dursun H., et al. Protective effect of mirtazapine on indomethacin-induced ulcer in rats and its relationship with oxidant and antioxidant parameters. *Digest. Dis. Sci.* [Epub ahead of print] doi:10.1007/s10620-008-0560-z.
- 37 Odabasoglua F., Cakirb A., Suleyman H., et al. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *J. Ethnopharmacol.* (2006) **103**(1) 59–65.