



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

**MARIANA LIMA FEITOSA**

**INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DA ATIVIDADE**  
**GASTROPROTETORA DE 1,4-CINEOL EM MODELOS DE ÚLCERA**  
**GÁSTRICA EM CAMUNDONGOS.**

**FORTALEZA-CE**

**2011**

**MARIANA LIMA FEITOSA**

**INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DA ATIVIDADE  
GASTROPROTETORA DE 1,4-CINEOL EM MODELOS DE 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**

**2011**

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

- 
- F336i Feitosa, Mariana Lima  
Investigação dos mecanismos de ação da atividade gastroprotetora de 1,4-cineol em modelos de úlcera gástrica em camundongos / Mariana Lima Feitosa . – 2011.  
96 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2011.  
Área de Concentração: Farmacologia Geral  
Orientação: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa

1. Úlcera Péptica. 2. Prostaglandinas. 3. Camundongos I. Título.

---

CDD 616.3434

**MARIANA LIMA FEITOSA**

**INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DA ATIVIDADE  
GASTROPROTETORA DE 1,4-CINEOL EM MODELOS DE 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 31/08/2011.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Francisca Cléa Florenço de Sousa (orientadora)**  
**Universidade Federal do Ceará-UFC**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Danielle Silveira Macêdo**  
**Universidade Federal do Ceará-UFC**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Nylane Maria Nunes de Alencar**  
**Universidade Federal do Ceará-UFC**

*Este trabalho é dedicado, como  
tudo em minha vida, a D E U S,  
pois sem Ele não seria chegado  
tão longe. Obrigada, Senhor!*

## AGRADECIMENTOS

*Muitas pessoas, amigos, me ajudaram a realizar este trabalho. Algumas foram meus braços direito e esquerdo durante os experimentos, outras foram minhas pernas que me mantiveram em pé ao longo destes longos meses. Passei por muitos altos e baixos, porém não estive sozinha em nenhum destes períodos, e a estas pessoas agradeço por fazerem parte da minha vida.*

*Agradeço, primeiramente, a meus pais, Ana Rosa e Batista, por estarem sempre ao lado, mantendo-me firme nos meus propósitos. Eles, acima de todos, foram os que mais torceram pelo sucesso neste mestrado. Então, a eles, eu agradeço a fé e a confiança que depositaram em mim.*

*Agradeço também a minhas irmãs, Ana Márcia e Ana Cláudia, pelas discussões que mantiveram minha rotina sempre mais animada (hehehehehe) e pelas conversas jogadas fora que alegraram meus dias.*

*Ao meu noivo, Janio, agradeço o amor e a dedicação dadas a mim. Obrigada pelo companheirismo durante esses 6 anos em que estamos juntos, sempre me dando força e me fazendo erguer a cabeça e seguir em frente.*

*À minha orientadora Prafa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa, por sempre me guiar pelos caminhos corretos e sempre perdoar as minhas faltas.*

*Às minhas amigas de faculdade e seus respectivos namorados, Thamires (meu clone) e Adnan, Alyne (Nyne) e Leonardo, Camylla (mulher) e Alex, e Tatiana (iracema) e Pedro. Nossa amizade felizmente perdurou após o término do curso! Obrigada pelas risadas de sempre e pela companhia constante!!*

*À minha amiga Edith. Nossa amizade começou de uma forma tão repentina e ao mesmo tempo tão sincera. Obrigada pelo companheirismo constante. Com você nunca me sinto sozinha!! Obrigada por tudo amiga!!*

*A Isabel e Camila, por me ajudarem na correria desse último mês. Apesar do aperreio dos experimentos e dos almoços BEM atrasados (por causa da Camila), me diverti bastante com a companhia de vocês!!*

*A Nayrton e Emiliano, eu agradeço todas as dúvidas tiradas. Peço desculpas se perturbei vocês demais. Espero, quando for doutoranda, ser uma referência de conhecimento para as pessoas assim como vocês são para mim.*

*Aos meus companheiros de guerra do laboratório, Brinell, Alyne e Leonardo. Este mestrado não seria tão completo se vocês não tivessem me ajudado. Valeu!*

*A todos do laboratório, que me ajudaram direta ou indiretamente, Vilani, Lena, Arnaldo, Marília, Thiciane, Fernando, Cacá, Luciana, Carol, Izabel Gomes, Patrícia Gomes, Gersilene, Helvira, Fernanda, Patrícia Xavier, e todos os outros que me fizeram companhia todo esse tempo de trabalho!!*

*Obrigada a todos as outras pessoas que não citei aqui, porém não menos importantes!!*

## RESUMO

1,4-Cineol é um monoterpeneo éter amplamente distribuído, o qual é um dos constituintes responsáveis pelo odor do limão. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito gastroprotetor de 1,4-Cineol (CIN 100 e 200 mg/Kg) nos modelos de lesão induzidas por etanol ou piroxicam em camundongos e, posteriormente, investigar os possíveis mecanismos de ação farmacológica envolvidos nesta ação. A administração oral de 1,4-cineol 200 mg/Kg foi capaz de proteger a mucosa gástrica dos danos causados pelo etanol (0,2 ml/animal, v.o). Esta gastroproteção foi também avaliada microscopicamente mostrando que CIN (200 mg/Kg, p.o.) diminuiu o edema na submucosa, o infiltrado inflamatório e a hemorragia. 1,4-Cineol (100 e 200 mg/Kg, v.o.) também reduziu significativamente as lesões gástricas causadas pelo piroxicam (30 mg/Kg, s.c.). O mecanismo de gastroproteção de CIN foi examinado na dose de 200 mg/Kg no modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos. Nos animais pré-tratados com L-NAME (10 mg/Kg, i.p.), um inibidor da oxido nítrico sintetase, com glibenclamida (10 mg/Kg i.p.), uma substância que bloqueia os canais de potássio ATP-dependente, ou com capsazepina (5 mg/Kg i.p.) um antagonista dos receptores vanilóides TRPV-1, o efeito gastroprotetor de CIN não foi significativamente inibido por estes mecanismos. Por outro lado, o efeito gastroprotetor de CIN foi revertido em animais pré-tratados com indometacina (10 mg/Kg v.o.), um inibidor não seletivo da ciclooxigenase, demonstrando que há uma ativação desta enzima no mecanismo de ação de CIN. Este trabalho avaliou também o mecanismo antioxidante de CIN como um agente gastroprotetor contra as lesões induzidas pelo etanol. Sob as nossas condições experimentais, o modelo de indução pelo etanol causou mudanças nos sistema antioxidante da mucosa gástrica dos camundongos, como a diminuição dos níveis de grupamentos sulfidríla (GSH) e da atividade da superóxido dismutase (SOD), também mostrou um aumento da atividade da mieloperoxidase (MPO) e uma concentração aumentada das espécies que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) como índice de peroxidação lipídica (LPO). 1,4-Cineol (200 mg/Kg, v.o.) no modelo de úlcera por etanol, não interferiu na concentração do GSH, mas permitiu a restauração da atividade normal de SOD, níveis normais de LPO e de atividade da MPO. Estes dados sugerem que CIN 100 e 200 mg/Kg promovem gastroproteção contra lesões induzidas pelo etanol e/ou piroxicam em camundongos nos quais o mecanismo de ação incluem o envolvimento de prostaglandinas endógenas e uma potente atividade antioxidante.

Palavras-chave: Úlcera Péptica; Prostaglandinas; Camundongos.

## ABSTRACT

1,4-Cineole is a widely distributed monoterpene ether, which is one of the flavor constituents of lime juice. The aim of this work was to evaluate the gastroprotective effect of 1,4-Cineole (CIN 100 and 200 mg/Kg) on ethanol or piroxicam-induced lesions in mice and further investigate the possible pharmacological mechanisms involved in this action. The oral administration of 1,4-cineole 200 mg/kg was able to protect the gastric mucosa from ethanol injury (0.2 ml/animal, p.o.). This gastroprotection was also evaluated microscopically showing that CIN (200 mg/kg, p.o.) decreased the cell loss in the mucosa, submucosal edema, inflammatory infiltration and hemorrhage. 1,4-Cineole (100 and 200 mg/kg, p.o.) also reduced significantly the gastric lesions induced by piroxicam (30 mg/kg, s.c.). Gastroprotective mechanism of CIN was examined in the dose of 200 mg/kg, in the model of gastric lesions induced by ethanol in mice. In animals pretreated with L-NAME (10 mg/kg, i.p.), an inhibitor of nitric oxide synthase, or with glibenclamide (10 mg/kg, i.p.), a drug that blocks ATP-dependent potassium channels, or with capsazepine (5 mg/kg, i.p.), an antagonist of vanilloid receptor TRPV-1, the gastroprotective effect of CIN was not inhibited significantly, suggesting that the effect of CIN is not involved with this mechanisms. Otherwise, the gastroprotective effect of CIN (200 mg/kg, p.o.) was reverted in animals pretreated with indomethacin (10 mg/kg, p.o.), a nonselective inhibitor of cyclooxygenase, demonstrating that there is activation of these enzymes in the mechanism of action of CIN. This work also evaluated the antioxidant mechanism of CIN as gastroprotective agent against ethanol-induced lesions. Under our experimental conditions, the model of induction of ethanol injury caused changes in the antioxidant system of the gastric mucosa of mice as the decrease in the levels of sulfhydryl groups (GSH) and activity of superoxide dismutase (SOD), also showed increased activity of myeloperoxidase (MPO) and high concentration of species that react with thiobarbituric acid (TBARS) as index of lipid peroxidation (LPO). 1,4-Cineole (200 mg/kg, p.o.) in the model of ethanol did not interfere with the concentration of GSH, but allowed the restoration of normal SOD activity, normal levels of LPO and MPO activity. The data suggest that CIN 100 and 200 mg/kg promote gastroprotection against lesions induced by ethanol or piroxicam in mice whose mechanisms include the involvement of endogenous prostaglandins and potent antioxidant activity.

Key words: Peptic ulcer; Prostaglandins; Mice.

## LISTA DE FIGURAS

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>1:</b>  | Esquema representativo dos efeitos do consumo agudo e crônico de etanol no estômago   | <b>17</b> |
| <b>2:</b>  | <i>Croton sp.</i> Família Euphorbiaceae   | <b>27</b> |
| <b>3:</b>  | Estruturas de 1,8-cineol e 1,4-cineol   | <b>28</b> |
| <b>4:</b>  | Efeito de 1,4-cineol (CIN) sobre a área ulcerada no modelo de indução de úlcera por etanol  | <b>44</b> |
| <b>5:</b>  | Efeitos macroscópico e microscópico na mucosa gástrica de camundongos submetidos às lesões gástricas induzidas por etanol pré-tratados ou não com 1,4-cineol                              | <b>47</b> |
| <b>6:</b>  | Efeito de 1,4-cineol frente a lesões gástricas induzidas por Piroxicam  | <b>49</b> |
| <b>7:</b>  | Envolvimento do Óxido Nítrico (NO) no efeito gastroprotetor associado ao 1,4-cineol (CIN) em modelos de úlcera induzida por etanol absoluto em camundongos                                | <b>51</b> |
| <b>8:</b>  | Envolvimento dos canais de potássio ATP-dependentes ( $K^+_{ATP}$ ) na gastroproteção induzida por 1,4-cineol (CIN) no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em camundongos       | <b>53</b> |
| <b>9:</b>  | Envolvimento da síntese de prostaglandinas no efeito gastroprotetor associado ao 1,4-cineol (CIN) no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em camundongos                         | <b>55</b> |
| <b>10:</b> | Envolvimento do Receptor Transiente Potencial Vanilóide 1 (TRPV 1) no efeito gastroprotetor associado ao 1,4-cineol (CIN) no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em camundongos | <b>57</b> |
| <b>11:</b> | Avaliação do envolvimento da glutathiona reduzida (GSH) no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto   | <b>59</b> |
| <b>12:</b> | Avaliação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD) no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol (CIN) no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto  | <b>61</b> |
| <b>13:</b> | Avaliação da atividade da Mieloperoxidase (MPO) no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol (CIN) no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto   | <b>63</b> |
| <b>14:</b> | Determinação do envolvimento da peroxidação lipídica no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto  | <b>65</b> |

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

|                  |  |           |
|------------------|--|-----------|
| <b>QUADRO 1.</b> | Drogas e regentes utilizados durante os procedimentos experimentais  | <b>32</b> |
| <b>QUADRO 2.</b> | Determinação do índice de lesões gástricas induzidas por piroxicam   | <b>36</b> |
| <b>TABELA 1.</b> | Escores das alterações histopatológicas na mucosa gástrica de camundongos submetidos às lesões gástricas induzidas por etanol pré-tratados ou não com 1,4-cineol | <b>46</b> |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|                    |  |
|--------------------|--|
| <b>CIN 100</b>     | - 1,4-cineol 100 mg/kg                             |
| <b>CIN 200</b>     | - 1,4-cineol 200mg/kg                              |
| <b>EA</b>          | - Etanol absoluto                                  |
| <b>L-NAME</b>      | - N <sup>G</sup> -Nitro-L-arginina-metiléster      |
| <b>DPU</b>         | - Doença péptica ulcerosa                          |
| <b>NO</b>          | - Óxido nítrico                                    |
| <b>ATP</b>         | - Trifosfato de adenosina                          |
| <b>PG</b>          | - Prostaglandina                                   |
| <b>ANOVA</b>       | - Análise de Variância                             |
| <b>Cipro 10</b>    | - Ciproheptadina 10 mg/Kg                          |
| <b>L-ARG</b>       | - L-Arginina                                       |
| <b>NAC</b>         | - N-Acetilcisteína                                 |
| <b>DZD</b>         | - Diazóxido  |
| <b>CGRP</b>        | - Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina      |
| <b>Glib</b>        | - Glibenclamida                                    |
| <b>COX</b>         | - Cicloxigenase                                    |
| <b>Indo 10</b>     | - Indometacina 10 mg/Kg                            |
| <b>Miso</b>        | - Misoprostol                                      |
| <b>E.P.M.</b>      | - Erro Padrão da Média                             |
| <b>CPZ</b>         | - Capsazepina                                      |
| <b>CPS</b>         | - Capsaicina                                       |
| <b>GMPC</b>        | - Guanidina 3', 5' monofosfato cíclica             |
| <b>EOCN</b>        | - Óleo essencial de <i>C. nepetaefolius</i>        |
| <b>DAINEs</b>      | - Drogas antiinflamatórias do tipo não esteroidais |
| <b>ILU</b>         | - Índice de lesões ulcerativas                     |
| <b>NBT</b>         | - Azul de nitro-tetrazolio                         |
| <b>IL</b>          | - Interleucina                                     |
| <b>TGI</b>         | - Trato gastrointestinal                           |
| <b>LT</b>          | - Leucotrienos                                     |
| <b>i.p.</b>        | - Intraperitoneal                                  |
| <b>kg</b>          | - Kilograma  |
| <b>NOS</b>         | - Óxido nítrico sintase                            |
| <b>min ou min.</b> | - Minuto   |
| <b>mg</b>          | - Miligrama  |
| <b>VR1</b>         | - Receptor vanilóide tipo 1                        |

|                                    |  |
|------------------------------------|--|
| <b>mL</b>                          | - Mililitros   |
| <b>MPO</b>                         | - Mieloperoxidase  |
| <b>nm</b>                          | - Nanômetros   |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>  | - Peróxido de hidrogênio                                 |
| <b>OH<sup>·</sup></b>              | - Radical peróxido                                       |
| <b>O<sub>2</sub><sup>·-</sup></b>  | - Radical superóxido                                     |
| <b>p</b>                           | - Nível de significância                                 |
| <b>PAF</b>                         | - Fator de ativação de plaquetas                         |
| <b>%</b>                           | - Porcentagem  |
| <b>TRPV1</b>                       | - Canal de potencial transiente tipo vanilóide subtipo 1 |
| <b>PGE1</b>                        | - Prostaglandina da série E1                             |
| <b>K<sup>+</sup><sub>ATP</sub></b> | - Canais de potássio sensíveis ao ATP                    |
| <b>LPS</b>                         | - Lipopolissacarídeos                                    |
| <b>rpm</b>                         | - Rotações por minuto                                    |
| <b>GSH</b>                         | - Glutathiona reduzida                                   |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b>     | - Fator de necrose tumoral alfa                          |
| <b>SHs</b>                         | - Grupos sulfidrílicos não-protéicos                     |
| <b>EROs</b>                        | - Espécies reativas de oxigênio                          |
| <b>O<sub>2</sub></b>               | - Oxigênio   |
| <b>v.o.</b>                        | - Via oral   |
| <b>vs</b>                          | - Versus   |
| <b>H<sub>2</sub>O</b>              | - Água   |
| <b>SOD</b>                         | - Enzima superóxido dismutase                            |
| <b>GPx</b>                         | - Enzima glutathiona peroxidase                          |
| <b>GR</b>                          | - Enzima glutathiona redutase                            |
| <b>CAT</b>                         | - Enzima catalase  |
| <b>HCl</b>                         | - Ácido clorídrico                                       |
| <b>LPO</b>                         | - Peroxidação lipídica                                   |
| <b>±</b>                           | - Mais ou menos  |
| <b>n</b>                           | - Número de animais por grupo                            |
| <b>U</b>                           | - Unidade  |
| <b>PLA<sub>2</sub></b>             | - fosfolipase A <sub>2</sub>                             |

## SUMÁRIO

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>1</b>   | <b>INTRODUÇÃO</b>   | <b>15</b> |
| <b>1.1</b> | <b>Úlcera péptica</b>   | <b>15</b> |
| <b>1.2</b> | <b>Fatores protetores da mucosa gástrica</b>  | <b>17</b> |
| 1.2.1      | Óxido nítrico (NO)  | 17        |
| 1.2.2      | Neurônios sensoriais aferentes  | 18        |
| 1.2.3      | Canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K^+_{ATP}$ )   | 19        |
| 1.2.4      | Prostaglandinas (PGs)   | 19        |
| 1.2.5      | Grupos sulfidrílicos não-protéicos (SHs)  | 20        |
| 1.2.6      | Sistema antioxidante  | 21        |
| <b>1.3</b> | <b>Terapêutica atual</b>  | <b>22</b> |
| <b>1.4</b> | <b>Produtos naturais e a relação com a gastroproteção</b>   | <b>24</b> |
| 1.4.1      | Óleos essenciais e os terpenos  | 25        |
| 1.4.2      | <i>Croton nepetaefolius</i> baill. (euphorbiaceae) e 1,4-cineol   | 26        |
| <b>2</b>   | <b>OBJETIVOS</b>  | <b>30</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Geral</b>  | <b>30</b> |
| <b>2.2</b> | <b>Específicos</b>  | <b>30</b> |
| <b>3</b>   | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>  | <b>32</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Drogas e Reagentes</b>   | <b>32</b> |
| <b>3.2</b> | <b>Aspectos éticos observados para a realização dos procedimentos experimentais em animais</b>  | <b>34</b> |
| <b>3.3</b> | <b>Animais</b>  | <b>34</b> |
| <b>3.4</b> | <b>Avaliação da atividade Gastroprotetora</b>   | <b>34</b> |
| 3.4.1      | Lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos  | 34        |
| 3.4.2      | Avaliação histopatológica da mucosa gástrica de camundongos   | 35        |
| 3.4.3      | Modelo de indução de úlcera por droga anti-inflamatória não-esteroidal (Piroxicam) em camundongos   | 35        |
| 3.4.4      | Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol em modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos   | 36        |
| 3.4.5      | Papel dos canais de potássio ATP-dependentes ( $K_{ATP}$ ) no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol em modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos                | 37        |
| 3.4.6      | Papel das prostaglandinas (PGs) no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol em modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos   | 37        |
| 3.4.7      | Papel dos receptores TRPV-1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos | 38        |
| <b>3.5</b> | <b>Avaliação da atividade antioxidante</b>  | <b>38</b> |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 3.5.1      | Papel dos grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH) no efeito antioxidante e gastroprotetor de 1,4-cineol em modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos | 38        |
| 3.5.2      | Papel da Superóxido Dismutase (SOD) no efeito antioxidante e gastroprotetor de 1,4-cineol em modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos                  | 39        |
| 3.5.3      | Papel da Mieloperoxidase (MPO) no efeito antioxidante e gastroprotetor de 1,4-cineol em modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos                       | 39        |
| 3.5.4      | Papel da lipoperoxidação no efeito antioxidante e gastroprotetor de 1,4-cineol em modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos                             | 40        |
| 3.5.5      | Dosagem de proteínas totais na amostra de estômago após lesão induzida por etanol em camundongos  | 41        |
| <b>3.6</b> | <b>Análise estatística</b>  | <b>41</b> |
| <b>4</b>   | <b>RESULTADOS</b>   | <b>43</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Atividade gastroprotetora</b>  | <b>43</b> |
| 4.1.1      | Lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos  | 43        |
| 4.1.2      | Avaliação histopatológica da mucosa gástrica de camundongos   | 45        |
| 4.1.3      | Avaliação do efeito de 1,4-cineol frente às lesões gástricas induzidas por Piroxicam (Droga anti-inflamatória) em camundongos   | 48        |
| 4.1.4      | Avaliação do envolvimento do Óxido Nítrico (NO) no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol sobre as lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos                      | 50        |
| 4.1.5      | Avaliação do envolvimento dos Canais de K-ATP-dependentes ( $K_{ATP}$ ) no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto           | 52        |
| 4.1.6      | Avaliação do envolvimento da síntese de prostaglandinas (PGs) no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto                     | 54        |
| 4.1.7      | Avaliação do envolvimento do Receptor Transiente Potencial Vanilóide 1 (TRPV 1) no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto   | 56        |
| <b>4.2</b> | <b>Atividade antioxidante</b>   | <b>58</b> |
| 4.2.1      | Avaliação do envolvimento dos grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH) no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto          | 58        |
| 4.2.2      | Avaliação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD) no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto                              | 60        |
| 4.2.3      | Avaliação da atividade da Mieloperoxidase (MPO) no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto                                   | 62        |
| 4.2.4      | Determinação do envolvimento da peroxidação lipídica no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto                              | 64        |
| <b>5</b>   | <b>DISCUSSÃO</b>  | <b>67</b> |
| <b>6</b>   | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>   | <b>77</b> |
| <b>7</b>   | <b>CONCLUSÃO</b>  | <b>79</b> |
|            | <b>REFERÊNCIAS</b>  | <b>81</b> |



# *INTRODUÇÃO*

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Úlcera péptica

A úlcera é definida como uma abertura na mucosa do trato digestivo, que se estende através da musculatura da mucosa à submucosa ou mais profundamente (THOMOPOULOS *et al.*, 2004).

Úlcera péptica ou Doença péptica ulcerosa (DPU) é uma denominação genérica, comumente utilizada para designar as úlceras que surgem principalmente no estômago e no intestino, com tecido aparente. Gastrite ou duodenite podem gerar úlceras pépticas. As úlceras esofágicas, mesmo sendo raras, também podem ser consideradas úlceras pépticas.

O surgimento destas lesões deve-se a um desequilíbrio entre os fatores protetores (muco, bicarbonato, fluxo sanguíneo adequado, óxido nítrico (NO), prostaglandina (PG), dentre outros) e agressores (pepsina, ácido clorídrico,  $H_2O_2$ ,  $OH^-$ ,  $O_2^-$ , dentre outros). Estas lesões podem ser desencadeadas e agravadas pelo estresse, consumo excessivo de álcool, tabagismo, uso de drogas antiinflamatórias do tipo não esteroidais (DAINES) e pela presença de *Helicobacter pylori* no trato gastrointestinal (WALLACE; GRANGER, 1996; MAITY *et al.*, 2003).

Apesar da baixa mortalidade associada a esta doença, a qualidade de vida dos doentes é bastante afetada, implicando em elevados custos econômicos, diretos ou indiretos (MARTINS *et al.*, 2005).

Do ponto de vista epidemiológico, a úlcera péptica é uma doença extremamente dinâmica. Sua prevalência é difícil de ser estimada, devido à subjetividade dos sintomas e à semelhança do quadro clínico com os vários tipos de dispepsia. A maioria dos estudos epidemiológicos baseia-se em estatísticas obtidas a partir de atendimentos médicos, hospitalizações, cirurgias e óbitos, dados estes, sujeitos a críticas, como não-representativos de todo o espectro da doença ulcerosa. Apesar de ser uma doença extremamente freqüente, não se conhece de modo preciso sua real incidência na população brasileira. Nas diferentes

estatísticas, a incidência de úlcera péptica no Brasil varia de 1 a 20%, o que reflete tão somente diferenças na coleta dos dados, nos critérios de diagnóstico e na variação das populações estudadas. Atualmente, estudos mostram que as úlceras pépticas afetam cerca de 10% da população mundial (VERAS, 2007).

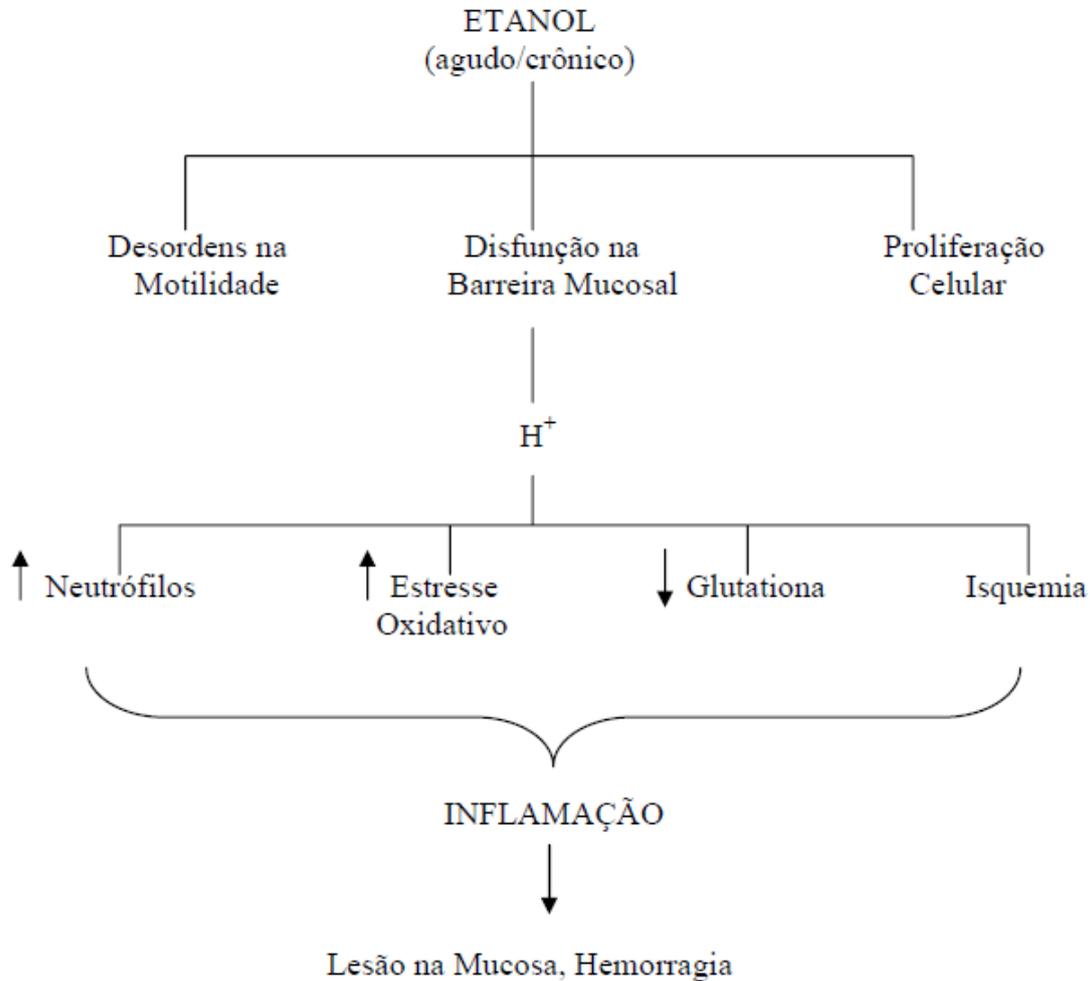
O etanol é uma causa comum de lesão gástrica em humanos. É conhecido como uma substância tóxica que causa injúria à mucosa gástrica. Sua ingestão excessiva pode resultar em gastrite aguda, caracterizada por edema de mucosa, hemorragias subepiteliais, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias (GUSLANDI, 1987). O etanol absoluto promove rapidamente a formação de bolhas enantemáticas na mucosa gástrica, devido a uma reação inflamatória aguda que provoca um aumento na permeabilidade vascular (SZABO *et al.*, 1985).

Um importante efeito deletério do etanol no estômago é depleção dos grupos sulfidrílicos não-protéicos, que são necessários para a estabilização das membranas celulares, bem como para a eliminação de radicais livres. O etanol também influencia a atividade da musculatura, provoca estase gástrica, congestão capilar e aumento da permeabilidade vascular, aumentando o risco de hemorragia e ulceração, associados a lesões macroscópicas e microscópicas na mucosa (MACMATH, 1990; SANTOS; RAO, 2001).

Como consequência dos danos aos microvasos, o etanol promove a liberação de mediadores inflamatórios e vasoconstrição de artérias na submucosa, podendo resultar em isquemia, além de promover também a liberação de endotelina e degranulação de mastócitos. Eventualmente, esses eventos levam à formação de mais necrose na mucosa (SAIKA; UEYAMA; SENBA, 2000; TARNAWSKI *et al.*, 1998). Foi verificado também que o etanol causa um aumento na transmigração neutrofílica, de forma dose-dependente, com consequente dano celular no epitélio gástrico (KVIETYS *et al.*, 1990; SZABO *et al.*, 1985).

Com base nos conhecimentos produzidos, Siegmund, Teyssen e Singer (2002) propuseram um esquema para representar os efeitos agudos e crônicos do etanol na mucosa gástrica (**Figura 1**).

**Figura 1:** Esquema representativo dos efeitos do consumo agudo e crônico de etanol no estômago



Fonte: (SIEGMUND; TEYSSEN; SINGER, 2002).

## 1.2 Fatores protetores da mucosa gástrica

### 1.2.1 Óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso que participa da sinalização de inúmeros processos fisiológicos como o relaxamento do músculo liso, neurotransmissão, agregação plaquetária, regulação de mecanismos pró e anti-apoptóticos e controle da pressão arterial e fluxo sanguíneo regional (RADOMSKI; MONCADA, 1993; KIM *et al.*, 2001). Na presença de oxigênio molecular, o terminal guanidino nitrogenado da L-arginina produz NO e L-citrulina em um processo catalisado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (KUO;

SCHROEDER, 1995).

O óxido nítrico (NO) tem um importante papel na modulação da defesa da mucosa gástrica, como: regulador na secreção de muco (BROWN *et al.*, 1993), vasodilatador produzindo aumento de fluxo sanguíneo local (WALLACE; MILLER, 2000), inibidor da migração de neutrófilo (BANICK *et al.*, 1997) e auxiliar no processo de cicatrização da úlcera gástrica (JADESKI; LALA, 1999). Na cicatrização, o NO é um importante reparador da mucosa, provavelmente pela sua habilidade de aumentar o depósito de colágeno pelos fibroblastos além de estimular a angiogênese (WALLACE *et al.*, 2000).

O bloqueio do NO aumenta o estresse oxidativo ativando mastócito. Essas células são encontradas em grandes quantidades no trato gastrointestinal (TGI), as quais liberam mediadores como histamina e fator ativador de plaquetas, causando o aumento da permeabilidade epitelial; esse evento é rapidamente revertido pela liberação exógena de NO (KANWAR *et al.*, 1994).

Alguns trabalhos recentes têm confirmado o papel do óxido nítrico endógeno na gastroproteção contra diferentes agressores. Santos *et al.* (2005) mostraram que o sildenafil, droga estimuladora da via NO/GMPc, protegeu a mucosa gástrica da lesão por indometacina. Medeiros *et al.* (2008) mostraram também uma ação protetora do sildenafil na lesão gástrica induzida por etanol. O uso de L-NAME, um inibidor das isoformas da óxido nítrico sintase, prolongou a cicatrização da injúria gástrica aguda (KONTUREK *et al.*, 1993) e aumentou a intensidade da lesão provocada por etanol em estômago de ratos (NAHAVANDI *et al.*, 1999).

### 1.2.2 Neurônios sensoriais aferentes

A importância do papel dos neurônios sensoriais sensíveis a capsaicina veio de estudos que mostraram que a administração sistêmica de capsaicina (GRAY *et al.*, 1994; HOLZER; LIPPE, 1988; SZOLCSÁNYI; BARTHÓ, 1981) ou a administração dentro do estômago de capsaicina em concentrações elevadas (ABDEL-SALAM; MÓZSIK; SZOLCSÁNYI, 1995; SZOLCSÁNYI, 1990) resultaram em exacerbação do efeito lesivo de agentes ulcerogênicos. Por outro lado, a administração em baixas concentrações estimulou terminações periféricas de nervos sensoriais sensíveis a capsaicina e protegeu a mucosa

gástrica contra injúrias diversas (ABDEL-SALAM; SZOLCSÁNYI; MÓZSIK, 1997; HOLZER *et al.*, 1990; MERCHANT *et al.*, 1994).

O receptor vanilóide tipo 1 (VR1), chamado de acordo com a nova nomenclatura de canal de potencial transiente tipo vanilóide subtipo 1 (TRPV1), está expresso numa subpopulação de nervos sensoriais sensíveis a capsaicina que respondem a estímulos nocivos mecânicos, térmicos e químicos. A estimulação desses receptores sensoriais gástricos leva a liberação de substância P (KWOK; MCINTOSH, 1990), somatostatina e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (INUI *et al.*, 1991; REN *et al.*, 1993), mas inibe a secreção de gastrina (REN *et al.*, 1993).

### 1.2.3 Canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K^+_{ATP}$ )

Os  $K^+_{ATP}$  participam de diversos processos fisiológicos como liberação de neurotransmissores (LISS; BRUNS; ROEPER, 1999), controle da secreção de insulina e glucagon (ASHCROFT; HARRISON; ASHCROFT, 1984), citoproteção na isquemia cardíaca e cerebral, reatividade vascular e manutenção do tônus do músculo liso (DAUT *et al.*, 1994). Apesar de não ter sua ação completamente elucidada no estômago, os  $K^+_{ATP}$  parecem estar envolvidos com a contratilidade do estômago, a regulação do fluxo sanguíneo e com a secreção de ácido gástrico (TOROUDI *et al.*, 1999). Nos últimos dez anos, estudos utilizando glibenclamida e diazóxido, respectivamente, inibidor e ativador dos  $K^+_{ATP}$ , têm demonstrado que a ativação desses canais tem participação na proteção gástrica contra diferentes agressores. Akar *et al.* (1999) demonstraram que o diazóxido reduziu a lesão gástrica e a infiltração neutrofílica induzida por indometacina, enquanto o uso de glibenclamida reverteu esses achados. A ativação de canais  $K^+_{ATP}$  também está envolvida na proteção gástrica do sildenafil contra a lesão induzida por etanol (MEDEIROS *et al.*, 2008). Gomes *et al.* (2006) demonstraram que os  $K^+_{ATP}$  têm papel na gastroproteção do LPS contra a lesão induzida por indometacina e, Rahgozar *et al.* (2001) mostraram que o diazóxido inibiu as lesões gástricas provocadas por etanol, enquanto a glibenclamida aumentou essas lesões.

### 1.2.4 Prostaglandinas (PGs)

A formação das PGs inicia-se com a ativação da fosfolipase  $A_2$  que pode ser

provocada por estímulos fisiológicos (angiotensina, bradicinina, noradrenalina) ou por estímulos patológicos (lesão tecidual). A fosfolipase A<sub>2</sub> atua sobre fosfolipídeos transformando-os em ácido araquidônico que por sua vez pode percorrer duas vias: a via da ciclooxigenase (COX), com formação de PGs e tromboxano, ou a via da lipoxigenase, com formação de leucotrienos (RANG *et al.*, 2007).

Acredita-se que a maior parte das prostaglandinas no tecido gástrico normal seja sintetizada pela ação da ciclooxigenase-1 (COX-1) (HALTER *et al.*, 2001). Segundo Vane e Botting (1998), a COX-1 é responsável por manter a integridade da mucosa e o fluxo sanguíneo, enquanto a ciclooxigenase-2 (COX-2) está envolvida no processo inflamatório. No entanto, estudos recentes vêm demonstrando um papel relevante da COX-2 na defesa da mucosa gastrointestinal. Tegeder *et al.* (2000) mostraram a contribuição da COX-2 na síntese de prostaglandinas no estômago de ratos. Brzozowski *et al.* (1999) e Maricic *et al.* (1999) demonstraram que inibidores seletivos da COX-2 pioraram a lesão gástrica por isquemia e reperfusão. Posteriormente, Miyake *et al.* (2002) observaram que no curso de uma reação inflamatória gástrica ocorreu um aumento da expressão de COX-2 e uma adaptação da mucosa à lesão por etanol. Souza *et al.* (2003) demonstraram que o efeito protetor da gastrite por iodocetamina em ratos é inibido pelo rofecoxibe, um inibidor seletivo de COX-2.

#### 1.2.5 Sistema antioxidante

O termo radical livre refere-se ao átomo ou molécula altamente reativo, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). É este não-emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a estes átomos ou moléculas. Na verdade, radical livre não é o termo ideal para designar os agentes reativos patogênicos, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada. Como em sua maioria são derivados do metabolismo do O<sub>2</sub>, o termo que melhor identifica estes agentes é “espécies reativas do oxigênio” (EROs).

EROs são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O<sub>2</sub> sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H<sub>2</sub>O. Durante esse processo são formados intermediários

reativos, como os radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ ) e hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).

Normalmente, a redução completa do  $O_2$  ocorre na mitocôndria, e a reatividade das EROs é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons (COHEN, 1987). Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das EROs, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares (MELLO *et al.*, 1983). Conseqüentemente, a perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular (HERSHKO, 1989).

Em condições normais, a concentração destas espécies dentro das células é extremamente baixa pelo fato de existirem enzimas antioxidantes que as removem, ou impedem sua formação. Estes radicais tendem a ser eliminados do organismo pelo conjunto das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR) e pela catalase (CAT) (MCCORD; FRIDOVICH, 1969).

#### 1.2.5.1 Grupos sulfidrílicos não-protéicos (SHs)

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo formado por cisteína, glutamato e glicina. Sua molécula possui uma ligação peptídica não muito comum entre o grupo amina da cisteína e o grupo carboxila do glutamato. A glutathiona é um antioxidante hidrossolúvel reconhecido como o mais importante componente endógeno do *pool* dos grupos sulfidrílicos não-protéicos do nosso organismo (PARK *et al.*, 2000; GONZALES *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2004), e atua protegendo as células contra toxinas como as espécies reativas de oxigênio (EROs) (STRUZYNSKA; CHALIMONIUK; SULKOWSKI, 2005).

O papel gastroprotetor dos grupamentos SH endógenos (compostos sulfidrila), presentes no muco gástrico e em diversas enzimas do sistema antioxidante, já foi demonstrado em diversos modelos de indução de úlcera (etanol, DAINEs e estresse), nos quais ocorre uma depleção destes compostos (HERNANDEZ-MUNOZ; MONTIEL-RUIZ, C.; VAZQUEZ-

MARTINEZ, 2000; BAYIR *et al.*, 2006). O pré-tratamento com bloqueadores de grupos SH demonstrou potencializar significativamente a indução de úlceras gástricas (HIRAISHI *et al.*, 1994), enquanto que aumentos significativos promovem gastroproteção (SENER-MURATOGLU *et al.*, 2001).

No processo inflamatório, espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas e iniciam uma reação em cadeia que culmina na peroxidação lipídica e morte celular (TARIQ *et al.*, 2006). Os compostos sulfidrila ligam-se aos radicais livres formados durante este processo ou produzidos após exposição a agentes nocivos, protegendo assim a mucosa gástrica (AVILA *et al.*, 1996).

Estes agentes são também importantes na produção (SALIM, 1992) e manutenção do muco gástrico, uma vez que suas subunidades glicoprotéicas são unidas entre si por pontes dissulfeto que, uma vez reduzidas, tornam o muco hidrossolúvel (AVILA *et al.*, 1996).

### 1.3 Terapêutica atual

O tratamento da doença ulcerosa objetiva restabelecer o equilíbrio da mucosa gastroduodenal rompido, seja por aumento dos fatores agressores (HCl, pepsina, bile, medicamentos ulcerogênicos, *Helicobacter pylori*), seja por redução dos fatores defensivos locais (secreção de muco, bicarbonato e prostaglandinas) ou, ainda, por ambos os desvios (VERAS, 2007).

Durante séculos, os fármacos visavam sempre neutralizar o conteúdo gástrico de ácido clorídrico utilizando antiácidos, dieta alimentar ou cirurgia. Somente no início dos anos 70 foram introduzidos no mercado novos fármacos através da definição dos receptores de histamina H<sub>2</sub> e conseqüentemente uso de antagonistas seletivos, como a cimetidina e a ranitidina (BLACK *et al.*, 1972; YUAN; PADOL; HUNT, 2006). Esses fármacos causaram um grande impacto mundial, o que levou Kurata *et al.* (1983) a escreverem um artigo na Science intitulado “What in the world is happening to ulcers?”. O artigo descreve essa modificação no panorama do tratamento de úlcera péptica, com uma diminuição expressiva no número de cirurgias.

Algum tempo depois, foram desenvolvidos fármacos citoprotetores, como o misoprostol, um análogo da PGE<sub>1</sub>, e extensas revisões sobre eles têm sido feitas. A prostaglandina no estômago inibe a secreção ácida, enquanto estimula a secreção de muco e bicarbonato (HAWKEY, 2000).

Outros fármacos gastroprotetores foram introduzidos como os inibidores da bomba protônica ou H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase, responsável pela secreção ácida gástrica. A substância padrão foi o omeprazol, que é capaz de inibir a secreção ácida por inativação da bomba através da formação de ligações dissulfeto entre as moléculas reagentes do omeprazol com a enzima (LINDBERG; BRANDSTROM; WALLMARK, 1987; SACHS *et al.*, 1988; OLBE; CARLSSON; LINDBERG, 2003).

Apesar da grande variedade de tratamentos, a doença tem mostrado uma elevada tendência para a recidiva (MARTINS *et al.*, 2005). Muitos medicamentos utilizados no tratamento desta doença não são completamente efetivos e muitos efeitos adversos acompanham estas drogas, além do alto custo desses medicamentos para o paciente (TOMA *et al.*, 2002).

Desta forma, muitos produtos derivados de plantas apresentam-se como uma fonte atraente de novas drogas e muitos têm mostrado resultados promissores para a clínica (ZAYACHKIVSKA *et al.*, 2005), seja como fonte no desenvolvimento de novas ferramentas farmacológicas ou como um produto adjuvante no tratamento das úlceras gástricas (ARRIETA *et al.*, 2003).

Modelos experimentais utilizando o sistema digestivo, ou partes dele, podem ser de grande utilidade para a descoberta de novas drogas. Modelos experimentais de úlcera gástrica e de secreção estomacal têm custos relativamente baixos, pois necessitam basicamente de animais de laboratório e algumas drogas (CARVALHO, 2006).

A lesão gástrica por etanol é um modelo extensamente utilizado para avaliação experimental de drogas antiulcerogênicas (PANDIAN; ANURADHA; VISWANATHAN, 2002). As lesões ocorrem predominantemente na parte glandular do estômago com formação de leucotrienos C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>), espécies reativas do oxigênio, produtos secretados pelos

mastócitos, diminuição do muco e depleção de grupamentos sulfidrílicos, resultando em danos à mucosa gástrica (RAO *et al.*, 2004). Este modelo possui fundamental importância para a pesquisa científica no que concerne ao fato de podermos avaliar possíveis mecanismos pelos quais as substâncias podem atuar promovendo gastroproteção.

Outro modelo bastante utilizado é a úlcera induzida por indometacina. A administração de indometacina reduz, de forma significativa, a secreção de prostaglandinas, bicarbonato e o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica em animais experimentais. A inibição das prostaglandinas predispõe o estômago e o duodeno a danos na mucosa, enquanto o estímulo das prostaglandinas pode exercer um papel de proteção. Assim, o efeito antiulcerogênico citoprotetor de uma droga pode ser mediado pelas prostaglandinas endógenas (SZABO; SZELENYI, 1987; TAN *et al.*, 2002).

#### **1.4 Produtos naturais e a relação com a gastroproteção**

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

A utilização das plantas como medicamentos pelo homem é tão antiga quanto à própria história da humanidade. Assim, desde muito tempo, os produtos naturais, principalmente os oriundos de plantas, têm se destacado como fonte de agentes terapêuticos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Pesquisadores investem fortemente na área de produtos naturais pelo fato desses produtos encontrados na natureza apresentarem uma extensa diversidade em termos de estrutura química e de propriedades farmacológicas (WALL; WANI, 1996).

Apesar do aumento dos estudos nessa área, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (SOEJARTO, 1996). Dessa forma, as plantas medicinais tornaram-se o grande alvo das indústrias

farmacêuticas e institutos de pesquisa na busca de novas drogas e compostos com atividade terapêutica (EVANS, 1996).

Vários produtos naturais têm sido usados para o tratamento de distúrbios gastrintestinais. A primeira droga sistemicamente efetiva contra úlceras gástricas, a carbenoxolona, foi descoberta como resultado de estudos da *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz), comumente usada pelos indígenas no tratamento de úlceras gástricas, bronquite, inflamação e espasmos (AKTAR; MUNIR, 1989).

Dados recentes na literatura demonstram a grande variedade de substâncias químicas isoladas de plantas que apresentam atividade antiulcerogênica e contra distúrbios do TGI, como alguns estudos de nosso próprio grupo, que demonstraram o efeito gastroprotetor das substâncias naturais isopulegol e esculina (SILVA *et al.*, 2009; RIOS *et al.*, 2010).

#### 1.4.1 Óleos essenciais e os terpenos

Óleos essenciais, óleos etéreos ou essências são os nomes dados às misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, conhecidas por óleos voláteis obtidos de partes de plantas principalmente através de destilação por arraste com vapor d'água, bem como por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. Óleos essenciais possuem diferentes aplicações, especialmente na área da medicina e cosméticos (CRAVEIRO; FERNANDES; ANDRADE, 1981). Eles contribuem para a percepção dos sabores e das fragrâncias naturais (LIS-BALCHIN *et al.*, 1999). Muitas das propriedades farmacológicas apresentadas pelos óleos essenciais derivados de plantas se devem aos compostos químicos terpenóides, particularmente os monoterpenóides, geralmente presentes em grande quantidade nestes óleos (AMARAL *et al.*, 2007). Dentre as diversas propriedades biológicas apresentadas pelos monoterpenos, estudos na literatura têm demonstrado que estas substâncias apresentam atividade no sistema nervoso central, tais como ação ansiolítica (ALMEIDA *et al.*, 2004), depressora e anticonvulsivante (DE SOUSA *et al.*, 2006).

Quando se determinou a estrutura de alguns terpenos, ficou claro que eles poderiam, em princípio, ser considerados como múltiplos de uma unidade básica: a do hidrocarboneto isopreno ( $C_5H_{10}$ ). Esta observação levou a formação da chamada regra do isopreno, ou seja,

todos os terpenos devem ser divisíveis em unidades isopreno. No entanto, sabe-se atualmente que os terpenos não se formam na natureza a partir do isopreno, o qual nunca foi isolado como produto natural. O precursor dos terpenos é o ácido mevalônico (SIMÕES *et al.*, 1999).

Os monoterpenos e sesquiterpenos encontrados em óleos essenciais de plantas superiores foram classificados segundo suas estruturas químicas, em numerosos tipos de esqueletos (SIMÕES *et al.*, 1999). Para os monoterpenos, oito esqueletos são mais comuns (um acíclico e sete cíclicos): p-metano, tujano, pinano, carano, fenchano, bornano, triciclano.

Nos últimos anos, um número crescente de estudos tem demonstrado que vários óleos essenciais derivados de plantas brasileiras apresentam uma variedade de propriedades biológicas, tais como analgésica (AMARAL *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2001), anticonvulsivante (DE SOUSA *et al.*, 2006), efeitos centrais (SILVA *et al.*, 2007), e atividades gastroprotetoras (PAULA *et al.*, 2006). Muitos dos efeitos descritos anteriormente são frequentemente atribuídos a monoterpenos, que são os principais componentes químicos dos óleos essenciais.

#### 1.4.2 *Croton nepetaefolius* Baill. (Euphorbiaceae) e 1,4-Cineol

*Croton nepetaefolius* Baill. (Euphorbiaceae) trata-se de uma planta aromática abundante no nordeste do Brasil, onde é vulgarmente conhecida como "Marmeleiro sabiá". O gênero *Croton* é um dos mais bem representados na flora da região e inclui um grande número de espécies aromáticas que são amplamente utilizadas na medicina popular local. Infusões ou chás da casca ou das folhas de *C. nepetaefolius* são comumente utilizados por possuir propriedades antiespasmódicas, por aliviar a flatulência e aumentar o apetite (CRAVEIRO *et al.*, 1980; LEAL-CARDOSO; FONTELES, 1999). As folhas de *C. nepetaefolius* têm um teor de óleo essencial de aproximadamente 2% do peso da folha seca, composta principalmente de mono e sesquiterpenos (CRAVEIRO *et al.*, 1980). Foi mostrado que o óleo essencial de *C. nepetaefolius* (EOCN) induz uma variedade de efeitos farmacológicos. Em tecido gastrointestinal isolados de cobaias, EOCN exibiu um efeito antiespasmódico (MAGALHÃES *et al.*, 1998; MAGALHÃES; LAHLOU; LEAL-CARDOSO, 2004). No sistema cardiovascular, o tratamento intravenoso com EOCN diminuiu a pressão arterial e a

freqüência cardíaca tanto em ratos conscientes como anestesiados (LAHLOU *et al.*, 1999). Além disso, EOCN mostrou uma atividade antinociceptiva em camundongos que não foi mediada pela ativação do receptor opióide (ABDON *et al.*, 2002). 1,8-cineol, também conhecido como eucaliptol ou cajeputol (TISSERAND; BALACS, 1995), é o principal constituinte do EOCN. Este óxido de terpenóides, presente em muitos óleos essenciais vegetais, tem sido relatado por alterar um disparo neural em certas áreas do lobo olfatório (NIKITIN; BALABAN, 2000; HUMMEL *et al.*, 2003), bem como ter atividades hipotensora, relaxante muscular suave (LAHLOU *et al.*, 2002), antiinflamatória (SANTOS; RAO, 2000; KHALIL *et al.*, 2004), e antinociceptiva (SANTOS; RAO, 2000). O 1,8-cineol bloqueou a injúria gástrica promovida por etanol, de modo similar ao ácido nordihidroguanético, um inibidor da lipoxigenase. Em estudo de secreção gástrica, o 1,8-cineol semelhantemente a cimetidina, um bloqueador do receptor da histamina, inibiu o volume do suco gástrico bem como a acidez total (SANTOS; RAO, 2001).

**Figura 2:** *Croton sp.* Família Euphorbiaceae.



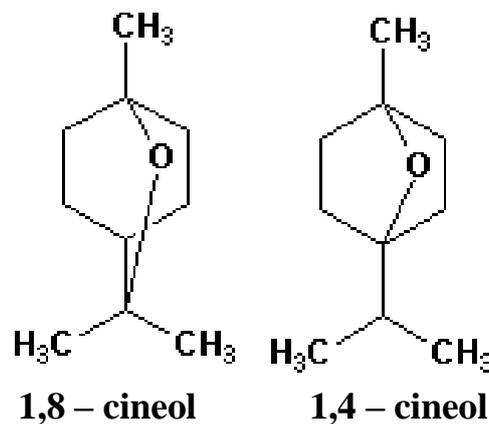
Fonte: <http://uece.br/laboeeco/index.php/pesquisas-em-andamento>; acesso em 02/08/2011)

1,4-cineol, um análogo do 1,8-cineol, é um monoterpene oxigenado amplamente distribuído, sendo um dos constituintes do sabor característico do suco de limão. Este análogo está presente no EOCN em menores quantidades, sendo considerado um precursor para a hidroxilação microbiana com base em extensa precedência das biotransformações de monoterpeneos (ROSAZZA *et al.*, 1987).

A oxidação de 1,4-cineol, um éter cíclico de monoterpene, foi estudada em ratos, microsomas de fígado humano e enzimas citocromo P450 (P450 ou CYP) recombinantes expressas em células de inseto.

Em análise por cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massa, 2-exo-hidroxi-1,4-cineol foi identificado como o principal produto de oxidação de 1,4-cineol. CYP<sub>3A4</sub> trata-se da principal enzima envolvida na 2-hidroxilação de 1,4-cineol por microsomas de fígado humano (MIYAZAWA; SHINDO; SHIMADA, 2001).

**Figura 3:** Estruturas de 1,8-cineol e 1,4-cineol.



Recentemente, em um estudo realizado em nosso laboratório, foi sugerido que 1,4-cineol apresenta uma atividade ansiolítica e depressora do Sistema Nervoso Central (GOMES *et al.*, 2010). Porém outros tipos de estudos, até onde se saiba, ainda são escassos com relação a esta substância, principalmente com relação a seus efeitos a nível gastrointestinal. Neste caso, o objeto do estudo realizado foi investigar as ações de 1,4-cineol frente a vários tipos de injúrias gástricas, visando estabelecer um efeito gastroprotetor.



*OBJETIVOS*

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

O presente trabalho visa avaliar a atividade de 1,4-cineol em modelos padronizados de úlcera gástrica em camundongos, e tentar identificar os mecanismos farmacológicos envolvidos.

### 2.2 Específicos

- Avaliar os efeitos de 1,4-cineol sobre as lesões gástricas induzidas por etanol e por piroxicam em camundongos;
- Estudar as alterações histopatológicas na mucosa gástrica após a lesão promovida pelo etanol e o efeito de 1,4-cineol na proteção da mucosa.
- Investigar o envolvimento das prostaglandinas (PGs), dos canais de potássio-ATP-dependentes, dos neurônios aferentes sensíveis a capsaicina (Receptores TRPV 1) e do óxido nítrico (NO) no possível efeito gastroprotetor de 1,4-cineol no modelo de lesão induzida por etanol absoluto.
- Avaliar o envolvimento de parâmetros antioxidantes, como glutatona reduzida (GSH) e a enzima Superóxido Dismutase (SOD), envolvidos no possível efeito gastroprotetor de 1,4-cineol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto.
- Verificar parâmetros de estresse oxidativo, como peroxidação lipídica (LPO) e dosagem de mieloperoxidase (MPO), após a lesão promovida pelo etanol e o efeito de 1,4-cineol e da N-acetilcisteína na proteção da mucosa.



*MATERIAIS E MÉTODOS*

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Drogas e Reagentes

O quadro 1 mostra as substância e reagentes utilizados na investigação experimental.

**Quadro 1.** Drogas e reagentes utilizados durante os procedimentos experimentais.

| <b>Drogas/Reagentes</b>                                     | <b>Procedência</b>                   |
|---|--------------------------------------|
| <b>1,4-Cineol (CIN)</b>                                     | Sigma <sup>®</sup> , U.S.A.          |
| <b>Ácido Clorídrico.</b>                                    | Vetec <sup>®</sup> , Brasil.         |
| <b>Ácido ditio bis-2-nitrobenzóico (DTNB)</b>               | Sigma, <sup>®</sup> U.S.A.           |
| <b>Ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico (EDTA)</b> | Reagen <sup>®</sup> , Brasil.        |
| <b>Ácido tricloroacético (TCA)</b>                          | Vetec <sup>®</sup> , Brasil.         |
| <b>Albumina sérica bovina</b>                               | Sigma <sup>®</sup> , U.S.A           |
| <b>Azul de nitro-tetrazolio</b>                             | Sigma <sup>®</sup> , U.S.A           |
| <b>Brometo de Hexadeciltrimetilamônio (HTAB)</b>            | Sigma <sup>®</sup> , U.S.A           |
| <b>Capsaicina</b>   | Sigma <sup>®</sup> , U.S.A           |
| <b>Capsazepina</b>  | Sigma <sup>®</sup> , U.S.A           |
| <b>Ciproptadina</b>   | Sigma <sup>®</sup> , U.S.A.          |
| <b>Coomassie Blue G250</b>                                  | Sigma <sup>®</sup> , U.S.A.          |
| <b>Diazóxido</b>  | Sigma <sup>®</sup> , U.S.A.          |
| <b>Etanol P.A.</b>  | Merck <sup>®</sup> , Alemanha.       |
| <b>Formaldeído P.A.</b>                                     | Reagen <sup>®</sup> , Brasil.        |
| <b>Fosfato de potássio monobásico</b>                       | Vetec <sup>®</sup> , Brasil.         |
| <b>Fosfato de potássio dibásico</b>                         | Vetec <sup>®</sup> , Brasil.         |
| <b>Glibenclamida</b>  | Biossintética <sup>®</sup> , Brasil. |
| <b>Hidrocloridrato de o-dianiside</b>                       | Sigma <sup>®</sup> , U.S.A           |
| <b>Hidróxido de sódio</b>                                   | Vetec <sup>®</sup> , Brasil.         |
| <b>L-Arginina</b>   | Sigma <sup>®</sup> , U.S.A.          |

|   |   |
|---|---|
| <b>L-Metionina</b>  | Vetec <sup>®</sup> , Brasil.                    |
| <b>L-NAME (N<sup>G</sup>-Nitro-L-arginina-metiléster)</b> | Sigma <sup>®</sup> , U.S.A.                     |
| <b>Misoprostol</b>  | Pharmacia Brasil LTDA <sup>®</sup> ,<br>Brasil. |
| <b>N-acetilcisteína</b>                                   | União química <sup>®</sup> , Brasil.            |
| <b>Peróxido de hidrogênio</b>                             | Vetec <sup>®</sup> , Brasil.                    |
| <b>Piroxicam</b>  | EMS <sup>®</sup> , Brasil.                      |
| <b>Riboflavina</b>  | Sigma <sup>®</sup> , U.S.A                      |
| <b>Cloridrato de ranitidina</b>                           | União química <sup>®</sup> , Brasil.            |
| <b>Reagente de Folin</b>                                  | QEEL <sup>®</sup> , Brasil.                     |
| <b>Trisma base</b>  | USB <sup>®</sup> , USA                          |
| <b>Tween 80</b>   | Sigma <sup>®</sup> , U.S.A.                     |

A capsaicina foi veiculada em diluente específico, segundo composição abaixo:

- Formulação do diluente da capsaicina

|                 |      |
|-----------------|------|
| Etanol absoluto | 1mL  |
| Tween 80        | 1mL  |
| PBS q.s.p.      | 10mL |

- Formulação do PBS (Salina Tamponada)

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| NaCl                        | 8g     |
| KCl                         | 0,2g   |
| Fosfato de sódio dibásico   | 1,15g  |
| Fosfato de sódio monobásico | 0,2g   |
| H <sub>2</sub> O q.s.p.     | 1000mL |

### **3.2 Aspectos éticos observados para a realização dos procedimentos experimentais em animais**

Todos os procedimentos envolvendo a utilização de animais realizados no presente estudo seguiram as recomendações do Conselho Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), respeitando a legislação vigente, e sob a autorização do Comitê de ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (protocolo nº64/09).

### **3.3 Animais**

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss*, adultos, machos, pesando entre 24-34g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia em caixas de propileno  $26 \pm 2$  °C, com ciclos claro/escuro de 12 em 12 horas, recebendo ração padrão (Purina®) e água “ad libitum”. Os animais foram colocados em jejum de sólidos de 15-16 horas, antes da realização de cada experimento em que a via oral foi utilizada para a absorção do fármaco ou ação da droga.

### **3.4 Avaliação da atividade Gastroprotetora**

#### **3.4.1. Lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos**

Camundongos *Swiss*, machos, com peso em torno de 24-34 g, divididos em grupos (n=8), foram tratados com ciproheptadina 10 mg/Kg, v.o. (Cipro 10) (OHTA; KOBAYASHI; ISHIGURO, 1999; SILVA *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2009), um conhecido antioxidante, ou com veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, 10 mL/Kg, v.o.) ou CIN (100, 200 mg/Kg, v.o.) 60 min antes da administração oral de etanol absoluto (0,2 mL/animal). Decorridos 30 min da administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados, abertos pela grande curvatura, lavados em solução salina 0,9 % e comprimidos entre dois

vidros de relógio para uma melhor visualização. O percentual da face glandular gástrica lesionada foi determinado com o auxílio de um programa de planimetria computadorizada (*ImageJ*<sup>®</sup>). A área ulcerada foi expressa em termos de percentagem em relação à área total do corpo gástrico (ROBERT *et al.*, 1979).

### 3.4.2 Avaliação histopatológica da mucosa gástrica de camundongos

Para o estudo histopatológico, uma amostra do estômago foi fixada numa solução de formol 10% tamponado, onde permaneceu por 24 horas. Em seguida as amostras foram transferidas para uma solução de álcool 70%, onde permaneceram até a realização dos procedimentos histológicos. Logo após, o material biológico foi seccionado e embebido em parafina. Foram feitos cortes de cinco micrometros, colocados numa lâmina e corados com hematoxilina-eosina para o estudo no microscópio óptico. As amostras foram avaliadas de acordo com os critérios de Laine e Weinstein (1988), sendo avaliada a perda de células epiteliais (escores de 0-3), edema na superfície da mucosa (escores de 0-4), hemorragia (escores de 0-4) e infiltração de células inflamatórias (escores de 0-3), sendo 14 o escore máximo. Toda a avaliação histopatológica foi realizada através de um estudo cego.

### 3.4.3 Modelo de indução de úlcera por droga anti-inflamatória não-esteroidal (Piroxicam) em camundongos

Este método foi realizado conforme descrito por Hayden, Thomas e West (1978) e modificado por Puscas *et al.* (1997). Após 36 horas de jejum, os grupos experimentais foram tratados 30 minutos antes da indução da lesão. Grupos de animais receberam solução de NaCl 0,9 % (v.o.), Ranitidina (20 mg/Kg, v.o.) ou CIN nas doses de 100 ou 200 mg/kg (v.o.). A lesão gástrica foi induzida pela administração subcutânea de piroxicam (30 mg/Kg). Após 4 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e, em seguida, os estômagos foram retirados e abertos ao longo da grande curvatura, e determinado o índice de lesões ulcerativas (ILU). A extensão das lesões foi registrada, atribuindo-se escores, de acordo com a escala de Szabo *et al.* (1985), evidenciada no quadro 2.

**Quadro 2.** Determinação do índice de lesões gástricas induzidas por piroxicam segundo SZABO et al., 1985.

| <b>Parâmetro avaliado</b>           | <b>Pontuação</b><br>(n = nº de úlceras encontradas) |
|-------------------------------------|---|
| 1. Perda de pregas da mucosa        | 1 ponto   |
| 2. Descoloração da mucosa           | 1 ponto   |
| 3. Edema                            | 1 ponto   |
| 4. Hemorragias                      | 1 ponto   |
| 5. Número de petéquias              |   |
| • até 10                            | 2 pontos  |
| • mais de 10                        | 3 pontos  |
| 6. Intensidade da ulceração         |   |
| • úlceras ou erosão de até 1mm      | n x 2 pontos  |
| • úlceras ou erosão maiores que 1mm | n x 3 pontos  |
| • úlceras perfuradas                | n x 4 pontos  |

#### 3.4.4 Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol em modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos

Os animais, divididos em grupos (n=8), foram tratados com veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, 10 mL/Kg, v.o.) ou CIN (200 mg/Kg, v.o.) 60 min antes, ou L-Arginina (L-ARG) (600 mg/Kg, i.p.) ou N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metilester (L-NAME) (10 mg/Kg, i.p.) (GÜRBÜZ *et al.*, 1999; CHANDRANATH; BASTAKI; SINGH, 2002), 15 min antes da administração de etanol absoluto (0,2 mL/animal, v.o.). Para avaliar o papel do óxido nítrico no efeito antiulcerogênico de CIN, também foram realizadas combinações onde L-NAME (10 mg/Kg, i.p.) foi administrado 15 min antes de CIN (200 mg/Kg, v.o.) ou L-ARG (600 mg/Kg, i.p.) e 1 hora ou 30 min depois foi induzida a lesão com etanol. Decorridos 30 min da administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados, abertos pela grande curvatura e em seguida procedeu-se como descrito anteriormente no que concerne a análise do percentual de lesão gástrica.

### 3.4.5 Papel dos canais de potássio ATP-dependentes ( $K^+_{ATP}$ ) no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol em modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos

Os animais foram tratados com veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, 10 mL/Kg, v.o.), CIN (200 mg/Kg, v.o.) ou diazóxido (3 mg/Kg, i.p.) 60 min ou 30 min, para o diazóxido, antes da administração oral de etanol absoluto (0,2 mL/animal). Para avaliar a possível participação dos canais de potássio ATP dependentes ( $K^+_{ATP}$ ) no efeito gastroprotetor de CIN, foram realizadas combinações nas quais glibenclamida (10 mg/Kg, i.p.) (PESKAR; EHRLICH; PESKAR, 2002) foi administrada 15 min antes do tratamento com CIN (200 mg/Kg, v.o.) ou diazóxido (3 mg/Kg, i.p.) e 1 hora ou 30 min depois foi induzida a lesão com etanol. Trinta minutos depois da administração do etanol absoluto, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados, abertos pela grande curvatura e em seguida procedeu-se como descrito anteriormente no que concerne a análise do percentual de lesão gástrica.

### 3.4.6 Papel das prostaglandinas (PGs) no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol em modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos

Para avaliar a possível participação das prostaglandinas no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol, os animais foram tratados com veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, 10 mL/Kg, v.o.), CIN (200 mg/Kg, v.o.) ou misoprostol (50  $\mu$ g/Kg, v.o.) 1 h antes da administração de etanol absoluto (0,2 mL/animal, v.o.). Combinações também foram realizadas e, indometacina (10 mg/Kg, v.o., dose em que inibe a síntese de prostaglandinas sem induzir lesão gástrica (ADEYEMI *et al.*, 2005) foi administrada 2 h antes da administração de CIN (200 mg/Kg, v.o.) ou do misoprostol (50  $\mu$ g/Kg, v.o.) e 1 hora depois foi induzida a lesão com etanol. Após 30 min da administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos foram removidos e em seguida procedeu-se como descrito anteriormente no que concerne a análise do percentual de lesão gástrica.

### 3.4.7 Papel dos receptores TRPV-1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos

Para avaliar a possível participação dos neurônios aferentes sensíveis a capsaicina no efeito gastroprotetor de CIN, os animais foram divididos em grupos (n=8) e tratados com veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, 10 mL/Kg, v.o.), CIN (200 mg/Kg, v.o.) ou capsaicina (0,3 mg/Kg, v.o.) 1 h antes da administração oral de etanol absoluto (0,2 mL/animal, v.o.). Também foram realizadas combinações nas quais capsazepina (5 mg/Kg, i.p.) (CAMPOS *et al.*, 2008) foi administrada 30 min antes do tratamento com CIN ou capsaicina e 1 hora depois foi induzido a lesão com etanol. Decorridos 30 min da administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos removidos e em seguida procedeu-se como descrito anteriormente no que concerne a análise do percentual de lesão gástrica.

## 3.5 Avaliação da atividade antioxidante

### 3.5.1 Papel dos grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH) no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol em modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos

Para avaliar uma possível ação antioxidante no efeito gastroprotetor de CIN em modelo de úlcera gástrica induzida por etanol, grupos de animais foram tratados com N-Acetilcisteína (NAC) (300 mg/Kg, v.o.), com veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, 10 mL/Kg, i.p.) ou CIN (200 mg/Kg, i.p.) 60 min antes da administração de etanol absoluto (0,2 mL/animal, v.o.). Um outro grupo, tratado apenas com solução salina 0,9 %, foi incluído no estudo. Após 30 min da administração do etanol, os animais foram sacrificados e tiveram seus estômagos retirados. A quantificação dos grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH) foi realizada segundo o método de Sedlak e Lindsay (1968). A porção glandular de cada estômago foi removida, pesada e homogeneizada com EDTA 0,02 M gelado, para preparação do homogenato a 10 %. Em seguida, adicionou-se uma alíquota de 1 mL do homogenato com 800 µL de água destilada e 200 µL de ácido tricloroacético (TCA 50 % em solução aquosa) e então as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 min. Um volume de 1 mL foi então

retirado do sobrenadante e adicionou-se 2 mL de tampão Tris 0,4 M, pH 8,9 e 50 µL de DTNB 0,01 M. A absorbância foi medida dentro de 5 min a 412 nm em espectrofotômetro. A concentração de NP-SH foi calculada através de uma curva padrão de glutathiona reduzida (GSH) e os resultados expressos em µg de NP-SH/g de proteína. A concentração de proteínas foi medida utilizando o método de Bradford (1976).

### 3.5.2 Papel da Superóxido Dismutase (SOD) no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol em modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos

A atividade da SOD foi medida de acordo com Sun, Oberley e Li (1988). A quantidade da enzima foi avaliada medindo-se sua capacidade de inibir a redução fotoquímica do azul de nitro-tetrazolio (NBT). Nesse método a riboflavina reduzida fotoquimicamente gera  $O_2^-$  o qual reduz o NBT produzindo formazan que absorve no comprimento de onda de 560nm. Na presença de SOD a redução do NBT é inibida. Os resultados serão expressos em unidades da enzima por grama de proteína, que é a quantidade de SOD necessária para inibir a taxa de redução do NBT em 50%. O homogenato (10% em tampão fosfato) foi centrifugado (10 minutos, 3600 rpm a 4°C). O sobrenadante foi retirado e centrifugado novamente (20 min, 12000 rpm, 4°C). Para o ensaio foi utilizado o sobrenadante. Numa câmara escura foram misturados 1mL do meio de reação (tampão fosfato 50mM, EDTA 100nM e L-metionina 13mM pH 7,8), 30 µL da amostra, 150µL do NBT 75µM e 300 µL riboflavina 2µM. Os tubos contendo a solução obtida foram expostos a lâmpadas fluorescentes (15W) por 15 minutos. Ao término do tempo o material foi lido em espectrofotômetro a 560nm. A concentração de proteínas foi medida utilizando o método de Bradford (1976).

### 3.5.3 Papel da Mieloperoxidase (MPO) no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol em modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos

Os neutrófilos são considerados a primeira linha de defesa do corpo por serem recrutados rapidamente ao local da inflamação através da quimiotaxia (ABBAS *et al.*, 2002). O aumento significativo da atividade da mieloperoxidase (MPO) tem uma proporção direta ao número de neutrófilos infiltrados no tecido, portanto pode-se utilizar sua atividade como índice de migração leucocitária e de estresse oxidativo (PERALTA; BARNARD;

TURRENS,1993). Animais, divididos em grupos de 8, foram sacrificados 45 minutos após a administração do etanol, seus estômagos foram retirados. Após o congelamento, as amostras de estômago foram homogeneizadas em uma solução de Brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5% (HTAB) em tampão fosfato 50mM pH 6.0 (1 ml por 50g do tecido). O homogenato foi submetido a três ciclos de congelamento, 5 minutos (-70° C) e descongelamento (15 segundos no sonificador). As amostras foram então centrifugadas a 4000 rpm numa temperatura de 4° C por 15 minutos para remover o material insolúvel. A MPO contida no sobrenadante (0,1ml) foi analisada espectrofotometricamente após a adição de 2,9 ml de tampão fosfato (50mM pH6) contendo 0,167 mg/ml de hidrocloreto de  $\theta$ -dianisidine e 0,0005% de peróxido de hidrogênio. As cinéticas de mudança na absorbância a 470 nm foram medidas no tempo 0, 1 e 3 minutos após a adição de  $\theta$ -dianisidine (BRADLEY; CHRISTENSEN; ROTHSTEIN, 1982). A concentração de proteínas foi medida utilizando o método de Bradford (1976).

#### 3.5.4 Papel da lipoperoxidação no efeito antioxidante e gastroprotetor de 1,4-cineol em modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos

A taxa de lipoperoxidação da mucosa gástrica foi estimada pela determinação de malonildialdeído (MDA) usando o teste do ácido tiobarbitúrico. Os estômagos foram lavados com salina gelada para minimizar a interferência da hemoglobina com radicais livres e remover o sangue aderido à mucosa. Os estômagos foram homogeneizados a 10% com tampão fosfato de potássio, retirado uma alíquota de 250  $\mu$ L e posto em banho-maria a 37°C por 1 hora, em seguida foi adicionado 400  $\mu$ L de ácido perclórico 35% e centrifugado a 14000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado e posto em contato com 400  $\mu$ L de ácido tiobarbitúrico 0,6% e a mistura foi incubada a 95-100°C por 1 hora. Após esfriar, a medida da absorbância do sobrenadante foi lida a 532 nm em espectrofotômetro. Uma curva padrão foi gerada usando 1,1,3,3-tetrametoxipropene. Os resultados foram expressos como nmol de MDA/mg de proteína. A concentração de proteínas foi medida utilizando o método de Bradford (1976).

### 3.5.5 Dosagem de proteínas totais na amostra de estômago após lesão induzida por etanol em camundongos

O método é baseado na interação do corante Coomassie Blue G250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica que absorve fortemente em 595nm. Adicionou-se as soluções (albumina padrão, água destilada, tampão e amostras) aos poços. Em cada poço foi adicionado 40µL de solução. Por exemplo, se no poço foi adicionado 2 µL da amostra, também recebeu 38µL do tampão utilizado no preparo da amostra. Em seguida foi adicionado 200 µL da solução de Bradford (DILUÍDA 5x), composição abaixo, em cada poço. Após 5 minutos foi lido em comprimento de onda de 595nm em ELISA (BRADFORD, 1976).

- Formulação da solução de Bradford (concentrada 5x):

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| Coomassie Blue G250     | 0,1g   |
| Etanol absoluto         | 50mL   |
| Ácido o-fosfórico       | 100mL  |
| H <sub>2</sub> O q.s.p. | 200 mL |

### 3.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada empregando o teste de análise de variância (ANOVA). Quando houve diferença significativa entre os grupos, foi realizado o teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls. Para a análise das alterações histológicas, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunns. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M (variáveis com distribuição normal) ou pela mediana ± mínimo e máximo (variáveis sem distribuição normal), sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .



*RESULTADOS*

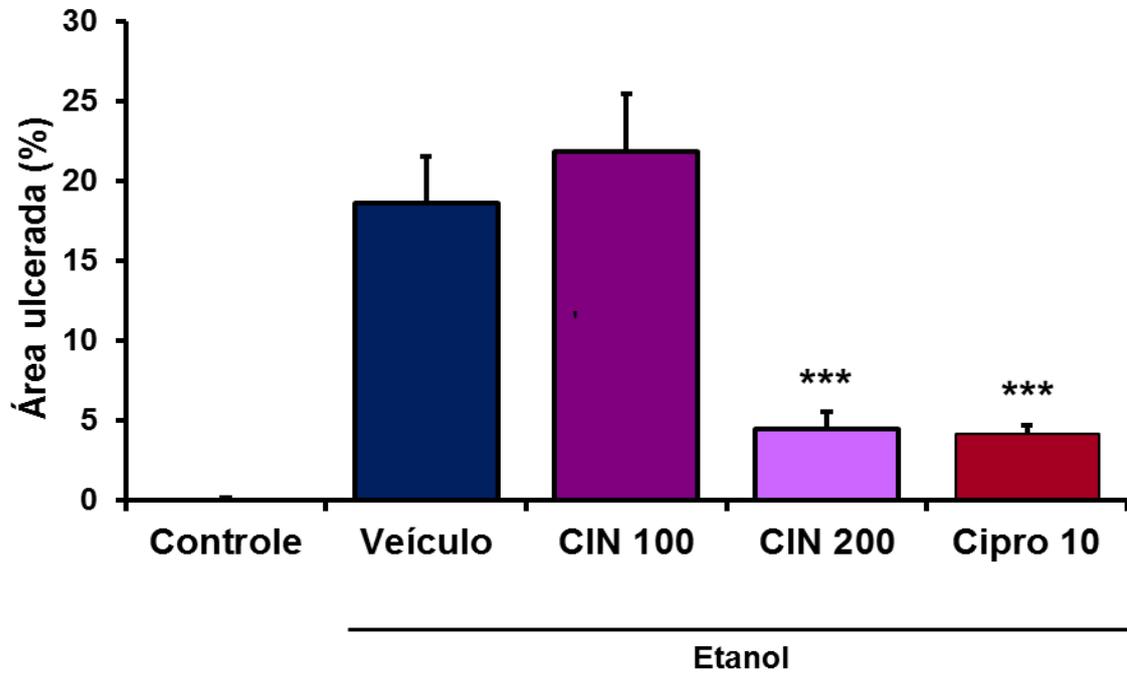
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Atividade gastroprotetora

#### 4.1.1 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 ( $18,61 \pm 2,92$  %). A área ulcerada pelo etanol com a administração prévia de Cineol 100 mg/Kg (CIN 100) v.o. foi estatisticamente semelhante ao veículo ( $21,82 \pm 3,62$  %). Essa ulceração foi significativamente diminuída com a pré-administração de Cineol 200 mg/Kg v.o. (CIN 200) ( $4,45 \pm 1,06$  %,  $p < 0,001$ ) quando comparado ao grupo veículo. Esse efeito gastroprotetor foi semelhante à Cipro 10, droga antagonista dos receptores de histamina e 5-HT, usada como droga de referência, que foi capaz de diminuir a área gástrica lesionada ( $4,11 \pm 0,61$  %,  $p < 0,001$ ) em comparação ao grupo veículo. Houve diferença estatística entre as doses de CIN utilizadas (**Figura 4**).

**Figura 4.** Efeito de 1,4-cineol (CIN) sobre a área ulcerada no modelo de indução de úlcera 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), CIN 100 e 200 mg/Kg, v.o e Ciproptadina 10 mg/Kg v.o (Cipro 10) foram administrados 1h antes dos animais receberem etanol absoluto. Controle representa o grupo sadio. Foram utilizados oito animais por grupo. \*\*\* $p < 0,001$  vs Veículo (ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*).

#### 4.1.2 Avaliação histopatológica da mucosa gástrica de camundongos

Os resultados referentes à análise histopatológica da mucosa gástrica dos camundongos estão demonstrados na **Figura 5** e na **Tabela 1**. Os animais pré-tratados com CIN 200, v.o. (**Figura 5C**) apresentaram grande diferença macroscópica e microscópica da mucosa gástrica lesada, evidenciando a gastroproteção, quando comparado ao controle tratado apenas com o agente estressor (**Figura 5B**), no qual foi observada lesão severa caracterizada por dano hemorrágico, edema, perda de células epiteliais e infiltrado inflamatório. O grupo sadio não apresentou lesões (**Figura 5A**).

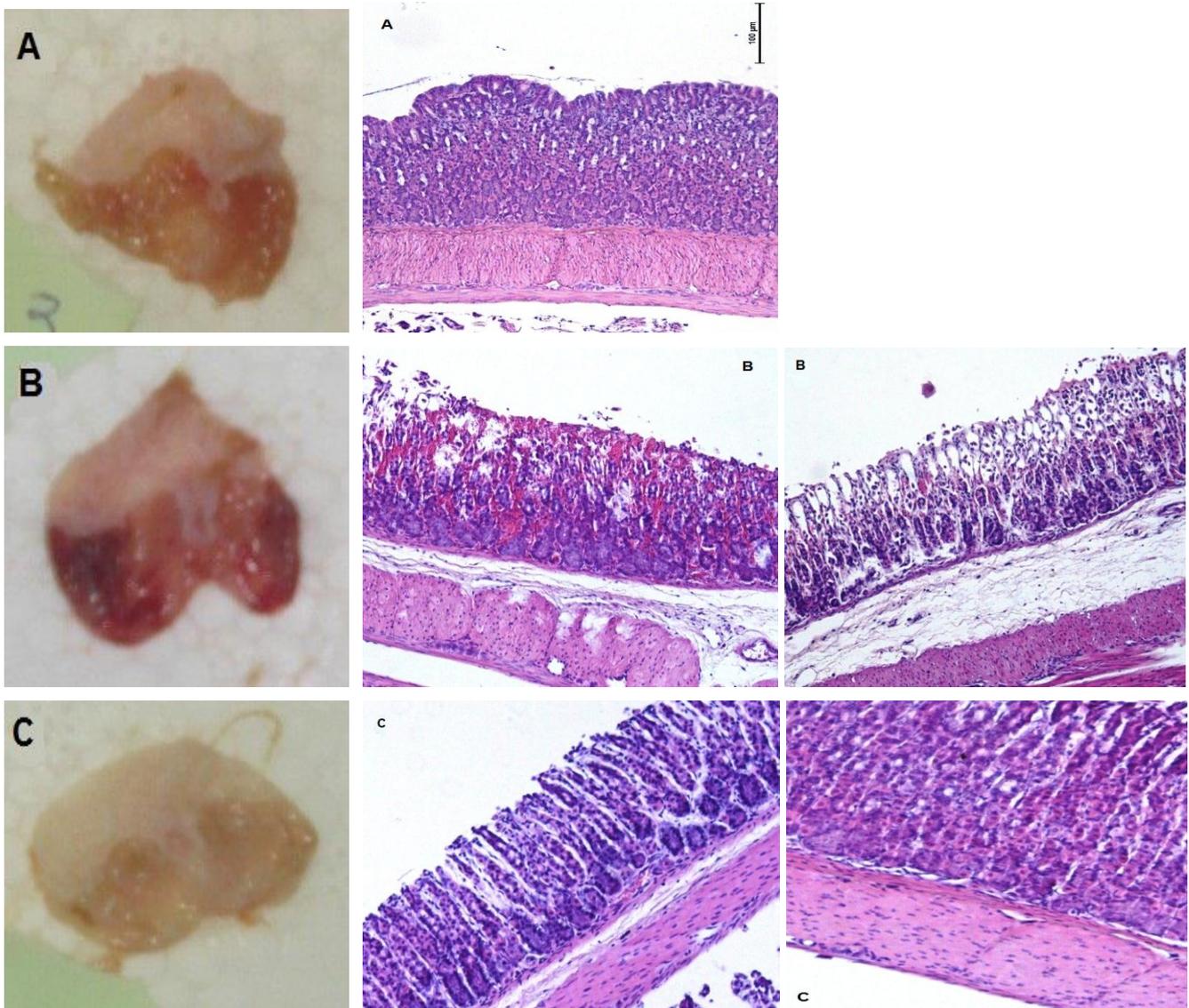
A **Tabela 1** apresenta o resultado do somatório dos escores de todos os parâmetros histopatológicos avaliados, ou seja, da hemorragia (0-4 escores), do edema (0-4 escores), da perda de células epiteliais (0-3 escores) e do infiltrado inflamatório (0-4 escores). Verifica-se que CIN 200 diminuiu, significativamente, os efeitos do etanol sobre quase todos estes parâmetros.

**Tabela 1.** Escores das alterações histopatológicas na mucosa gástrica de camundongos submetidos às lesões gástricas induzidas por etanol pré-tratados ou não com 1,4-cineol.

| Tratamento       | Escore da Microscopia   |                                     |  |  |
|------------------|-------------------------|-------------------------------------|--|--|
|                  | Edema<br>(escore 0–4)   | Dano<br>Hemorrágico<br>(escore 0–4) | Perda de Células<br>Epiteliais<br>(escore 0–3) | Infiltração de<br>células<br>inflamatórias<br>(escore 0-4) |
| Sadio            | 0                       | 0                                   | 0,5 (0-1)                                      | 0  |
| Veículo + Etanol | 2,6 (2-4) <sup>##</sup> | 3,5 (3-4) <sup>##</sup>             | 3 (2-3) <sup>##</sup>                          | 2 (2-3) <sup>#</sup>                                       |
| CIN 200 + Etanol | 0,25 (0-1)*             | 0 *                                 | 1 (0-1)  | 0 *  |

Os animais foram tratados oralmente com veículo (salina a 0,9 % com 3% de Tween 80, v.o.) ou 1,4-cineol 200 mg/Kg (CIN 200), 60 min antes da administração do etanol (0,2 mL, v.o.). As alterações histopatológicas da porção glandular dos estômagos foram avaliadas de acordo com os critérios descritos por Laine e Weinstein (1988): 1- edema (escore 0–4), 2- dano hemorrágico (escore 0–4), 3- perda de células epiteliais (escore 0–3) e 4- infiltração de células inflamatórias (escore 0-3). Os resultados são apresentados como mediana, com valores máximos e mínimos mostrados entre parênteses (n = 5). <sup>#</sup> $p < 0,05$  e <sup>##</sup> $p < 0,01$  vs Controle; \* $p < 0,05$  vs veículo + etanol. Foi utilizado o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* seguido pelo teste de *Dunn post hoc*.

**Figura 5.** Efeitos macroscópico e microscópico na mucosa gástrica de camundongos submetidos às lesões gástricas induzidas por etanol pré-tratados ou não com 1,4-cineol.



Fotografias dos estômagos abertos ao longo da grande curvatura (A-C) e análise microscópica com ampliação de 100x e 400x para cada grupo (A-C 100x e 400x). (A) Animais tratados apenas com veículo (salina a 0,9% com 3% de Tween 80, v.o.), mostrando aspectos histológicos normais; (B) Tratamento com etanol (0,2 mL/animal), evidenciando infiltração inflamatória, edema, hemorragia e perda de células epiteliais; (C) Tratamento com 1,4-cineol (200 mg/kg, v.o.) 1h antes do etanol, mostrando aspectos histológicos semelhantes ao grupo A. Os resultados quantitativos desta análise são apresentados na **Tabela 1**.

#### 4.1.3 Avaliação do efeito de 1,4-cineol frente às lesões gástricas induzidas por Piroxicam (Droga anti-inflamatória) em camundongos

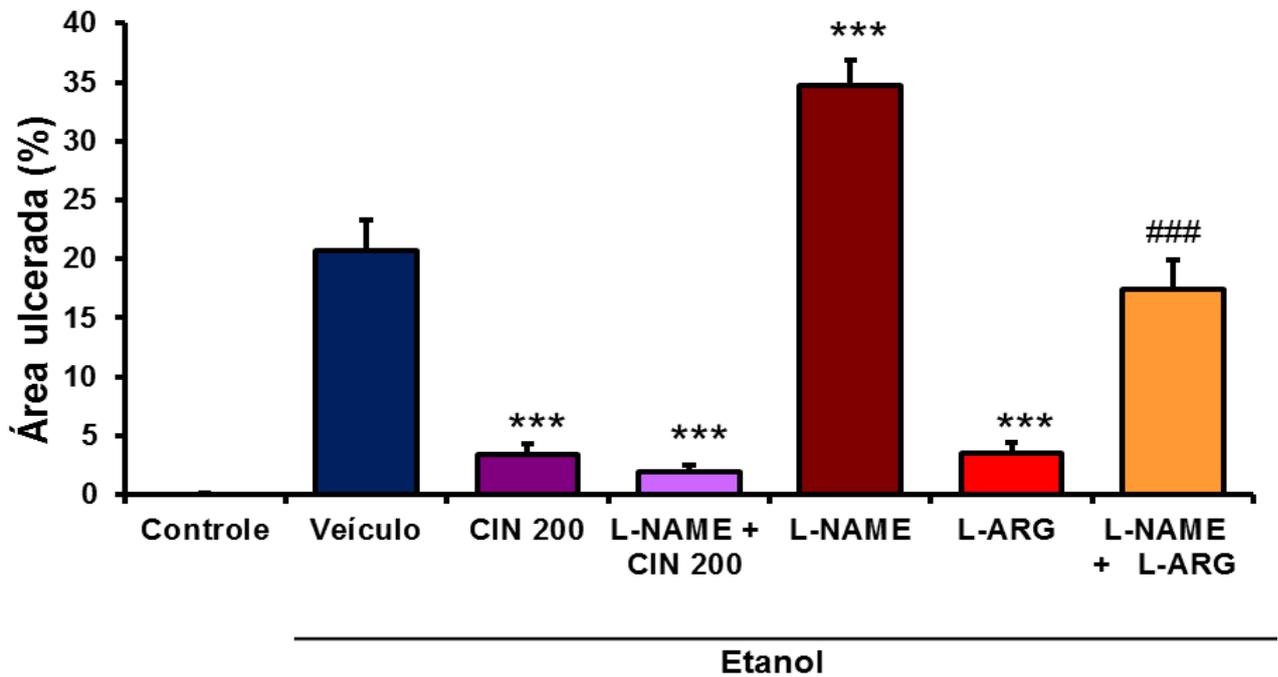
A administração de piroxicam 30 mg/Kg, s.c., aos animais previamente tratados apenas com veículo evidenciou grandes escores de lesão gástrica ( $5,54 \pm 0,43$ ). A administração prévia de 1,4-cineol 100 mg/Kg (CIN 100) e 200 mg/Kg (CIN 200) foram capazes de diminuir significativamente os escores de lesão gástrica ( $1,38 \pm 0,38$ ,  $p < 0,001$ ) e ( $1,73 \pm 0,45$ ,  $p < 0,01$ ) respectivamente em relação aos animais pré-tratados apenas com veículo antes de piroxicam. Ranitidina, 25 mg/Kg, v.o., droga antagonista dos receptores  $H_2$  de histamina, usada como padrão, diminuiu significativamente os escores de lesão gástrica ( $1,06 \pm 0,32$ ,  $p < 0,001$ ) quando comparado ao grupo tratado com veículo antes do piroxicam (**Figura 6**).



#### 4.1.4 Avaliação do envolvimento do Óxido Nítrico (NO) no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol sobre as 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 gástrica ulcerada ( $20,73 \pm 2,60$  %). A área gástrica ulcerada pelo etanol foi significativamente diminuída com a administração prévia de CIN 200 ( $3,46 \pm 0,89$  %,  $p < 0,001$ ) e L-ARG ( $3,49 \pm 0,92$  %,  $p < 0,001$ ) quando comparado ao grupo tratado apenas com veículo. O grupo que recebeu L-NAME previamente à administração de etanol exibiu aumento na área gástrica ulcerada ( $34,74 \pm 2,15$  %,  $p < 0,05$ ). O efeito gastroprotetor de CIN 200 não foi revertido pela administração prévia de L-NAME, um inibidor da síntese de NO ( $1,89 \pm 0,64$  %,  $p < 0,001$ ). A administração de L-NAME reverteu o efeito gastroprotetor da L-ARG ( $17,39 \pm 2,48$  %,  $p < 0,001$ ) (**Figura 7**).

**Figura 7.** Envolvimento do Óxido Nítrico (NO) no efeito gastroprotetor associado ao 1,4-cineol (CIN) em modelos de úlcera induzida por etanol absoluto em camundongos.



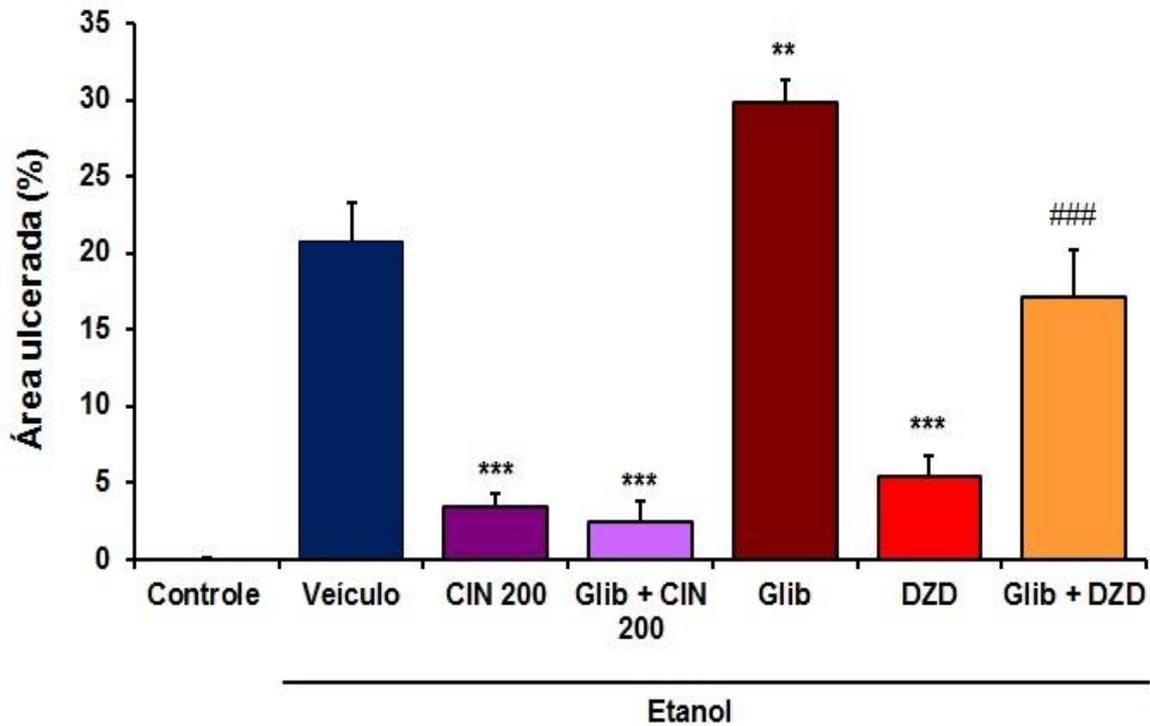
Os valores no gráfico representam a média  $\pm$  E.P.M. de área gástrica ulcerada. Os animais foram tratados previamente, 60 min, por via oral, com Veículo (Tween 80, 3% em água destilada) ou CIN 200 mg/Kg. L-Arginina 600 mg/Kg (L-ARG), i.p. ou L-NAME 10 mg/Kg, i.p. foram administrados 30 min antes da administração de etanol absoluto. L-NAME foi administrado 15 min antes nos animais que receberam CIN 200 mg/Kg (Grupo L-NAME + CIN 200) ou L-Arginina (Grupo L-NAME + L-ARG). Os animais foram sacrificados 30 min após a indução de úlcera. Foram utilizados grupos de 8 animais. \*\*\* $p < 0,001$  vs Veículo; ### $p < 0,001$  vs L-Arginina ou L-NAME. (ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*).

#### 4.1.5 Avaliação do envolvimento dos Canais de K-ATP-dependentes ( $K^+_{ATP}$ ) no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol 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 ( $20,73 \pm 2,60$  %). A área ulcerada pelo etanol foi significativamente diminuída com a administração prévia de CIN 200 e DZD ( $3,46 \pm 0,89$  %,  $p < 0,001$ ) e ( $5,38 \pm 1,44$  %,  $p < 0,001$ ), respectivamente, quando comparado ao grupo tratado apenas com veículo.

A gastroproteção de CIN 200 não foi revertida pela administração prévia de Glib, droga bloqueadora dos canais de potássio ATP dependente ( $K^+_{ATP}$ ), ( $2,48 \pm 1,39$  %), enquanto que o grupo tratado apenas com Glib antes do etanol apresentou área ulcerada superior ao veículo ( $29,81 \pm 1,54$ ,  $p < 0,01$ ). Em contrapartida, a gastroproteção do DZD foi revertida pela ação de Glib ( $17,08 \pm 3,11$  %,  $p < 0,001$ ) (**Figura 8**).

**Figura 8.** Envolvimento dos canais de potássio ATP-dependentes ( $K^+_{ATP}$ ) na gastroproteção induzida por 1,4-cineol (CIN) no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em camundongos.



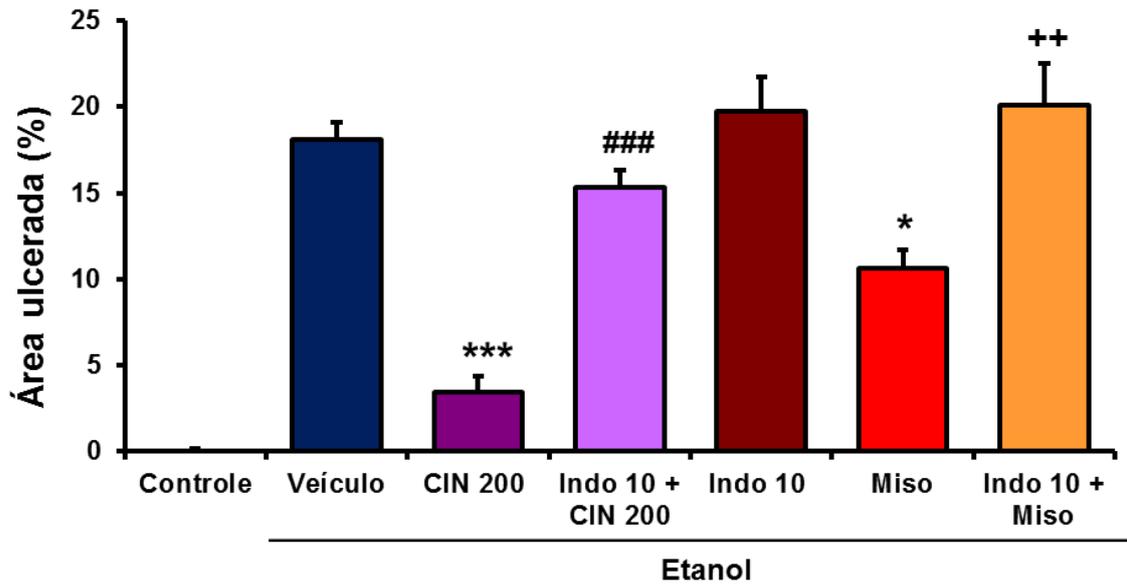
Os valores no gráfico representam a média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de área gástrica ulcerada. Foram administrados 60 min. antes da administração de etanol por via oral CIN 200 mg/Kg ou Veículo (Tween 80, 3% em água destilada). Diazóxido (DZD) 3 mg/Kg, i.p. foi administrado 30 min antes dos animais receberem etanol. Glibenclamida (Glib) 10 mg/Kg, i.p., foi administrada 15 min antes da administração de CIN 200 mg/Kg (Grupo Glib + CIN 200) ou DZD (Grupo Glib + DZD). Os animais foram sacrificados 30 min após a indução de úlcera. Foram utilizados grupos de 8 animais. \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  vs Veículo; ### $p < 0,001$  vs Glib ou DZD. (ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*).

#### 4.1.6 Avaliação do envolvimento da síntese de prostaglandinas no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol 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 percentagem de área ulcerada ( $18,13 \pm 0,96$  %). A área ulcerada pelo etanol foi significativamente diminuída com a administração prévia de CIN 200 ( $3,46 \pm 0,89$  %,  $p < 0,001$ ) quando comparado ao grupo tratado apenas com veículo.

A gastroproteção de 1,4-cineol foi revertida pela administração prévia de Indometacina 10 mg/Kg (Indo 10), v.o, inibidor da síntese de prostaglandinas, ( $15,3 \pm 1,04$  %,  $p < 0,001$ ) enquanto que o grupo em que a Indo foi administrada sozinha antes do etanol mostrou área ulcerada semelhante ao controle ( $19,77 \pm 1,91$ ). A gastroproteção promovida pelo misoprostol (Miso) ( $10,61 \pm 1,06$  %,  $p < 0,01$ ), quando comparado com veículo, também foi revertida pela Indo ( $20,1 \pm 2,39$  %,  $p < 0,01$ ), quando comparado com o grupo Miso. **(Figura 9).**

**Figura 9.** Envolvimento da síntese de prostaglandinas no efeito gastroprotetor associado ao 1,4-cineol (CIN) no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em camundongos.



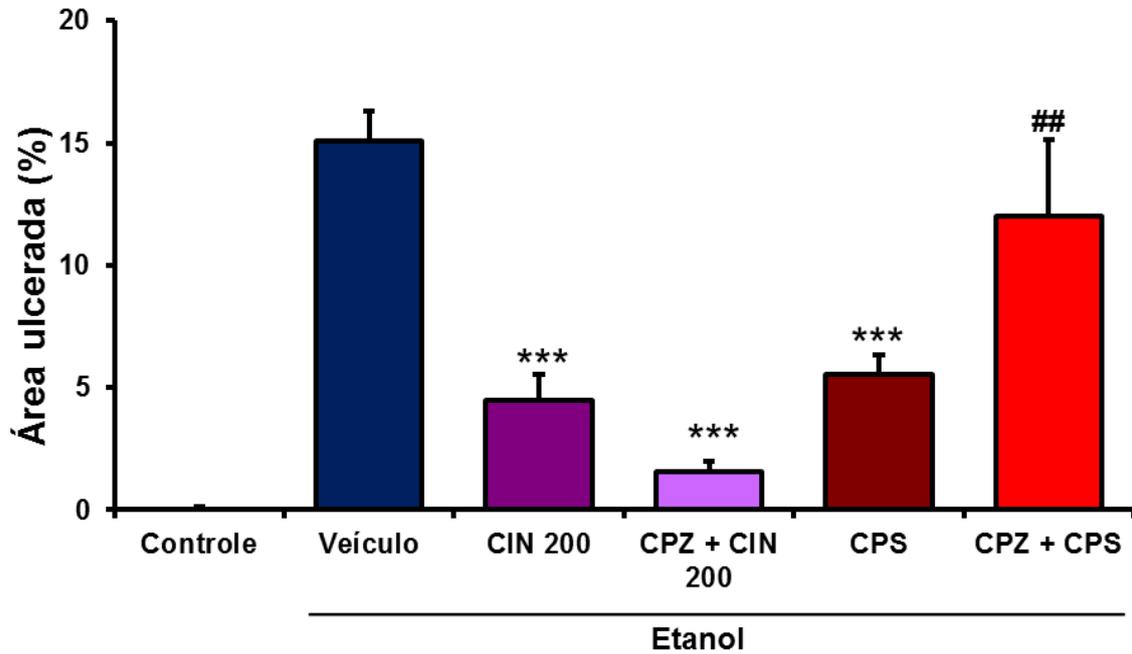
Os valores no gráfico representam a média  $\pm$  E.P.M da porcentagem de área gástrica ulcerada. Os animais foram previamente tratados com veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.) ou CIN 200, v.o., 60 min antes da administração de etanol absoluto. Indometacina (Indo) 10 mg/Kg, v.o., foi administrada 2h antes do tratamento com veículo ou CIN 200, e no grupo Indo. Foram utilizados grupos de 8 animais que foram sacrificados 30 minutos após a administração de etanol. \* $p < 0,05$  \*\*\* $p < 0,001$  vs veículo; ++ $p < 0,01$  vs Miso; ### $p < 0,001$  vs CIN 200. (ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*).

#### 4.1.7 Avaliação do envolvimento do Receptor Transiente Potencial Vanilóide 1 (TRPV 1) no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol 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 ( $15,09 \pm 1,25$  %). A área ulcerada pelo etanol foi significativamente diminuída com a administração prévia de CIN 200 ( $4,45 \pm 1,06$  %,  $p < 0,001$ ) quando comparado ao grupo tratado apenas com veículo.

A gastroproteção de CIN 200 não foi revertida pela administração prévia de capsazepina 5 mg/Kg (CPZ), v.o, antagonista TRPV 1, ( $1,57 \pm 1,04$  %,  $p < 0,001$ ). A gastroproteção promovida pela capsaicina (CPS) ( $5,54 \pm 0,77$  %,  $p < 0,01$ ) foi revertida pela CPZ ( $12,00 \pm 3,13$  %,  $p < 0,01$ ) quando comparada com o grupo CPS. (**Figura 10**).

**Figura 10.** Envolvimento do Receptor Transiente Potencial Vanilóide 1 (TRPV 1) no efeito gastroprotetor associado ao 1,4-cineol (CIN) 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.), CIN 200 mg/Kg ou Capsaicina (CPS) 0,3 mg/Kg, v.o., 60 min antes da administração de etanol absoluto. O grupo CZP + CIN 200 e CZP + CPS receberam Capsazepina 1h antes da administração de CIN 200 ou CPS. Foram utilizados grupos de 8 animais que foram sacrificados 30 minutos após a administração de etanol. \*\*\* $p < 0,001$  vs veículo, e ## $p < 0,01$  vs CPS. (ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*).

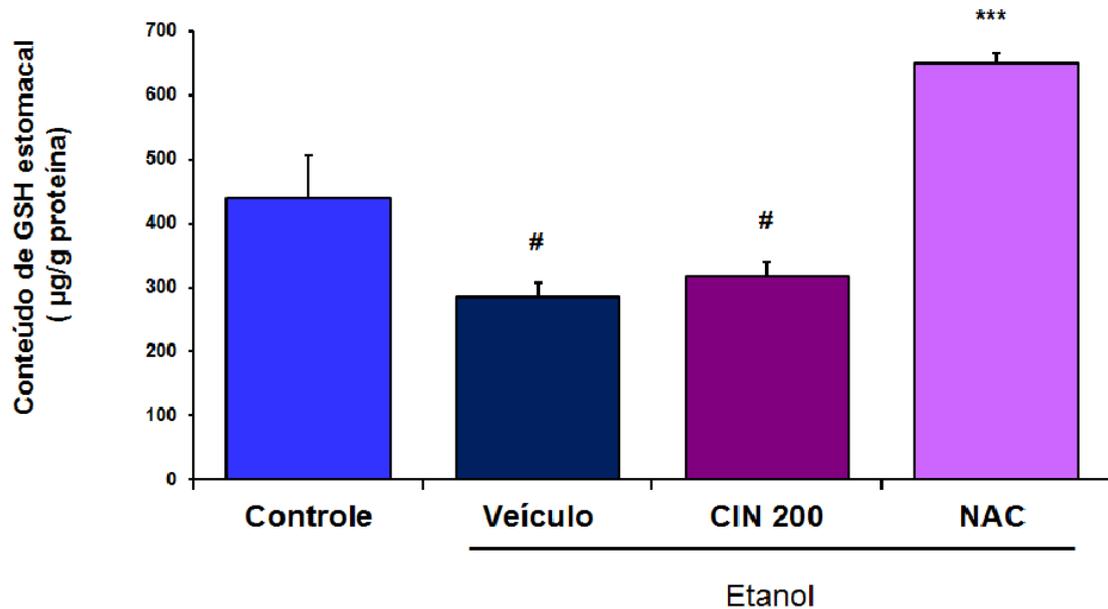
## 4.2 Atividade antioxidante

### 4.2.1 Avaliação do envolvimento dos grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH) no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto

A administração de etanol diminuiu o conteúdo gástrico de Glutathiona reduzida (GSH) nos animais pré-tratados apenas com o veículo (Tween 80, 3%, em água destilada) ( $285,40 \pm 22,13 \mu\text{g/g}$  proteína,  $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo controle não ulcerado ( $440,2 \pm 66,11 \mu\text{g/g}$  proteína).

O pré-tratamento com 1,4-cineol 200 mg/Kg (CIN 200) não alterou significativamente o conteúdo gástrico de GSH ( $317,7 \pm 21,87 \mu\text{g/g}$  proteína), comparando com o grupo que recebeu apenas veículo antes do etanol. Diferentemente, o grupo tratado com N-acetilcisteína 300 mg/Kg (NAC), um conhecido precursor do GSH, exibiu um aumento significativo no conteúdo gástrico de GSH ( $649,40 \pm 16,17 \mu\text{g/g}$  proteína,  $p < 0,001$ ) quando comparado com o controle ulcerado. (**Figura 11**).

**Figura 11.** Avaliação do envolvimento da glutatona reduzida (GSH) no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto.



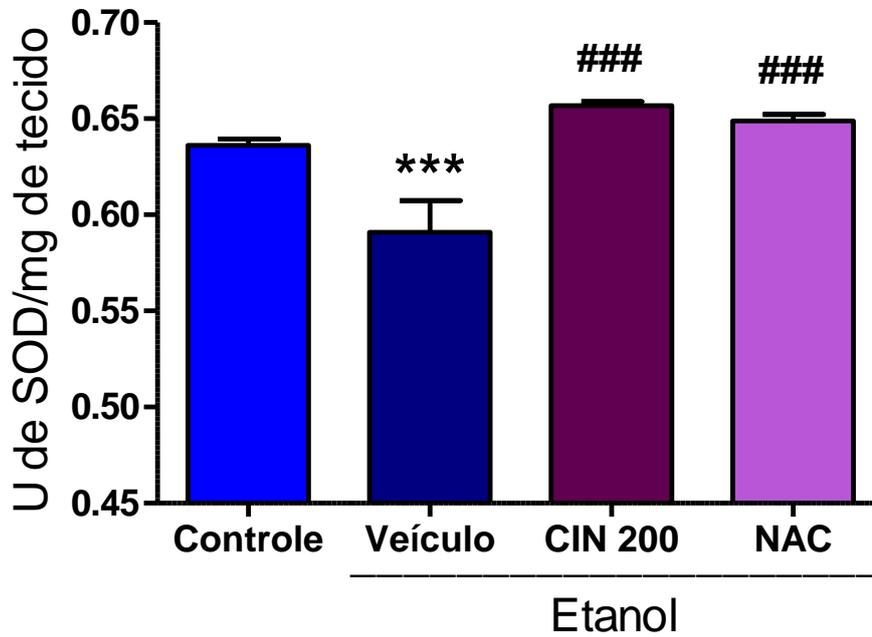
Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M., para os níveis gástricos de GSH. Foram dosados os níveis de GSH no homogenato feito trinta minutos após administração de etanol absoluto. Veículo (Tween 80, 3% em água destilada), 1,4-cineol 200 mg/Kg (CIN 200, v.o) e N-acetilcisteína (NAC, 300 mg/Kg, v.o) foram administrados uma 1h antes de receberem etanol. # $p < 0,05$  vs Controle e \*\*\* $p < 0,001$  vs Veículo. (ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*).

#### 4.2.2 Avaliação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD) no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto

O etanol diminuiu a atividade da SOD nos estômagos ulcerados pré-tratados apenas com o veículo (Tween 80, 3%, em água destilada) ( $0,591 \pm 0,02$  U SOD/mg tecido,  $p < 0,001$ ) quando comparado com o grupo não ulcerado (sadio) ( $0,636 \pm 0,003$  U SOD/mg tecido).

O pré-tratamento com 1,4-cineol 200 mg/Kg normalizou os níveis da enzima ( $0,657 \pm 0,002$  U SOD/mg tecido,  $p < 0,001$ ), comparando com o grupo ulcerado. Da mesma forma, o grupo tratado com N-acetilcisteína, um conhecido agente antioxidante e protetor da mucosa gástrica, normalizou os níveis de SOD ( $0,649 \pm 0,003$  U SOD/mg tecido,  $p < 0,001$ ) quando comparado com o controle ulcerado (**Figura 12**).

**Figura 12.** Avaliação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD) no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol (CIN) no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto.



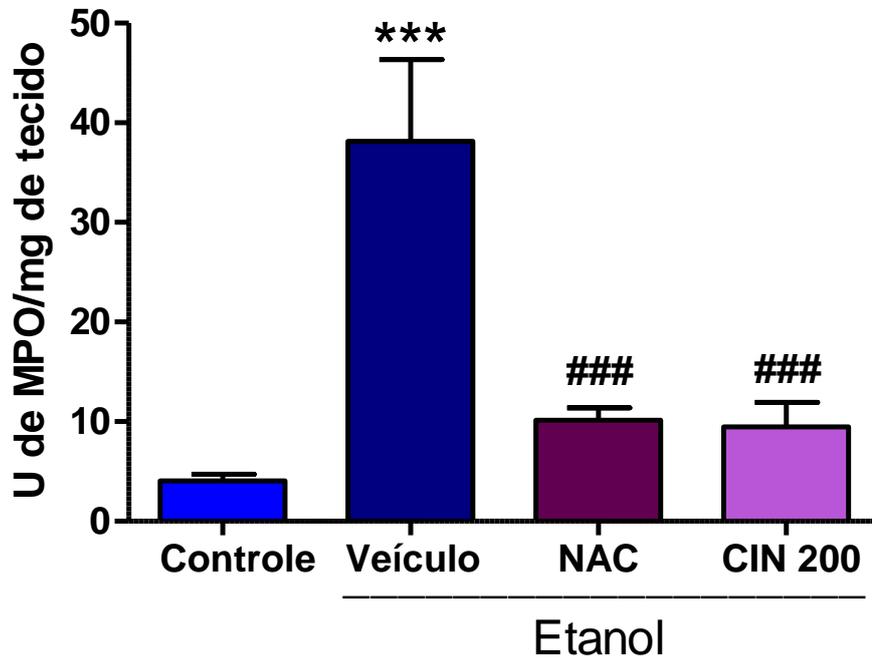
Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M., para a atividade da SOD. Foi medida a atividade da enzima no homogenato feito 30 min após administração de Etanol Absoluto. Veículo (Tween 80, 3% em água destilada), 1,4-cineol (CIN 200 mg/Kg, v.o) e N-acetilcisteína (NAC, 300 mg/Kg, v.o) foram administrados uma 1h antes de receberem etanol. \*\*\* $p < 0,001$  vs Controle e ### $p < 0,001$  vs Veículo+Etanol. (ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*).

#### 4.2.3 Avaliação da atividade da Mieloperoxidase (MPO) no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto

A atividade da MPO nos estômagos ulcerados pré-tratados apenas com o veículo (Tween 80, 3%, em água destilada) ( $38,15 \pm 8,20$  U de MPO/mg de tecido,  $p < 0,001$ ) foi significativamente maior quando comparado com o grupo não ulcerado (controle) ( $4,06 \pm 0,67$  U de MPO/mg de tecido).

Nos estômagos dos animais pré-tratados com cineol 200 mg/Kg houve uma normalização da atividade da enzima ( $9,50 \pm 2,45$  U de MPO/mg de tecido,  $p < 0,001$ ), comparando com o grupo ulcerado. De forma semelhante o grupo tratado com N-acetilcisteína 300mg/Kg apresentou a atividade diminuída ( $10,16 \pm 1,22$  U de MPO/mg de tecido,  $p < 0,001$ ) quando comparado com o controle ulcerado. (**Figura 13**).

**Figura 13.** Avaliação da atividade da Mieloperoxidase (MPO) no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol (CIN) no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto.



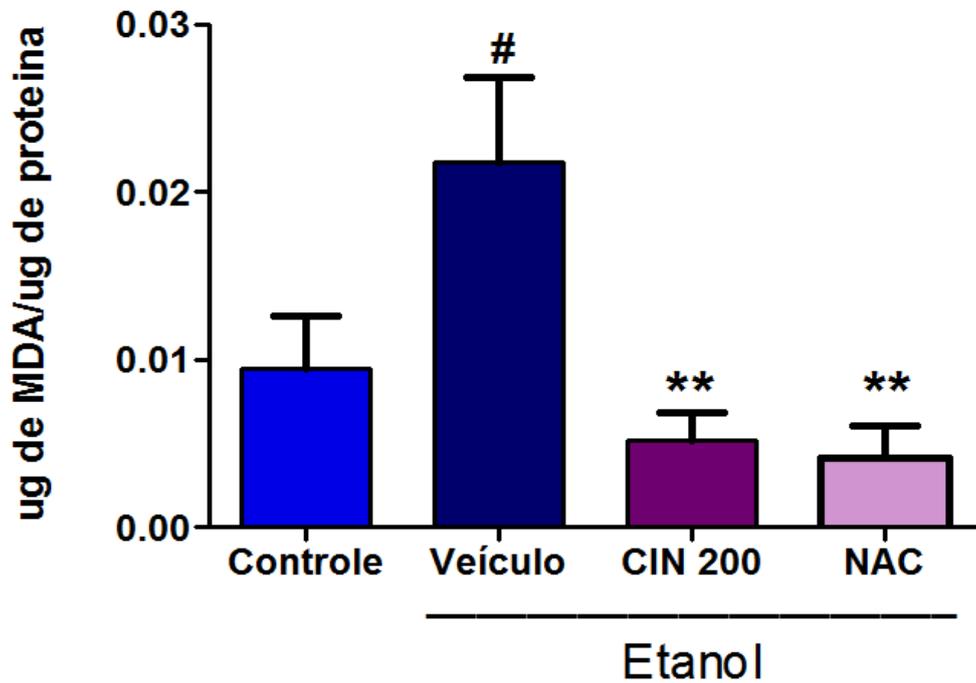
Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M., para a atividade da MPO. Foi medida a atividade da enzima no homogenato feito 30 min após administração de Etanol Absoluto. Veículo (Tween 80, 3% em água destilada), 1,4-cineol (CIN 200 mg/Kg, v.o) e N-acetilcisteína (NAC, 300 mg/Kg, v.o) foram administrados uma 1h antes de receberem etanol. \*\*\* $p < 0,001$  vs Controle e ### $p < 0,001$  vs Veículo + Etanol. (ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*).

#### 4.2.4 Determinação do envolvimento da peroxidação lipídica no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto

A peroxidação lipídica nos estômagos ulcerados pré-tratados apenas com o veículo (Tween 80, 3%, em água destilada) ( $0,02 \pm 0,005$   $\mu\text{g}$  de MDA/ $\mu\text{g}$  de proteína,  $p < 0,05$ ) foi maior quando comparado com o grupo não ulcerado ( $0,009 \pm 0,003$   $\mu\text{g}$  de MDA/ $\mu\text{g}$  de proteína).

Nos estômagos dos animais pré-tratados com 1,4-cineol 200 mg/Kg e N-acetilcisteína 300mg/Kg houve a diminuição da peroxidação, ( $0,005 \pm 0,001$   $\mu\text{Mol}$  de MDA/mg de tecido,  $p < 0,01$ ) e ( $0,004 \pm 0,002$   $\mu\text{g}$  de MDA/ $\mu\text{g}$  de proteína,  $p < 0,01$ ), respectivamente, quando comparado com o grupo ulcerado pré-tratado apenas com veículo. **(Figura 14).**

**Figura 14.** Determinação do envolvimento da peroxidação lipídica no efeito gastroprotetor de 1,4-cineol no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto.



Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M., para a concentração de MDA. Foram medidas as concentrações de MDA no homogenato feito 30 min após administração de etanol absoluto. Veículo (Tween 80, 3% em água destilada), 1,4-cineol 200 mg/Kg (CIN 200), v.o. e N-acetilcisteína 300 mg/Kg (NAC), v.o. foram administrados uma 1h antes de receberem etanol. \*\* $p < 0,01$  vs Veículo e # $p < 0,05$  vs Controle. (ANOVA e Student-Newman-Keuls, *post hoc*).



*DISCUSSÃO*

## 5 DISCUSSÃO

Segundo Quan e Talley (2002) na patogênese da úlcera gástrica estão envolvidos a predisposição genética, secreção ácida alterada, rápido esvaziamento gástrico, problemas com os mecanismos de defesa da mucosa, estresse psicológico e físico, tabagismo e alcoolismo. Os procedimentos cirúrgicos para o tratamento da úlcera péptica foram substituídos por intervenções farmacológicas, como a utilização de antagonistas de receptor  $H_2$  e inibidores da bomba prótonica, consideradas estratégias eficazes contra desordens gástricas (BRZOZOWSKI, 2003). Entretanto, esses agentes farmacêuticos não são completamente efetivos e podem provocar efeitos adversos (ALPER, 1993). Assim, extratos e princípios ativos de plantas serviriam como possíveis alternativas para o desenvolvimento de novas drogas (GONZALES *et al.*, 2000), mais eficazes e com menos efeitos adversos.

Os modelos experimentais utilizados neste trabalho para a avaliação dos efeitos gastroprotetores de 1,4-cineol foram selecionados por envolverem diferentes agentes e mecanismos, conhecidos na indução de lesões gástricas (ver seção 1 deste trabalho).

Os modelos de indução de úlcera por etanol absoluto (EA) promovem as lesões necróticas de maneira multifatorial na mucosa gástrica. O etanol é capaz de alcançar o epitélio da mucosa através do rompimento da barreira muco-bicarbonato e suas ações celulares refletem em ruptura da parede dos vasos sanguíneos, sendo as hemorragias a consequência das lesões gástricas observadas nestes modelos (MINCIS *et al.*, 1995). Esses efeitos provavelmente se devem a ações de lipoperoxidação, formação de radicais livres, estresse oxidativo intracelular, alterações na permeabilidade e despolarização da membrana mitocondrial que precedem a morte celular (BAGCHI *et al.*, 1998; HIROKAWA *et al.*, 1998; REPETTO; LLESUY, 2002).

Neste estudo, duas doses de 1,4-cineol (100 e 200 mg/Kg) foram testadas no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol para determinar possíveis doses efetivas para causar efeito antiulcerogênico. Nossos resultados mostraram que os animais pré-tratados com 1,4-cineol 200 mg/Kg (CIN 200) diminuiram 76,09% do dano gástrico induzido por etanol, enquanto 1,4-cineol 100 mg/Kg não foi capaz de diminuir significativamente este parâmetro.

Como esperado, ciproheptadina 10 mg/Kg, usada como controle positivo, causou inibição do dano gástrico de 77,93% quando comparado ao grupo controle ulcerado. A administração do EA diretamente no estômago de animais causa edema no tecido, hemorragia sub-epitelial, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias que podem contribuir para indução dos danos na mucosa e geração de EROs (KOUNTOURAS; CHATZOPOULOS; ZAVOS, 2001). As úlceras aparecem devido à ação necrotizante do etanol na mucosa gástrica, com menor participação da secreção gástrica (LEWIS; HANSON, 1991; EVANS, 1996). Esta menor participação da secreção gástrica é devido ao desaparecimento do ácido no lume gástrico (KIVILAAKSO; FROM; SILEN, 1978). Esse desaparecimento tem sido atribuído a uma contra-difusão do ácido direto na barreira gástrica rompida (DAVENPORT, 1972). Desta forma, pode-se sugerir que CIN 200 agiu sobre algum mecanismo de forma a proteger a mucosa gástrica dos danos causados pelo EA.

Esta proteção foi confirmada através da análise histológica da parte glandular dos estômagos, onde o grupo tratado com veículo antes da administração de EA apresentou várias evidências de dano gástrico, como perda de células epiteliais, edema na superfície da mucosa, hemorragia e infiltração de células inflamatórias. Pode-se perceber, pela análise microscópica dos tecidos gástricos, que o pré-tratamento com CIN 200 foi capaz de prevenir de forma significativa dos danos que foram causados pelo EA.

Para somar aos resultados obtidos com a úlcera induzida por EA, foi realizado o experimento de úlcera induzida por drogas antiinflamatórias, no qual se pode abordar outros tipos de mecanismos. Úlceras induzidas por drogas antiinflamatórias não-esteroidais envolvem mecanismos de inibição das cicloxigenases 1 e 2, de maneira a promover redução da produção de prostaglandinas  $E_2$ . As prostaglandinas possuem efeitos na síntese de muco e bicarbonato, na regulação da secreção ácida e do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica (CURTIS *et al.*, 1995; HALTER *et al.*, 2001). Segundo Suzuki *et al.* (2000), outros fatores como a hipermotilidade gástrica e infiltração ou ativação de neutrófilos estariam envolvidos com os processos iniciais de formação das lesões. A redução dos níveis de prostaglandinas facilita a formação de lesões causadas pelas secreções gástricas (ácidas e enzimáticas), comprometendo assim a barreira mucosa.

Anderson e Grossman (1965) propuseram, com seus experimentos, que o contato direto das DAINEs com a mucosa quebra o gradiente de íons hidrogênio entre o lume gástrico e o tecido da mucosa; essa interação é essencial para a continuidade epitelial, assim como para a manutenção da sua integridade. Essa ação local sugere que danos na barreira superficial são resultados do contato das DAINEs com o tecido da mucosa e não um reflexo de uma resposta bioquímica e farmacológica, como inibição da COX. A ação local na mucosa gástrica pode ser descartada já que o piroxicam foi administrado por via subcutânea, evidenciando assim que os danos causados foram em consequência da inibição da COX. Nossos resultados mostraram que tanto CIN 100 como CIN 200 foi capazes de proteger a mucosa gástrica contra os danos causados pela DAINe piroxicam, assim como o padrão positivo Ranitidina, confirmando seu efeito antiulcerogênico.

Prostaglandinas endógenas são geradas a partir do ácido aracdônico. Três isoenzimas da ciclooxigenase COX, COX-1 (VANE, 1994), COX-2 (XIE *et al.*, 1991) e, posteriormente, COX-3 (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002) têm sido descritas como catalisadores da conversão do ácido aracdônico. COX-1 é expressa, constitutivamente, em muitos tecidos (O'NEIL; FORD-HUTCHINSON, 1993) e foi sugerido que sua origem relaciona-se às funções constitutivas (“house keeping”). Por outro lado, níveis de COX-2, quando mensurados, são usualmente baixos ou não-detectados em condições basais (KARGMAN *et al.*, 1996), mas aumentam rapidamente sob influência de estímulos pró-inflamatórios ou mitogênicos (KUJUBU *et al.*, 1991). Entre os muitos efeitos importantes das prostaglandinas, com respeito à defesa da mucosa, estão a estimulação da secreção de muco e bicarbonato e manutenção do fluxo sanguíneo (HAWKEY, 2000). Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a ação gastroprotetora de CIN pode estar relacionada ao aumento das prostaglandinas, produzidos via ciclooxigenase. Possivelmente, esse aumento das PGs se deve à ação de CIN na isoenzima COX-1, já que as prostaglandinas derivadas da COX-2 representam uma pequena porção do pool total de prostaglandinas na mucosa gástrica não ulcerada (EHRLICH *et al.*, 2003).

Os resultados inéditos e promissores obtidos com 1,4-cineol frente aos severos agentes indutores de lesão descritos nos experimentos iniciais nos levaram à realização de experimentos que caracterizassem os mecanismos de ação desta substância. Desta maneira, foram realizados experimentos que visavam verificar o envolvimento de 1,4-cineol sobre:

óxido nítrico (NO); canais de potássio ATP-dependentes ( $K^+_{ATP}$ ); prostaglandinas (PGs); receptores vanilóides (TRPV1); atividade antioxidante (GSH, SOD, MPO e TBARS).

Estudos mostram que o Óxido Nítrico (NO) está envolvido no mecanismo de manutenção da integridade do epitélio gástrico. De acordo com Cho, (2001), o NO, no trato intestinal, pode exercer efeito protetor e deletério (promover peroxidação lipídica, quando combinado com espécie reativa de oxigênio), isso depende do tipo de Óxido Nítrico Sintetase (NOS) envolvida. Sabe-se que a NOS Constitutiva (cNOS) é responsável pela produção de NO no contexto fisiológico, já a NOS induzível (iNOS) produz NO em circunstâncias patofisiológicas (CHO, 2001).

O NO também está envolvido com a regulação da circulação sanguínea gástrica (promove a diferenciação das células endoteliais nos tubos vasculares) e estimulação direta da secreção gástrica de muco pela estimulação da guanilato ciclase nas células epiteliais (CHO, 2001). Evidências na literatura indicam que um bloqueio na produção de NO resulta em enfraquecimento da resposta vascular e subsequente fluxo alcalino no lúmen (CHO, 2001).

No experimento executado no presente trabalho, em que foi avaliado o papel do NO no mecanismo de proteção de CIN, foi utilizado o inibidor da NOS, N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME). Este inibidor é hidrolizado em L-nitroarginina, que inativa a NOS (PFEIFFER *et al.*, 1996), fazendo com que as úlceras induzidas por etanol sejam agravadas (KAWANO; TSUJI, 2000). Neste experimento, L-NAME não foi capaz de reverter a gastroproteção de CIN 200. Em contrapartida, o efeito contrário foi observado com L-arginina (L-ARG), que teve seu efeito de proteção bloqueado pelo L-NAME. Estes resultados indicam que o efeito gastroprotetor de CIN 200 provavelmente não está envolvido com a via do NO.

Trabalhos anteriores estudando os efeitos do diazóxido no estômago demonstraram que esta substância inibiu as lesões na mucosa gástrica induzidas por etanol, enquanto a glibenclamida, um agente hipoglicemiante oral que estimula a secreção de insulina por bloquear os  $K^+_{ATP}$ , aumentou as lesões gástricas (TOROUDI *et al.*, 1999). Os autores referem que a diminuição do fluxo sanguíneo gástrico é uma das possibilidades pelas quais a glibenclamida estaria aumentando as lesões gástricas induzidas por etanol. Estudos mais recentes também mostraram que o efeito lesivo direto da indometacina na mucosa gástrica de

rato pode ser agravado pelo uso da glibenclamida. Entretanto esse efeito pode ser inibido com o uso de cromacalina ou diazóxido (AKAR *et al.*, 1999; GOMES *et al.*, 2006).

Desta forma, em consequência de vários estudos, a capacidade da glibenclamida e do diazóxido de alterar a resposta de algumas drogas tem sido aceita como evidência para sugerir o envolvimento dos  $K^+_{ATP}$  nos eventos biológicos que resultam em gastroproteção (STANDEN *et al.*, 1989). No presente estudo, a glibenclamida não foi capaz de reverter o efeito protetor gástrico da substância estudada, CIN, na dose de 200 mg/Kg. O resultado inverso foi observado com o diazóxido, que apresentou seu efeito bloqueado pela glibenclamida. Assim, pode-se sugerir que o efeito gastroprotetor de CIN 200 não está envolvido com os canais de potássio ATP dependente.

Evidências mostram que drogas antiinflamatórias não-esteroidais (DAINEs), como indometacina, aspirina, piroxicam e outras, induzem ulceração na mucosa gástrica principalmente pela redução da síntese de PGs. Tal diminuição traz como conseqüências uma diminuição da secreção de muco e bicarbonato e uma redução do fluxo sanguíneo local (CRYER, 2000). Além disso, o contato direto destes fármacos com a mucosa gástrica ataca os fosfolipídios presentes tanto no muco quanto no epitélio gástrico, o que reduz severamente a hidrofobicidade da camada de muco, causando assim uma retrodifusão de íons hidrogênio (BJORKMAN, 1996; BERSTAD; BERSTAD; BERSTAD, 2002).

A redução do nível de PGs na mucosa gástrica, ao mesmo tempo em que diminui a inflamação, reduz as defesas do estômago. Nosso estudo mostrou que a indometacina foi capaz de reverter o efeito gastroprotetor de CIN 200, assim como o misoprostol (análogo das PGs), indicando que o efeito antiulcerogênico da substância estudada está relacionado com o aumento dos níveis de PGs.

Outro mecanismo pelo qual as PGs podem causar diminuição da resposta inflamatória e dano na mucosa é através da modulação da atividade de imunócitos na mucosa.  $PGE_2$  é um potente supressor do TNF- $\alpha$  ou fator de necrose tumoral (KUNKEL *et al.*, 1986) liberado por macrófagos, além de reduzir a expressão do gene para TNF- $\alpha$  nas células (KUNKEL *et al.*, 1988); entretanto, em 1993 foi demonstrado que  $PGE_2$  inibe, de modo dose dependente, a liberação de fator de agregação plaquetária (PAF), histamina e TNF- $\alpha$  de

células na mucosa intestinal (HOGABOAM *et al.*, 1993). As PGs também regulam a liberação de outras citocinas como as interleucinas IL-1 dos macrófagos (KUNKEL *et al.*, 1986), e reduzem a liberação do leucotrieno LTB<sub>4</sub> dos neutrófilos (HAM *et al.*, 1983).

Em seguida, tentou-se investigar uma possível ação dos receptores TRPV<sub>1</sub> na proteção gástrica de CIN 200. O mecanismo pelo qual a capsaicina exerce seu efeito antiulcerogênico envolve primariamente um aumento do fluxo sanguíneo para a mucosa gástrica através da liberação de peptídeos vasodilatadores como o CGRP (ABDEL-SALAM *et al.*, 1996; HOLZER *et al.*, 1991; TACHÉ; RAYBOULD; WEI, 1991). Aihara *et al.* (2005, 2006) demonstraram que fibras nervosas sensoriais que expressam o receptor TRPV<sub>1</sub> são ativadas quando a barreira de muco protetora é rompida e o ácido entra em contato com a lâmina própria. Essa ativação libera CGRP e óxido nítrico e leva a uma pronta hiperemia da mucosa facilitando outros mecanismos de defesa como secreção de bicarbonato e inibição da secreção de ácido gástrico. Ichikawa *et al.* (2006) demonstraram que o CGRP e o óxido nítrico estimulam a síntese de mucina na mucosa do corpo gástrico. Okajima e Harada (2006) concluíram que o estímulo das vias aferentes tem papel antiinflamatório ao liberar CGRP, uma vez que esse peptídeo aumenta a formação de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e diminui a liberação de TNF- $\alpha$ . Nossos resultados mostraram que o efeito de CIN 200 não está envolvido com esses receptores, já que sua ação permaneceu apesar desses receptores estarem bloqueados.

A geração de EROs no modelo de etanol é evidenciada pelo aumento na liberação de LPO da mucosa gástrica (MIZUI *et al.*, 1986; KAHRAMAN *et al.*, 2003) e diminuição na quantidade de GSH (BAGCHI *et al.*, 1998; MELCHIORRI *et al.*, 1997). A liberação de O<sub>2</sub><sup>-</sup> neste tipo de lesão pode estar relacionada à produção de acetaldeído, formado pela ação da álcool desidrogenase sobre o etanol. O acetaldeído serve como substrato para a xantina oxidase (enzima chave no metabolismo das purinas), a qual produz radicais livres (HIRAISHI *et al.*, 1999; KOCH *et al.*, 2004; STEINBECK; KHAN; KARNOVSKY, 1993). A infiltração de células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, também pode se configurar como fonte de EROs (LA CASA *et al.*, 2000).

Estudos têm demonstrado que EROs, como os radicais O<sub>2</sub><sup>-</sup>, os radicais .OH e peroxidação lipídica, desempenham um papel importante na patogênese da úlcera gástrica induzida por etanol absoluto, pois as mesmas promovem severas mudanças celulares,

conduzindo à morte celular. O ataque do etanol aos constituintes celulares, como proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e peroxidação de ácidos graxos, resultam em formação de compostos tóxicos, como radicais peroxil, hidroperóxidos e fragmentação de lipídeos. (KAHRAMAN *et al.*, 2003).

Compostos sulfidrilas estão significativamente implicados na manutenção da integridade gástrica, particularmente quando espécies reativas de oxigênio estão envolvidas na patofisiologia do tecido lesado (KIMURA *et al.*, 2001; TEPPERMAN; JACOBSON, 1994). Danos induzidos por etanol foram associados com uma significativa redução dos níveis de GSH na mucosa em humanos (LOGUERCIO *et al.*, 1991) e animais experimentais (VICTOR *et al.*, 1991). A administração de SHs preveniu danos induzidos pelo etanol em humanos (LOGUERCIO *et al.*, 1991), e tratamentos com doadores de SHs protegeram a mucosa gástrica contra danos por agentes necrotizantes, estresse ou isquemia (TEPPERMAN; JACOBSON, 1994). Nosso estudo provou que CIN 200 não alterou os níveis de GSH, não havendo, portanto, relação desta substância antioxidante no efeito gastroprotetor de CIN 200. Já o padrão positivo utilizado, NAC, por se tratar de um precursor de GSH, foi capaz de aumentar significativamente os níveis deste composto sulfidrílico.

A superóxido dismutase (SOD) trata-se de uma enzima anti-oxidante produzida pelo nosso organismo. São 3 os tipos de SOD, as quais se distinguem em: citoplasmática, mitocondrial e extracelular (HAVSTEEN, 2002; KOCK *et al.*, 2004). A SOD catalisa a dismutação do anion superóxido ( $O_2^-$ ) em um radical menos nocivo, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o qual é posteriormente degradado pela Catalase ou Glutathione peroxidase. Ogino *et al.* (1997) demonstraram que o aumento na atividade da SOD gera substrato para as COXs podendo levar a estimulação da produção de  $PGE_2$ . De acordo com Myers e Hernandez (1992) a SOD é também capaz de promover restabelecimento dos níveis de eicosanóides de maneira indireta, ou seja, após administração de SOD os níveis de 6- keto- $PGF1\alpha$  são restabelecidos. Nosso estudo mostrou que CIN 200 normalizou os níveis de SOD, o que nos evidencia mais um mecanismo pelo qual nossa substância age na gastroproteção.

A úlcera gástrica é resultado de um processo de necrose e isquemia da mucosa. A área do tecido necrosado passa a não receber mais nutriente porque ocorre dano microvascular,

com constrição e consequente oclusão dos vasos. O tecido necrosado libera leucotrieno que atrai leucócitos e macrófagos. Estes últimos fagocitam o tecido necrosado liberando citocinas próinflamatórias como TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  entre outras (TARNAWSKI, 2005).

Os neutrófilos fazem parte do sistema de defesa imunológico inato, e são os primeiros a chegar ao local da inflamação. A infiltração de neutrófilos na mucosa gástrica ocorre em condições de hipóxia e baixo fluxo sanguíneo local, e está intimamente relacionada ao surgimento de lesões ulcerativas. Por sua vez, as principais causas do surgimento destas lesões é a liberação de EROs pelos neutrófilos no local da inflamação (OHTA; KOBAYASHI; ISHIGURO, 1999; BAYIR *et al.*, 2006) e o metabolismo de componentes do muco gástrico pela enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) cuja expressão é estimulada em neutrófilos ativados (BERSTAD; BERSTAD; BERSTAD, 2002).

Estratégias para inibir a infiltração/ativação de neutrófilos demonstraram proteger os animais contra as úlceras gástricas. Fármacos imunossupressores, portanto, poderiam causar um efeito benéfico à mucosa gástrica, ao inibir a infiltração de neutrófilos sem afetar as defesas gástricas (KVIETYS *et al.*, 1990; SHIMIZU *et al.*, 2000).

A enzima mieloperoxidase (MPO) está presente dentro dos lisossomos dos neutrófilos. Uma vez nos tecidos, após estímulos pró-inflamatórios, os neutrófilos sofrem um processo de degranulação com a liberação para o citoplasma da enzima mieloperoxidase (armazenada nos grânulos azurófilos). A MPO atua na presença do ânion superóxido e do ânion cloreto (Cl<sup>-</sup>) para formar o ácido hipoclorídrico. O ácido hipoclorídrico apresenta intensa ação tóxica sobre as bactérias, sendo também lesivo para as células do tecido (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). A MPO pode ser usada como um índice de infiltração de neutrófilos nos tecidos (KRAWISZ *et al.*, 1984). No presente trabalho, CIN 200, assim como NAC, utilizado com controle positivo, foi capaz de diminuir os níveis de MPO, comprovando a ação de CIN 200 na proteção do estômago contra os danos causados por essa enzima.

Nossos resultados também mostraram que o pré-tratamento com 1,4-cineol 200mg/Kg reduziu a níveis basais a taxa de LPO, avaliados indiretamente pela dosagem de MDA. CIN 200 foi capaz de reduzir este índice provavelmente pela eliminação dos

compostos tóxicos pela SOD, fazendo com que a mucosa do trato gastrointestinal permanecesse preservada.

Todos esses resultados analisados conjuntamente confirmam que 1-4-cineol representa uma substância de suma importância para o mercado farmacêutico devido a seus efeitos farmacológicos antiulcerogênicos. Sua ação provavelmente está relacionada à regulação das enzimas ciclooxigenases 1 e/ou 2, promovendo aumento de prostaglandinas, além de seu efeito antioxidante.



*CONSIDERAÇÕES FINAIS*

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- 1,4-Cineol apresentou uma atividade gastroprotetora evidenciada pelo experimento de indução de úlcera por etanol;
- A gastroproteção de 1,4-cineol foi confirmada através da análise histológica da parte glandular do estômago, onde se evidenciou diminuição de edema, hemorragia e infiltrado inflamatório;
- 1,4-Cineol também apresentou gastroproteção através da úlcera induzida por Piroxicam, onde o mecanismo de ação se dá através do aumento da produção de ácido pelo estômago;
- Através do uso de antagonistas específicos no experimento de úlcera induzida por etanol, evidenciou-se que o mecanismo antiulcerogênico de 1,4-cineol provavelmente se dá pelo aumento dos níveis de prostaglandinas na mucosa gástrica;
- Verificou-se também que a gastroproteção de 1,4-cineol não está envolvida com óxido nítrico, receptores vanilóides tipo 1 e canais de potássio ATP-dependentes;
- 1,4-Cineol apresentou ação antioxidante através do aumento dos níveis da enzima Superóxido dismutase;
- 1,4-Cineol também diminuiu o estresse oxidativo através da redução do nível de infiltração inflamatória, evidenciada pela diminuição nos níveis da enzima mieloperoxidase, e da redução da peroxidação lipídica.

*CONCLUSÃO*

## **7 CONCLUSÃO**

1,4-Cineol mostrou-se ser uma substância inovadora, pois se trata de um fármaco antiulcerogênico que age por mecanismo diferente dos medicamentos presentes no mercado com esta função. Como a doença ulcerosa apresenta uma alta incidência de recidiva, faz-se necessário o implemento de novos fármacos no mercado que visem ajudar no tratamento desta doença.

A decorative scroll graphic with a black outline and a light gray shadow. The scroll is horizontal and has a rolled-up appearance at both ends. The word "REFERÊNCIAS" is written in a black, serif, all-caps font across the center of the scroll.

## *REFERÊNCIAS*

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, N. *et al.* Up-regulation of the inflammatory cytokines IFN-gamma and IL-12 and down-regulation of IL-4 in cerebral cortex regions of APP(SWE) transgenic mice. **J. Neuroimmunol.**, v. 126, n. 1/2, p. 50-57, 2002.
- ABDEL-SALAM, O. M.; MÓZSIK, G.; SZOLCSÁNYI, J. Studies on the effect of intragastric capsaicin on gastric ulcer and on the prostacyclin-induced cytoprotection in rats. **Pharmacol. Res.**, v. 32, p. 209-215, 1995.
- ABDEL-SALAM, O. M. *et al.* Effect of capsaicin and resiniferatoxin on gastrointestinal blood flow in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 305, p. 127-136, 1996.
- ABDEL-SALAM, O. M.; SZOLCSÁNYI, J.; MÓZSIK, G. The indomethacin-induced gastric mucosal damage in rats. Effect of gastric acid, acid inhibition, capsaicin-type agents and prostacyclin. **J. Physiol.**, v. 91, p. 7-19, 1997.
- ABDON, A. P. *et al.* Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p. 1215-19, 2002.
- ADEYEMI, E.O. *et al.* Mechanisms of action of leptin in preventing gastric ulcer. **World J. Gastroenterol.**, v. 11, n. 27, p. 4154-60, 2005.
- AIHARA, E. *et al.* Mechanisms underlying capsaicin-stimulated secretion in the stomach: comparison with mucosal acidification. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 315, p. 423-432, 2005.
- AIHARA, E. *et al.* Distinct mechanisms of acid-induced HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion in normal and slightly permeable stomachs. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 291, p. 464-471, 2006.
- AKAR, F. *et al.* Protective effect of cromakalim and diazoxide, and proulcerogenic effect of glibenclamide on indomethacin-induced gastric injury. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 374, p. 461-470, 1999.
- ALMEIDA, R. *et al.* Plants with central analgesic activity. **Phytomedicine**, v. 8, p. 310-322, 2001.
- ALMEIDA, R. N. *et al.* Anxiolytic-like effects of rose oil inhalation on the elevated plus-maze test in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 77, p. 361-364, 2004.
- ALPER, J. Ulcers as an infectious disease. **Science**, v. 260, n. 9, p. 159-160, 1993.
- AMARAL, J. F. *et al.* Antinociceptive effect of the monoterpene R-(+)-limonene in mice. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 30, n. 7, p. 1217-1220, 2007.
- ANDERSON, S.; GROSSMAN, M. I. Profile of pH, pressure and potential difference at gastroduodenal junction in man. **Gastroenterology**, v. 49, p. 364-371, 1965.

ARRIETA, J. *et al.* Purification of gastroprotective triterpenóides from stem bark of *Amphipterygium adstringes*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. **Planta Méd.**, v. 69, p. 905-909, 2003.

ASHCROFT, F.M.; HARRISON, D. E.; ASHCROFT, S.J. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. **Nature**, v. 312, p. 446-448, 1984.

AVILA, J. R. *et al.* Role of endogenous sulphhydryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. **Inflamm. Res.**, v.45, n. 2, p. 83-88, 1996.

BAGCHI, D. *et al.* Stress, diet and alcohol-induced oxidative gastrointestinal mucosal injury in rats and protection by bismuth subsalicylate. **J. Appl. Toxicol.**, v. 18, n. 1, p. 3-13, 1998.

BAKER, R. D.; COOK, C. O.; GOODWIN, D. C. Properties of catalase-peroxidase lacking its C-terminal domain. **Biochem. Bioph. Res. CO**, v. 320, n. 3, p. 833-839, 2004.

BANICK, P. D. *et al.* Nitric oxide inhibits neutrophil beta 2 integrin function by inhibiting membrane-associated cyclic GMP synthesis. **J. Cell Physiol.**, v. 172, n. 1, p. 12-24, 1997.

BAYIR, Y. *et al.* The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. **Phytomedicine**, v. 13, n. 8, p. 584-590, 2006.

BERSTAD, A. E.; BERSTAD, K.; BERSTAD, A. PH-activated phospholipase A2: an important mucosal barrier breaker in peptic ulcer disease. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 37, n. 6, p. 738-742, 2002.

BJORKMAN, D. J. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastrointestinal injury. **Am. J. Med.**, v. 101, n. 1A, p. 25S-32S, 1996.

BLACK, J. W. *et al.* Definition and antagonism of histamine H<sub>2</sub> -receptors. **Nature**, v. 236, n. 5347, p. 385- 390, 1972.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, p. 618-622, 1982.

BROWN, J. F. *et al.* Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells. **Am. J. Physiol.**, v. 265, n. 3, Pt. 1, p. G418-G422, 1993.

BRZOZOWSKI, T. *et al.* Role of prostaglandins generated by cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in healing of ischemia-reperfusion-induced gastric lesions. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 385, p. 47-61, 1999.

BRZOZOWSKI, T. Experimental production of peptic ulcer, gastric damage and cancer models and their use in pathophysiological studies and pharmacological treatment – Polish achievements. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 54, n. 3, p. 99-126, 2003.

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.

CARVALHO, J. E. **Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese.** Campinas: CPQBA/UNICAMP, 2006.

CHANDRANATH, S. I.; BASTAKI, S. M. A.; SINGH, J. A. Comparative study on the activity of lansoprazole, omeprazole and PD-136450 on acidified ethanol and indomethacin-induced gastric lesions in the rat. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 29, n. 3, p. 173–180, 2002.

CHANDRASEKHARAN, N. V. *et al.* COX-3, a variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, p. 13926-13931, 2002.

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

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

COHEN, M. V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Ann. Intern. Med.**, v. 111, p. 918-31, 1989.

CRAVEIRO, A. A. *et al.* Fixed and volatile constituents of *Croton aff. Nepetaefolius*. **J. Natl. Prod.**, v. 43, p. 756–757, 1980.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste.** Fortaleza: Edições UFC, 1981.

CRYER, B. NSAID gastrointestinal toxicity. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 16, n. 6, p. 495-502, 2000.

CURTIS, G. H. *et al.* Intraluminal pH modulates gastric prostaglandin synthesis. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 73, p. 130-134, 1995.

DAUT, J. *et al.* KATP channels and basal coronary vascular tone. **Cardiovasc. Res.**, v. 28, p. 811-817, 1994.

DAVENPORT, H. The gastric mucosal barrier. **Digestion**, v. 5, p. 162-165, 1972.

DE SOUSA, D. *et al.* Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. **Neurosci. Lett.**, v. 401, p. 231–235, 2006.

EHRlich, K. *et al.* Interaction of cyclooxygenase isoenzymes, nitric oxide, and afferent neurons in gastric mucosal defense in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 308, p. 277-283, 2003.

EVANS, F. The gastro-intestinal Tract. In: \_\_\_\_\_. **Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of plant Material**. New York: John Wiley & Sons, 1996. p. 25-45.

FIRENZOULI, F.; GORI, I.; NERI, D. Clinical phytherapy: opportunities and problematics. **Ann. Inst. Super Sanita**, v. 41, n. 1, p. 27-33, 2005.

GOMES, A. S. *et al.* LPS from *Escherichia coli* protects against indomethacin-induced gastropathy in rats-role of ATP-sensitive potassium channels. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 547, p. 136-142, 2006.

GOMES, P. B. *et al.* Anxiolytic-like effect of the monoterpene 1,4-cineole in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 96, p. 287-293, 2010.

GONZALES, E. *et al.* Gastric cytoprotection of bolivian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 70, p. 329-333, 2000.

GONZALEZ, F. G. *et al.* Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 77, p. 41-47, 2001.

GRAY, J. L. *et al.* A role for calcitonin gene-related peptide in protection against gastric ulceration. **Ann. Surg.**, v. 219, p. 58-64, 1994.

GÜRBÜZ, V. *et al.* Role of nitric oxide in indomethacin-induced gastric mucosal dysfunction in the rat. **Exp. Physiol.**, v. 84, n. 2, p. 319-332, 1999.

GUSLANDI, M. Effect of ethanol on the gastric mucosa. **Dig. Dis.**, v. 5, p. 21-32, 1987.

KAHRAMAN, A. *et al.* The antioxidant and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. **Toxicology**, v. 183, p. 133-142, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J. Neurochem.**, v. 59, p. 1609-1623, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4th ed. Oxford: Oxford University Press, 2006.

HALTER, F. *et al.* Cyclooxygenase 2-implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. **Gut**, v. 49, p. 443-453, 2001.

HAM, E. A. *et al.* Jr. Inhibition by prostaglandins of leukotriene B4 release from activated neutrophils. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 80, n. 14, p. 4349- 4353, 1983.

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

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol. Therapeutics**, v. 96, n. 2/3, p. 67-202, 2002.

HAYDEN, L. J.; THOMAS, G.; WEST, G. B. Inhibitors of gastric lesions in the rat. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 30, p. 244-246, 1978.

HERNANDEZ-MUNOZ, R.; MONTIEL-RUIZ, C.; VAZQUEZ-MARTINEZ, O. Gastric mucosal cell proliferation in ethanol-induced chronic mucosal injury is related to oxidative stress and lipid peroxidation in rats. **Lab. Invest.**, v. 80, n. 8, p. 1161-1169, 2000.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Semin Hematol.**, v. 26, p. 277-285, 1989.

HIRAISHI, H. *et al.* Protection of cultured rat gastric cells against oxidant-induced damage by exogenous glutathione. **Gastroenterology**, v. 106, n. 5, p. 1199-1207, 1994.

HIRAISHI, H. *et al.* A. Role of antioxidant defenses against ethanol-induced damage in cultured rat gastric epithelial cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 289, n. 1, p. 103-109, 1999.

HIROKAWA, M. *et al.* Oxidative stress and mitochondrial damage precedes gastric mucosal cell death induced by ethanol administration. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v. 22, n. 3, p. 111-114, 1998.

HOGABOAM, C. M. *et al.* Prostaglandins inhibit inflammatory mediator release from rat mast cells. **Gastroenterology**, v. 104, n. 1, p. 122-129, 1993.

HOLZER, P.; LIPPE, I. T. Stimulation of afferent nerve endings by intragastric capsaicin protects against ethanol-induced damage of gastric mucosa. **Neuroscience**, v. 27, p. 981-987, 1988.

HOLZER, P. *et al.* Afferent nerve-mediated protection against deep mucosal damage in the rat stomach. **Gastroenterology**, v. 98, p. 838-848, 1990.

HOLZER, P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, p. 143-201, 1991.

HUMMEL, T. *et al.* Effects of olfactory function, age, and gender on trigeminally mediated sensations: A study based on the lateralization of chemosensory stimuli. **Toxicol. Lett.**, v. 140-141, p. 273-280, 2003.

ICHIKAWA, T. *et al.* Nitric oxide synthase activity in rat gastric mucosa contributes to mucin synthesis elicited by calcitonin gene-related peptide. **Biomed. Res.**, v. 27, p. 117-124, 2006.

INUI, T. *et al.* Linkage between capsaicin-stimulated calcitonin gene-related peptide and somatostatin release in rat stomach. **Am. J. Physiol.**, v. 261, p. G770-G774, 1991.

- JADESKI, L. C.; LALA, P. K. Nitric oxide synthase inhibition by N(G)-nitro-L-arginine methyl ester inhibits tumor-induced angiogenesis in mammary tumors. **Am. J. Pathol.**, v. 155, n. 4, p. 1381-1390, 1999.
- KAHRAMAN, A. *et al.* The antioxidant and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. **Toxicology**, v. 183, p. 133-142, 2003.
- KANWAR, S. *et al.* Nitric oxide synthesis inhibition increases epithelial permeability via mast cells. **Am. J. Physiol.**, v. 266, n. 2, Pt. 1, p. G222-G229, 1994.
- KARGMAM, S. *et al.* Characterization of prostaglandin G/H synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey and human gastrointestinal tracts. **Gastroenterology**, v. 111, p. 445-454, 1996.
- KAWANO, S.; TSUJI, S. Role of mucosal blood flow: a conceptual review in gastric mucosal injury and protection. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 15, p. D1- D6, 2000.
- KHALIL, Z. *et al.* Regulation of wheal and flare by tea tree oil: Complementary human rodent studies. **J. Invest. Dermatol.**, v. 123, p. 683-690, 2004.
- KIM, P. K. *et al.* The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. **Int. Immunopharmacol.**, v. 1, p. 1421-1441, 2001.
- KIMURA, M. *et al.* Impairment of glutathione metabolism in human gastric epithelial cells treated with vacuolating cytotoxin from *Helicobacter pylori*. **Microb. Pathol.**, v. 31, p. 29-36, 2001.
- KIVILAAKSO, E.; FROM, D.; SILEN, W. Relationship between ulceration and intramural pH on gastric mucosa during haemorrhagic shock. **Surgery**, v. 84, p. 70-78, 1978.
- KOCH, O. R. *et al.* Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. **Mol. Aspects Med.**, v. 25, n. 1/2, p. 191-198, 2004.
- KONTUREK, S. J. *et al.* Inhibition of nitric oxide synthase delays healing of chronic gastric ulcers. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 239, p. 215-217, 1993.
- KOUNTOURAS, J.; CHATZOPOULOS, D.; ZAVOS, C. Reactive oxygen metabolites and upper gastrointestinal diseases. **Hepatogastroenterology**, v. 48, p. 743-51, 2001.
- KUJUBU, D. A. *et al.* TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 12866-12872, 1991.
- KUNKEL, S. L. *et al.* Regulation of macrophage tumor necrosis factor production by prostaglandin E2. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 137, n. 1, p. 404-410, 1986.
- KUNKEL, S. L. *et al.* Prostaglandin E2 regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression. **J. Biol. Chem.**, v. 263, n. 11, p. 5380-5384, 1988.

KUO, P.C.; SCHROEDER, R.A. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. **Ann. Surg.**, v. 221, p. 220-235, 1995.

KURATA, J. H. *et al.* A reappraisal of time trends in ulcer disease: factors related to changes in ulcer hospitalization and mortality rates. **Am. J. Public Health**, v. 73, n. 9, p. 1066-1072, 1983.

KVIETYS, P. R. *et al.* Ethanol-induced injury to the rat gastric mucosa. Role of neutrophils and xanthine oxidase-derived radicals. **Gastroenterology**, v. 98, p. 909-920, 1990.

KWOK, Y. N.; MCINTOSH, C. H. Release of substance P-like immunoreactivity from the vascularly perfused rat stomach. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 180, p. 201-207, 1990.

LA CASA, C. *et al.* Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **J. Ethnopharmacology**, v. 71, p. 45-73, 2000.

LAHLOU, S. *et al.* Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* in rats: Role of the autonomic nervous system. **Planta Med.**, v. 65, p. 553-557, 1999.

LAHLOU, S. *et al.* Cardiovascular effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oils, in normotensive rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 80, p. 1125-1130, 2002.

LAINE, L.; WEINSTEIN, W. M. Histology of alcoholic hemorrhagicgastritis: a prospective evaluation. **Gastroenterology**, v. 94, p. 1254-1262, 1988.

LEAL-CARDOSO, J. H.; FONTELES, M. C. Pharmacological effects of essential oils of plants of the Northeast of Brazil. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 71, p. 207-213, 1999.

LEWIS, D.A.; HANSON, P.J. Anti-ulcer drugs of plant origin In: GP Ellis, GB West. **Progress Medicinal Chemistry**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, v. 28, p. 201-231, 1991.

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

LINDBERG, P.; BRANDSTROM, A.; WALLMARK, B. Omeprazole, a new antiulcer drug with a unique mechanism of action. **Acta Pharm. Suec.**, v. 24, n. 6, p. 329-332, 1987.

LIS-BALCHIN, M.; HART, S. Studies on the mode of action of the essential oil of lavender (*Lavandula angustifolia*). **Phytotherapy Research**, v. 13 (6), p. 540-542, 1999.

LISS, B.; BRUNS, R.; ROEPER, J. alternative sulfonylurea receptor expression defines metabolic sensitivity of K-ATP channels in dopaminergic midbrain neurons. **EMBO J.**, v. 18, p. 833-846, 1999.

- LOGUERCIO, C. *et al.* Regional variations in total and nonprotein sulfhydryl compounds in the human gastric mucosa and effects of ethanol. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 26, p. 1042-1048, 1991.
- MACMATH, T. L. Alcohol and gastrointestinal bleeding. **Emerg. Med. Clin. North Am.**, v. 8, p. 859-872, 1990.
- MAEHLY, A.C.; CHANCE, B. The assay of catalases and peroxidases. **Methods Biochem. Anal.**, v.1, p. 357-424, 1954.
- MAGALHÃES, P. J. C. *et al.* Intestinal myorelaxant and anti-spasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius*, and its constituents cineole, methyl-eugenol and terpineol. **Phytother. Res.**, v. 12, p. 172–177, 1998.
- MAGALHÃES, P. J. C.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H. Antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on guinea-pig ileum: A myogenic activity. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 18, p. 539–546, 2004.
- MAITY, P. *et al.* Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer – recent mechanism update. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 253, p. 329-338, 2003.
- MARICIC, N. *et al.* Selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors aggravate ischaemia-reperfusion injury in the rat stomach. **Br. J. Pharmacol.**, v. 128, p. 1659-1666, 1999.
- MARTINS, A. P. *et al.* Regimes terapêuticos para a úlcera péptica e erradicação de *Helicobacter pylori* nos utentes da Rede Médicos-Sentinelas. **Rev. Port. Clin. Geral**, v. 21, p. 431-444, 2005.
- MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **J. Biol. Chem.**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.
- 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.
- MELCHIORRI, D. *et al.* Suppressive effect of melatonin administration on ethanol-induced gastroduodenal injury in rats in vivo. **Br. J. Pharmacol.**, v. 121, n. 2, p. 264-270, 1997.
- MELLO FILHO, A. C.; HOFFMAN, M. E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochem. J.**, v. 218, p. 273-275, 1983.
- MERCHANT, N. B. *et al.* Capsaicin-induced gastric mucosal hyperemia and protection: the role of calcitonin gene-related peptide. **Surgery**, v. 116, p. 419-425, 1994.
- MINCIS, M. *et al.* Etanol e o Trato Gastrointestinal. **Arq. Gastroenterol.**, v. 32, p. 131-139, 1995.

- MIYAKE, K. *et al.* Irritant-induced cyclooxygenase-2 is involved in the defense mechanism of the gastric mucosa in mice. **J. Gastroenterol.**, v. 37, p. 164-171, 2002.
- MIYAZAWA, M.; SHINDO, M.; SHIMADA, T. Roles of cytochrome P450 3A enzymes in the 2-hydroxylation of 1,4-cineole, a monoterpene cyclic ether, by rat and human liver microsomes. **Xenobiotica**, v. 31, n. 10, p. 713-723, 2011.
- MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Lipid peroxidation: a possible role in gastric damage induced by ethanol in rats. **Life Sciences**, v. 38, n. 23, p. 2163-2167, 1986.
- MOLINA, V. *et al.* Therapeutic effect of D-002 (Abexol) on gastric ulcer induced experimentally in rats. **J. Med. Food**, v. 8, n. 1, p. 59-62, 2005.
- MYERS, S. I.; HERNANDEZ, R. Role of oxygen-derived free radicals on rat splanchnic eicosanoid production during acute hemorrhage. **Prostaglandins**, v. 44, n. 1, p. 25-36, 1992.
- NAHAVANDI, A. *et al.* N(G)-nitro-L-arginine methylester is protective against ethanol-induced gastric damage in cholestatic rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 370, p. 283-286, 1999.
- NIKITIN, E.S.; BALABAN, P.M. Optical recording of odor-evoked responses in olfactory brain of the naïve and adversity trained terrestrial snails. **Learn. Mem.**, v. 7, p. 422-32, 2000.
- OGINO, K. *et al.* Evaluation of pharmacological profile of meloxicam as an anti-inflammatory agent, with particular reference to its relative selectivity for cyclooxygenase-2 over cyclooxygenase-1. **Pharmacology**, v. 55, n. 1, p. 44-53, 1997.
- 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.**, v. 39, p. 79-84, 1999.
- OHTA, Y.; KOBAYASHI, T.; ISHIGURO, I. Participation of xanthine-xanthine oxidase system and neutrophils in development of acute gastric mucosal lesions in rats with a single treatment of compound 48/80, a mast cell degranulator. **Dig. Dis. Sci.**, v. 44, n. 9, p. 1865-1874, 1999.
- OKAJIMA, K.; HARADA, N. Regulation of inflammatory responses by sensory neurons: molecular mechanism(s) and possible therapeutic applications. **Curr. Med. Chem.**, v. 13, p. 2241-2251, 2006.
- OLBE, L.; CARLSSON, E.; LINDBERG, P. A proton-pump inhibitor expedition: The case histories of omeprazole and esomeprazole. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 2, n. 2, p. 132-139, 2003.
- O'NEIL, G. P.; FORD-HUTCHINSON, A. W. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. **FEBS Lett.**, v. 330, p. 156-160, 1993.

- PANDIAN, R. S.; ANURADHA, C. V.; VISWANATHAN, P. Gastroprotective effect of fenugreek seeds (*Trigonella foenum graecum*) on experimental gastric ulcer in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 81, n. 3, p. 393-397, 2002.
- PARK, J. S. *et al.* Capsaicin protects against ethanol-induced oxidative injury in the gastric mucosa of rats. **Life Sci.**, v. 67, p. 3087-3093, 2000.
- PAULA, A. C. *et al.* The gastroprotective effect of the essential oil of *Croton cajucara* is different in normal rats than in malnourished rats. **Br. J. Nutr.**, v. 96, n. 2, p. 310-315, 2006.
- PERALTA, J. G.; BARNARD, M. L.; TURRENS, J. F. Characteristics of neutrophil influx in rat lungs following fecal peritonitis. **Inflammation**, v. 17, n. 3, p. 263-271, 1993.
- 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.**, v. 301, p. 969-974, 2002.
- PFEIFFER, S. *et al.* Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (LNAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. **Br. J. Pharmacol.**, v. 118, n. 6, p. 1433-1440, 1996.
- PUSCAS, I. *et al.* Comparative study of the safety of ebrotidine versus ranitidine and placebo in the prevention of piroxicam-induced gastroduodenal lesions. **Arzneimittelforschung**, v. 47, n. 4A, p. 568-572, 1997.
- QUAN, C.; TALLEY, N. J. Management of peptic ulcer disease not related to *Helicobacter pylori* or NSAIDs. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 97, n. 12, p. 2950-2961, 2002.
- RADOMSKI, M. W.; MONCADA, S. Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide. **Thromb Haemost.**, v. 70, p. 36-41, 1993.
- RAHGOZAR, M. *et al.* Diazoxide, a K(ATP) opener, accelerates restitution of ethanol or indomethacin-induced gastric ulceration in rats independent of polyamines. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 16, p. 290-296, 2001.
- RANG, H. P. *et al.* Pharmacology., 6. ed. United Kingdom: Elsevier, 2007.
- RAO, C. V. *et al.* Antiulcer activity of *Urtica salicifolia* rhizome extract. **J. Ethnopharmacology**, v. 91, p. 243-249, 2004.
- REN, J. *et al.* Calcitonin gene-related peptide mediates capsaicin-induced neuroendocrine responses in rat antrum. **Gastroenterology**, v. 104, p. 485-491, 1993.
- REPETTO, M. G.; LLEUSY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcer. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p. 523-534, 2002.
- RIOS, E. R. *et al.* Mechanisms involved in the gastroprotective activity of esculin on acute gastric lesions in mice. **Chem. Biol. Interact.**, v. 188, n. 1, p. 246-254, 2010.

ROBERT, A. *et al.* Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. **Gastroenterology**, v. 77, n. 3, p. 433–443, 1979.

ROCHA, N. F. M. *et al.* Gastroprotection of (-)-alpha-bisabolol on acute gastric mucosal lesions in mice: the possible involved pharmacological mechanisms. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 24, n. 1, p. 63-71, 2010.

ROSAZZA, J. P. N. *et al.* Microbial Hydroxylation of 1,4-Cineole. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 53, p. 2482-2486, 1987.

SACHS, G. *et al.* Gastric H,K-ATPase As Therapeutic Target. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 28, p. 269- 284, 1988.

SALIM, A. S. Sulphydryl-containing agents: a new approach to the problem of refractory peptic ulceration. **Pharmacology**, v. 45, n. 6, p. 301-306, 1992.

SAIKA, M.; UEYAMA, T.; SENBA, E. Expression of immediate early genes, HSP70, and COX-2 mRNAs in rat stomach following ethanol ingestion. **Dig. Dis. Sci.**, v. 45, p. 2455–2462, 2000.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. **Phytother. Res.**, v. 14, p. 240–244, 2000.

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

SANTOS, C. L. *et al.* Sildenafil prevents indomethacin-induced gastropathy in rats: role of leukocyte adherence and gastric blood flow. **Br. J. Pharmacol.**, v. 146, p. 481-486, 2005.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal. Biochem.**, v. 25, n. 1, p. 192-205, 1968.

SENER-MURATOGLU, G. *et al.* Protective effect of famotidine, omeprazole, and melatonin against acetylsalicylic acid-induced gastric damage in rats. **Dig.Dis.Sci.**, v. 46, n. 2, p. 318-330, 2001.

SHIMIZU, N. *et al.* Pentoxifylline accelerates gastric ulcer healing in rats: roles of tumor necrosis factor alpha and neutrophils during the early phase of ulcer healing. **Digestion**, v. 61, n. 3, p. 157-164, 2000.

SIEGMUND, S.; TEYSSEN, S.; SINGER, M. V. Alcohol-associated organ damage. Health sequelae caused by moderate alcohol drinking. **Internist (Berl)**, v. 43, p. 287-293, 2002.

SILVA, M. I. G. *et al.* Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 88, n. 2, p. 141–147, 2007.

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, n. 3, p. 233-245, 2009.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. Porto Alegre: Editora Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Florianópolis: Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, 1999.

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

SOUZA, M. H. *et al.* Gastritis increases resistance to aspirin-induced mucosal injury via COX-2-mediated lipoxin synthesis. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 285, p. G54-G61, 2003.

STANDEN, N. B. *et al.* Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in arterial smooth muscle. **Science**, v. 14, p. 177-180, 1989.

STEINBECK, M. J.; KHAN, A.U.; KARNOVSKY, M. J. Extracellular production of singlet oxygen by stimulated macrophages quantified using 9,10-diphenylanthracene and perylene in a polystyrene film. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 21, p. 15649-15654, 1993.

STRUZYNSKA, L.; CHALIMONIUK, M.; SULKOWSKI, G. The role of astroglia in Pb-exposed adult rat brain with respect to glutamate toxicity. **Toxicology**, v. 212, p. 185-194, 2005.

SUN, Y.; OBERLEY, L.W.; LI, Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. **Clin. Chem.**, v. 34, n. 3, p. 497-500, 1988.

SUZUKI, K. *et al.* Permissive role of neutrophils in pathogenesis of indomethacin-induced gastric lesions in rats. **Med. Sci. Monit.**, v. 6, n. 5, p. 908-914, 2000.

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

SZABO, S. *et al.* Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. **Gastroenterology**, v. 88, p. 228-236, 1985.

SZABO, S.; SZELENYI, I. 'Cytoprotection' in gastrointestinal pharmacology. **TIPS**, v. 8, p. 149-154, 1987.

SZOLCSÁNYI, J.; BARTHÓ, L. Impaired defense mechanism to peptic ulcer in the capsaicin-desensitized rat. In: MÓZSIK, G. Y.; HÄNNINEN, O.; JÁVOR, T. (Ed.). **Advances in physiological sciences**. Beijing: Pergamon Press, 1981. v. 29, p. 39-51.

SZOLCSÁNYI, J. Capsaicin, irritation, and desensitization: Neurophysiological basis and future perspectives. In: Green, B. G.; MASON, J. R.; KARE, M. R. (Ed.). **Chemical senses**. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 141-169.

TACHÉ, Y.; RAYBOULD, H.; WEI, J. Y. Central and peripheral actions of calcitonin gene-related peptide on gastric secretory and motor function. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 298, p. 183-198, 1991.

TAN, P. V. *et al.* Gastric cytoprotective anti-ulcer effects of the leaf methanol extract of *Ocimum suave* (Lamiaceae) in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 82, p. 69-74, 2002.

TARIQ, M. *et al.* Bromophenacyl bromide, a phospholipase A2 inhibitor attenuates chemically induced gastroduodenal ulcers in rats. **World J. Gastroenterol.**, v. 12, n. 36, p. 5798-5804, 2006.

TARNAWSKI, A. *et al.* Cellular aspects of alcohol-induced injury and prostaglandin protection of the human gastric mucosa. Focus on the mucosal microvessels. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 10, p. 35-45, 1988.

TARNAWSKI, A. S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. **Dig. Dis. Sci.**, v. 50, n. 1, p. S24-S33, 2005.

TEGEDER, I. *et al.* Effects of selective and unselective cyclooxygenase inhibitors on prostanoic acid release from various rat organs. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 292, p. 1161-1168, 2000.

TEPPERMAN, B. L.; JACOBSON, E. D. Circulatory factors in gastric mucosal defense and repair. In: JOHNSON, L. R. (Ed.). **Physiology of the gastrointestinal tract**. 3rd ed. New York: Raven Press, 1994. p. 488-493.

THOMOPOULOS, K. C. *et al.* Changes in aetiology and clinical outcome of acute upper gastrointestinal bleeding during the last 15 years. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 16, n. 2, p. 177-182, 2004.

TISSERAND, R.; BALACS, T. **Essential Oil Safety: a guide for health care professionals**, 1st ed. New York: Churchill Livingstone, 1995.

TOMA, W. *et al.* Antiulcerogenic activity of four extracts from the bark and wood of *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). **Biol. Pharm. Bull.**, v. 25, n. 9, p. 1151-1155, 2002.

TOROUDI, H. P. *et al.* Potassium channel modulators and indomethacin-induced gastric ulceration in rats. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 34, p. 962-966, 1999.

WALL, M. E.; WANI, M.C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **J. Ethnopharmacology**, v. 51, p. 239-254, 1996.

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

WALLACE, J. L.; MILLER, M. J. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. **Gastroenterology**, v. 119, n. 2, p. 512-520, 2000.

VANE, J. Towards a better aspirin. **Nature (Lond)**, v. 367, p. 215-216, 1994.

VANE, J.R.; BOTTING, R.M. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Am. J. Med.**, v.104, p. 2S-8S, 1998.

VERAS, V. Úlcera péptica. In: UNIVERSIDADE DE CUIABÁ. Faculdade de Medicina. **Clínica Médica**. Disponível em: <[http://www.medstudents.com.br/content/resumos/resumo\\_medstudents\\_20050922\\_.doc](http://www.medstudents.com.br/content/resumos/resumo_medstudents_20050922_.doc)>. Acesso em: 08 abr. 2011.

VICTOR, B. E. *et al.* Protection against ethanol injury in the canine stomach: role of mucosal glutathione. **Am. J. Physiol.**, v. 261, p. 966-973, 1991.

XIE, W. L. *et al.* Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase in regulated by mRNA splicing. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 8, p. 2692-2696, 1991.

YUAN, Y.; PADOL, I. T.; HUNT, R. H. Peptic ulcer disease today. **Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 3, n. 2, p. 80-89, 2006.

ZAYACHKIVSKA, O. S. *et al.* Gastroprotective effects of flavonoids in plant extracts. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 56, n. 1, p. 219-231, 2005.