



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

RACHEL SINDEAUX PAIVA PINHEIRO

**EFEITO GASTROPROTETOR DE UMA FRAÇÃO PROTEICA ISOLADA DO
LÁTEX DE *Plumeria rubra* L. (APOCYNACEAE) EM LESÃO GÁSTRICA
INDUZIDA POR ETANOL: ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES TRPV1, DA VIA
NO/GMPc/K_{ATP} E DA GLUTATIONA.**

FORTALEZA

2012

RACHEL SINDEAUX PAIVA PINHEIRO

**EFEITO GASTROPROTETOR DE UMA FRAÇÃO PROTEICA ISOLADA DO
LÁTEX DE *Plumeria rubra* L. (APOCYNACEAE) EM LESÃO GÁSTRICA
INDUZIDA POR ETANOL: ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES TRPV1, DA VIA
NO/GMPc/K_{ATP} E DA GLUTATIONA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador (a): Prof^a. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar

FORTALEZA

2012

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

P722e

Pinheiro, Rachel Sindeaux Paiva.

Efeito gastroprotetor de uma fração proteica isolada do látex de *Plumeria rubra* L. (*APOCYNACEAE*) em lesão gástrica induzida por etanol: envolvimento de receptores TRPV1, da via NO/GMPc/K_{ATP} e da glutatona/ Rachel Sindeaux Paiva Pinheiro. – 2012.

104 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2012.

Orientação: Prof^ª. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar.

1. Proteínas 2. *Plumeria* 3. Úlcera gástrica 4. Etanol. I. Título.

CDD 615.32

RACHEL SINDEAUX PAIVA PINHEIRO

**EFEITO GASTROPROTETOR DE UMA FRAÇÃO PROTEICA ISOLADA DO
LÁTEX DE *Plumeria rubra* L. (APOCYNACEAE) EM LESÃO GÁSTRICA
INDUZIDA POR ETANOL: ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES TRPV1, DA VIA
NO/GMPc/K_{ATP} E DA GLUTATIONA.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em: 12/07/12

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Nylane Maria Nunes de Alencar (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Márcio Viana Ramos
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^a. Dr^a. Flávia Almeida Santos
Universidade Federal do Ceará - UFC

Dedico...

*À Deus, por ter me promovido saúde, força e coragem para a realização deste
trabalho.*

Aos meus pais, pelo carinho, dedicação e incentivo nos meus estudos.

Ao meu marido, pelo incansável incentivo, amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre me deu forças para perseverar e continuar, diante de qualquer obstáculo que surgisse.

Aos meus familiares, em especial minha mãe e meu pai, Minerva Maria Sindeaux Paiva Pinheiro e Antonio Carlos Pinheiro, que sempre me ensinaram a discernir o certo do errado, e se empenharam ao máximo para dar-me escolaridade e educação. Muito obrigada pelo carinho, apoio incondicional, educação e incentivo.

Ao meu marido e meu amor, Régis Gonçalves Pinheiro, por sua amizade, companhia, palavras, carinho e amor incessantes. Pela compreensão, incentivo e incansável busca pelo meu sucesso. Por ser meu companheiro inseparável em todos os momentos e por se orgulhar e torcer por mim!!!!

Aos meus irmãos, Daniel Sindeaux Paiva Pinheiro e Victor Sindeaux Paiva Pinheiro por sempre acreditarem em mim e nos meus ideais e torcerem pelo meu sucesso!!!!

À minha grande cunhada, comadre e irmã Valdireza Arsene, pois ser uma pessoa tão maravilhosa e me incentivar, me apoiar e torcer por mim em todos os momentos da minha vida!!!

Aos meus sobrinhos Amanda, Matheus, Gabriela, Ícaro, Daniel Filho e Maria Eduarda, por me darem tanto amor e entenderem que muitas vezes a tia Chel não podia brincar com eles pois estava ocupada com suas experiências!!!

À Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar pela valorosa orientação na realização deste trabalho, pelas palavras de incentivo e estímulo dado durante toda minha vida acadêmica e por ser um exemplo de orientadora, na qual quero seguir durante toda minha jornada.

À Profa. Flávia Almeida Santos por aceitar compor a banca examinadora desta dissertação.

Ao professor Dr. Márcio Viana Ramos, por fornecer as proteínas laticíferas utilizadas neste trabalho e por aceitar compor a banca examinadora desta dissertação.

À Lyara Basbosa e Patrícia Luz pela ajuda constante em todos os momentos da realização deste trabalho, pelo convívio maravilhoso, por estarem sempre disponíveis em todos os dias de experimento, seja feriado ou fim de semana, pelas palavras de amizade quando sempre precisei e por termos o privilégio de compartilharmos de uma grande amizade. **Muito obrigada por tudo!!!**

À Ingrid Samantha Tavares de Figueredo, pelo conselhos e experiências passadas pra mim, por me ensinar bastante durante minha época de iniciação

científica e por ter sido uma peça fundamental na construção de minha formação acadêmica. **Muito obrigada por tudo!!!**

Aos colegas de laboratório que participaram da realização dos experimentos: Patrícia Sâmara, nos auxiliando em tudo que era necessário além de ajudar nos experimentos de toxicologia; César, por estar sempre disponível pra ajudar, tirando todas as dúvidas que surgiam durante os experimentos; Daniele, por estar sempre presente e por ajudar nos ensaios de dosagem de enzimas antioxidantes; Larisse por estar em todos os experimentos sempre ajudando e proporcionando um ambiente agradável.

Aos alunos de iniciação científica Tamiris, Luana, Tatiana, Yury e Gisele, sempre tão competentes e dispostos a me ajudar, além de proporcionar um ambiente alegre e descontraído para o trabalho e por me proporcionar passar um pouco de minha experiência para eles. **Sem vocês este trabalho não teria ido realizado!!Muito obrigada!!!**

Aos demais integrantes do laboratório de Bioquímica- Farmacologia: Flávio, Karol, Tiago, Alana, Ingrid, Ítalo Prof. Marcus Vale, pelos momentos de aprendizado e companhia e por sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos amigos que ganhei durante a graduação e que me acompanham até hoje, seja torcendo de longe ou mesmo juntos na pós-graduação: Lívia Alves, Ramon Róseo, Lyara Barbosa e Patrícia Luz.

A todos os professores da Pós-graduação, pelos conhecimentos cedidos e, pelos ensinamentos que contribuíram para meu crescimento intelectual e pessoal.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Muito Obrigada!

RESUMO

EFEITO GASTROPROTETOR DE PROTEÍNAS ISOLADAS DO LÁTEX DE *Plumeria rubra* L. (APOCYNACEAE) EM MODELO DE LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL: ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES TRPV1, DA VIA NO/GMPc/K_{ATP} E DA GLUTATIONA.

A *Plumeria rubra* L. é uma planta laticífera pertencente à família *Apocynaceae*, popularmente conhecida como Jasmim. Esta amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais, incluindo o Brasil. Essa planta é utilizada popularmente para o tratamento de sífilis, febre e como purgativo. Alguns estudos mostram que o látex de *P. rubra* possui atividade antioxidante e vasodilatadora. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito gastroprotetor das proteínas laticíferas da *Plumeria rubra* (PrLP) em modelo de úlcera gástrica induzida por etanol, investigar o possível envolvimento dos receptores TRPV1, da via NO/GMPc/K_{ATP} e da glutaciona, e possíveis efeitos tóxicos. A manipulação dos animais e os protocolos experimentais foram registrados no Comitê de Ética Institucional sob o número 057/2010. Camundongos Swiss (n = 8), em jejum de 16h, foram tratados por via intravenosa com PrLP nas doses de 0,05; 0,5; 5 e 50 mg/kg. Após 30 min da administração de PrLP os animais receberam 0,2 ml de etanol absoluto v.o. Decorridos 60 min dessa administração, os animais foram sacrificados, os estômagos removidos e analisados para determinação do índice de lesão. Para investigar o envolvimento de mediadores no efeito de PrLP, os animais receberam indometacina (10 mg/kg; v.o.), L-NAME (20 mg/kg; i.p.), ODQ (10 mg/kg; i.p.), glibenclamida (5 mg/kg; i.p.) e capsazepina (5 mg/kg; i.p.) antes do tratamento com PrLP (0,5 mg/kg; i.v.). Misoprostol (50 µg/kg v.o), L-arginina (600 mg/kg; i.p.), diazóxido (3mg/kg; i.p.) e capsaicina (0,3 mg/kg; v.o.) foram utilizados como droga-padrão. Para avaliar o efeito de PrLP sobre os níveis de NO₃⁻/NO₂⁻, foi realizada sua dosagem no homogenato do estômago, mas para investigar um possível efeito antioxidante, foi realizada a dosagem dos níveis de GSH em estômagos normais e lesionados. Para a toxicidade sub-crônica os animais foram tratados por 7 dias com a dose de 50 mg/kg; i.v., seguido da avaliação de vários parâmetros, tais como: peso corporal, hemograma completo, bioquímicos (uréia, ALT e AST) e peso úmido de órgãos vitais (coração, baço, fígado e rim). PrLP nas doses de 0,5; 5 e 50 mg/kg foi capaz de inibir lesão gástrica em 81,9; 72,8 e 68%, respectivamente, recuperou os níveis de GSH na mucosa em 105% quando comparados com o grupo etanol e não alterou os níveis de GSH em animais que não tiveram seus estômagos lesionados pelo etanol. Adicionalmente, PrLP também aumentou em 26% os níveis de NO₃⁻/NO₂⁻ que foram reduzidos pela administração de etanol. Indometacina, L-NAME, ODQ, Glibenclamida e capsazepina foram capazes de reverter o efeito de PrLP, demonstrando o envolvimento das Prostaglandinas, NO, GMPc, canais de K_{ATP} e dos receptores TRPV1 em seu mecanismo de ação. Além disso, o tratamento por 7 dias com PrLP não alterou nenhum parâmetro avaliado, mostrando segurança no seu uso. Estes resultados indicam que PrLP possui atividade farmacológica gastroprotetora sobre a mucosa do estômago ao qual parece ser mediada em parte pela modulação de prostaglandina, pela via NO/GMPc/K_{ATP} e pelos receptores TRPV1, ao qual possuem papel fundamental na manutenção do fluxo sanguíneo e na defesa da mucosa gástrica. PrLP atua evitando a depleção dos níveis de GSH induzidas pelo etanol. Sendo isto importante para a manutenção das defesas

antioxidantes da mucosa. Além do mais, PrLP não apresenta toxicidade aguda nos animais.

Palavras chave: Proteínas laticíferas. *Plumeria rubra*. Úlcera gástrica. Etanol.

ABSTRACT

GASTROPROTECTIVE EFFECT OF PROTEIN ISOLATED FROM *Plumeria rubra* L. (APOCYNACEAE) LATEX IN ETHANOL-INDUCED GASTRIC DAMAGE: INVOLVEMENT OF TRPV1 RECEPTOR, NO/cGMP/K_{ATP} PATHWAY AND GLUTATHIONE.

The *Plumeria rubra* is a laticifer plant of family Apocynaceae, popularly known as "Jasmim". It is widely distributed in tropical and subtropical regions, including Brazil. This plant is commonly used for the treatment of syphilis, fever, and as a purgative. Some studies show that the latex of *P. rubra* has antioxidant and vasodilator activity. The aim of this study was to evaluate the gastroprotective effect of laticifers proteins of *Plumeria rubra* (PrLP) in ethanol-induced gastric damage, to investigate the possible involvement of TRPV1 receptors, NO/cGMP/K_{ATP} pathway and glutathione, and possible toxic effects. Animal handling and experimental protocols were registered on the Institutional Ethics Committee under number 057/2010. Swiss mice (n=8), fasting for 16 hours, were treated intravenously (i.v.) with PrLP doses of 0.05, 0.5, 5 and 50 mg/kg. After 30 min the animals received 0.2 ml of absolute ethanol per oral (p.o.). After 60 min of ethanol administration, the animals were sacrificed, their stomachs removed and analyzed to determine lesion index. To investigate the involvement of mediators in PrLP effect, animals received indomethacin (10 mg/kg, p.o.), L-NAME (20 mg/kg, i.p.), ODQ (10 mg/kg, i.p.), glibenclamide (5 mg/kg, i.p.) and capsazepine (5 mg/kg, i.p.) prior to treatment with PrLP (0.5 mg/kg i.v.). Misoprostol (50 µg/kg; p.o.), L-arginine (600 mg/kg; i.p.), diazoxide (3 mg/kg; i.p.) and capsaicin (0.3 mg/kg; p.o.) were used as standard-drug. To evaluate the effect of PrLP on the levels of NO₃⁻/NO₂⁻, the dosage was performed in the homogenate of the stomach, but to investigate a possible antioxidant effect, it was carried out the measurement of the GSH levels in normal and injured stomachs. For sub-chronic toxicity animals were treated for 7 days with 50 mg/kg i.v., followed by evaluation of various parameters, such as: body weight, complete blood count, biochemical (urea, ALT, AST) and wet weight of vital organs (heart, spleen, liver and kidney). PrLP at doses of 0.5, 5 and 50 mg/kg was able to inhibit the gastric lesions by 81.9, 72.8 and 68%, respectively, retrieving the GSH levels in the mucosa by 105% compared with the ethanol group and PrLP did not alter the GSH levels in animals that were not ethanol-lesioned stomachs. Additionally, PrLP also increased in 26% NO₃⁻/NO₂⁻ levels that were reduced by ethanol administration. Indometacin, L-NAME, ODQ, glibenclamide and capsazepine were able to reverse the PrLP protective effect, demonstrating the involvement of prostaglandins, NO, GMPc, potassium channels ATP-dependent and TRPV1 receptors in its mechanism of action. Furthermore, the treatment for 7 days with PrLP did not change any parameter evaluated showing safety in their use. These results indicate that PrLP have gastroprotective pharmacology activity on the gastric mucosa which seems to be mediated in part by modulation of prostaglandin, NO/cGMP/K_{ATP} pathway and TRPV1 receptors, which play a fundamental role in maintaining blood flow and gastric mucosa defense. PrLP acts avoiding depletion of GSH levels ethanol-induced. Since this is important for the maintenance of mucosal antioxidant defenses. Moreover, PrLP did not shown acute toxicity in animals.

Key-Words: laticifer proteins. *Plumeria rubra*. gastric ulcer. ethanol.

LISTA DE FIGURAS

1. Estômago e glândulas gástricas	22
2. Modelo ilustrando a regulação da secreção ácida neural, parácrina e hormonal....	25
3. Mucosa gástrica e mecanismo de defesa.....	27
4. Aspecto geral da planta <i>Plumeria rubra</i>	43
5. Modelo experimental utilizado na avaliação do efeito gastroprotetor de PrLP.....	54
6. Representação esquemática do procedimento experimental utilizado para avaliar o efeito das prostaglandinas.....	55
7. Representação esquemática do procedimento experimental utilizado para avaliar o efeito de NO.....	56
8. Representação esquemática do procedimento experimental utilizado para avaliar o efeito de GMPc.....	58
9. Representação esquemática do procedimento experimental utilizado para avaliar o efeito de canais de potássio ATP – dependentes.....	59
10. Representação esquemática do procedimento experimental utilizado para avaliar o efeito de neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina.....	60
11. Efeito protetor de PrLP no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol	65
12. Análise macro e microscópica do pré-tratamento com PrLP no modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto.....	68
13. Indometacina reverte efeito gastroprotetor de PrLP.....	69
14. L-NAME reverte efeito gastroprotetor de PrLP.....	70
15. Fração proteica do látex de <i>Plumeria rubra</i> induz aumento dos níveis de nitrato/nitrito na mucosa gástrica com lesões por etanol.....	71
16. ODQ reverte efeito gastroprotetor de PrLP.....	72
17. Glibenclamida reverte efeito gastroprotetor de PrLP.....	73
18. Capsazepina reverte efeito gastroprotetor de PrLP.....	74
19. Fração proteica do látex de <i>Plumeria rubra</i> induz aumento dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) na mucosa gástrica com lesões por etanol.....	76

20. Fração proteica do látex de <i>Plumeria rubra</i> não aumenta os níveis de glutathione reduzida (GSH) na mucosa gástrica sem lesões.....	76
21. Mecanismo hipotético do efeito gastroprotetor de PrLP.....	88

LISTA DE TABELAS

1. Perfil hematológico em camundongos tratados durante sete dias com PrLP e veículo..... 64
2. Evolução ponderal e peso relativo de órgãos vitais em camundongos tratados durante sete dias com PrLP e veículo..... 64
3. Perfil bioquímico em camundongos tratados durante sete dias com PrLP e veículo..... 64
4. Efeito protetor de PrLP no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol..... 66
5. Avaliação histopatológica do efeito de PrLP sobre lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos..... 67

LISTA DE SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromol
abs	Absoluto
Ach	Acetilcolina
AINE	Antiinflamatório Não Esteroidal
ALT	Alanina aminotransferase
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
ANOVA	Análise de Variância
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
Ca ²⁺	Íon Cálcio
CAT	Catalase
CCK-B	Colecistoquinina – B
CCVP	Canais de Cálcio Voltagem Dependentes
DNA	Ácido Desoxirribonucléico complementar
CEPA	Comissão de Ética Institucional
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene calcitonina
COX	Ciclooxigenase
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico
EP ₁	Receptor de Prostaglandina tipo 1
EP ₂	Receptor de Prostaglandina tipo 2
EP ₃	Receptor de Prostaglandina tipo 3
EP ₄	Receptor de Prostaglandina tipo 4
EPM	Erro Padrão da Média
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
g	Gramas
GCs	Guanilato Ciclase Solúvel

GMPc	Guanosina Monofosfato Cíclico
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GS	Glutathione Sintase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Disulfeto Glutathione
h	Hora
H ⁺	Íon Hidrogênio
H ⁺ /K ⁺ /ATPase	Bomba de Prótons
H ₂ R	Receptor Histamínico tipo 2
H ₂ CO ₃	Ácido Carbônico
H ₃ PO ₄	Ácido Fosfórico
HCl	Ácido Clorídrico
HCO ₃ ⁻	Bicarbonato
HDC	Histidina Descarboxilase
HdLP	Fração Proteica do Látex de <i>Himatanthus drasticus</i>
IBPs	Inibidores da Bomba de Prótons
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
IL	Interleucina
IP	Receptor de Prostaglandina
IP ₃	Inositol Trifosfato
K _{ATP}	Canais de Potássio sensíveis a ATP
KCl	Cloreto de Potássio
kg	Kilograma
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potássio Monobásico
L-NAME	N ^G -Nitro-L-arginina-metiléster
M	Molar
M ₃	Receptor colinérgico muscarínico tipo 3
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
NAC	N-acetilcisteína

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaNO ₂	Nitrito de Sódio
NEED	N-(1-naftil)-etilenodiamina
nm	Nanômetro
NO	Óxido Nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
NOS	Óxido Nítrico Sintetase
NOS _e	NOS endotelial
NOS _n	NOS neuronal
NOS _i	NOS induzível
NP-SH	Grupos Sulfidrílicos Não-Proteicos
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	Nível de significância
PACAP	Polipeptídeo Ativador da Adenilato Ciclase Pituitária
PG	Prostaglandina
PLC	Fosfolipase C
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF ₂	Prostaglandina F ₂
PGI ₂	Prostaciclina I ₂
PGH ₂	Prostaglandina Endoperóxido H ₂
pH	Potencial Hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto
s.c.	Subcutâneo
SOD	Superóxido Dismutase
SST ₂	Receptor de Somatostatina Tipo 2
TCA	Ácido Tricloroacético
TGI	Trato Gastrointestinal
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRPV1	Receptor de potencial transiente vanilóide 1

UFC	Universidade Federal do Ceará
VIP	Peptídeo Intestinal Vasoativo
v.o.	Via Oral
vs	Versus

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Mecanismos da secreção ácida	23
1.2	Mecanismo de Defesa da Mucosa	26
1.2.1	Barreira Muco/Bicarbonato/Fosfolípido	27
1.2.2	Microcirculação	28
1.2.3	Neurônios Sensoriais Aferentes	28
1.2.4	Prostaglandinas	29
1.2.5	Óxido Nítrico	30
1.2.6	Canais de Potássio ATP dependentes	31
1.2.7	Sistema Antioxidante	31
1.3	Úlcera Péptica	33
1.4	Farmacoterapêutica da Úlcera Péptica	34
1.5	Indução de Lesão Gástrica por Etanol	37
1.6	Látex e Plantas laticíferas	39
1.7	Látex na Proteção Gástrica	41
1.8	Látex de <i>Plumeria rubra</i> L.	42
2	JUSTIFICATIVA	45
3	OBJETIVOS	47
3.1	Objetivo Geral	47
3.2	Objetivos Específicos	47
4	MATERIAIS	48
4.1	Material vegetal	48
4.2	Coleta do látex e Isolamento da fração proteica	48
4.3	Equipamentos e instrumentos laboratoriais	49
4.4	Drogas e reagentes	50
4.5	Animais	51
5	MÉTODOS	52
5.1	Avaliação toxicológica aguda da PrLP	52
5.2	Efeito da fração proteica do látex de <i>Plumeria rubra</i> (PrLP) na Lesão Gástrica Induzida por Etanol: Curva Dose-Resposta	53
5.3	Avaliação histopatológica	54

5.4 Investigação de mecanismos envolvidos no efeito Protetor da fração proteica do látex de <i>Plumeria rubra</i> na lesão gástrica Induzida por etanol.....	55
5.4.1 Avaliação do envolvimento das prostaglandinas.....	55
5.4.2 Avaliação do Papel do Óxido Nítrico.....	56
5.4.2.1 Modulação Farmacológica com L-NAME.....	56
5.4.2.2 Determinação dos níveis de nitrato/nitrito na mucosa gástrica...	57
5.4.3 Avaliação do envolvimento de GMPc.....	58
5.4.4 Avaliação do envolvimento dos canais de K_{ATP}	59
5.4.5 Avaliação do envolvimento dos neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina via receptor de potencial transiente vanilóide 1 (TRPV1).....	60
5.4.6 Investigação do envolvimento de defesa Antioxidante.....	61
5.5 Análise estatística.....	62
6 RESULTADOS.....	63
6.1 Administração aguda da fração proteica do látex de <i>Plumeria rubra</i> não produz sinais de toxicidade sistêmica em camundongos.....	63
6.2 Fração proteica do látex de <i>Plumeria rubra</i> reduz percentual de lesões gástricas induzidas por etanol.....	65
6.3 Avaliação Histopatológica.....	66
6.4 O pré-tratamento com indometacina bloqueia a proteção gástrica da fração proteica do látex de <i>Plumeria rubra</i> no modelo de lesão gástrica induzida por etanol.....	69
6.5 Avaliação do Papel do Óxido Nítrico.....	70
6.5.1 O pré-tratamento com L-NAME bloqueia a proteção gástrica da fração proteica do látex de <i>Plumeria rubra</i>	70
6.5.2 Fração proteica do látex de <i>Plumeria rubra</i> induz aumento dos níveis de Nitrato/Nitrito na mucosa gástrica com lesões por etanol.....	71
6.6 O pré-tratamento com ODQ bloqueia a proteção gástrica da fração proteica do látex de <i>Plumeria rubra</i>	72
6.7 O pré-tratamento com glibenclamida bloqueia a proteção gástrica da fração proteica do látex de <i>Plumeria rubra</i>	73

6.8 O pré-tratamento com capsazepina bloqueia a proteção gástrica da fração proteica do látex de <i>Plumeria rubra</i>.....	74
6.9 A fração proteica do látex de <i>Plumeria rubra</i> impede a redução dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) na mucosa gástrica de camundongos com úlcera induzida por etanol.....	75
7 DISCUSSÃO.....	77
8 CONCLUSÃO.....	88
REFERÊNCIAS.....	89

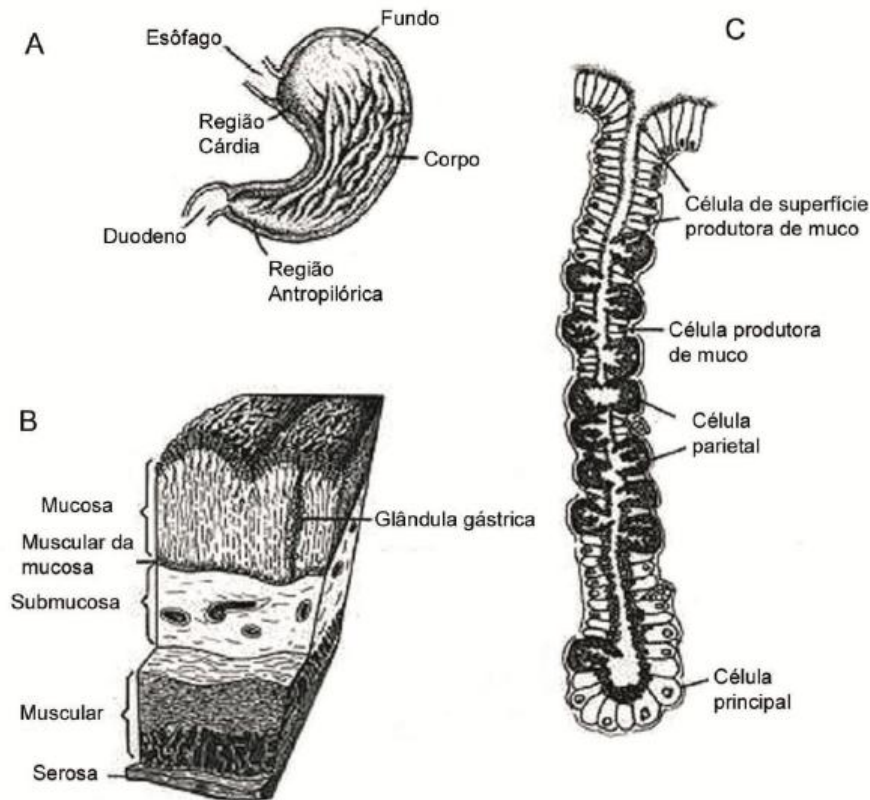
1 INTRODUÇÃO

O estômago é uma dilatação do trato digestivo, dividido anatomicamente em quatro regiões a cárdia, o fundo, o corpo e o antro. A cárdia é a porção estreitada do estômago imediatamente distal à junção gastroesofágica. O fundo constitui a porção do estômago proximal que se estende acima do nível da junção gastroesofágica. A porção mais distal do órgão demarcado do duodeno pelo esfíncter pilórico é denominada antro. Os dois terços restantes do estômago são chamados de corpo (HAM, 1991). As porções do estômago são limitadas por dois sistemas de esfíncteres: o esfíncter esofágico inferior (parte superior/proximal do estômago) e o esfíncter pilórico (parte inferior ou distal) (HOGBEN *et al.*, 1974).

Funcionalmente, a mucosa gástrica pode ser dividida em três regiões glandulares, com base nas estruturas das glândulas presentes: região glandular cardíaca, glandular oxíntica e glandular pilórica (JAIN *et al.*, 2006) A região glandular cardíaca está localizada abaixo do esfíncter esofágico inferior e contém primariamente células glandulares secretoras de muco. As glândulas oxínticas compreendem as células parietais que são secretoras de ácido clorídrico, células principais que produzem pepsinogênio, células D, que produzem somatostatina e células enterocromafins (ECL), que liberam histamina. E as glândulas pilóricas que compreendem os mesmos tipos celulares que as glândulas oxínticas (exceto as células principais) e incluindo as células G que produzem gastrina (JAIN *et al.*, 2006).

No que se refere à histologia gástrica, podem ser observadas várias camadas: a mucosa, que recobre o lúmen estomacal; uma fina camada de músculo liso, conhecida como muscular da mucosa; a submucosa, que consiste em tecido conjuntivo e vasos sanguíneos; a túnica muscular, composta por várias camadas de músculo liso e a serosa, que faz o limite do estômago com a cavidade peritoneal (**Figura 1**) (JOHNSON *et al.*, 2006).

FIGURA 1 – Estômago e glândulas gástricas.



A) As regiões anatômicas do estômago são indicadas. B) Um corte da parede gástrica indicando as glândulas gástricas na mucosa e várias camadas de tecido; C) Esquema da glândula gástrica indicando alguns tipos celulares presentes no epitélio gástrico.

Fonte: Adaptado de Johnson *et al.*, 2006.

O estômago é um órgão que exerce papel importante na digestão e absorção dos alimentos por meio da secreção de ácidos, enzimas digestivas, muco e bicarbonato que são importantes para a continuidade da digestão de carboidratos iniciada na boca, transformação do bolo alimentar em uma massa viscosa (quimo), para o início a digestão das proteínas pela ação da pepsina e para o controle na absorção de água, nutrientes e eletrólitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; KOEPPEN; STANTON, 2009). Esse órgão também exerce função endócrina através

da secreção de hormônios, sendo um dos sistemas endócrinos mais importantes do corpo, possui sua rede neuronal integrativa, o sistema nervoso entérico, que contém aproximadamente o mesmo número de neurônios da medula espinhal (RANG *et al.*, 2007).

Essas atividades do trato gastrintestinal são reguladas pelo sistema nervoso composto de fibras neuronais extrínsecas (neurônios sensoriais e eferentes do sistema nervoso autônomo parassimpático e simpático) e intrínsecas (sistema nervoso entérico), mediadores parácrinos, autócrinos e endócrinos (KOEPPEN; STANTON, 2009).

O sistema nervoso autônomo simpático regula as funções gastrintestinais por meio da liberação de noradrenalina, o parassimpático atua liberando acetilcolina e o sistema nervoso entérico libera neuropeptídeos que agem controlando a secreção gastrintestinal e a motilidade. Dentre os hormônios que controlam o funcionamento do trato gastrintestinal, podemos citar a histamina, gastrina, somatostatina, colecistocinina, secretina, peptídeo YY e serotonina (KOEPPEN; STANTON, 2009).

1.1 Mecanismos da secreção ácida gástrica

A secreção ácida é um processo fisiológico importante para a digestão dos alimentos, pois induz a ativação do pepsinogênio na digestão através da secreção de pepsina, além de garantir um ambiente intragástrico estável, eliminando bactérias e outros microrganismos (JAIN *et al.*, 2007).

Os principais agentes que estimulam a secreção ácida incluem a gastrina, a acetilcolina e a histamina. A inibição é feita pela somatostatina, fatores de crescimento epidérmico (EGF) e por prostaglandinas E2 e I2; estas últimas também estimulam as células superficiais a produzir muco e bicarbonato (AIRES, 2008).

A secreção ácida está sob um complexo sistema de controle regulado de maneira hormonal através da secreção de gastrina, neural pela secreção de acetilcolina e parácrina pela secreção de histamina (**Figura 2**).

Estímulos externos (odor e estimulação visual dos alimentos) e internos ativam neurônios do sistema nervoso central (SNC). Os impulsos gerados são transmitidos através do nervo vago, a neurônios intramurais gástricos colinérgicos, com liberação de acetilcolina (ACh) e a neurônios peptidérgicos: Peptídeo Liberador de Gastrina – GRP, Peptídeo Intestinal Vasoativo – VIP e Peptídeo Ativador de

Adenilato Ciclase Pituitária – PACAP e estes estimulam a liberação de gastrina e histamina. A ACh estimula diretamente a secreção ácida ao se ligar receptores muscarínicos (tipo M₃) localizados na membrana basolateral das células parietais e estimula de forma indireta através da inibição da secreção de Somatostatina (SST). Além disso, a estimulação parassimpática resulta na liberação de histamina por células ECL e de gastrina pelas células G, localizadas no fundo gástrico (SCHUBERT; PEURA, 2008).

A histamina estimula diretamente a secreção ácida através da interação com os receptores H₂ presentes na célula parietal e, indiretamente, pela ligação aos receptores H₃, que resultam na inibição da secreção de SST pelas células D (SCHUBERT; PEURA, 2008).

A ACh também estimula a liberação de gastrina por células G localizadas no antro pilórico. Essa substância atinge posteriormente a circulação sanguínea e estimula a secreção ácida ao se ligar a receptores de gastrina localizados na célula parietal. A gastrina também tem ação indireta ao estimular a liberação de histamina partir de células ECL (JAIN *et al.*, 2007; SCHUBERT; PEURA, 2008).

Neurônios PACAP estimulam, de forma indireta, a secreção de SST pelas células D, através da liberação de ANP (Peptídio Natriurético Atrial) e os neurônios VIP ativam, de forma direta, a secreção de SST por essas mesmas células (SCHUBERT; PEURA, 2008).

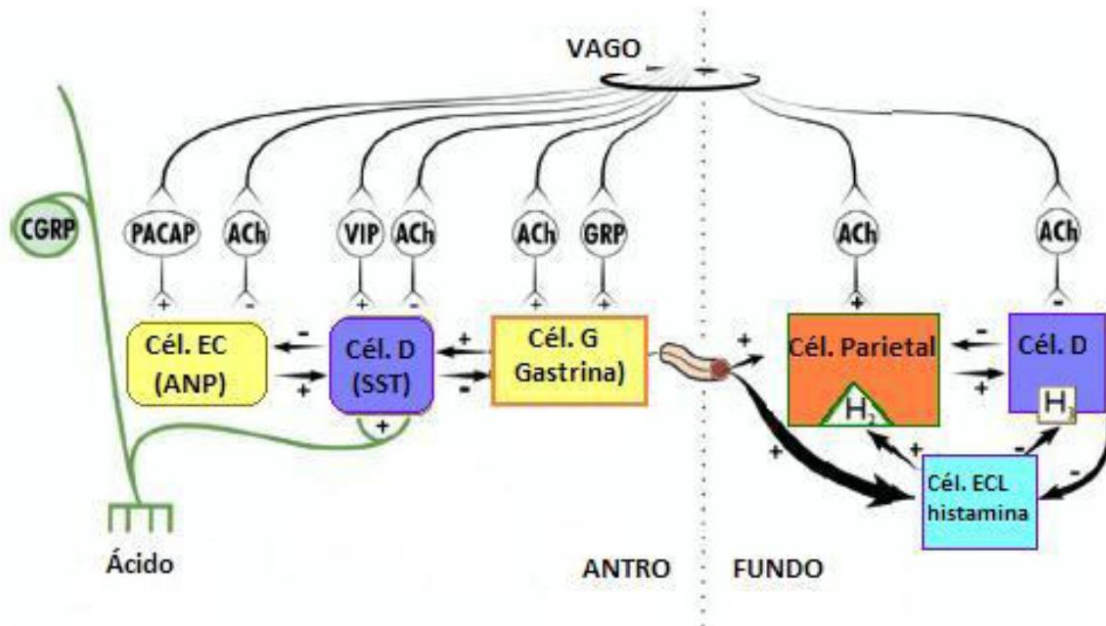
A ingestão dos alimentos (distensão gástrica) ativa reflexos parassimpáticos que têm um efeito estimulatório direto nas glândulas gástricas. Na célula parietal a gastrina e a ACh aumentam as concentrações celulares de Ca²⁺ e a histamina ao se ligar ao seu receptor que é acoplado à proteína G, ativa a adenilil ciclase e aumenta a concentração de AMPc. Esses efeitos, então, resultam na ativação da bomba de prótons H⁺/K⁺-ATPase presente na célula parietal, para que assim, haja a secreção ácida (SCHUBERT; PEURA, 2008).

Com o esvaziamento gástrico, a presença de aminoácidos provenientes da digestão e de íons H⁺ na luz intestinal resulta na inibição da secreção ácida. Inicialmente a estimulação parassimpática nas glândulas gástricas é reduzida através de impulsos nervosos. Em seguida, iniciam-se reflexos locais que, ao serem produzidos por neurônios da mucosa do intestino, diminuem a secreção ácida através da liberação de peptídeo inibidor gástrico, colecistocinina, secretina e GLP-1, que ativam o caminho inibitório mediado pela somatostatina. Por fim, ocorre o

restabelecimento da secreção de SST produzida por células D, localizadas no fundo e antro. A SST é a principal substância inibitória da secreção ácida, que se liga a receptores SSTR-2 e seu efeito é estabelecido por meio de um mecanismo parácrino (SCHUBERT & PEURA, 2008).

Devido a secreção ácida ser um fator potencialmente lesivo para o estômago (presença de ácido e pepsina) é necessário que existam fatores na mucosa gástrica que sejam capazes de proteger esse órgão da ação danosa desses agentes.

FIGURA 2 – Modelo ilustrando a regulação da secreção ácida neural, parácrina e hormonal.



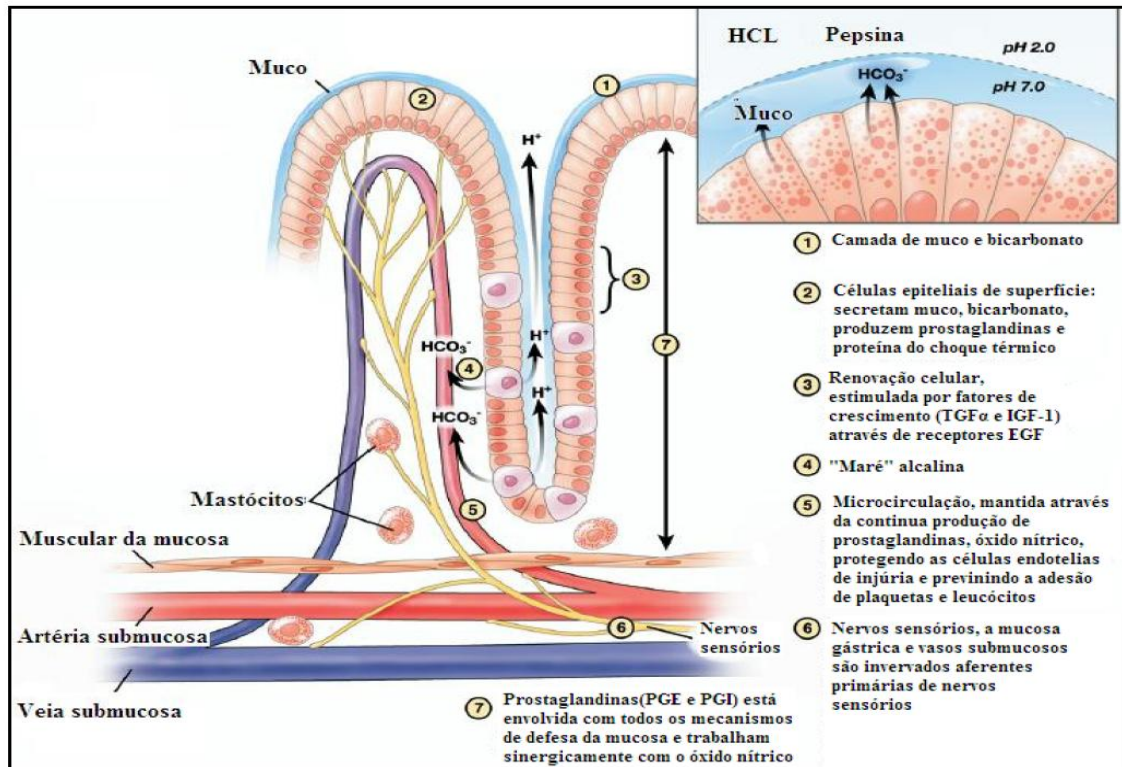
Fonte: SCHUBERT & PEURA, 2008 – Adaptado.

1.2 Mecanismo de Defesa da Mucosa Gástrica

Concentrações extremamente elevadas de H^+ no lúmen gástrico, pepsina, sais biliares, motilidade anormal do trato gastrintestinal e infecções por microorganismos como, por exemplo, *Helicobacter pylori*, são fatores que causam danos à mucosa gástrica, assim são necessários mecanismos eficazes para evitar que esses agentes causem danos. A barreira formada por muco, fosfolipídios e bicarbonato, a contínua geração de prostaglandinas (PGs), inervação neuronal sensorial da mucosa gástrica e a manutenção de uma eficiente microcirculação local constituem os principais fatores protetores da mucosa gástrica (LAINE *et al.*, 2008; MATSUI *et al.*, 2011).

Esses mecanismos de defesa são classificados em: pré-epitelial, epitelial e pós-epitelial ou sub-epitelial. O mecanismo pré-epitelial consiste em evitar o contato direto dos agentes lesivos com a mucosa gástrica, como por exemplo, a barreira formada por muco, bicarbonato e fosfolipídios superficiais. O mecanismo epitelial serve como uma segunda linha de defesa, as propriedades físicas da membrana e os complexos de junções organizados previnem a difusão de H^+ para a mucosa. As células epiteliais superficiais também protegem a mucosa por secretar muco e bicarbonato, participam da renovação celular e iniciam respostas antioxidantes. O mecanismo pós-epitelial envolve a motilidade gastrintestinal, células de defesa e o controle da microcirculação sanguínea (MATSUI *et al.*, 2011) (**Figura 3**).

FIGURA 3 – Mucosa Gástrica e mecanismo de defesa.



Fonte: LAINE *et al.*, 2008 - Adaptado

1.2.1 Barreira muco/bicarbonato/fosfolípido

A barreira muco/bicarbonato/fosfolípido constitui a primeira linha de defesa da mucosa. Essa barreira é formada por um gel de muco, bicarbonato e fosfolípidos surfactantes que recobrem a superfície da mucosa funcionando como uma barreira mecânica aos estímulos lesivos.

O muco gástrico é composto de aproximadamente 95% de água e 5% de glicoproteínas, denominadas mucinas e é revestido por uma película de fosfolípido, agente tensoativo com fortes propriedades hidrofóbicas. As unidades de mucina se polimerizam para formar um gel estável (REPETT; LLESUY, 2002; LAINE *et al.*, 2008). Devido à sua aderência e estabilidade, o muco é capaz de reter o bicarbonato secretado pelas células epiteliais superficiais do estômago e duodeno, mantendo um microambiente neutro (pH~7,0) que previne a penetração de pepsina e a digestão proteolítica. A secreção do muco se dá pelas células superficiais, do colo da glândula gástrica, caliciformes do intestino grosso e glândula de Brenner no intestino

delgado e sua produção é estimulada pelos hormônios gastrina e secretina, a prostaglandina E_2 (PGE_2) e agentes colinérgicos (TANI *et al.*, 2002; LAINE *et al.*, 2008).

Recentemente, Brozowski e colaboradores (2012) demonstraram o papel do sistema renina-angiotensina na proteção contra úlceras gástricas. Com a estimulação da produção de renina, a angiotensina I circulante é convertida em angiotensina II, através da ação da enzima conversora de angiotensina. A angiotensina II se liga a receptores de angiotensina do tipo 1 e 2 (AT1 e AT2) e essa sinalização resulta em gastroproteção.

Os íons bicarbonato têm papel de neutralizar o excesso de íons H^+ que se difundem para o epitélio, são liberados pelas células superficiais e parietais quando estas são estimuladas por estímulos colinérgicos, PGs, NO e pela presença de um baixo pH luminal, enquanto que são inibidas por estímulos adrenérgicos (FLEMSTRÖM; ISENBERG, 2001; KAGAWA *et al.*, 2003).

1.2.2 Microcirculação

A microcirculação é fundamental para a entrega de oxigênio e nutrientes e remoção de substâncias tóxicas da mucosa. Microvasos das células epiteliais geram vasodilatadores potentes, tais como óxido nítrico (NO) e prostaciclina (PGI_2) que protegem a mucosa gástrica e opõem-se à ação prejudicial de agentes vasoconstritores, como, por exemplo, o leucotrieno C_4 e de endotelina.

A PGI_2 e o NO matam a viabilidade das células endoteliais e previnem a aderência de plaquetas e leucócitos às células endoteliais que poderia comprometer a microcirculação gástrica (GUTH, 1992; LAINE *et al.*, 2008). O sulfeto de hidrogênio (H_2S), outro composto endógeno, também exerce efeito protetor da mucosa similar ao NO, o qual reduz a expressão de fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$), diminui a aderência de leucócitos e inibe lesões induzidas por AINEs (LAINE *et al.*, 2008).

1.2.3 Neurônios sensíveis à capsaicina

Os neurônios aferentes funcionam como sensores luminiais, que regulam o fluxo sanguíneo local por liberarem substâncias neuroendócrinas. Fibras do tipo C sensíveis à capsaicina e lidocaína, podem ser ativadas por estímulos mecânicos ou

térmicos, isquemia ou hipóxia. Inervam vasos das camadas mucosa e submucosa do estômago e formam um denso complexo na base da mucosa (LAINE *et al.*, 2008).

A estimulação desses nervos leva à liberação de neurotransmissores como a substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e as neurocininas (taquicininas) (SZALLASI *et al.*, 2007). No estômago, o CGRP está presente nos terminais periféricos dos nervos aferentes sensíveis à capsaicina e exerce ação protetora. Estas terminações nervosas e os mediadores estão envolvidos com a resposta protetora da mucosa ao ácido luminal, incluindo aumento do fluxo sanguíneo da mucosa e da secreção de muco e bicarbonato (DEMBINSKI *et al.*, 2005).

A liberação de CGRP de neurônios sensoriais aferentes resulta na geração de NO, presumivelmente por células endoteliais que revestem as arteríolas submucosas (WALLACE; GRANGER, 1996), com um conseqüente aumento do fluxo sanguíneo, o que torna o estômago menos suscetível a danos (EVANGELISTA, 2006). Além disso, CGRP liberado estimula a liberação de somatostatina pelas células D e, assim, inibe a secreção de histamina e gastrina, resultando em inibição da produção de ácido gástrico (KOMASAKA *et al.*, 2002).

O papel dos neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina no acompanhamento real ou ameaças potenciais para a mucosa gastrointestinal é de relevância fisiológica para a homeostase do corpo. Os neurônios sensoriais aferentes são agora reconhecidos por reforçar a defesa da mucosa gastrointestinal através de vários mecanismos, entre os quais os reflexos autônomos e o início de proteção tecidual local frente a agressões (HOLZER, 2007).

1.2.4 Prostaglandinas

A produção contínua de prostaglandinas (PGE₂ e PGI₂) pela mucosa é muito importante para a sua manutenção e proteção contra ação de agentes lesivos. A enzima ciclooxygenase (COX) converte o ácido araquidônico em prostaglandinas e existe em pelo menos três formas distintas: COX-1 e COX-2 (PERINI, M.A.; WALLACE, 2003) e COX-3 (SIMMONS, 2003). A COX-1 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos e promove a produção de prostaglandinas protetoras da mucosa gástrica que possuem um papel importante na manutenção da

homeostase (RODRÍGUEZ; TÉLLEZ *et al.*, 2001). Ao contrário, a expressão da COX-2 geralmente é baixa sob condições basais. O aumento da expressão da COX-2 ocorre em certas condições patofisiológicas como a inflamação, dano tecidual e transformação maligna (PESKAR, 2001). A COX-3 parece ser expressa no cérebro e está envolvida no mecanismo de ação do paracetamol (KIS *et al.*, 2005).

As prostaglandinas exercem diferentes funções protetoras na mucosa gástrica através da interação à receptores do tipo EP1, EP3 e EP4. O aumento da produção de bicarbonato e do fluxo sanguíneo na mucosa lesionada e diminuição da motilidade gástrica é decorrente da interação de PG's com EP-1. A redução da secreção ácida e o aumento da produção de muco é resultado da ligação de PG's com EP-3 e EP-4, respectivamente. Além disso, as PG's aumentam o fluxo sanguíneo, aceleram o processo de cicatrização e restituição epitelial, inibem a ativação de mastócitos e leucócitos e a adesão de plaquetas (HAM; KAUNITZ, 2007; KOBAYASHI; ARAKAWA, 1995; ATAY *et al.*, 2000; LAINE *et al.*, 2008).

1.2.5 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um gás, de natureza lipofílica que se difunde rapidamente, iniciando vários sinais nas células. O NO é gerado pela reação entre L-arginina e O₂ catalisada pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS) utilizando NADPH e BH₄ como co-fatores (PALMER *et al.*, 1987). Essa enzima possui três isoformas: NOS-endotélial (NOSe), presente normalmente no endotélio vascular e plaquetas, NOS-neuronal (NOSn), presente nos neurônios e a NOS-indutível (NOSi) que não é expressa sob condições normais, é induzida por citocinas e/ou endotoxinas em uma variedade de células (MACMICKING *et al.*, 1997; DUSSE *et al.*, 2003).

Quando gerado, o NO liga-se ao grupo heme da guanilil ciclase solúvel (GCs), que catalisa a conversão de GTP para GMPc, aumentando, por conseguinte, a concentração de GMPc intracelular. Por sua vez, esse segundo mensageiro liga-se aos domínios específicos de moléculas efetoras, incluindo proteínas quinases, canais iônicos e fosfodiesterases, desencadeando respostas celulares, dentre elas a vasodilatação (LANAS, 2008).

NO participa da proteção e manutenção da integridade gástrica, uma vez que essa substância é capaz de facilitar a secreção de muco e de substâncias alcalinas no estômago, inibir a secreção ácida e prevenir a ativação e aderência de neutrófilos

no endotélio vascular (BRZOZOWSKI *et al.*, 2008). Além disso, NO atua como vasodilatador e, portanto, regula o fluxo sanguíneo gástrico (LANAS, 2008).

1.2.6 Canais de Potássio ATP dependentes

Os canais de potássio sensíveis ao ATP (canais de K_{ATP}) representam a maior e mais diversificada família de canais iônicos do corpo. Foi descoberto originalmente no coração (TERZIC *et al.*, 1995) e encontradas mais tarde em muitos outros tecidos.

Esses canais apresentam um importante papel em vários processos fisiológicos, como por exemplo, a liberação de neurotransmissores (LISS *et al.*, 1999), a excitabilidade celular, a secreção de hormônios (DAUT *et al.*, 1994), o controle da secreção de insulina e do glucagon (ASHCROFT *et al.*, 1984). Também estão envolvidos nas respostas celulares a vários tecidos, alterando o estado metabólico, como hiperglicemia, hipoglicemia, isquemia e hipóxia (YOKOSHIKI *et al.*, 1998; SEINO & MIKI, 2003)

Canais de K_{ATP} parecem também estarem envolvidos com o mecanismo de PGs endógenas e exógenas, uma vez que a gastroproteção promovida pelas prostaglandinas é inibida não apenas pela indometacina, mas também pela glibenclamida, uma droga inibidora dos canais de K_{ATP} . (PESKAR *et al.*, 2002).

1.2.7 Sistema Antioxidante

O termo radical livre é definido como qualquer espécie química que contém um ou mais elétrons desemparelhados. Espécies reativas derivadas de oxigênio (EROS) é uma expressão que inclui radicais de oxigênio, como radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxila ($OH\bullet$), peroxila (RO_2) e hidroperoxila (HO_2) e outros agentes oxidantes que não são radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$) e ozônio (O_3), e que podem ser convertidos fácil e rapidamente em radicais (ATAY e GUTRIDGE, 1989).

Estes radicais são produtos de reações catalisadas por metais, reações catabólicas e metabólicas (xantina oxidase, citocromo P450 oxidase, monoamianooxidases, ciclooxigenases, lipooxigenases e NADPH oxidase)

desenvolvidas por organelas citoplasmáticas, bem como produzidos por neutrófilos e macrófagos durante inflamação (CADENAS, 1989).

Em geral, o ambiente redox (oxidação-redução) do interior das células impede os danos causados pelos radicais livres. Este ambiente é mantido pela ação de enzimas antioxidantes, como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e também por substâncias não enzimáticas como a glutathione reduzida (GSH), ubiquinona, melatonina, tioredoxina (TxR) e ácido lipóico (BAYIR *et al.*, 2006).

Alterações no estado redox e depleção de antioxidantes pela exposição a agentes oxidantes levam ao estresse e dano oxidativo (BAYIR, 2005).

A SOD é uma metaloproteína que catalisa a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em espécies menos reativas como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2). No homem, apresentam-se de três formas: citosólica (CuZn-SOD), Mitochondrial (Mn-SOD) e extracelular (EC-SOD) (LANDIS & TOWER, 2005). A isoforma citosólica catalisa a dismutação, enquanto que a mitocondrial é responsável pela segunda fase da dismutação do superóxido alterando o estado redox de Mn^{3+} a Mn^{2+} . A isoforma EC-SOD é uma glicoproteína de Zn/Cu com alta afinidade por glicosaminoglicanos, como a heparina e regula os tecidos por coordenação de citocinas e, basicamente não respondem aos oxidantes (MATES *et al.*, 1999).

O peróxido de hidrogênio não é considerado um radical livre, mas é altamente importante pela sua habilidade de penetrar nas membranas biológicas, e por ser intermediário na formação de moléculas mais reativas, tais como o ácido hipocloroso (HOCl) pela ação da mieloperoxidase (enzima presente nos fagossomas de neutrófilos), e mais importante na formação de $\bullet OH$ via ativação de metais de transição (NORDBERG; ARNER, 2001). O H_2O_2 gerado é degradado por GPx e catalase (VALKO *et al.*, 2006).

As glutathione peroxidases apresentam-se nos tecidos nas isoformas dependentes (GPx) e independente (glutathione-S-transferase, GST) de selênio e tem como função proteger os tecidos contra baixos níveis de estresse oxidativo. GPx decompõe peróxidos inorgânicos (H_2O_2) e orgânicos (ROOH) em água ou álcool e O_2 , enquanto simultaneamente oxida GSH. O processo de decomposição de H_2O_2 ocorre sob competição com CAT, localizada nos peroxissomos (MATES *et al.*, 1999).

Um dos mais importantes antioxidantes celulares é a glutatona, que representa o mais proeminente tiol de baixo peso molecular presente nas células. Os níveis celulares de GSH são controlados por diversos sistemas enzimáticos - glutamyltranspeptidase (-GT), transportador de aminoácidos, glutatona sintase (GS), GPx e glutatona redutase (GR) (ISHIKAWA *et al.*, 1997). Sobre condições de estresse oxidativo, os EROs são reduzidas pela GSH com formação concomitante de GSSG (dissulfido oxidado). A GSH reage rapidamente e não enzimaticamente com o radical hidroxila, com N_2O_3 e peroxinitrito (GRIFFITH, 1999), indicando a sua ação antioxidante química. A glutatona age como um co-fator do GPx mediando a redução de peróxido e resultando na formação de GSSG (CNUBBEN *et al.*, 2001). Em condições normais o GSSG é reduzido para GSH pela glutatona redutase (GR) na presença de NADPH, formando o ciclo redox. (LU, 2000). Em condições de estresse oxidativo, para manter o balanço redox, o GSSG é exportado da célula por proteínas transportadoras dependentes de ATP, assim, em condições severas de estresse oxidativo ocorre a depleção dos níveis de GSH (LEIER, *et al.*, 1996).

1.3 Úlcera Péptica

A úlcera péptica é um termo referido às lesões necrosadas e profundas da mucosa até a camada muscular do esôfago, estômago e duodeno como consequência de processos isquêmicos, baixo suporte local de oxigênio e nutrientes e formação de radicais livres causados por alterações vasculares e microvasculares (TARNAWKI, 2010). É uma doença de origem multifatorial que atinge um considerável número de pessoas em todo o mundo e cujos fatores etiológicos incluem estresse emocional, dieta inadequada, fatores genéticos, uso contínuo ou indiscriminado de AINEs e infecção por *Helicobacter pylori* (JAIN *et al.*, 2007; MUSUMBA *et al.*, 2009).

Segundo Wallace (2001), os antiinflamatórios não-esteroidais estão entre os agentes farmacológicos mais utilizados na clínica e contribuem para a patogênese da úlcera gastrintestinal. Fármacos desta classe terapêutica, como indometacina e piroxicam, inibem as isoformas das enzimas ciclooxigenases (COX) resultando em distúrbios na microcirculação sanguínea, aumentam a migração e adesão de polimorfonucleares, induzem a formação de radicais livres, reduzem a secreção de

muco alcalino e provocam alterações na motilidade gastrintestinal (NYLANDER, 2011).

Outro fator de grande importância no desenvolvimento de úlceras gástricas é o consumo de álcool pela população. O etanol é um agente necrosante para a mucosa gastrintestinal por fragilizar a camada de muco protetor, aumentar a permeabilidade do tecido epitelial à secreção ácida estomacal e provocar a formação de erosões hemorrágicas como conseqüência da constrição de vênulas e dilatação arteriolar (SZABO, 1991; SAEKI *et al.*, 2004).

A ingestão excessiva de álcool pode resultar em gastrite caracterizada por edema, hemorragia sub-epitelial, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias na mucosa gástrica (JAHOVIC *et al.*, 2007; MATSUHASHI, *et al.*, 2007). Além disso, em modelos experimentais, o etanol tem efeito ulcerogênico e necrosante que resulta em dano direto da mucosa. Em cultura de células, o etanol tem sido descrito como capaz de retardar a restauração do epitélio gástrico por provocar danos no citoesqueleto celular (MATSUHASHI *et al.*, 2007). O etanol também induz liberação de endotelinas, degranulação de mastócitos, inibição da síntese de PGs e conseqüente redução da produção de muco, além de provocar dano no endotélio vascular da mucosa gástrica, desordem da microcirculação e isquemia, resultando na produção de EROs (PAN *et al.*, 2008).

De fato, a mucosa gástrica é continuamente exposta a vários fatores e agentes nocivos, sejam eles endógenos (ácido clorídrico e pepsina) ou exógenos (*Helicobacter pylori*, fumo, ingestão de álcool, uso de AINEs, estresse). Em contra partida, o organismo possui potentes mecanismos de defesa (barreira muco-bicarbonato, fosfolipídios da superfície epitelial de revestimento, camada lipoproteica da membrana, fluxo sanguíneo, síntese de PGs, NO e sistema antioxidante) que protegem a mucosa de possíveis lesões.

Portanto, a integridade da mucosa gastrointestinal depende de um equilíbrio entre os fatores agressivos e os fatores protetores, sendo que a úlcera é o resultado final de uma série de alterações fisiológicas.

1.4 Farmacoterapêutica da úlcera péptica

O tratamento da úlcera péptica é feito com a utilização de medicamentos que reduzem a acidez gástrica e com citoprotetores, além disso, pode-se utilizar de

processos cirúrgicos quando a ulceração é considerada do tipo hemorrágica, obstrutiva ou perfurativa (LIPOF *et al.*, 2006).

Atualmente, os medicamentos utilizados na clínica para reduzir a secreção ácida são representados por antagonistas dos receptores H₂ e inibidores da bomba de prótons (H⁺/K⁺ ATPase) (WALLACE; FERRAZ, 2010).

Os antiácidos compreendem carbonatos, hidróxidos de alumínio e magnésio ou associações. São substâncias amplamente utilizadas cujo mecanismo de ação consiste na neutralização ácida. Apesar de serem efetivos e de baixo custo (DRUGDEX, 2012), podem reduzir a biodisponibilidade oral de fármacos e de minerais presentes em suplementos alimentares (SRINIVAS, 2009; TAYLOR *et al.*, 2010). Os efeitos adversos comuns incluem náusea, distensão abdominal, flatulência, diarreia e constipação (JAIN *et al.*, 2007).

Em meados da década de 70, a supressão farmacológica da secreção ácida gástrica foi efetivada com a introdução dos antagonistas de receptores H₂ histaminérgicos (cimetidina e ranitidina) e, até 1990, foram os fármacos mais prescritos no mundo inteiro. Atualmente, existem quatro antagonistas H₂ utilizados clinicamente: cimetidina, ranitidina, famotidina e nizatidina, os quais promovem a redução da secreção ácida ao competir reversivelmente com a histamina pela sua ligação aos receptores H₂ nas células parietais, diminuindo os níveis de AMPc. Porém essa ação só reduz aproximadamente 50% das lesões gastrintestinais e não impede a recorrência da úlcera (KOROLKOVAS *et al.*, 2004).

Os inibidores irreversíveis da bomba de prótons (IBPs) são considerados os mais eficazes no controle da secreção ácida por inibir o final da cascata de formação do ácido gástrico, resultando em melhoras significativas nas taxas de cicatrização de úlceras gástricas e duodenais. São representados pelos fármacos omeprazol, esomeprazol, lansoprazol, pantoprazol e rabeprazol (PALENCIA-HERREJÓN *et al.*, 2011). Além disso, atualmente são os medicamentos mais utilizados no tratamento e prevenção dos distúrbios ácido-pépticos. Porém, tanto os antagonistas de receptores H₂ quanto os inibidores da bomba de H⁺/K⁺ ATPase, podem apresentar alguns efeitos adversos quando utilizados cronicamente devido à supressão do ácido gástrico. Dentre esses efeitos, destacam-se o desenvolvimento da hipergastrinemia (resultante da menor liberação de somatostatina a partir das células D, que ocorre subsequentemente à supressão da secreção ácida) e o aumento do risco de infecção bacteriana (como pela *Helicobacter pylori* e *Clotridium*

difficile), adicionalmente esses dois problemas podem levar à formação de câncer gástrico (PALENCIA-HERREJÓN *et al.*, 2011; VAKIL, 2012;).

Nos casos em que a úlcera péptica está relacionada à infecção provocada pela bactéria *H. pylori*, os antagonistas H₂ ou IBPs são associadas à antibióticos. As combinações aplicadas na clínica são de inibidores de bomba/claritromicina/amoxicilina, inibidores de bomba/claritromicina/metronidazol, ranitidina/metronidazol/tetraciclina ou tetraciclina/metronidazol/compostos de bismuto (MÖSSNER & CACA, 2005).

Em busca de fármacos que aumentem fatores protetores da mucosa gastrintestinal ou proporcionem proteção mecânica na superfície da úlcera, os citoprotetores foram introduzidos na terapêutica antiulcerogênica. Entre os mais utilizados, podem ser citados os compostos de bismuto, sucralfato e análogos de prostaglandinas (BRUTON *et al.*, 2006). Os compostos de bismuto são um complexo coloidal do sal amônio potássico de oxidrocitratobismutato III que se deposita sobre as lesões gastrintestinais facilitando a cicatrização por estimular secreção de muco e a síntese de PGs.

De forma semelhante, o sucralfato é constituído de sacarose sulfatada e hidróxido de alumínio formando um gel viscoso sobre a mucosa gástrica que evita a ação de agentes lesivos, além de estimular a secreção de muco e síntese de PGs. Como representante dos análogos de prostaglandina, pode ser citado o misoprostol que age na mucosa gastrintestinal aumentando a secreção de muco e bicarbonato, mantendo o fluxo sanguíneo e inibindo a secreção ácida via receptores EP3 na célula parietal (BRUTON *et al.*, 2006). Contudo, no Brasil, o misoprostol é exclusivamente utilizado em ambientes hospitalares, uma vez que o uso inadequado por gestantes poderá causar aborto (KOROLKOVAS *et al.*, 2004).

No entanto, os fármacos protetores da mucosa apresentam efeitos colaterais, a exemplo da diarreia, constipação, náuseas, vômitos, hipergastrinemia e tumores gástricos, perda da libido, impotência, confusão mental e sonolência. Além disso, não impedem a recorrência das lesões (BRUTON *et al.*, 2006).

Diante dos efeitos colaterais provocados pela utilização desses fármacos, se faz necessário investigar alternativas que agreguem efeitos farmacológicos capazes de promover a prevenção e a cicatrização de úlceras, com ausência ou redução de efeitos colaterais.

1.5 Indução de lesão gástrica por etanol

Devido ao caráter multifatorial da úlcera gástrica, existem diversos modelos experimentais para indução de lesões na mucosa gástrica, a partir de diferentes agentes, como etanol absoluto, antiinflamatórios não esteroidais, ácido acético, entre outros.

O etanol é uma substância de efeitos complexos, sendo a causa mais comum de ulceração gástrica em homens. É conhecido como uma substância necrosante que causa injúria na mucosa gástrica, e a ingestão excessiva de etanol pode resultar em gastrite, caracterizada por edema na mucosa, hemorragias subepiteliais, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias (GUSLANDI, 1987).

O uso de etanol na indução de úlceras é um processo simples e facilmente reprodutível, na qual se administra etanol concentrado. Dependendo da quantidade de etanol a ser administrada, uma porcentagem de 10-40% da porção glandular do estômago fica coberta por lesões hemorrágicas e úlceras, que são observadas após 1-2 horas da administração (SZABO, 1987).

No estômago o etanol interfere na secreção do ácido gástrico, efeito provavelmente mediado pela gastrina e histamina. O etanol em altas concentrações aumenta a permeabilidade epitelial causando redifusão de íons H^+ (DAVENPORT, 1967; DAVENPORT, 1969). Essa substância também reduz o fluxo sanguíneo no estômago causando estase gástrica, aumenta a permeabilidade vascular, resultando em maior probabilidade de desenvolvimento de úlceras e hemorragias, associadas a injúrias histológicas e macroscópicas na mucosa (BODE, 1997; SANTOS; RAO, 2001).

Além disso, o etanol também causa depleção de muco, possivelmente por mobilizar os mucopolissacarídeos da mucosa para o lúmen, reduzindo a capacidade secretória de muco do estômago, contribuindo assim, para a formação de úlceras (CHO *et al.*, 1983; ISHIHARA *et al.*, 1988). A liberação de muco em resposta a aplicação de agentes irritantes possui um papel importante no reparo do epitélio e no processo de restituição. Alguns autores demonstraram que o óxido nítrico e as prostaglandinas são capazes de aumentar a secreção de muco no estômago (ROWN *et al.*, 1992).

Um dos fatores que desempenham um papel primordial nas muitas vias de danos induzidos por etanol é o estresse oxidativo, que resulta na geração espécies

reativas de oxigênio. Ele aumenta a produção de ânions superóxido e radicais hidroxila e a peroxidação lipídica na mucosa gástrica.

O tratamento agudo com etanol causa depleção dos níveis de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona reduzida (GSH), que são enzimas antioxidantes importantes para a redução de radicais livres. Assim, a redução desses compostos vai levar ao acúmulo desses radicais altamente reativos (CHO *et al*, 2001; SARAVANAN *et al*, 2003) que levam, portanto, ao estresse oxidativo (REPETTO *et al.*, 2003).

1.6 Látex e Plantas laticíferas

O látex é um fluido presente em muitas plantas e em algumas espécies de fungos dos gêneros *Lactarium* e *Peziza* (KONNO., 2011). Na maioria das vezes tem aspecto leitoso, no entanto pode apresentar coloração amarelada ou alaranjada como em plantas pertencentes à família Papaveraceae, marrom-amarelado em plantas do gênero *Cannabis*, ou pode ser límpido como em *Nerium oleander* (KEKWICK, 2001). É armazenado dentro de células ou fileiras de células especializadas denominadas laticíferos, e é exsudado quando a planta sofre algum tipo de injúria, seja por dano mecânico ou por ataque de predadores (MOURSY, 1997).

Considerando o aspecto anatômico dos laticíferos, existem dois tipos distintos que podem ser observados: os laticíferos articulados os quais são formados por células seqüenciais interconectadas por perfurações em suas paredes celulares e os laticíferos não articulados, formados por uma única célula alongada que se desenvolve nos espaços intercelulares e, eventualmente, se ramifica nos tecidos das plantas de um modo similar às hifas de fungos (AGRAWAL; KONNO, 2009).

O látex contém uma grande variedade de substâncias tais como carboidratos, lipídeos e proteínas (MORCELLE *et al.*, 2004). Neste fluido também já foram encontrados metabólitos secundários tais como alcalóides, cardenolídeos, compostos fenólicos, terpenos, taninos e flavonóides (KONNO, 2011).

Dentre a grande variedade de proteínas já identificadas no látex de plantas temos beta-1,3-glucanases (CHEYE; CHEUNG, 1995), lisozimas, proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) (GIORDANI & LAFON, 1993), lectinas, quitinases (JEKEL *et al.*, 1991), amilases (LYNN; CLEVETTE-RADFORD, 1987), inibidores de proteinases (ARCHER, 1983; SRITANYARAT *et al.*, 2006), oxidases (AGRAWAL; KONNO, 2009) dentre outros. Mais de 110 plantas produtoras de látex distribuídas em diferentes famílias são conhecidas por apresentar atividade proteolítica. Estas são pertencentes à classe das proteinases cisteínicas, serínicas e aspárticas (DOMSALLA; MELZIG, 2008).

Existem várias hipóteses sobre a real função do látex para a planta, e entre estas podemos citar: excreção de resíduos do metabolismo, cobertura de tecido danificado e defesa da planta contra o ataque de predadores (KONNO, 2011). Entre

estas hipóteses, a mais aceita é a de que o látex serve prioritariamente para a defesa da planta contra herbívoros e patógenos, que é evidenciado, principalmente, pela presença de proteínas relacionadas à defesa contra esses organismos, como as glucanases e quitinases (VAN LOON; VAN STTRIEN, 1999) e inibidores de proteinases (SRITANYARAT *et al.*, 2006).

Os canais laticíferos podem estar presentes em todas as partes da planta ou, apenas, em tecidos ou órgãos restritos. O látex poder ser extraído a partir do caule (*Hevea brasiliensis*), tubérculos (*Manihot glaziovii*), folhas (*Calotropis procera*), galhos (*Plumeria rubra*) ou do fruto (*Achras sapota*, *Carica papaya*).

O processo de coleta do látex não é igual para todas as plantas, por exemplo a extração de látex de *Hevea brasiliensis* ocorre através de incisões realizadas em seu tronco, o látex de *Calotropis procera* é coletado a partir de extremidades foliares, enquanto que na *Plumeria rubra* este fluido é abundante apenas nas extremidades dos seus galhos, não sendo possível coletar látex a partir de sua porção lenhosa.

Dentre a grande variedade de plantas que compõem o Reino Vegetal, mais de 35.000 espécies de plantas exsudam látex, resinas e exsudatos, e mais de 20.000 espécies de plantas com flores em mais de 40 famílias são consideradas plantas laticíferas (KONNO, 2011).

Em geral, as plantas laticíferas são mais freqüentemente encontradas em clima tropical, representando 12,2% das famílias e 14,0% das espécies deste clima. Enquanto no clima temperado elas representam apenas 4,9% das famílias e 5,9% das espécies (KONNO, 2011).

Plantas comuns do nosso cotidiano são laticíferas, tais como o jasmim (*Plumeria rubra* L.), hortências (*Calotropis procera*) e o sapoti (*Achras sapota*). Entre as famílias produtoras de látex destacam-se Euphorbiaceae e Apocynaceae, embora existam outras famílias que produzem tais como: Papaveraceae, Moraceae, Convolvulaceae, Asteraceae, Araceae, Alliaceae e Musaceae. (KONNO, 2011).

Dentre a diversidade de plantas laticíferas, a mais conhecida é a seringueira (*Hevea brasiliensis*), uma árvore nativa da Amazônia. A borracha produzida por esta planta é amplamente utilizada pela indústria (SUSSMAN *et al.*, 2002) e como esse látex é intensamente explorado, a maior parte dos estudos bioquímicos já desenvolvidos com fluidos laticíferos se refere ao látex desta planta. Atualmente, têm crescido o interesse de se estudar os fluidos laticíferos de espécies vegetais, por estas apresentarem propriedades bioquímicas consideravelmente interessantes,

como por exemplo: *Papaver somniferum*, *Cannabis sativa* e *Calotropis procera* (HAGEL *et al.*, 2008).

1.7 Látex na Proteção Gástrica

Ao longo do tempo, vários trabalhos têm sido publicados descrevendo atividade antiulcerogênica de substâncias ou extratos obtidos de plantas das mais variadas espécies, em modelos animais de lesões gástricas agudas e crônicas (WANG *et al.*, 1997; RAJI *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2004; CARVALHO *et al.*, 2007; MONTEIRO *et al.*, 2007; OLINDA *et al.*, 2008; MORAIS *et al.*, 2010; CALDAS *et al.*, 2011; TAHA *et al.*, 2012; COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 2012), nesse sentido moléculas de estruturas de classes químicas marcadamente diferentes têm se demonstrado serem promissoras alternativas terapêuticas.

Pesquisas com o látex de plantas vêm sendo desenvolvidas a fim de investigar seu efeito na úlcera gástrica. TOMA e colaboradores (2005) demonstraram o efeito antissecretório e gastroprotetor de extratos obtidos do látex de *Mammea americana* em modelos de lesão gástrica induzida por etanol acidificado, estresse, indometacina e ligadura do piloro. Em outro estudo, o látex do mamão verde reduziu a secreção gástrica induzida por metacolina em ratos, o que aconteceu somente por via oral, mas não por via intraperitoneal, sugerindo que o efeito desse látex ocorre por ação local e direta sobre a mucosa gástrica (CHO e HAN, 1984). Estudo realizado com uma fração proteolítica do látex de *Carica candamarcensis* mostrou que essa substância foi capaz de reduzir a lesão gástrica no modelo de úlcera induzida por indometacina. Essa fração também teve ação cicatrizante em úlcera gástrica induzida por ácido acético e esse efeito parece estar envolvido com o aumento de muco no conteúdo estomacal e estimulação da angiogênese (MELLO *et al.*, 2007). Estudo desenvolvido com o látex de *Himatanthus drasticus* mostrou que este possui efeito gastroprotetor no modelo de lesão gástrica induzida por etanol (LEITE *et al.*, 2009). Um trabalho publicado por BHARTI *et al.* (2010), mostrou que a suspensão e o extrato metanólico do látex de *Calotropis procera* reduz o dano na mucosa gástrica induzido por álcool e aspirina. Esse efeito protetor parece estar envolvido com a redução da hemorragia gástrica, manutenção da integridade do tecido, ação antioxidante e aumento do pH no estômago.

Estudo recente desenvolvido por nosso grupo de pesquisa mostrou que as proteínas do látex de *Himatanthus drasticus* apresentam atividade protetora em úlcera gástrica induzida por álcool, e esse efeito provavelmente está envolvido com uma ação antioxidante e com via NO/GMPc/Canais de K⁺ (MARQUES, 2012).

1.8 Látex de *Plumeria rubra* L.

Plumeria rubra L. é uma planta laticífera que pertence à família *Apocynaceae*. Conhecida popularmente como jasmim, jasmim-manga, *frangipani* ou árvore-pagode, é originária da América Central e encontra-se amplamente distribuída pelas regiões de clima tropical do mundo, inclusive no Brasil (BROWN, 2008). Tem sido amplamente utilizada na medicina popular para tratamento de sífilis, como purgativo e no combate da febre (KARNODO *et al.*, 1990). Devido à beleza e perfume de suas flores, o Jasmim é facilmente encontrado como planta ornamental em praças e jardins de muitas regiões metropolitanas (**Figura 4**).

O nome do gênero, *Plumeria*, é uma homenagem ao botânico que a descreveu, Charles Plumier. Trata-se de uma árvore, com ramificações bifurcadas, espessas de aspecto suculento, de 6-8 metros de altura. Com folhas decíduas, aglomeradas no ápice dos ramos. Possui inflorescência terminal, com numerosas flores sucessivas, perfumadas na espécie típica, vermelhas ou róseas com o centro amarelo (BROWN, 2008). Quanto ao seu cultivo, apresenta fácil multiplicação por estacas (LORENZI; SOUZA, 1999).

Estudos com *P. rubra* têm sido feitos no sentido de investigar as propriedades farmacológicas dessa planta. Um estudo publicado por Hamburguer e colaboradores (1991) mostrou que compostos isolados do cerne de *P. rubra* apresentaram efeitos muluscicida, citotóxico e antibacteriano. Outro estudo feito com a casca de *P. rubra* mostrou que as substâncias isoladas dessa parte da planta apresentam atividade antifúngica, antálgica, antibacteriana (KUIGOUA *et al.*, 2010). PETIL e colaboradores (2012) demonstraram que essa planta apresenta atividade larvicida contra *Aedes aegypti* e *Anopheles stephensi*.

FIGURA 4 - Aspecto geral da planta *Plumeria rubra*



A: Árvore; B: Inflorescência; C: Flor; D: Ápice Caulinar.

Fonte: BROWN, 2008.

Estudos fitoquímicos com o látex de *P. rubra* demonstraram que ela possui muitos iridóides, um metabólito secundário monoterpênico. Estes iridóides demonstraram possuir atividade algicida, antibacteriana e citotóxica contra linhagens de células de leucemia linfocítica (P-388) e contra células de vários tipos de câncer humano (mama, cólon, fibrossarcoma, pulmão e melanoma) (KARNODO *et al.*, 1990; KUIOGA *et al.*, 2010). O extrato metanólico das folhas dessa planta apresentou atividade antimicrobiana e antifúngica (EGWAIKHIDE, 2009; GAITÁN *et al.*, 2011) e anti-câncer (BANU *et al.*, 2011) e o essa mesma preparação, sendo das flores, também apresentou atividade antimicrobiana (EGWAIKHIDE, 2009). Um

glicosídeo flavônico isolado de *P. rubra* mostrou ter atividade antioxidante e hipolipidêmica (BEGUM *et al.*, 2010).

Quanto ao látex de *P. rubra*, no que se refere à atividade enzimática, é uma fonte de atividade lipolítica (CAMBON *et al.*, 2006) e proteolítica (CHANDA *et al.*, 2011). Um trabalho desenvolvido por FREITAS e colaboradores (2010) mostrou que proteínas isoladas do látex de *P. rubra* apresentam atividade antioxidante e proteolítica *in vitro* e outro estudo mostrou que proteases isoladas do látex dessa planta apresentam atividade antiinflamatória e cicatrizante (CHANDA *et al.*, 2011). Um estudo desenvolvido pelo laboratório do Prof. Marcio Viana Ramos (UFC) demonstrou que uma fração proteica dializável (PrDF) e uma não dializável (PrLP) isoladas do látex de *P. rubra* resultam em relaxamento, de forma dose-dependente, do endotélio da aorta de ratos que foram contraídos com a administração de fenilefrina. A melhor resposta relaxante se deu pela fração PrDF, que parece ter seu efeito mediado por Src-quinase e por NO via GMPc. Essa fração do látex também apresentou efeito antihipertensivo, uma vez que PrDF foi capaz de reduzir a pressão arterial de ratos alterada pelo tratamento dos animais com L-NAME (Dados não publicados) e outro estudo desenvolvido por esse mesmo grupo de pesquisa demonstrou que essa proteínas apresentam ação sobre fitopatógenos (SOUZA *et al.*, 2011).

Apesar desses relatos, essa planta, bem como o seu látex, são poucos estudados quando considerado seus aspectos bioquímicos e farmacológicos, e não existem, de acordo com pesquisa bibliográfica realizada, estudos relacionados ao uso desse látex com propósitos aplicados.

2 JUSTIFICATIVA

De acordo com Sung e colaboradores (2009), a incidência anual de úlcera péptica no mundo varia de 0,10 a 0,19%, e a prevalência, de 0,12 a 1,5%. Em Setembro de 2009, segundo o *United States Census Bureau*, a população mundial era de aproximadamente 6,784 bilhões de pessoas. Isso significa que anualmente são diagnosticados entre 7 a 13 milhões novos casos de úlcera péptica, e que podem existir mais de 100 milhões de pessoas no mundo com essa enfermidade.

Barkun e Leontiadis (2010) realizaram um estudo e verificaram que os custos diretos do tratamento da úlcera foram de 163 a 866 dólares por paciente, por ano. Já os custos anuais do tratamento da úlcera hemorrágica, que envolvem internação e medicação, foram bem mais altos, 1883 a 25.444 dólares por paciente. Assim, as úlceras pépticas configuram como um problema social e clínico de importância econômica global (SÁNCHEZ-MENDOZA *et al.*, 2011).

A terapia usada para o tratamento de úlceras gástricas inclui a inibição da bomba H⁺/K⁺ ATPase e da secreção ácida, além do controle da bactéria *H. pylori*, no entanto estas estratégias além de não serem completamente efetivas, produzem muitas reações adversas e representam altos custos para os pacientes (TOMA *et al.*, 2002).

Diversos compostos de origem vegetal como monoterpenos, lipídeos fenólicos, óleos essenciais, lectinas entre outros, têm demonstrado atividade antiúlcero-gênica em modelos experimentais (SILVA *et al.*, 2009; MORAIS *et al.*, 2010; CALDAS *et al.*, 2011; ABDON *et al.*, 2012; TAHA *et al.*, 2012), porém poucos estudos clínicos foram realizados. Nessas classes de compostos, observam-se substâncias de importância terapêutica particular que podem apresentar tanto atividade antiúlcera quanto anti-inflamatória, uma vantagem em relação aos anti-inflamatórios tradicionais que, em sua maioria, são ulcerogênicos (BORRELLI & IZZO, 2000).

Estudos com o látex de plantas têm sido desenvolvidos a fim de se verificar o potencial farmacológico desses compostos (ALENCAR *et al.*, 2004; ALENCAR *et al.*, 2006; ALBUQUERQUE *et al.*, 2009; RAMOS *et al.*, 2009; LIMA-FILHO *et al.*, 2010; RAMOS *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Adicionalmente, vêm crescendo o interesse de se investigar o efeito de fluidos laticíferos em modelos de úlcera gástrica (TOMA *et al.*, 2005; MELLO *et al.*, 2007; LEITE *et al.*, 2009; BHARTI *et*

al.,2010). Nesse contexto acreditamos que o látex de *Plumeria rubra* possa ser uma ferramenta farmacológica importante e útil no tratamento de úlcera gástrica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade gastroprotetora da fração proteica do látex de *Plumeria rubra* (PrLP) e seus possíveis mecanismos de ação farmacológicos em modelo experimental de úlcera gástrica, além de analisar a segurança terapêutica destas proteínas.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Investigar o efeito gastroprotetor de PrLP no modelo experimental de úlcera gástrica induzida por etanol.
- ✓ Avaliar a participação das prostaglandinas, do óxido Nítrico, dos canais de Potássio ATP dependentes e do GMPc no efeito gastroprotetor de PrLP.
- ✓ Estudar a participação dos receptores TRPV1 no efeito gastroprotetor de PrLP.
- ✓ Investigar o efeito de PrLP sob o consumo de glutathione na mucosa gástrica induzida por etanol.
- ✓ Verificar a segurança terapêutica do uso de PrLP através da avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos.

4 MATERIAS

4.1 Material vegetal

O látex utilizado neste estudo foi coletado de espécimes de *Plumeria rubra* L. (Jasmim) cultivados no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Ceará ou de exemplares existentes em praças ou jardins residenciais na cidade de Fortaleza.

P. rubra L. foi identificada pelo Professor Edson de Paula Nunes, taxonomista do Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, onde uma exsicata (N. 15018) desse material encontra-se depositada.

4.2 Coleta do látex e isolamento da fração proteica

Coletas em campo foram realizadas semanalmente, durante todo o ano e sempre no período da manhã, e preferencialmente antes das nove horas, pois foi observado que, à medida que se aproxima do pico solar, a liberação de látex pela planta é diminuída.

O látex foi extraído da planta através da quebra do ápice caulinar. O fluido exsudado foi coletado em tubos do tipo Falcon contendo água destilada, na proporção de 1:2 (v/v). Este procedimento foi normalmente adotado porque o látex sofre um processo natural de coagulação, adquirindo uma característica colante. A coleta do látex em água tem a finalidade de diminuir este efeito e evitar a formação de flocos de borracha, os quais podem aprisionar substâncias solúveis.

O processamento do látex foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Biologia de Proteínas Vegetais da Universidade Federal do Ceará, coordenado pelo Prof. Dr. Márcio Viana Ramos de acordo com metodologia descrita por RAMOS e colaboradores (2009).

No laboratório, a amostra foi submetida à centrifugação a 5000 x g por 10 min, a 4°C. Este procedimento inicial propiciou a precipitação parcial da parte insolúvel do látex, borracha. Essa fração foi denominada de BL (Borracha do Látex), a qual foi separada. O sobrenadante foi dialisado por 1 hora contra o mesmo volume de água destilada, ou seja, respeitando a relação de 1:1 (v/v). Ao término desse período a fração dialisável (dialisato) foi coletada e o saco de diálise com o

sobrenadante foi transferido para outro recipiente, onde foi dialisado exaustivamente contra água destilada por 72 horas, a 4°C. O material resultante foi novamente centrifugado e o sobrenadante obtido, contendo a fração proteica do látex, foi liofilizado.

Nas diálises foram utilizadas membranas com capacidade para retenção de moléculas com massa molecular superior a 8 kDa. Dessa maneira, o dialisato era então, constituído de moléculas menores que 8 kDa, provavelmente íons, metabólitos secundários e/ou peptídeos. Esta fração foi denominada de DL (Dialisato do Látex). O sobrenadante final liofilizado resultou em uma fração livre de borracha e rica em proteínas solúveis, e foi por isso denominada de Proteínas do Látex de *Plumeria rubra* – PrLP.

4.3 Equipamentos e instrumentos laboratoriais

Os equipamentos e instrumentos laboratoriais utilizados nos procedimentos experimentais estão listados a seguir:

Aparelho ou instrumento	Procedência
Balança para animais (mod. MF-6)	Filizola, Brasil
Balança analítica (mod. AX-200)	Shimadzu, Japão
Câmera fotográfica	Sony, China
Centrífuga refrigerada (modelo Marathon 26KMR)	Fisher Scientific, EUA
Eppendorfs	Global Trade Technology
Homogeneizador de tecidos	Ultra Stirrer
Leitora de microplacas	ASYS, Áustria
Ponteiras para pipetas automáticas	Global Trade Technology
Pipetas automáticas monocanal	Digipet
Pipetas automáticas multicanal	Digipet
Seringas plásticas	B-D Plastipak
Banho-maria	Fanen, Brasil
Microscópio	Quimis, EUA

4.4 Drogas e reagentes

As drogas e reagentes utilizados nos procedimentos experimentais estão listados abaixo:

Droga ou reagente	Procedência
Ácido tricloroacético	Sigma, EUA
Capsaicina	Sigma, EUA
Capsazepina	Sigma, EUA
Diazóxido	Sigma, EUA
DTNB	Sigma, EUA
EDTA	VETEC, Brasil
Etanol absoluto	Merck, Alemanha
Formol	VETEC, Brasil
Glibenclamida	Sigma, EUA
Glutaciona reduzida	Sigma, EUA
Indometacina	Sigma, EUA
Kits de análise bioquímica	Labtest, Brasil
L-Arginina	Sigma, EUA
L- NAME	Sigma, EUA
Metanol	Dinâmica Química Contemporânea, Brasil
Misoprostol	Biolab Searle, Brasil
N-acetilcisteína	EMS, Brasil
NADPH	Sigma, EUA
Nitrato redutase	Sigma, EUA
ODQ	Sigma, EUA
Solução salina 0,9%	Química Farmacêutica Gaspar Viana, Brasil
Tris-HCl	Merck, Alemanha

4.5 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*) machos e fêmeas, pesando entre 20 a 25 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus do Pici – UFC e mantidos no Biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Todos foram acondicionados em gaiolas apropriadas (6 – 10), sob condições adequadas de luz e temperatura, permanecendo nas mesmas condições ambientais durante os experimentos.

Foram utilizados no mínimo oito animais por grupo experimental. Os protocolos experimentais foram aprovados na Comissão de Ética Institucional (CEPA) sob o número (57/2010).

5. MÉTODOS

5.1 Avaliação toxicológica aguda da PrLP

Antes de iniciar as abordagens experimentais para avaliar efeitos farmacológicos da PrLP, avaliamos o efeito da administração de PrLP aos animais, através de estudo toxicológico agudo, descrito anteriormente (BEZERRA *et al.*, 2008). Para tanto, foram utilizados dois grupos experimentais os quais foram tratados diariamente por um período de sete dias com veículo (solução salina 0,9%, i.v.) ou PrLP (50 mg/kg, i.v.), uma vez ao dia.

Durante o período de tratamento foram observados e registrados diariamente, parâmetros fisiológicos (consumo de água e ração, produção de fezes e urina) e alterações comportamentais (consciência e disposição geral, coordenação motora, tônus muscular e reflexos) e condição da pelagem dos animais.

Após o período de tratamento, os animais foram pesados e a massa corporal comparada com o a massa anterior (antes do tratamento) e o resultado expresso como variação de massa corpórea antes e após os tratamentos. Em seguida, o sangue foi coletado dos camundongos pelo plexo orbital, sob leve anestesia, para avaliação do leucograma, quantitativo de plaquetas e dosagens bioquímicas. Os animais foram, então, eutanasiados por deslocamento cervical, e seus órgãos (fígado, coração, rim e baço) removidos ainda úmidos, pesados e avaliados macroscopicamente.

Na avaliação do leucograma, esfregaços de sangue foram confeccionados, corados pelo método de hematoxilina-eosina e destinados à contagem diferencial das células em microscópio óptico, utilizando a objetiva de imersão. A contagem total foi feita de acordo com o método de SOUZA; FERREIRA (1985). Após este procedimento, obteve-se então o número de células x 10^6 / mL de sangue.

Para a contagem de plaquetas, diluições de 1:200 foram preparadas, adicionando 2 mL de oxalato de amônio 1% e 10 μ L do concentrado de plaquetas em tubos plásticos. A diluição foi homogeneizada e mantida sobre a bancada por 10 a 15 minutos. Posteriormente, a câmara de Neubauer foi preenchida com esta diluição utilizando um capilar ou micropipeta elevada a uma câmara úmida (placa de Petri com gaze ou algodão embebido em água), onde permaneceu por, no mínimo,

20 minutos. Finalmente, a câmara de Neubauer foi analisada em microscópio óptico, na objetiva de 40x. Para minimizar os erros e assegurar a sua reprodutibilidade, as amostras foram analisadas em duplicada (LEWIS *et al.*, 2006).

Para as dosagens bioquímicas alíquotas do sangue coletado foram submetidos à centrifugação por 15 minutos, numa rotação de 3.500 rpm, obtendo-se, assim, o plasma, que foi mantido sob refrigeração a -20 °C até o momento da realização das análises. A atividade sérica de transaminases (aspartato aminotransferase – AST e alanina aminotransferase - ALT) foi utilizada como marcador da função hepática e a dosagem da uréia como marcador de função renal. Os ensaios bioquímicos foram realizados conforme orientação do laboratório fabricante “kit” utilizando (Labtest®), por método cinético de tempo fixo e medição de ponto final. Os resultados foram expressos em UI/mL (transaminases) e mg/dL (uréia).

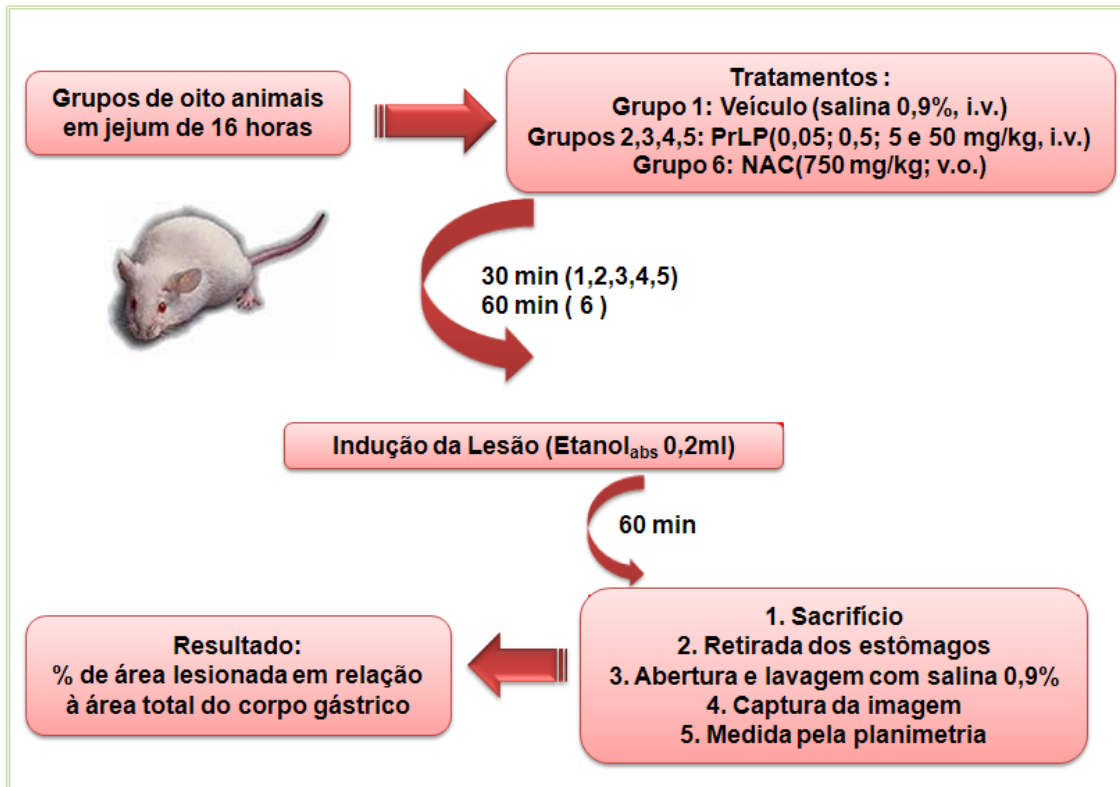
5.2 Efeito da fração proteica do látex de *Plumeria rubra* (PrLP) na Lesão Gástrica Induzida por Etanol: Curva Dose-Resposta

Para a avaliação da possível atividade antiulcerogênica de PrLP foi utilizado o modelo de lesão gástrica induzida pelo etanol conforme protocolo anteriormente descrito por Robert e colaboradores (1979).

Camundongos swiss em jejum de sólidos de 16 horas, foram divididos em grupos de oito animais, tratados com veículo (solução salina 0,9%), PrLP (0,05; 0,5 , 5 e 50 mg/kg, i.v.) ou N-acetilcisteína (NAC 750 mg/kg, v.o.). Trinta minutos após os tratamentos com veículo e PrLP, e uma hora após o tratamento com NAC, os animais receberam por via oral 0,2 mL de etanol absoluto (98%). Passados 60 minutos, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, os estômagos foram retirados, abertos pela grande curvatura, lavados com salina 0,9% e comprimidos entre duas placas de petri para melhor visualização e captura da imagem através de câmara fotográfica. **(Figura 5)**.

A área total e lesionada da parte glandular dos estômagos foram determinadas por análise planimétrica das fotografias, através do programa de computador *Image J*. A área lesada foi expressa em valores de percentagem em relação à área total do corpo gástrico.

FIGURA 5 – Modelo experimental utilizado na avaliação do efeito gastroprotetor de PrLP.



5.3 Avaliação histopatológica

Esta abordagem foi feita no sentido de avaliar as alterações histopatológicas provocadas pelo etanol na mucosa gástrica dos animais e o efeito de PrLP sob estas alterações.

Para tanto a úlcera gástrica foi induzida conforme item 5.2, os estômagos foram coletados, fixados em solução tamponada de formaldeído 10% (v/v) (pH 7,4) durante 24 horas e, posteriormente, processadas em padrão histológico habitual. Com auxílio de um micrótomo, secções de 5 µm de espessura foram dispostas em lâminas de microscopia e submetidas às técnicas de coloração hematoxilina-eosina. Os cortes, identificados por códigos, foram examinados em microscópio óptico (aumento de 100x) por um especialista alheio ao desenvolvimento experimental, com o objetivo de estabelecer uma análise histopatológica dos materiais. A análise histopatológica foi realizada de acordo com os critérios de LAINE & WEINSTEIN

(1988) que atribui escores aos parâmetros de hemorragia (0-4), perda de células epiteliais (0-3) e infiltrado inflamatório (0-3).

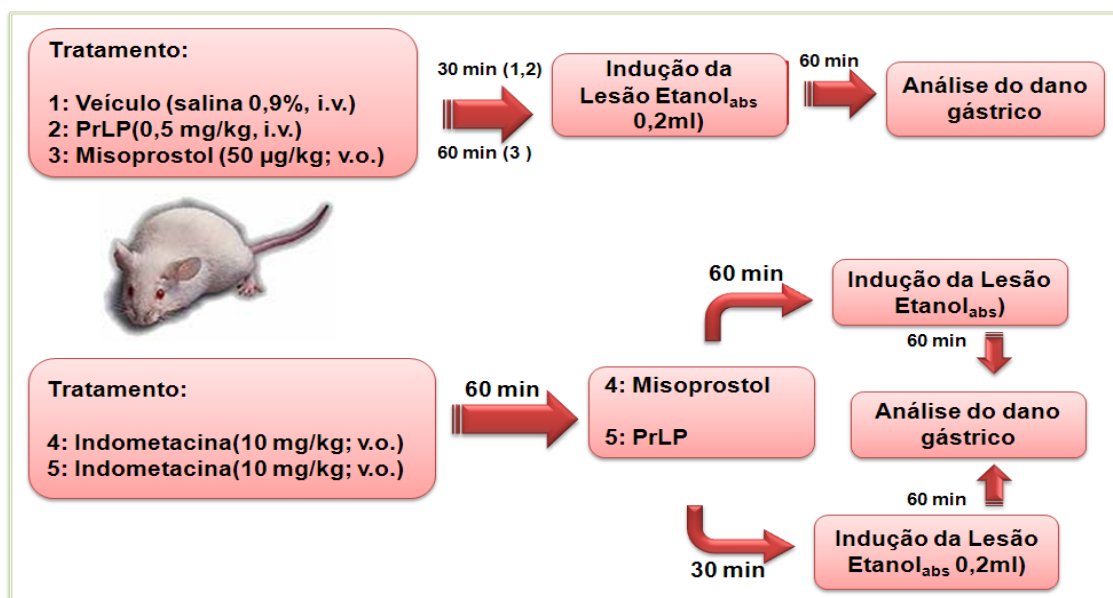
5.4 Investigação de mecanismos envolvidos no efeito Protetor da fração proteica do látex de *Plumeria rubra* na lesão gástrica induzida por etanol

5.4.1 Avaliação do envolvimento das prostaglandinas

Para investigar o papel das prostaglandinas no efeito gastroprotetor de PrLP foi feita uma modulação farmacológica com as seguintes drogas: misoprostol, um análogo de protaglandina E₁ e indometacina, droga que inibe inespecificamente a enzima cicloxigenase (COX) (MORAIS *et al.*, 2010).

Os animais foram tratados com veículo (solução salina 0,9%, i.v.) ou PrLP (0,5mg/kg, i.v.) 30 minutos antes ou misoprostol (50µg/kg, v.o.) 60 minutos antes da administração do etanol_{abs} (0,2 ml/animal, v.o.). A participação das prostaglandinas foi avaliada através da administração de indometacina (10mg/kg, v.o.) 60 minutos antes de misoprostol (50µg/Kg, v.o.) ou PrLP (0,5mg/kg, i.v.). Após 60 minutos da administração do misoprostol ou 30 minutos da administração de PrLP, os animais receberam etanol_{abs} (0,2mL/animal, v.o.). Decorridos 60 minutos da administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados e o percentual de lesão gástrica medido conforme descrito no item 5.2 (**Figura 6**).

FIGURA 6 - Representação esquemática do procedimento experimental utilizado para avaliar o efeito das prostaglandinas.



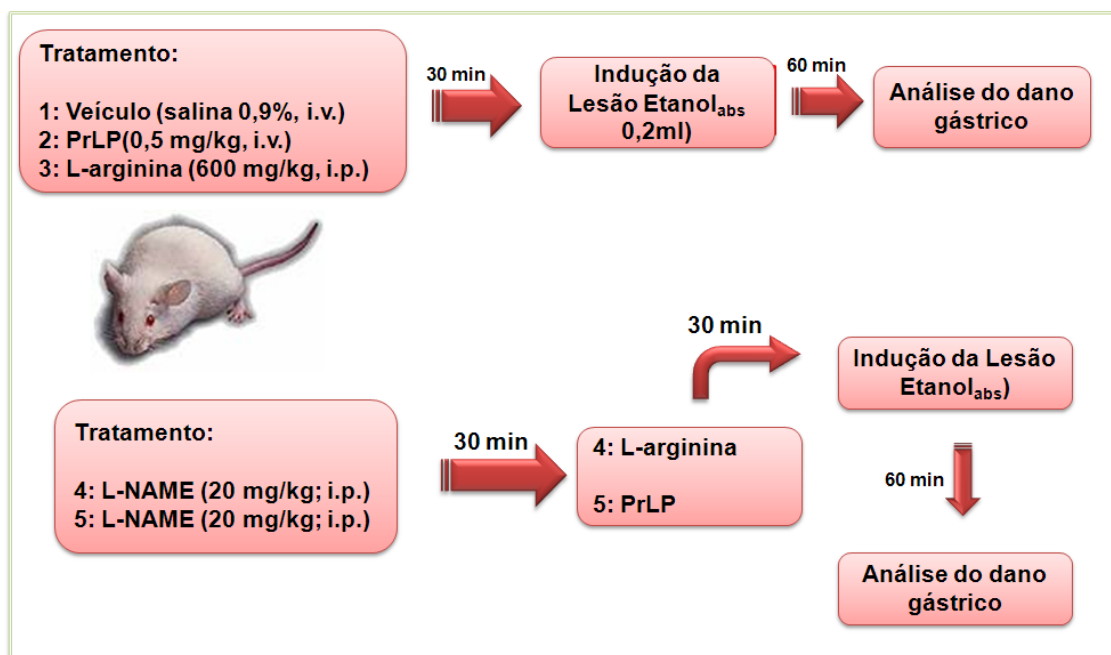
5.4.2 Avaliação do papel do óxido nítrico

5.4.2.1 Modulação farmacológica com L-NAME

Para investigar o papel do NO (óxido nítrico) no efeito gastroprotetor de PrLP foi feita modulação farmacológica com L-arginina, substrato para síntese de óxido nítrico e com L-NAME (N^G-nitro-L-arginina-metilester), um inibidor inespecífico da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (OLINDA *et al.*, 2008).

Os animais foram tratados com veículo (solução salina 0,9%, i.v.) ou PrLP (0,5mg/kg, i.v.) ou L-arginina (600mg/kg, i.p.) 30 minutos antes da administração do etanol_{abs} (0,2mL/animal, v.o.). A participação de NO foi avaliada através da administração de L-NAME (20mg/kg, i.p.) 30 minutos antes de L-arginina (600mg/kg, i.p.) ou PrLP (0,5mg/kg, i.v.). Após 30 minutos da administração de L-arginina ou PrLP, os animais receberam etanol_{abs} (0,2mL/animal, v.o.). Decorridos 60 minutos da administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados e o percentual de lesão gástrica medido conforme descrito no item 5.2 (**Figura 7**).

FIGURA 7 - Representação esquemática do procedimento experimental utilizado para avaliar o efeito de NO.



5.4.2.2 Determinação dos níveis de nitrato/nitrito na mucosa gástrica

A determinação de NO_2^- e NO_3^- baseia-se na reação do NO_2^- com uma amina primária aromática em meio ácido para formar um sal de diazônio, que por sua vez reage com um composto aromático formando um azo-composto (reação de Griess), que absorve na região do visível do espectro eletromagnético (ELLIOT; PORTER, 1971). O íon NO_3^- é determinado, geralmente, como íon NO_2^- , após redução pela enzima nitrato redutase.

Veículo (solução salina 0,9%, i.v.), PrLP (0,5mg/kg, i.v.) ou L-arginina (600mg/Kg i.p.) foram administrados 30 minutos antes da indução das lesões gástricas por etanol_{abs} (0,2mL/animal, v.o.). Após 60 minutos da administração do etanol os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e seus estômagos foram retirados e processados para determinação dos níveis de NO_2^- das amostra.

Os estômagos dos animais foram pesados, homogeneizados em uma solução resfriada de cloreto de potássio (KCl) a 1,15% (homogenato a 10%) e centrifugados (1500 x g; 15 minutos) para obtenção do sobrenadante. O sobrenadante do macerado foi plaqueado (placas de 96 poços) em duplicata (80 μL de cada amostra) e incubado em uma solução (0,04 mL de nitrato redutase, NADPH, KH_2PO_4 e água destilada) por 12 horas para que o NO_3^- das amostras fosse convertido em NO_2^- . No dia subsequente, uma curva-padrão de referência de NO_2^- , a partir de uma diluição seriada de uma solução de NaNO_2 foi preparada e plaqueada. Foram adicionados 80 μL da solução de Griess (1% de sulfanilamida em 1% H_3PO_4 / 0,1% de N-1-nafitiletilenodiamina dihidroclorato/água destilada/1:1:1:1) em cada poço. A coloração púrpura/magenta foi medida em leitor de ELISA com filtro de 540 nm. Os valores obtidos para as amostras experimentais foram plotados com curva padrão e expressos em μM de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$.

No ensaio, a porção glandular dos estômagos foi homogeneizada a 10% com solução gelada de KCl 1,15%. O nitrato das amostras foi convertido em NO_2^- através da incubação em placas (12 horas, 37°C) de 40 μL do homogenato com 40 μL de uma solução contendo nitrato redutase, fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) e água destilada. Após incubação, foram colocados 80 μL da solução de Griess (sulfanilamida 2%, ácido fosfórico 5%, NEED e água destilada) em cada poço e feita leitura em leitora de microplacas a 540nm. A concentração de nitrito foi calculada através de uma

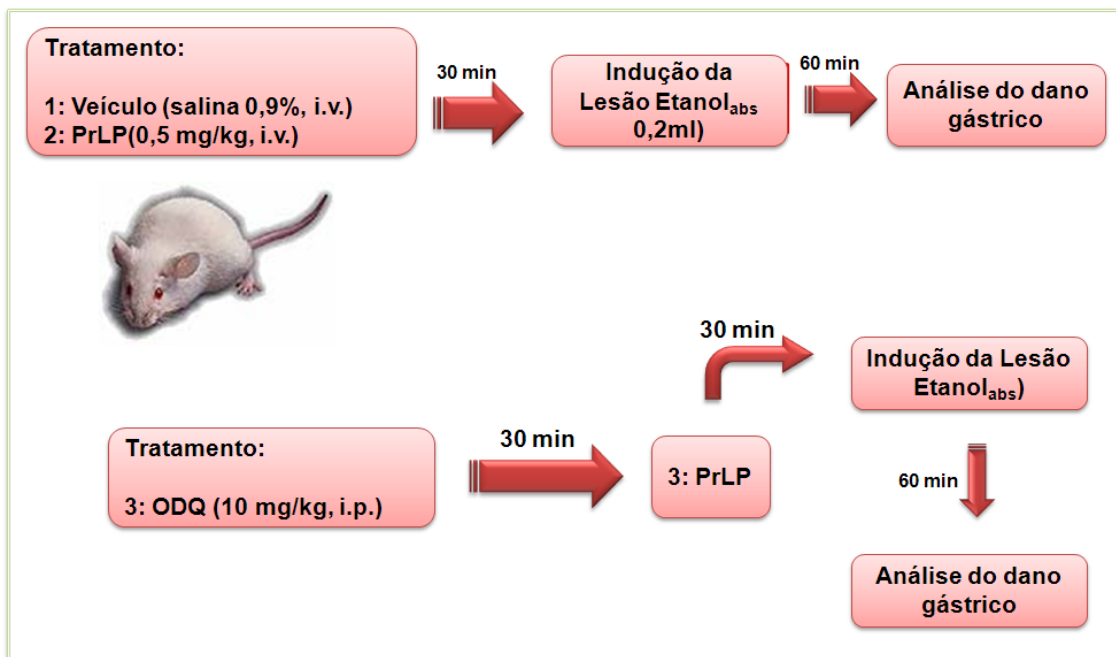
curva padrão utilizando-se nitrito de sódio (NaNO_2) e os resultados expressos em μM de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ (GREEN *et al.*, 2000).

5.4.3 Avaliação do envolvimento de GMPc

Para investigar o papel do GMPc (guanosina 3',5'-monofosfato cíclico) intracelular foi feita modulação farmacológica com o ODQ (1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-ona), um inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel (MEDEIROS *et al.*, 2008).

Os animais foram tratados com veículo (solução salina 0,9%, i.v.) ou PrLP (0,5 mg/kg, i.v.) 30 minutos antes da administração do etanol_{abs} (0,2mL/animal, v.o.). A participação de GMPc foi avaliada através da administração de ODQ (10mg/kg,i.p.) 30 minutos antes de PrLP (0,5mg/kg, i.v.). Após 30 minutos da administração de PrLP, os animais receberam etanol_{abs} (0,2mL/animal, v.o.). Decorridos 60 minutos da administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados e o percentual de lesão gástrica medido conforme descrito no item 5.2 (**Figura 8**).

FIGURA 8 - Representação esquemática do procedimento experimental utilizado para avaliar o efeito de GMPc.

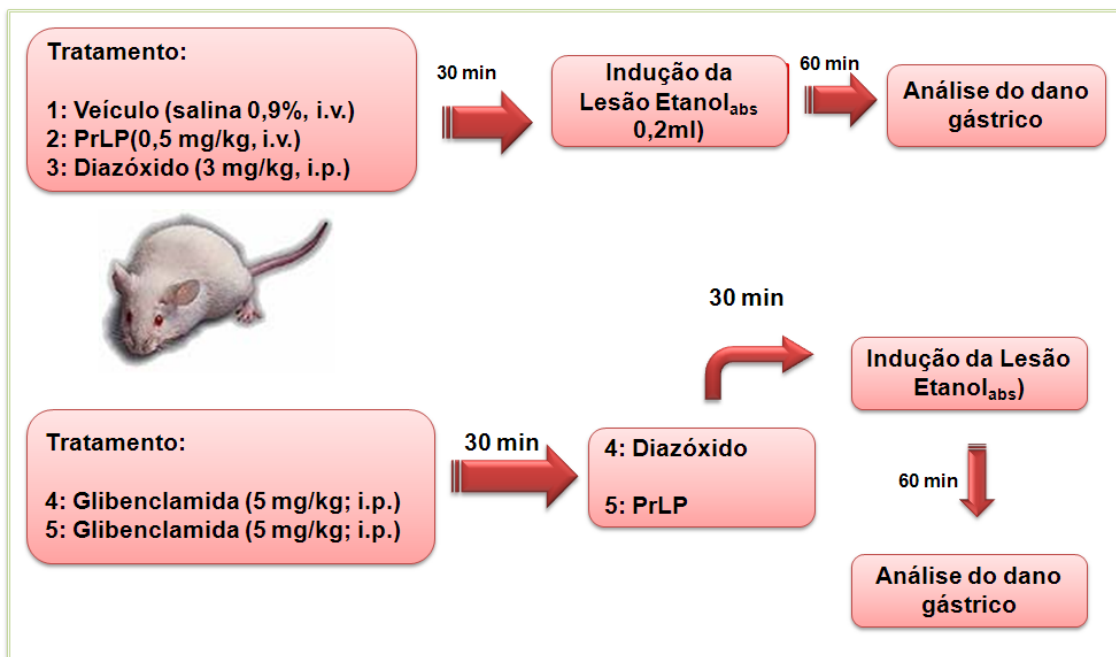


5.4.4 Avaliação do envolvimento dos canais de K_{ATP}

Para investigar o papel dos canais de potássio ATP – dependentes foi feita modulação farmacológica com diazóxido, droga ativadora dos canais de potássio sensíveis ao ATP e com glibenclamida, droga hipoglicemiante que bloqueia seletivamente os canais de potássio ATP - dependentes (RODRIGUES *et al.*, 2010).

Os animais foram tratados com veículo (solução salina 0,9%, i.v.) ou PrLP (0,5mg/kg, i.v.) ou diazóxido (3mg/kg,i.p.) 30 minutos antes da administração do etanol_{abs} (0,2mL/animal, v.o.). A participação dos canais de potássio ATP - dependentes foi avaliada através da administração de glibenclamida (5mg/kg, i.p.) 30 minutos antes do diazóxido (3mg/kg, i.p.) ou PrLP (0,5mg/kg, i.v.). Após 30 minutos da administração de diazóxido ou de PrLP, os animais receberam etanol_{abs} (0,2mL/animal, v.o.). Decorridos 60 minutos da administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados e o percentual de lesão gástrica medido conforme descrito no item 5.2. (**Figura 9**).

FIGURA 9 - Representação esquemática do procedimento experimental utilizado para avaliar o efeito de canais de potássio ATP - dependentes.

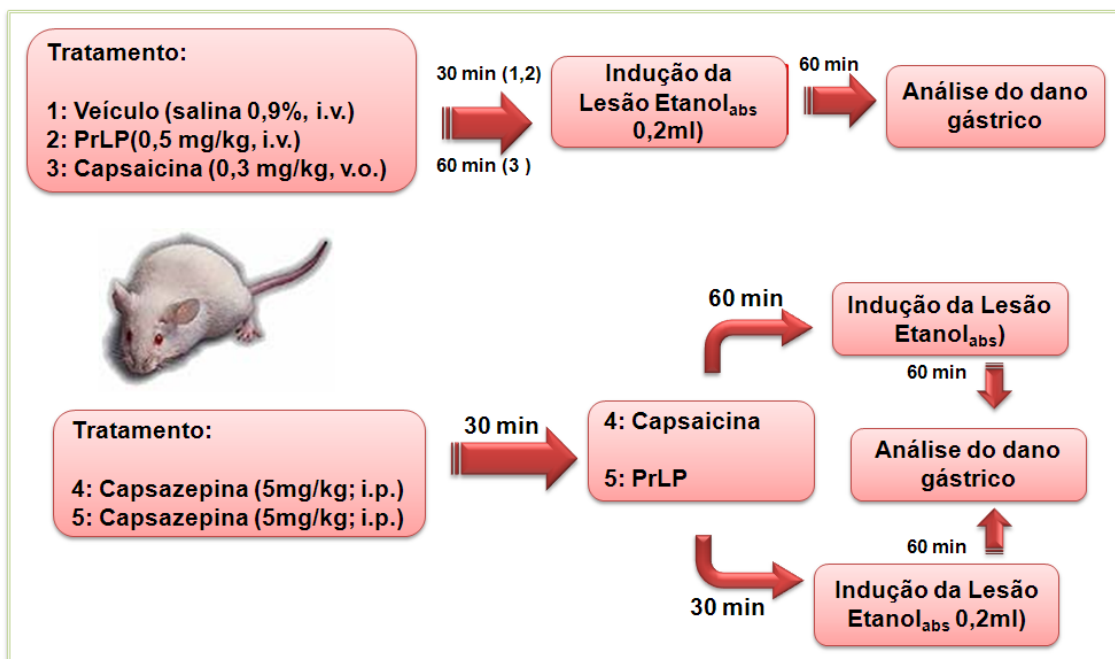


5.4.5 Avaliação do envolvimento dos neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina via receptor de potencial transiente vanilóide 1 (TRPV1)

Para investigar o papel dos neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina foi feita modulação farmacológica com capsaicina, um agonista dos receptores TRPV1 e capsazepina, droga antagonista desses mesmos receptores (RODRIGUES *et al.*, 2011).

Os animais foram tratados com veículo (solução salina 0,9%, i.v.) ou PrLP (0,5mg/kg, i.v.) 30 minutos antes ou capsaicina (0,3mg/kg, v.o.) 60 minutos antes da administração do etanol_{abs} (0,2mL/animal, v.o.). A participação dos receptores TRPV1 foi avaliada através da administração de capsazepina (5mg/kg, i.p.) 30 minutos antes de capsaicina (0,3mg/kg, v.o.) ou PrLP (0,5mg/kg, i.v.). Após 60 minutos da administração da capsaicina ou 30 minutos da administração de PrLP, os animais receberam etanol_{abs} (0,2mL/animal, v.o.). Decorridos 60 minutos da administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados e o percentual de lesão gástrica medido conforme descrito no item 5.2. (**Figura 10**).

FIGURA 10 - Representação esquemática do procedimento experimental utilizado para avaliar o efeito de neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina.



5.4.6 Investigação do efeito da fração proteica sobre o consumo de GSH

No intuito de avaliar uma possível ação antioxidante no efeito gastroprotetor de PrLP no modelo de lesão gástrica induzida por etanol, foram determinados os níveis de glutathiona reduzida (GSH) na mucosa gástrica dos camundongos. Nesse ensaio a N-acetilcisteína (NAC) foi utilizada como droga padrão antioxidante.

Para tanto, foram utilizadas duas abordagens: os animais foram divididos em grupos de oito e tratados com veículo (solução salina 0,9%, i.v.) ou PrLP (0,5mg/kg, i.v.) ou N-acetilcisteína (750mg/kg, v.o.), após os tratamentos as úlceras foram induzidas conforme item 5.2. Outros três grupos receberam veículo (solução salina 0,9%, i.v.) ou PrLP (0,5mg/kg, i.v.) ou N-acetilcisteína (750mg/kg, v.o.), mas não foram induzidas úlceras.

Após os tratamentos e a indução das úlceras, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as porções glandulares dos estômagos retiradas e homogeneizadas a 10% em solução gelada de EDTA 0,02M. Alíquotas de tecido (400 µl) homogeneizado foram misturadas com 320 µl de água destilada e 80 µl de ácido tricloroacético (50%) em tubos de vidros e centrifugados a 4000 rpm por 15 min. Subseqüentemente, o sobrenadante (400 µl) foi misturado com 800 µl de solução tampão Tris-HCL (0,4 M, pH 8,9) e adicionado 5,5-dithio-bis (ácido -2-nitrobenzóico) (DTNB; 0,01 M). Depois de agitada a mistura reacional por 3 minutos, foi medida a absorvância em 412 nm (SEDLAK; LINDSAY, 1968). A concentração de GSH foi calculada através de uma curva padrão de glutathiona reduzida (GSH) e os resultados expressos em µg de GSH/g de tecido.

5.5 Análise estatística

Os resultados do teste de lesão gástrica induzida por etanol foram expressos como média das percentagens das áreas ulceradas \pm o Erro Padrão da Média (EPM). Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos foi realizada Análise de Variância (ANOVA) utilizando o teste de Newman-Keuls e o teste T de student. Os dados não paramétricos resultantes da avaliação histopatológica foram reportados como medianas e foram aplicados os testes estatísticos de Kruskal-Wallis e teste de Dunn. Para todas as análises foi considerado significativo $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Administração aguda da fração proteica do látex de *Plumeria rubra* não produz sinais de toxicidade sistêmica em camundongos

Através da análise da **Tabela 01** podemos observar que o tratamento endovenoso com PrLP (50mg/kg) durante sete dias não promoveu mudança significativa em nenhum dos parâmetros hematológicos avaliados, leucócitos e plaquetas, em comparação com o grupo de animais tratados somente com salina estéril.

A administração de PrLP não provocou diferenças significativas, em comparação ao grupo salina, na evolução ponderal dos animais e também não alterou o peso úmido dos órgãos analisados (**Tabela 02**).

De acordo com a **Tabela 03** podemos observar que o tratamento endovenoso com PrLP não promoveu mudança significativa em nenhum dos parâmetros bioquímicos avaliados, uréia, ALT, AST em comparação com o grupo de animais tratados somente com salina estéril.

Em acréscimo, nenhuma alteração anormal nos parâmetros fisiológicos e comportamentais foi observada entre os grupos estudados.

TABELA 1 – Perfil hematológico em camundongos tratados durante sete dias com PrLP e veículo.

Grupo	Dose (mg/kg i.v.)	Plaquetas (10 ⁵ cels/mL)	Leucócitos Totais (10 ³ cels/mL)	Contagem diferencial de Leucócitos (10 ³ cels/mL)			
				Eosinófilos	Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos
Veículo	-	6,76 ± 0,51	2,17 ± 0,27	0,0	1,18 ± 0,06	0,32 ± 0,02	0,02 ± 0,003
PrLP	50	7,76 ± 0,94	2,03 ± 0,21	0,0	1,48 ± 0,11	0,19 ± 0,01	0,01 ± 0,002

Os valores representam a média ± E.P.M. da contagem das respectivas células após o período de sete dias, grupos de oito animais foram tratados com veículo (solução salina 0,9%) ou PrLP (50 mg/kg, i.v.).

TABELA 2 – Evolução ponderal e peso relativo de órgãos vitais em camundongos tratados durante sete dias com PrLP e veículo.

Grupo	Dose (mg/kg i.v.)	Massa corpórea			Peso dos Órgãos (g/10g peso do animal)			
		Inicial (g)	Final (g)	Ganho de peso(%)	Fígado	Rim	Baço	Coração
Veículo	-	25,7 ± 0,57	26,7 ± 0,73	4 ± 0,8	0,45 ± 0,01	0,05 ± 0,001	0,03 ± 0,002	0,05 ± 0,001
PrLP	50	24,75 ± 0,15	26,25 ± 0,55	6 ± 1,0	0,49 ± 0,01	0,06 ± 0,001	0,05 ± 0,003	0,05 ± 0,003

Os valores representam a média ± E.P.M. dos parâmetros avaliados após o período de sete dias, grupos de oito animais foram tratados com veículo (solução salina 0,9%) ou PrLP (50 mg/kg, i.v.).

TABELA 3 – Perfil bioquímico em camundongos tratados durante sete dias com PrLP e veículo.

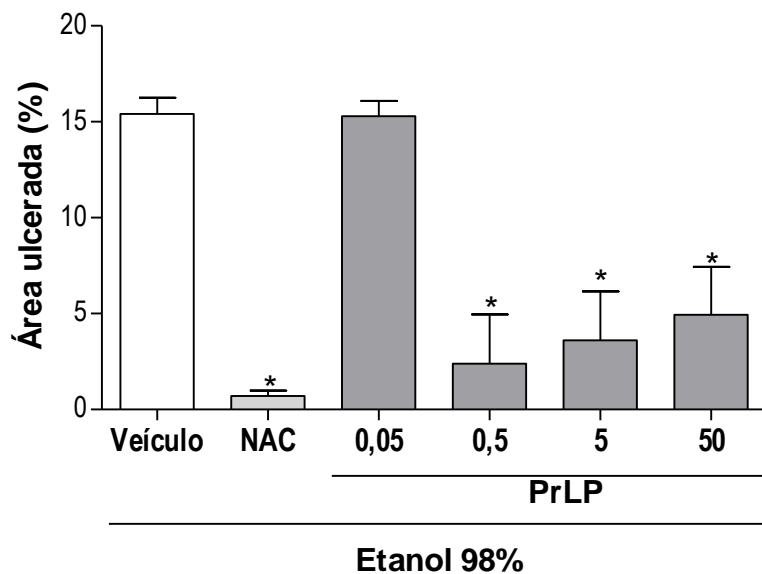
Grupo	Dose (mg/kg)	Uréia (mg/dL)	ALT (UI/L)	AST (UI/L)
Veículo	-	38,5 ± 7,3	68,7 ± 9,4	89,6 ± 5,3
PrLP	50	35,4 ± 5,3	73,1 ± 8,3	93,5 ± 10,4

Os valores representam a média ± E.P.M. dos parâmetros avaliados após o período de sete dias, grupos de oito animais foram tratados com veículo (solução salina 0,9%) ou PrLP (50 mg/kg, i.v.).

6.2 Fração proteica do látex de *Plumeria rubra* reduz o percentual de lesões gástricas induzidas por etanol

A administração de etanol absoluto nos animais que foram previamente tratados com veículo (salina 0,9%) resultou em área de lesão na mucosa gástrica com um percentual de $15,41 \pm 0,84$ % de área ulcerada. Tal efeito foi significativamente reduzido com a administração intravenosa prévia de PrLP nas doses de 0,5 mg/kg ($2,78 \pm 1,04$ %, $p < 0,05$, inibição de 81,95%), 5 mg/kg ($4,18 \pm 0,91$ %, $p < 0,05$, inibição de 72,8%) e 50mg/kg ($4,93 \pm 1,11$ %, $p < 0,05$, inibição de 68%), no entanto, para dose de 0,05 mg/kg, esse efeito protetor não foi observado ($15,30 \pm 0,79$ %). A NAC foi utilizada como droga padrão e sua administração foi capaz de reduzir a área gástrica lesionada ($0,7 \pm 0,28$ $p < 0,05$, inibição de 95%) em comparação com o grupo veículo ($15,41 \pm 0,84$ %). (Figura 11 e Tabela 4).

Figura 11 – Efeito protetor de PrLP no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol.



As barras representam a média \pm E.P.M. do percentual da área lesionada do estômago, após 60 min da indução da úlcera, grupos de oito animais foram tratados com veículo; N-acetilcisteína (NAC 750 mg/Kg, v.o.) e PrLP (0,05; 0,5 ; 5 e 50 mg/kg, i.v.) * $p < 0,05$; representa significância em relação ao grupo veículo(ANOVA e Teste de Newman-Keul).

TABELA 4 – Efeito protetor de PrLP no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol

Grupos	Doses	Área Ulcerada (%)	% de inibição
Controle	-	15,41 ±0,84	-
N-acetilcisteína	750 mg/kg	0,7±0,28*	95,45
PrLP	0,05 mg/kg	15,3±0,79	-
PrLP	0,5 mg/kg	2,78±1,04*	81,9
PrLP	5 mg/kg	4,18 ±0,91*	72,8
PrLP	50 mg/kg	4,93 ±1,11 *	68,0

Os valores representam a média ± E.P.M. do percentual da área lesionada do estômago, após 60 min. da indução da úlcera. Grupos de oito animais foram tratados com Veículo (salina 0,9%); N-acetilcisteína (750 mg/kg, v.o.) e PrLP (0,05; 0,5 ; 5 e 50 mg/kg; i.v.) * p < 0.05 representam significância em relação ao grupo controle (ANOVA e Teste de Newman-Keul).

6.3 Avaliação Histopatológica

O efeito gastroprotetor das proteínas de látex de *Plumeria rubra* foi analisado microscopicamente e está representado na **Figura 12**. Os parâmetros de hemorragia, perda de células epiteliais e infiltrado de células inflamatórias foram analisados de forma semi-quantitativa e estão dispostos na **Tabela 5**.

O parâmetro de hemorragia não foi evidenciado em animais do grupo controle normal. Pode-se observar que animais do grupo controle úlcera apresentaram extensa área lesionada associada à hemorragia. Este parâmetro ocorreu de forma intensa com mediana e variações de 4 (4-4) e, de forma significativa (p<0,05) quando comparado ao controle normal. De forma semelhante ao controle normal, não foi observada hemorragia em animais pré-tratados com N-acetilcisteína (NAC). O pré-tratamento com PrLP (0,5 mg/kg i.v.) reduziu a hemorragia de forma significativa (p<0,05) quando comparado ao controle úlcera, apresentando mediana e variações de 0,5 (0-1). A perda de células epiteliais não foi observada em animais grupo controle normal. Observou-se no grupo controle úlcera um número reduzido de células mucóides, principais e parietais. Desta forma, a perda de células epiteliais ocorreu de forma intensa, com mediana e variações de 3 (2-3). As diferenças foram significativas (p<0,05) quando comparado ao controle normal. O pré-tratamento com N-acetilcisteína (NAC 750 mg/kg; v.o.) ou PrLP (0,5 mg/kg i.v.) preveniram a perda epitelial, apresentando mediana e variações de 1 (1-1). As diferenças foram

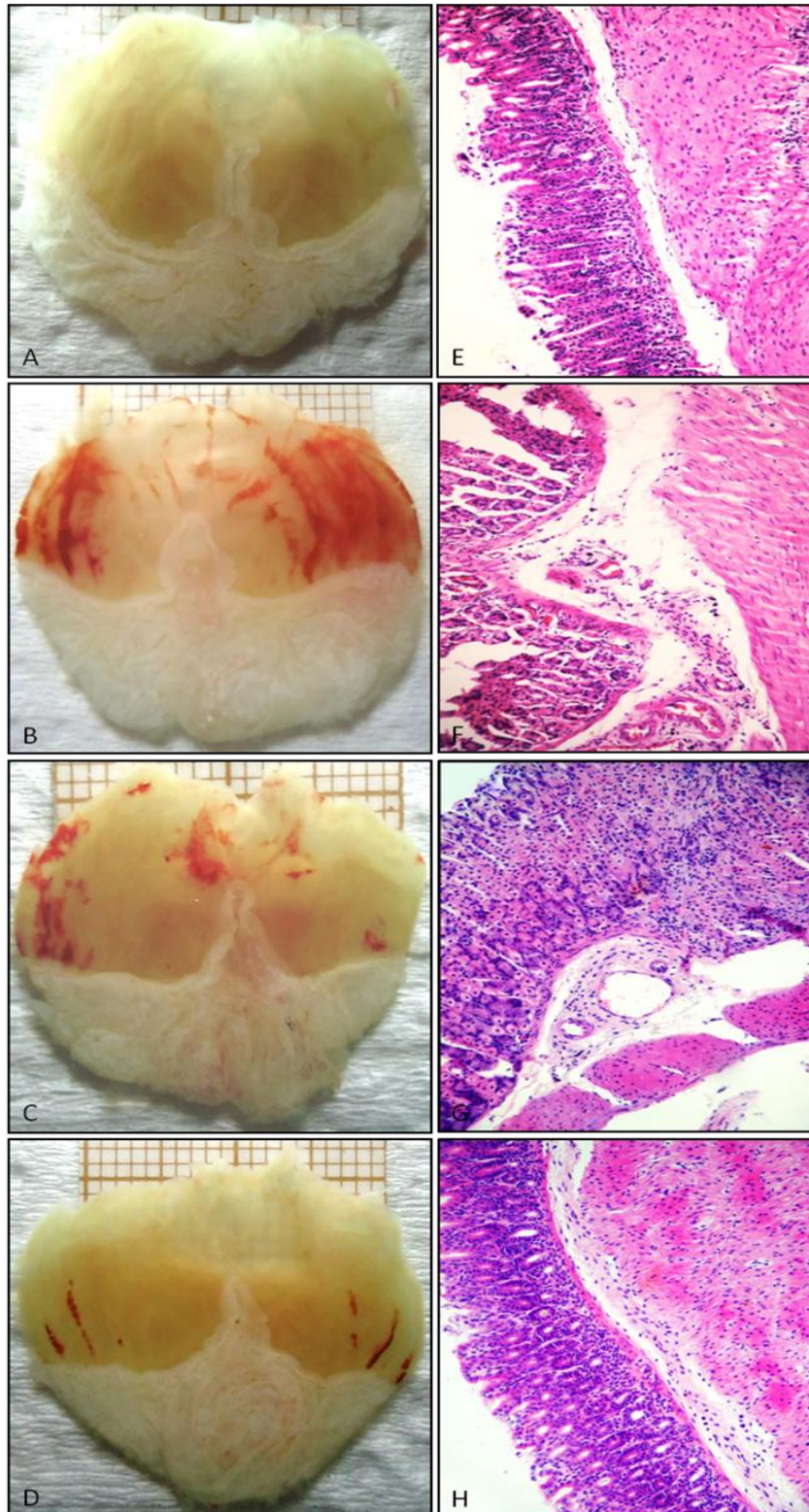
significativas ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle úlcera. O infiltrado de células inflamatórias foi raramente observado nos grupos controle e experimental, não havendo diferença significativa.

TABELA 5 – Avaliação histopatológica do efeito de PrLP sobre as lesões gástrica induzida por etanol em camundongos.

Grupos	Hemorragia (0-4 escores)	Perda de Células Epiteliais (0-3 escores)	Células Inflamatórias (0-3 escores)
Controle normal	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Controle úlcera	4 (4-4)*	3 (2-3)*	1 (0-1)
PrLP	0,5(0-1) [#]	1 (1-1) [#]	0 (0-1)
NAC	0 (0-0) [#]	1 (1-1) [#]	0 (0-1)

Os valores representam mediana e variação(máximo – mínimo) dos escores mensurados de acordo com os critérios de Laine & Weinstein (1988). Os animais foram tratados com veículo (salina 0,9%); PrLP (0,5 mg/kg, i.v.) e NAC (750 mg/kg; v.o.) em seguida 0,2 ml de Etanol_{ABS} v.o. * $p < 0,05$ indica diferença estatística em relação ao grupo controle normal e [#] $p < 0,05$ ao grupo controle úlcera (Kruskall-Wallis e teste de Dunn).

FIGURA 12 – Análise macro e microscópica do pré-tratamento com PrLP no modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto.



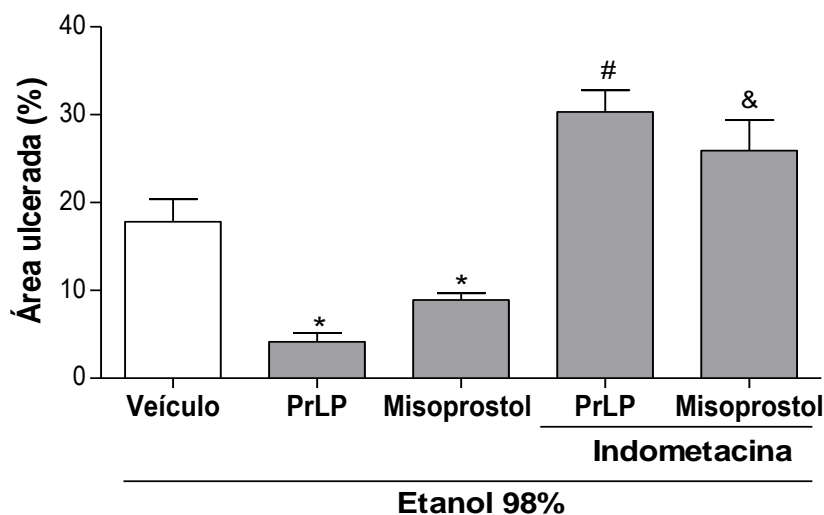
As mucosas gástricas dos animais foram removidas e utilizadas para confecção de lâminas histológicas pelo método de H&E. Fotomicrografias das mucosas gástricas foram obtidas de animais do grupo controle normal (A), controle úlcera (B), PrLP (0,5 mg/kg) (C) e NAC (750 mg/kg) (D), aumento de 200x.

6.4 O pré-tratamento com indometacina bloqueia a proteção gástrica da fração proteica do látex de *Plumeria rubra*

A administração de etanol absoluto nos animais que foram previamente tratados com veículo (salina 0,9%) produziu significativa porcentagem de área ulcerada ($17,82 \pm 2,58$ %). Tal efeito foi reduzido em 76,82% pela administração prévia de PrLP 0,5 mg/kg, i.v. ($4,13 \pm 1,01$ %, $p < 0,05$) e em 50% pelo pré-tratamento com misoprostol 50 μ g/kg, v.o. ($8,91 \pm 0,75$ %, $p < 0,05$), quando comparados ao grupo controle.

O pré-tratamento oral dos animais com indometacina 10mg/kg reverteu a gastroproteção promovida pela administração de misoprostol, aumentando significativamente ($p < 0,05$) a área lesionada em 191% ($25,91 \pm 1,56$ %), essa administração prévia também reverteu o efeito de PrLP, aumentando significativamente a área lesionada em 634% ($30,32 \pm 1,10$ %) (**Figura 13**).

FIGURA 13 – Indometacina reverte efeito gastroprotetor de PrLP .



As barras representam a média \pm E.P.M. do percentual da área lesionada do estômago, após 60 minutos da indução da úlcera. Grupos de oito animais foram tratados com veículo ; PrLP (0,5 mg/kg, i.v.); Misoprostol (50 μ g/kg, v.o.); Indometacina (10 mg/Kg, v.o.) + PrLP (0,5 mg/kg, i.v.) ou Indometacina (10 mg/kg, v.o.) + Misoprostol (50 μ g/kg, v.o.). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado somente com PrLP; & $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado somente com misoprostol (ANOVA e Teste de Newman-Keul).

6.5 Avaliação do papel do óxido nítrico

6.5.1 O pré-tratamento com L-NAME bloqueia a proteção gástrica da fração proteica do látex de *Plumeria rubra*

A administração de etanol absoluto nos animais que foram previamente tratados com veículo (salina 0,9%) produziu significativa porcentagem de área ulcerada ($17,32 \pm 2,16$ %). Tal efeito foi reduzido em 61,02% pela administração prévia de PrLP 0,5 mg/kg, i.v. ($6,75 \pm 2,20$ %, $p < 0,05$) e em 78,29% pelo pré-tratamento com L-Arginina 600 mg/kg, i.p. ($3,76 \pm 2,65$ %, $p < 0,05$), quando comparados ao grupo controle.

O pré-tratamento intraperitoneal dos animais com L-NAME 20 mg/kg, reverteu a gastroproteção promovida pela administração de L-arginina, aumentando significativamente ($p < 0,05$) a área lesionada em 635% ($24,64 \pm 2,32$ %), essa administração prévia também reverteu o efeito de PrLP, aumentando de forma significativa ($p < 0,05$) a área lesionada em 502% ($40,57 \pm 3,13$ %) (**Figura 14**).

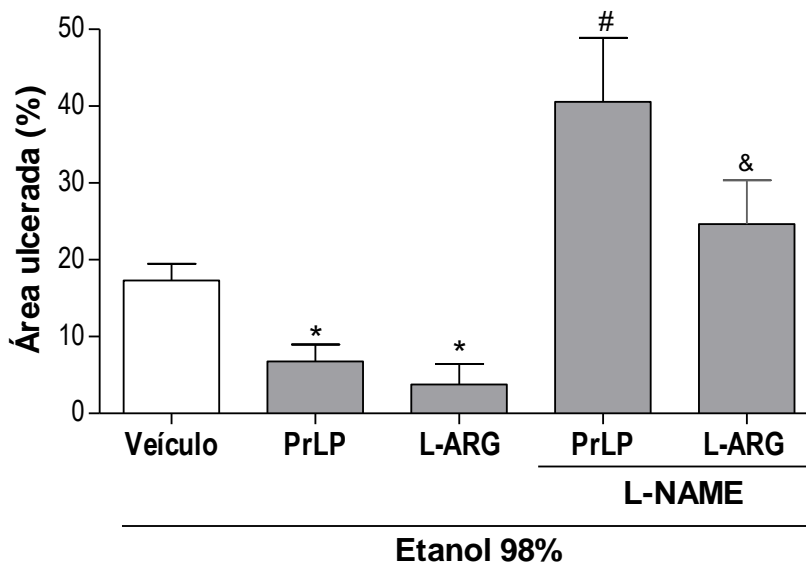


FIGURA 14 – L-NAME reverte efeito gastroprotetor de PrLP. As barras representam a média \pm E.P.M. do percentual da área lesionada do estômago, após 60 minutos da indução da úlcera. Grupos de oito animais foram tratados com Veículo (controle); PrLP (0,5 mg/kg, i.v.); L-Arginina (600 mg/kg, i.p.); L-NAME (20 mg/Kg, i.p.) + PrLP (0,5 mg/kg, i.v.) ou L-NAME (20 mg/Kg, i.p.) + L-Arginina (600 mg/kg, i.p.).* $p < 0,05$ vs grupo controle; # $p < 0,05$ vs grupo tratado somente com PrLP; & $p < 0,05$ vs grupo tratado somente com L-Arginina. (ANOVA e Teste de Newman-Keul).

6.5.2 Fração proteica do látex de *Plumeria rubra* induz aumento dos níveis de Nitrato/Nitrito na mucosa gástrica com lesões por etanol

O grupo controle, que recebeu somente veículo, teve os níveis de nitrito reduzidos na mucosa gástrica dos camundongos após tratamento oral com etanol absoluto ($17,68 \pm 0,84$ [$\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$]). O tratamento prévio com L-arginina 600mg/kg i.p. ou com PrLP 0,5mg/kg i.v. aumentou significativamente ($p < 0,05$) o conteúdo gástrico de nitrito em relação ao grupo controle. Esse aumento foi de 29% ($22,87 \pm 1,48$ [$\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$]) para L-arginina e de 26% ($22,31 \pm 1,62$ [$\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$]) para PrLP (Figura 15).

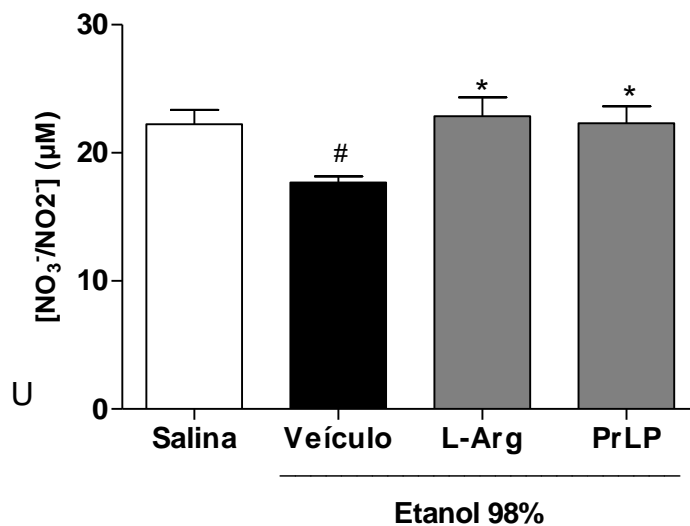


Figura 15 - Fração proteica do látex de *Plumeria rubra* induz aumento dos níveis de nitrato/nitrito na mucosa gástrica com lesões por etanol. As barras representam a média \pm E.P.M. dos níveis de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ no estômago, após 60 minutos da indução da úlcera. Grupos de oito animais foram tratados com Salina 0,9%; Veículo (controle); L-Arginina (600 mg/kg, i.p.) e PrLP (0,5 mg/kg, i.v.). * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina (ANOVA e Teste de Newman-Keul).

6.6 O pré-tratamento com ODQ bloqueia a proteção gástrica da fração proteica do látex de *Plumeria rubra*

A administração de etanol absoluto nos animais que foram previamente tratados com veículo (salina 0,9%) produziu significativa porcentagem de área ulcerada ($21,94 \pm 4,68$ %). Tal efeito foi reduzido em 73,92% pela administração prévia de PrLP 0,5 mg/kg, i.v. ($5,72 \pm 1,16$ %, $p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle.

O pré-tratamento intraperitoneal dos animais com ODQ 10 mg/kg, reverteu a gastroproteção promovida pela administração de PrLP, aumentando de forma significativa ($p < 0,05$) a área lesionada em 429% ($30,29 \pm 8,04$ %) (**Figura 16**).

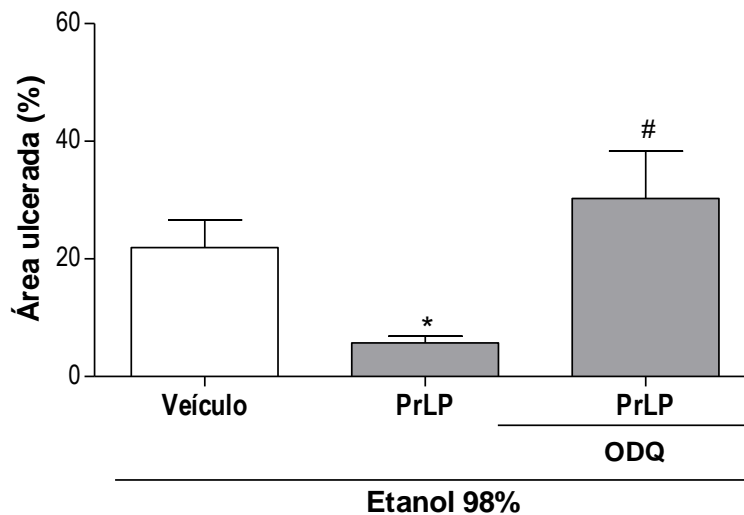


FIGURA 16 – ODQ reverte efeito gastroprotetor de PrLP. As barras representam a média \pm E.P.M. do percentual da área lesionada do estômago, após 60 minutos da indução da úlcera. Grupos de oito animais foram tratados com Veículo (controle); PrLP (0,5 mg/kg, i.v.); ODQ (10 mg/Kg, i.p.) + PrLP (0,5 mg/kg, i.v.).* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado somente com PrLP (ANOVA e Teste de Newman-Keul).

6.7 O pré-tratamento com glibenclamida bloqueia a proteção gástrica da fração proteica do látex de *Plumeria rubra*

A administração de etanol absoluto nos animais que foram previamente tratados com veículo (salina 0,9%) produziu significativa porcentagem de área ulcerada ($20,08 \pm 4,04$ %). Tal efeito foi reduzido em 73,25% pela administração prévia de PrLP 0,5 mg/kg, i.v. ($5,37 \pm 1,34$ %, $p < 0,05$) e em 75% pelo pré-tratamento com Diazóxido 3 mg/kg, i.p. ($5,02 \pm 1,34$ %, $p < 0,05$), quando comparados ao grupo controle.

O pré-tratamento intraperitoneal dos animais com Glibenclamida 5 mg/kg, reverteu a gastroproteção promovida pela administração de Diazóxido, aumentando significativamente ($p < 0,05$) a área lesionada em 299% ($20,04 \pm 1,64$ %), essa administração prévia também reverteu o efeito de PrLP, aumentando de forma significativa ($p < 0,05$) a área lesionada em 185% ($15,34 \pm 1,99$ %) (**Figura 17**).

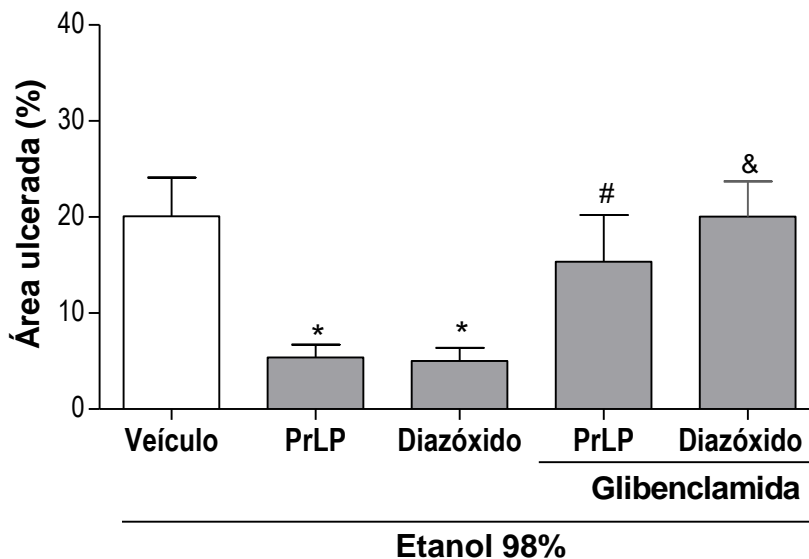


FIGURA 17 – Glibenclamida reverte efeito gastroprotetor de PrLP. As barras representam a média \pm E.P.M. do percentual da área lesionada do estômago, após 60 minutos da indução da úlcera. Grupos de oito animais foram tratados com Veículo (controle); PrLP (0,5 mg/kg, i.v.); Diazóxido (3 mg/kg, i.p.); Glibenclamida (5 mg/Kg, i.p.) + PrLP (0,5 mg/kg, i.v.) ou Glibenclamida (5 mg/Kg, i.p.) + Diazóxido (3 mg/kg, i.p.).* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado somente com PrLP; & $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado somente com Diazóxido. (ANOVA e Teste de Newman-Keul).

6.8 O pré-tratamento com capsazepina bloqueia a proteção gástrica da fração proteica do látex de *Plumeria rubra*

A administração de etanol absoluto nos animais que foram previamente tratados com veículo (salina 0,9%) produziu significativa porcentagem de área ulcerada ($20,56 \pm 5,01$ %). Tal efeito foi reduzido em 76,94% pela administração prévia de PrLP 0,5 mg/kg, i.v. ($4,74 \pm 1,01$ %, $p < 0,05$) e em 75,58% pelo pré-tratamento com capsaicina 0,3 mg/kg, v.o. ($5,02 \pm 1,35$ %, $p < 0,05$), quando comparados ao grupo controle.

O pré-tratamento intraperitoneal dos animais com capsazepina 5 mg/Kg reverteu a gastroproteção promovida pela administração de capsaicina, aumentando significativamente ($p < 0,05$) a área lesionada em 249% ($17,54 \pm 1,34$ %), essa administração prévia também reverteu o efeito de PrLP, aumentando de forma significativa ($p < 0,05$) a área lesionada em 252% ($16,66 \pm 2,66$ %) (**Figura 18**).

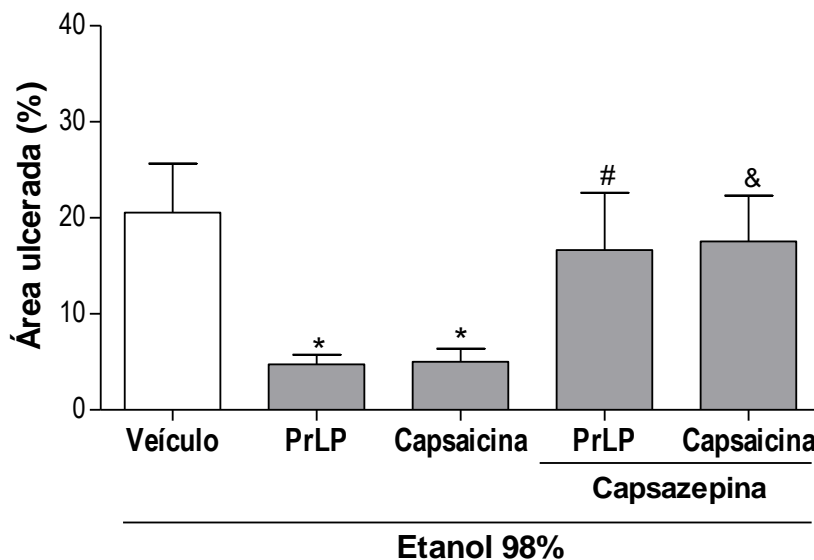


FIGURA 18 – Capsazepina reverte efeito gastroprotetor de PrLP. As barras representam a média \pm E.P.M. do percentual da área lesionada do estômago, após 60 minutos da indução da úlcera. Grupos de oito animais foram tratados com Veículo (controle); PrLP (0,5 mg/kg, i.v.); Capsaicina (0,3 mg/kg, v.o.); Capsazepina (5 mg/Kg, i.p.) + PrLP (0,5 mg/kg, i.v.) ou Capsazepina (5 mg/Kg, i.p.) + Capsaicina (0,3 mg/kg, v.o.). * $p < 0.05$ em relação ao grupo controle; # $p < 0.05$ em relação ao grupo tratado somente com PrLP; & $p < 0.05$ em relação ao grupo tratado somente com capsaicina (ANOVA e Teste de Newman-Keul).

6.9. A fração proteica do látex de *Plumeria rubra* impede a redução dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) na mucosa gástrica de camundongos com úlcera induzida por etanol

A concentração de GSH das amostras foi calculada a partir da leitura das absorbâncias após a reação com o DNTB, contra uma curva padrão de GSH. O grupo controle, que recebeu somente veículo, teve os níveis de GSH determinados na mucosa gástrica ($289,3 \pm 42,37$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido). O grupo que recebeu o veículo e posteriormente etanol teve seus níveis de GSH reduzidos em 42% ($165,0 \pm 21,74$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido). O tratamento prévio com N-acetilcisteína (NAC) 750mg/kg v.o. ou com PrLP 0,5mg/kg i.v. aumentou significativamente ($p < 0,05$) o conteúdo gástrico de GSH em relação ao grupo controle. Esse aumento foi de 105% ($338,9 \pm 40,63$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) para PrLP e de 325% ($702 \pm 39,75$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) para NAC (**Figura 19**).

A segunda abordagem foi feita no sentido de verificar se PrLP age através do aumento dos níveis de GSH, ou evita a lesão gástrica pelos radicais livres. Assim, o efeito de PrLP sobre a GSH gástrica foi avaliada em animais normais. Observou-se que PrLP não aumenta significativamente os níveis de GSH ($164,8 \pm 6,3$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) quando comparado ao grupo controle (232 ± 36 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido), porém o grupo tratado com NAC observou-se um aumento de 112% nos níveis de GSH ($493,3 \pm 66,67$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) (**Figura 20**).

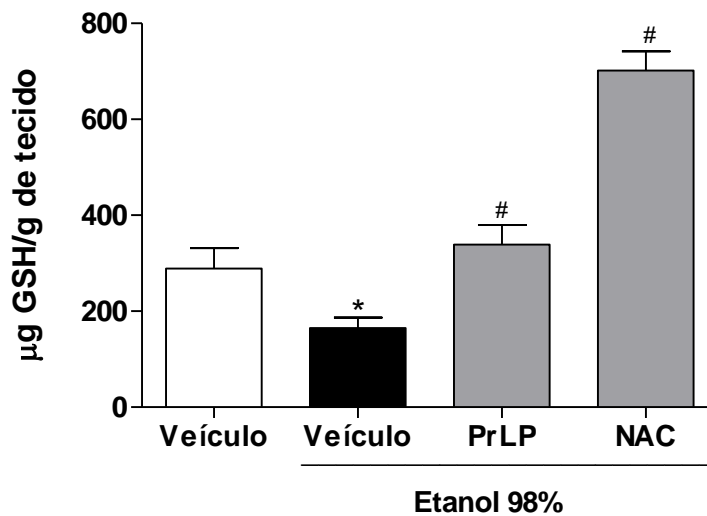


Figura 19 - Fração proteica do látex de *Plumeria rubra* evita a redução dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) na mucosa gástrica com lesões por etanol. As barras representam a média \pm E.P.M. dos níveis de GSH no estômago, após 60 minutos da indução da úlcera. Grupos de oito animais foram tratados com veículo (salina 0,9%); NAC (750 mg/kg, v.o.) e PrLP (0,5 mg/kg, i.v.). * $p < 0.05$ em relação ao grupo que recebeu apenas veículo; # $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo + etanol (ANOVA e Teste de Newman-Keul).

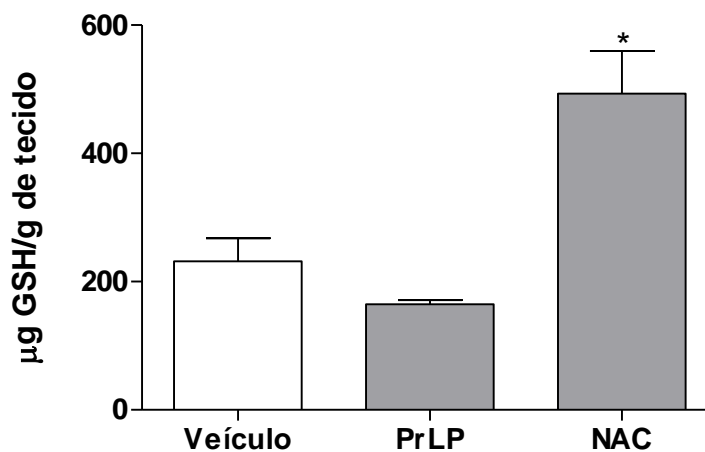


Figura 20 - Fração proteica do látex de *Plumeria rubra* não aumenta os níveis de glutathiona reduzida (GSH) na mucosa gástrica sem lesões. As barras representam a média \pm E.P.M. dos níveis de GSH no estômago. Grupos de oito animais foram tratados com Salina 0,9% (veículo); PrLP (0,5 mg/kg, i.v.) e NAC (750 mg/kg, v.o.). * $p < 0.05$ em relação ao grupo veículo (ANOVA e Teste de Newman-Keul).

7. DISCUSSÃO

Apesar do amplo uso de medicamentos sintéticos no mercado mundial, a utilização de produtos naturais vem aumentando de forma significativa, possivelmente por questões que envolvem aspectos culturais, econômicos e sociais, bem como pelas comprovações de eficácia terapêutica destes produtos através de trabalhos científicos. Entretanto, várias plantas utilizadas na medicina tradicional ainda não foram submetidas a nenhum tipo de avaliação toxicológica, representando assim risco para aqueles que delas fazem uso.

A idéia de que substâncias originadas das plantas são inofensivas e isentas de riscos à saúde humana é equivocada, considerando a toxicidade demonstrada para várias espécies vegetais (TAGLIATI; FÉRES, 2009). Sendo assim, a realização de estudos toxicológicos que investiguem ausência ou o nível de segurança terapêutica das drogas originadas de produtos naturais e de fitoterápicos é de fundamental importância para proteção da saúde humana.

Seguindo esta linha de raciocínio, antes de se avaliar o possível efeito farmacológico para a fração proteica do látex de *P. rubra* (PrLP) no modelo experimental aqui proposto, o efeito ocasionado pela administração de PrLP foi avaliado através de um estudo de toxicologia agudo adaptado pelo nosso laboratório e descrito anteriormente (BEZERRA *et al.*, 2008).

Foram avaliados parâmetros de toxicidade subcrônica, na qual utilizou-se a dose de 50 mg/kg, já que essa foi a maior dose testada com efeito gastroprotetor. Esse tratamento não provocou nenhuma alteração macroscópica e no peso úmido dos órgãos avaliados (rim, coração, fígado e baço). Parâmetros que avaliaram tanto a função renal (uréia) como a função hepática (AST e ALT) não foram alterados, bem como o número de leucócitos circulantes, quantidade de plaquetas e o peso corpóreo dos animais. Da mesma forma látex de outras plantas parecem não apresentar toxicidade aguda, Ramos *et al.* (2006) mostraram que animais que receberam proteínas laticíferas de *Calotropis procera* durante 35 dias consecutivos não apresentaram não promoveu morte dos animais e nem ocasionou rejeição ao consumo da amostra. Toxicidade aguda não foi registrada durante o período experimental. Neste contexto, proteínas laticíferas de *P. rubra* parecem não causar toxicidade aguda, já que não foram observados sinais de toxicidade nos animais que receberam essas proteínas.

A administração intragástrica de etanol constitui um modelo clássico de indução de lesões gástricas em animais, bastante utilizado para estudo fisiopatológico e para a busca de novas moléculas (WONG; OGLE, 1995; SAIRAN *et al.*, 2001; BARROS *et al.*, 2007; ROZZA *et al.*, 2010; FARIA *et al.*, 2012). No presente estudo foi demonstrado efeito antiulcerogênico de uma fração proteica isolada do látex de *P. rubra* (PrLP), evidenciado pela redução da área gástrica lesionada pelo etanol em camundongos. O pré-tratamento dos animais com PrLP reduziu de forma significativa a hemorragia e a necrose nas células do epitélio gástrico exposto à gastrotoxicidade promovida pelo etanol. O efeito gastroprotetor de PrLP foi observado nas três maiores doses que foram testadas e foi semelhante ao efeito da droga antiulcerogênica usada como padrão neste estudo, N-acetilcisteína (NAC). Tal efeito protetor de PrLP também foi visto na avaliação histopatológica, observou-se que o pré-tratamento com essa fração proteica reduziu o extravasamento de hemácias e perda de células epiteliais (mucóides, principais e parietais), além disso, o pré-tratamento com NAC também reduziu esses parâmetros, confirmando os achados macroscópicos aqui descritos.

Muitos produtos naturais de origem vegetal são conhecidos popularmente e cientificamente por apresentarem diversas propriedades farmacológicas, incluindo atividade antiulcerogênica (MARQUES *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2008; AKKOL *et al.*, 2009; CALDAS *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2012; ZAKARIA *et al.*, 2012). Nesse contexto, podemos destacar os fluidos laticíferos que têm sido objeto de muitos estudos e têm-se demonstrado como ferramentas promissoras para o tratamento de lesões gástricas (TOMA *et al.*, 2005; LEITE *et al.*, 2009; BHARTI *et al.*, 2010)

A gênese das lesões gástricas induzidas por etanol é de origem multifatorial e está associada à uma diminuição de fatores protetores da mucosa gástrica, como o muco e moléculas antioxidantes, e à um aumento de fatores agressores relacionados principalmente à alterações na microcirculação e ao estresse oxidativo (DAVENPORT, 1969).

Desta forma, considerando o significativo efeito gastroprotetor de PrLP aqui demonstrado, um estudo de possíveis mecanismos envolvidos neste efeito foi delineado utilizando estratégias experimentais que permitem a investigação do efeito de PrLP com a expressão e/ou efeito de receptores e mediadores envolvidos na lesão gástrica. Assim, investigamos o envolvimento da atividade antiulcerogênica

desta fração proteica com as prostaglandinas, fibras aferentes sensíveis à capsaicina através dos receptores TRPV1, óxido nítrico, canais de K^+ ATP dependentes, GMPc e com os níveis de glutathiona reduzida. Em todas essas abordagens, PrLP foi utilizada na dose de 0,5 mg/kg, uma vez que essa foi a menor dose testada que exibiu efeito gastroprotetor.

As prostaglandinas são importantes mediadores envolvidos na proteção da mucosa gástrica e na cicatrização de úlceras gástricas (HIGUCHI, 2010). Promovem uma ação protetora através da estimulação da liberação de bicarbonato e muco, além de melhorar o fluxo sanguíneo através da vasodilatação (HAWKEY, 2000; BRZOZOWSKI *et al.*, 2005; LAINE *et al.*, 2008) e de aumentar a resistência das células epiteliais contra danos causados por citotoxinas (HAWKEY; RAMPTON, 1985).

É bem conhecido que a prostaglandina E_2 possui uma ação protetora contra a lesão gástrica provocada pelo etanol (GLAVIN *et al.*, 1996). Também foi demonstrado que essa proteção de PGE_2 é devido a um aumento do GMPc intracelular, que é mediado via aumento da concentração de cálcio intracelular livre e a produção de óxido nítrico (SAKAI *et al.*, 1995).

Para avaliar o envolvimento de prostaglandinas com o efeito protetor de PrLP foi utilizada a indometacina, uma droga inibidora não seletiva de COX e que, portanto, inibe a produção das prostaglandinas. Para essa investigação utilizou-se, também, o misoprostol, que é um análogo estável da prostaglandina E_1 (RANG *et al.*, 2007). No ensaio, PrLP e misoprostol reduziram de forma significativa as lesões induzidas por etanol e esse efeito foi revertido pela administração de indometacina. Esses resultados sinalizam fortemente que o mecanismo de ação de PrLP se dá com o envolvimento de prostaglandinas, possivelmente através da estimulação da produção desse mediador.

O óxido nítrico (NO) é um mediador que desempenha importante função para a defesa da mucosa gástrica. O NO é produzido pela enzima óxido nítrico sintase, e após sua liberação, possui um tempo de meia-vida muito curto (5-10s), rapidamente esta molécula origina nitrito (NO_2^-) e posteriormente nitrato (NO_3^-), que são seus metabólitos estáveis (VINCENT *et al.*, 2000).

O NO é um fator importante na regulação do fluxo sanguíneo e da microcirculação na mucosa gástrica (WALLACE, 2006). Esse mediador também é importante para a regulação da secreção de muco (BROWN *et al.*, 1993), aumento

do fluxo sanguíneo (WALLACE; MILLER, 2000) e inibição da infiltração de neutrófilos (WALLACE *et al.*, 1997). Por outro lado, o excesso na produção de NO associado a estados inflamatórios é caracterizado pelo aumento na permeabilidade epitelial e perda da função da barreira de muco. Assim, os níveis de produção de NO, a isoforma geradora de NO e o estado redox das células epiteliais podem determinar os efeitos do óxido nítrico na permeabilidade da mucosa e proteção (SHAH *et al.*, 2004). Um trabalho desenvolvido por KO e colaboradores (2004) verificou que a administração de etanol 50% não influencia a atividade da NO sintase induzida, porém inibe a atividade da NO sintase constitutiva, provocando perda da integridade da mucosa.

Drogas que bloqueiam a síntese de NO agravam macro e microscopicamente as lesões associadas ao etanol e reduzem o fluxo sanguíneo da mucosa, alterando a hemodinâmica gástrica. Esses efeitos são reduzidos pela administração de L-arginina, que é um substrato para a formação de NO (MASUDA *et al.*, 1995).

A utilização de inibidores da síntese de NO, como o L-NAME, tem sido feita para avaliar o efeito da via da síntese do NO sobre o efeito gastroprotetor de várias drogas (LEITE *et al.*, 2008; OLINDA *et al.*, 2008; LIRA *et al.*, 2009; MORAIS *et al.*, 2010; CERQUEIRA *et al.*, 2012). O L-NAME é hidrolisado em L-nitroarginina que inativa a NOS (PFEIFEER *et al.*, 1996).

Para verificar a possível participação de NO no efeito gastroprotetor de PrLP, o L-NAME foi utilizado previamente à administração de PrLP e L-arginina. Foi observado que esse inibidor inespecífico de NOS reverteu o efeito gastroprotetor de PrLP e de L-arginina, sugerindo a participação de NO na proteção gástrica demonstrada por PrLP.

Com o objetivo de complementar o estudo da participação de NO no efeito gastroprotetor promovido por PrLP, foi realizada a dosagem da quantidade nitrito/nitrato nas amostras dos estômagos. Esses dois íons são produtos do metabolismo do NO, logo, esta é uma forma indireta de avaliar a quantidade de NO nos tecidos. Os resultados mostraram que os níveis de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ nos estômagos de animais que receberam apenas etanol foram significativamente reduzidos. Por outro lado, nos estômagos pré-tratados com PrLP e lesionados com o etanol houve um aumento da quantidade desses íons, corroborando com o resultado mostrado na abordagem de modulação com L-NAME. Adicionalmente, os animais que receberam

L-arginina também tiveram os níveis de nitrato/nitrito aumentados significativamente em relação ao grupo que recebeu apenas etanol.

Estes resultados são consistentes e sinalizam fortemente para o envolvimento do NO no efeito gastroprotetor de PrLP. Possivelmente, o tratamento dos animais com PrLP induz aumento dos níveis de óxido nítrico na mucosa gástrica provavelmente, por induzir um aumento da expressão de NOS constitutivas, aumentando assim a eficiência de suas ações catalíticas.

Alguns trabalhos relatam que o óxido nítrico e as prostaglandinas atuam de forma cooperativa modulando a microcirculação gástrica e estimulando a síntese de muco (SAKAI *et al.*, 1995; WALLACE; GRANGER 1996; MUSCARA; WALLACE, 1996; BROWN *et al.*, 1996; WALLACE, 1996; DING *et al.*, 1997). Também é sabido que o NO age aumentando a permeabilidade vascular e a produção de prostaglandinas (RANG *et al.*, 2007). Assim, os resultados do presente trabalho concordam com os dados da literatura, uma vez que foi demonstrado a participação desses dois mediadores no efeito protetor de PrLP.

O GMPc é um nucleotídeo sintetizado no interior da célula pela ação de uma enzima conhecida como guanilato ciclase. Esta enzima é ativada pelo óxido nítrico, formando GMPc a partir do ATP (BEAVO, 1995; POLSON; STRADA, 1996). A produção do GMPc é o principal mecanismo pelo qual o NO produz muitos dos seus efeitos fisiológicos (CHÁVEZ-PIÑA *et al.*, 2010). O ODQ é um inibidor altamente seletivo da guanilato ciclase solúvel e vários trabalhos utilizam essa droga para identificar se efeitos benéficos de drogas na úlcera gástrica envolve a enzima guanilato ciclase e o GMPc (BRZOZOWSKI *et al.*, 2000; MEDEIROS *et al.*, 2008; CHÁVEZ-PIÑA *et al.*, 2010).

Nesse trabalho o ODQ foi utilizado para avaliar se o efeito protetor de PrLP é dependente da produção de GMPc. O grupo tratado previamente com PrLP teve a porcentagem de lesão gástrica reduzida significativamente em relação ao grupo tratado apenas com etanol e a administração prévia de ODQ reverteu essa proteção gástrica, mostrando que o efeito da fração proteica é dependente de GMPc.

Já foi demonstrado que NO tem um papel fundamental no efeito protetor gástrico de PrLP e já é estabelecido que o efeito vasodilatador de NO é mediado pela estimulação da guanilato ciclase e conseqüente liberação de GMPc (DENNINGER *et al.*, 2001). Assim podemos sugerir que o efeito protetor de PrLP é dependente da liberação de NO e com o envolvimento da guanilato ciclase e GMPc.

Medeiros *et al.* (2008) obtiveram resultados semelhantes, demonstraram que o efeito antiulcerogênico do sildenafil (droga utilizada para impotência sexual) ocorre através do envolvimento de NO e GMPc.

Os canais de potássio ATP - dependentes (K_{ATP}) pertencem a uma grande família de proteínas de membrana. Estes canais regulados por ligantes são definidos tendo por base a sua sensibilidade ao ATP intracelular, que inibe sua atividade. Tais canais já foram descobertos em vários órgãos, como coração, pâncreas, rim e cérebro, e também podem ser encontrados nos músculos lisos e esqueléticos (NOMA, 1983; ASHCROFT *et al.*, 1984; HUNTER; GIEBSCH, 1988; ASHFORD *et al.*, 1988; STANDEN *et al.*, 1989; SPRUCE *et al.*, 1985).

Tem sido postulado que os canais de K_{ATP} estão envolvidos em uma variedade de funções fisiopatológicas no estômago tais como: regulação do fluxo sanguíneo, secreção de ácido gástrico e contratilidade da musculatura gástrica (TOROUDI *et al.*, 1999).

Alguns compostos, como o diazóxido, ativam e abrem os canais de potássio em diversos tecidos, causando hiperpolarização da membrana plasmática e redução da atividade elétrica (ASHCROFT; GRIBLLE, 2000; JAHANGIR *et al.*, 2001). O diazóxido, no estômago, inibe as lesões na mucosa gástrica induzidas por etanol, enquanto a glibenclamida, um agente hipoglicemiante oral que estimula a secreção de insulina por bloquear os canais de potássio ATP - dependentes, aumenta as lesões gástricas (TOROUDI *et al.*, 1999; GUEDES *et al.*, 2008; RODRIGUES, 2008). A capacidade da glibenclamida de alterar a resposta gastroprotetora de algumas drogas tem sido aceita como evidência para sugerir o envolvimento dos K_{ATP} nos eventos biológicos (FREITAS *et al.*, 2011; SAXENA *et al.*, 2011; ABDON *et al.*, 2012).

Para avaliar se o efeito gastroprotetor de PrLP está envolvido com K_{ATP} utilizamos a glibenclamida e o diazóxido. O diazóxido, bem como PrLP foram eficientes em reduzir a porcentagem de lesão gástrica induzida pelo etanol, no entanto, a administração prévia de glibenclamida reverteu o efeito de ambas. Sugerindo que a ação benéfica de PrLP é dependente de K_{ATP} .

Alguns trabalhos sugerem que a ação vasodilatadora das prostaglandinas endógenas e do NO se dá através da ativação de canais K_{ATP} . Essa estimulação pelo NO se dá através da ativação da guanilil ciclase com conseqüente liberação de

GMPc que ativa K_{ATP} (PESKAR *et al.*, 2002; MEDEIROS *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2009; CHÁVEZ-PIÑA *et al.*, 2010; ABDON *et al.*, 2012).

Analisando os prováveis mecanismos de ação da fração proteica de *P. rubra*, até o momento, podemos sugerir a participação das prostaglandinas, óxido nítrico e GMPc no efeito gastroprotetor de PrLP e essas vias devem estar acopladas a um sistema de abertura de canais de potássio sensíveis ao ATP, com conseqüente relaxamento endotelial na vasculatura gástrica e aumento do fluxo sanguíneo na região afetada, reduzindo, assim, a formação de úlceras.

A capsacina é o principal alcalóide responsável pela propriedade irritante da mucosa de plantas do gênero *Capsicum* (BARCELOUX, 2009). Tal substância age sobre os neurônios sensoriais estimulando os receptores de membrana, predominantemente os vanilóides (TRPV1- receptor de potencial transiente tipo 1), liberando neuropeptídeos tais como substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). A liberação de CGRP pela estimulação de neurônios aferentes ocasiona liberação de NO que resulta em proteção da mucosa gástrica pela estimulação da microcirculação (HOLZER, 1998). Em pequenas doses, a capsaicina funciona como um potente gastroprotetor, porém em altas doses, ela destrói seletivamente as terminações neuronais das fibras C, resultando em inativação dos nervos sensoriais (SZOLCSANYI; BAETHO, 2001; EVANGELISTA, 2006).

Estudos mostram que, no estômago, os nervos sensoriais aferentes sensíveis à capsacina estão envolvidos no sistema de defesa local contra a formação de úlceras e que a administração oral de capsaicina exerce proteção contra lesões gástricas induzidas por etanol (MÓZSIK *et al.*, 2007; CASTELO *et al.*, 2009). A capsazepina, droga inibidora dos receptores TRPV1 vem sendo bastante utilizada em modelos de úlcera gástrica para verificação do envolvimento desses receptores com diversas substâncias (EHRlich *et al.*, 2004; GUEDES *et al.*, 2008; MEDEIROS *et al.*, 2009; CERQUEIRA *et al.*, 2012).

No presente trabalho foi investigado se os receptores TRPV1 estão envolvidos no efeito protetor de PrLP. Observou-se que de forma semelhante à capsaicina, PrLP mostrou atividade gastroprotetora significativa quando comparada com o grupo controle e que o efeito gastroprotetor das duas substâncias foi revertido pela administração de capsazepina, sugerindo que esses receptores são importantes para o efeito gastroprotetor das proteínas do látex de *P. rubra*.

É bem conhecido que a ativação de neurônios aferentes sensíveis à capsaicina resultam em aumento da formação de NO (KAUNITZ; AKIBA, 2004), levando a uma vasodilatação. Os resultados obtidos com PrLP concordam com a literatura, uma vez que possivelmente essas proteínas também atuam estimulando essa via aferente, com conseqüente liberação do NO. Rodrigues e colaboradores (2010), mostram essa mesma relação, na qual o efeito gastroprotetor de um diterpeno parece estar o envolvido com ativação de receptores TRPV1 e aumento de NO, mostrando relação desses dois mecanismos de defesa da mucosa.

Neurônios aferentes contendo neuropeptídios estão bastante presentes na mucosa gástrica (STERNINI *et al.*, 1987). É bem conhecido que a ativação dos neurônios aferentes primários sensíveis à capsacina protege a mucosa gástrica da lesão por agentes irritantes, ao passo que a ativação e abertura dos canais K_{ATP} previnem os danos na mucosa induzida por etanol. Medeiros *et al.* (2009) sugerem que os receptores TRPV₁ e os canais K_{ATP} são co-expressos em neurônios aferentes, portanto estando envolvidos na proteção gástrica por sulfeto de hidrogênio. Bratz *et al.* (2008), em outros modelos, demonstraram que os receptores TRPV1 são funcionalmente expressos nos vasos e medeiam a vasodilatação endotélio-dependente através de um mecanismo envolvendo óxido nítrico e possivelmente canais de K_{ATP} . Esses trabalhos sustentam que receptores TRPV1 e canais K_{ATP} , estão, de alguma forma, relacionados e os resultados obtidos com PrLP corroboram com esses achados.

Diante da evidência de participação dos receptores TRPV1 e somando-se aos resultados das abordagens anteriores aqui demonstradas, podemos sugerir que PrLP promove seu efeito gastroprotetor no modelo estudado, através de um complexo que envolve a sensibilização de TRPV1, liberação de prostaglandinas e NO. As prostaglandinas atuariam diretamente através da liberação de NO ou por ativação direta de canais K_{ATP} e o NO levaria a liberação de prostaglandinas ou agiria estimulando a guanilil ciclase a liberar GMPc e esta, por sua vez, ativaria canais K_{ATP} . Além disso, a sensibilização de TRPV1 culminaria a liberação de NO e ativação de canais de K_{ATP} . Esses efeitos combinados levariam a secreção de muco e bicarbonato, ao aumento de fluxo sanguíneo gástrico e conseqüente proteção gástrica. Entretanto, estudos complementares serão necessários para melhor esclarecer e confirmar esta hipótese.

Mecanismos de ação gastroprotetores multifatoriais, como o das proteínas do látex de *P. rubra*, encontram-se relatados na literatura com diversos compostos de origem natural. Rios *et al.* (2010) demonstraram que a esculina, um derivado cumarínico, apresenta atividade gastroprotetora, possivelmente com o envolvimento de prostaglandinas, óxido nítrico e canais de potássio, Morais *et al.* (2010) demonstraram que o efeito gastroprotetor de lipídios fenólicos não isoprenóides, os ácidos anárdicos (AA), é dependente de fibras aferentes sensíveis à capsaicina, prostaglandinas, óxido nítrico e abertura de canais K_{ATP} . Além do trabalho de Chávez-Pinã *et al.* (2010) que mostra que o efeito gastroprotetor da carbenoxolona, um triterpenóide semi-sintético, resulta de um aumento nos níveis de prostaglandina e óxido nítrico (NO) com ativação da via NO/GMPc/ K_{ATP} .

A produção excessiva de radicais livres pode conduzir a danos celulares, sendo a causa ou o agravamento de inúmeras doenças, entre elas a úlcera gastrintestinal. Evidências clínicas e experimentais sugerem que o estresse oxidativo está bastante relacionado à etiopatologia da doença ulcerosa péptica, e que substâncias antioxidantes, podem desempenhar ação gastroprotetora (REPETTO *et al.*, 2002; THOMPSON *et al.*, 2006; FARIA, 2009; CERQUEIRA *et al.*, 2012).

As principais fontes de radicais livres são organelas citoplasmáticas detentoras de sistemas enzimáticos que utilizam oxigênio, nitrogênio, cloro, enxofre, hidrogênio, carbono e metais de transição nas reações metabólicas gerando metabólitos reativos em quantidade superior às condições homeostáticas (ROVER JUNIOR *et al.*, 2001).

Dentre os tipos de radicais livres, podem ser citados as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs, respectivamente). No trato gastrintestinal, os EROs como superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila são gerados em resposta a processos irritantes e inflamatórios, entre eles a privação do suprimento sanguíneo que provoca estresse oxidativo e a enzima NADPH oxidase que converte oxigênio molecular em ânions superóxido, enquanto que para os derivados do óxido nítrico está o peroxinitrito (NAKAGIRI; MURAKAMI, 2009).

Quando formados no meio biológico, estes radicais livres para se estabilizarem necessitam doar ou receber elétrons de outras moléculas, portanto tendem a reagir por oxidação com fosfolipídios de membrana, carboidratos, proteínas e DNA causando danos e morte celular (PAGLIA; VALENTINE, 1967). No entanto, o organismo possui um aparato antioxidante correspondente a fatores

enzimáticos e não enzimáticos que funcionam como mecanismo de radicais livres (ANDERSON, 1996; HALLIWELL *et al.*, 1995).

A GSH participa da proteção da mucosa pela ligação aos radicais-livres (efeito antioxidante) e por formar pontes de dissulfeto entre as subunidades do muco, de maneira a impedir a sua dissociação, portanto, a depleção desses grupamentos parece estar envolvida na formação da lesão (AVILA *et al.*, 1996). Nesse sentido, a GSH tem importância na redução do estresse oxidativo por eliminar radicais livres, reduzir os peróxidos e formar complexos com compostos eletrofílicos, de maneira a proteger estruturas celulares proteicas (DNA e lipídeos), além de proteger a célula de outros produtos tóxicos (KLAASSEM *et al.*, 1985; HAYES & MCLELLAN, 1999; KIMURA *et al.*, 2001).

As lesões gástricas induzidas por etanol estão relacionadas com a geração de radicais livres, essas lesões são produzidas por um desequilíbrio entre fatores celulares oxidantes e antioxidantes (REPETTO; LLESUY, 2002; NASSINI *et al.*, 2010). Assim, têm-se postulado que os efeitos deletérios do etanol na mucosa gástrica são consequência da peroxidação lipídica e redução dos níveis de glutathiona (RODRÍGUEZ *et al.*, 2007).

Assim, dando continuidade á investigação dos mecanismos envolvidos no efeito de PrLP aqui demonstrado, o envolvimento desta fração com as defesas antioxidantes foi investigado através da determinação dos níveis de GSH na mucosa gástrica dos animais.

Como era de se esperar, os resultados mostram que o etanol promoveu depleção dos níveis de GSH na mucosa gástrica e a administração de N-acetilcisteína (NAC), substância antioxidante doadora de grupos sulfidrilas, restabeleceu os níveis de GSH. O tratamento dos animais com PrLP foi capaz de restaurar, não completamente, mas de maneira significativa, os níveis de GSH na mucosa, reduzidos após a administração de etanol absoluto.

Uma segunda abordagem foi feita no intuito de verificar se esse efeito protetor de PrLP é mediado através da estimulação da síntese endógena GSH ou por evitar a depleção dos níveis destes grupos. Assim, os níveis de GSH foram quantificados em animais que receberam NAC e PrLP sem que houvesse a indução da úlcera por álcool. Como já era esperado, NAC aumentou os níveis de GSH, entretanto PrLP não alterou os níveis desse componente antioxidante, mostrando que o efeito antioxidante de PrLP se dá no sentido de evitar a depleção de GSH.

O efeito antioxidante de PrLP foi relatado por FREITAS e colaboradores (2010) que mostraram que as proteínas laticíferas de *P. rubra* apresentam atividade antioxidante *in vitro*. Assim, esse efeito também é responsável pela gastroproteção promovida pelas proteínas laticíferas, pois substâncias antioxidantes podem desempenhar ação gastroprotetora (REPETTO *et al.*, 2002; THOMPSON *et al.*, 2006; DURSUN *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2011). Adicionalmente, já foi demonstrado que látex de plantas tem efeito gastroprotetor com envolvimento de mecanismos antioxidantes, como por exemplo, a suspensão e o extrato metanólico do látex de *Calotropis procera*, que apresentaram efeito protetor gástrico frente à diferentes modelos de úlcera e esse efeito foi explicado, em parte, pelo aumento da atividade de fatores antioxidantes, como por exemplo GSH e SOD (BHARTI *et al.*, 2010). Tal dado concorda com os resultados obtidos com as proteínas laticíferas de *P. rubra*, que também resultaram em aumento nos níveis de GSH.

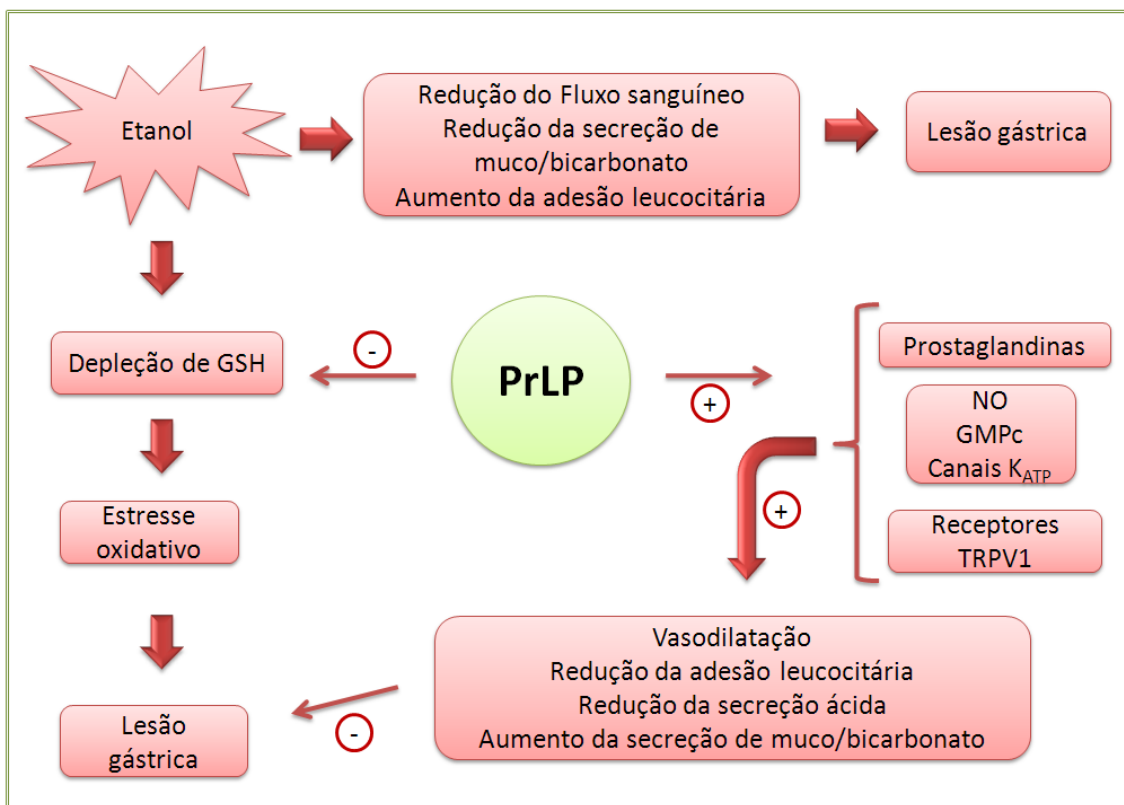
Finalmente, os resultados do presente estudo indicam que PrLP apresenta efeito gastroprotetor, e se mostra como uma alternativa promissora para aumentar a resistência da mucosa gástrica à injúria por etanol, com menos efeitos adversos. Acreditamos que este estudo pode sugerir uma nova aplicação biotecnológica para as proteínas do látex de *P. rubra*, e apresentando como vantagens o baixo custo e baixa toxicidade. Entretanto, estudos complementares são importantes e necessários para credenciar PrLP como uma potente ferramenta de origem natural que possa vir a ser utilizada para a prevenção da úlcera gástrica.

8. CONCLUSÃO

As proteínas do látex de *P. rubra* (PrLP) possuem efeito gastroprotetor na mucosa, provavelmente dependente de mecanismos vasodilatadores mediados pela via NO\GMPc\K_{ATP}, prostaglandinas endógenas e receptores TRPV1, bem como, pela proteção da mucosa contra os radicais livres evitando a depleção de GSH. Além disso, podemos sugerir que o uso de PrLP não causa toxicidade aguda aos animais.

Podemos, dessa forma, sugerir um possível mecanismo de ação para o efeito gastroprotetor de PrLP. (Figura 22).

Figura 22 – Mecanismo hipotético do efeito gastroprotetor de PrLP.



REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, T.M.; ALENCAR, N.M.N.; FIGUEIREDO, J.G.; FIGUEIREDO, I.S.T; TEIXEIRA, C.M.; BITENCOURT, F.S.; SECCOC, D.D.; ARAÚJO, E.S.; LEÃO, A.M.; RAMOS, M.V. Vascular permeability, neutrophil migration and edematogenic effects induced by the latex of *Cryptostegia grandiflora*. **Toxicon.**; v. 53, p. 15–23, 2009.
- AGRAWAL, A. A.; KONNO, K. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology and evolution plant defense against herbivory. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**; v. 40, p. 311-331, 2009.
- AKKOL, E.; ARCHER, B. An alkaline protease inhibitor from *Hevea brasiliensis* latex. **Phytochemistry.**; v.23, p.633-639, 1983.
- AKKOL, E.K.; KOCA, U.; PESIN, I.; YILMAZER, D.; TOKER, G.; YESILADA, E. Exploring the wound healing activity of *Arnebia densiflora* (Nordm.) Ledeb. by *in vivo* models. **J. Ethnopharmacol.**; v.124, p.137-141, 2009.
- AIRES, M. M. **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- AL-HARBI, M.M.; QURESHI, S.; RAZA, M.; AHMED, M.M.; AFZAL, M.; SHAH A. H. Gastric antiulcer and cytoprotective effect of Commiphoramolmol in rats. **J. Ethnopharmacol.**; v. 55, p. 141-150, 1997.
- ALQASOUMI, S.; AL-SOHAIBANI, M.; AL-HOWIRINY, T.; AL-YAHYA, M. Rafatullah S. Rocket “*Eruca sativa*”: A salad herb with potencial gastric anti-ulcer acivity. **World J. Gastroenterol.**; v. 15, p. 1958-1965, 2009.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutat. Res.**; v. 350, p. 103-108, 1996.
- ARCHER, B. An alkaline protease inhibitor from *Hevea brasiliensis* latex. **Phytochemistry.**; v. 23, p.633-639, 1983.
- ASHCROFT, F.M.; HARRISON, D.E.; ASHCROFT, S.J.H. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic β -cells. **Nature.**; v. 312, p. 446-448, 1984.
- ASHCROFT, F.M.; GRIBBLE, F.M. New windows on the mechanism of action of K(ATP) channel openers. **Trends Pharmacol. Sci.**; v. 11, p. 439-445, 2000.
- ASHFORD, M.L.; STURGESS, N.C.; TROUT, N.J.; GARDNER, N.J.; HALES, C.N. Adenosine-5'-triphosphate-sensitive ion channels in neonatal rat cultured central neurons. **Pflug Arch.**; v. 412, p. 297-304, 1988.
- ATAY, S.; TARNAWSKI, A. S.; DUBOIS, A. Eicosanoids and the stomach. **Prostag. Oth Lipid M.**; v. 1, p. 105-124, 2000.

- AVILA, J.R.; LASTRA, A.D.L.; MARTÍN, M.J.; MOTILVA, V.; LUQUE, I.; DELGADO, D.; ESTEBAN, J.; HERRERIAS, J. Role of endogenous sulphhydryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. **Inflamm. Res.**; v. 45, p. 83-88, 1996.
- BANU, J. R.; JAYAKAR, B. Anti cancer activity of ethanolic extract of Leaves of *Plumeria rubra* (Linn). **Curr. Pharm. Res.**; v. 1, p.175-179, 2011.
- BARCELOUX, D.G. Pepper and capsaicin (Capsicum and Piper species). **DM Dis-a-Month.**; v. 55, p. 380-390, 2009.
- BARKUN, A.; LEONTIADIS, G. Systematic Review of the Symptom Burden, Quality of Life Impairment and Costs Associated with Peptic Ulcer Disease. **Am. J. Med.**; v. 123, p. 358-366, 2010.
- BAYIR, H. Reactive oxygen species. **Crit Care Med.**; v. 33, p. 498-501, 2005.
- BAYIR, Y.; ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; ASLAN, A.; SULEYMAN, H.; HALICI, M.; KAZAZ, C. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. **Phytomedicine.**; v. 13, p. 584-590, 2006.
- BEGUM, H.; SULOCHANA, N.; MERINA, A.J.; SIVANESA, D. Antioxidant and hypolipidemic effect Of *Plumeria Rubra* L. In alloxan Induced hyperglycemic rats. **J. Chem.**; v.7, p.1-5, 2010.
- BEAVO, J.A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. **Physiol. Rev.**; v. 75, p. 725-745, 1995.
- BEZERRA, D.P.; CASTRO, O.; ALVES, A.P.P.N.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.S.; LIMA, M.A.S.; ELMIRO, F.J.M.; ALENCAR, N.M.N.; MESQUITA, R.O.; LIMA, M.W.; LOTUFO, L.V.C. *In vitro* and *in vivo* antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **J. Appl. Toxicol.**; v. 28, p. 156–163, 2008.
- BHARTI,S.; WAHANE, V.D.; KUMAR, V.L. Protective effect of *Calotropis procera* latex extracts on experimentally induced gastric ulcers in rat. **J. Ethnopharmacol.**; v. 127, p. 440–444, 2010.
- BRATZ, I.N.; DICK, G.M.; TUNE, J.D.; EDWARDS, J.M.; NEEB, Z.P.; DINCER, U.D.; STUREK, M. Impaired capsaicin-induced relaxation of coronary arteries in a porcine model of the metabolic syndrome. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**; v. 294, p. 2489–2496, 2008.
- BROWN, J.F.; KEATES, A.C.; HANSON, P.J.; WHITTLE, B.J. Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells. **Am. J. Physiol.**;v. 265, p. 418-422, 1993.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics**. 11th ed. United States of America: Mc Graw-Hill Companies, 2006.

BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P.C.; KONTUREK, S.J.; SLIWOWSKI, Z.; DROZDOWICZ, D.; KWIECIEŃ, S.; PAJDO, R.; PTAK, A.; PAWLIK, M.; HAHN, E. Gastroprotective and ulcer healing effects of nitric oxide-releasing non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Dig. Liver Dis.**; v. 7, p. 583-594, 2000.

BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P.C.; DROZDOWICZ, D.; KONTUREK, S.J.; ZAYACHIVSKA, O.; PAJDO, R.; KWIECIEŃ, S.; PAWLIK, W.W.; HAHN, E.G. Grapefruit-seed extract attenuates ethanol and stress-induced gastric lesions via activation of prostaglandin, nitric oxide and sensory nerve pathways. **World J. Gastroenterol.**; v. 11, p. 6450–6458, 2005.

BRZOZOWSKI, P.C.; KONTUREK, R.; PAJDO, A.; PTAK-BELOWSKA, S.; KWIECIEŃ, M.; PAWLIK, D.; DROZDOWICZ, Z.; SLIWOWSKI, B.; BRZOZOWSKI, S.J.; KONTUREK, W.W. Physiological mediators in nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) - induced impairment of gastric mucosal defense and adaptation. Focus on nitric oxide and lipoxins. **J. Physiol. Pharmacol.**; v. 59, p. 89-102, 2008.

BRZOZOWSKI, T.; PTAK-BELOWSKA, A.; KWIECIEŃ, S.; KRZYSIEK-MACZKA, G.; STRZALKA, M.; DROZDOWICZ, D.; PAJDO, R.; OLSZANECKI, R.; KORBUT, R.; KONTUREK, S.J.; PAWLIK, W.W. Novel concept in the mechanism of injury and protection of gastric mucosa: role of renin-angiotensin system and active metabolites of angiotensin. **Curr. Med. Chem.**; v. 19, p.55-62, 2012.

BODE, J.C. Alcohol and the gastrointestinal tract. **Ergebnisse der Inneren Medizin und Kinderheilkunde.**; v. 45, p. 1-75, 1980.

BORRELLI, F.; IZZO, A.A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytother. Res.**; v.14, p.581-591, 2000.

CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. **Annu. Rev. Biochem.**; v. 58, p. 79-110, 1989.

CALDAS, G.F.R.; COSTA, I.M.A.; SILVA, J.B.R.; NÓBREGA, R.F.; RODRIGUES, F.F.G.; MARTINS DA COSTA, J.G.M.; WANDERLEY, A.G. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth. (Lamiaceae). **J. Ethnopharmacol.**; v.137, p.886– 892, 2011.

CAMBON, E.; GOUZOU, F.; PINA, M.; BAREA, B.; BAROUH, N.; LAGO, R.; RUALES, J.; TSAI, S.; VILLENEUVE, P. Comparison of the lipase activity in hydrolysis and acyl transfer reactions of two latex plant extracts from Babaco (*Vasconcellea X Heilbornii* Cv.) and *Plumeria rubra*: Effect of the aqueous microenvironment. **J. Agric. Food Chem.**; v.54, p. 2726-2731, 2006.

CARTAXO, S.L.; SOUZA, M.M.A.; ALBUQUERQUE, P.U. Medicinal plants with bioprospecting potential use in semi-arid northeastern Brazil. **J. Ethnopharmacol.**; v. 131, p. 326–342, 2010.

CARVALHO, A.C.S.; GUEDES, M.M.; SOUZA, A.L.; TREVISAN, M.T.S.; LIMA, A.F.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Gastroprotective effect of mangiferin, a xanthonoid from *Mangifera indica*, against gastric injury induced by ethanol and indomethacin in rodents. **Planta Med.**; v.73, p.1372-1376, 2007.

CASTELO, A.P.; ARRUDA, B.N.; COELHO, R.G.; HONDA, N.K.; FERRAZOLI, C.; POTT, A.; HIRUMA-LIMA, C.A. Gastroprotective effect of *Serjania erecta* Radlk (Sapindaceae): involvement of sensory neurons, endogenous nonprotein sulfhydryls, and nitric oxide. **J. Med. Food.**; v. 6, p. 1411-1415, 2009.

CERQUEIRA, G.S.; SILVA, G.S.; VASCONCELOS, E.R.; FREITAS, A.P.F.; MOURA, B.A.; MACEDO, D.S.; SOUTO, A.L.; FILHO, J.B.M.; LEAL, L.K.A.; BRITO, G.A.C.; SOUCCAR, C.; VIANA, G.S.B. Effects of hecogenin and its possible mechanism of action on experimental models of gastric ulcer in mice. **Eur. J. Pharmacol.**; v. 683, p. 260–269, 2012.

CHANDA, I.; SARMA, U.; BASU, K.S.; LAHKAR, M.; DUTTA, S.K. A Protease Isolated from the Latex of *Plumeria rubra* Linn (Apocynaceae) 2: Anti- inflammatory and Wound- Healing Activities. **Trop. J. Pharm. Res.**; v. 10, p. 755-760, 2011.

CHEN, D.; AIHARA, T.; ZHAO, C.M.; HÅKANSON, R.; OKABE, S. Differentiation of the Gastric Mucosa I. Role of histamine in control of function and integrity of oxyntic mucosa: understanding gastric physiology through disruption of targeted genes. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**; v. 291, p. 539-544, 2006.

CHEYE, M. L.; CHEUNG, K.Y. Beta-1,3-glucanase is highly-expressed in laticifers of *Hevea brasiliensis*. **Plant. Mol. Biol.**; v.29, p.397-402, 1995.

CHO, C.H.; PFEIFFER, C.J.; MISRA, H.P. Ulcerogenic mechanism of ethanol and the action of sulphanilyl fluoride on the rat stomach in-vivo. **J. Pharm. Pharmacol.**; v.43, p. 495-498, 2001.

CHO, C.H.; HAN, P.W. Papain reduces gastric acid secretion induced by histamine and other secretagogues in anesthetized rats. **Proc. Natl. Sci. Council. Repub. China B.**; v.8, p. 177-181, 1984.

CHO, C.H.; HUA, M.F.; CHOU, C.K.; HO, L.T. Protection of zinc sulphate against necrosis induced by ethanol in rats. **Proc. Natl. Sci. Council.**; v. 7, p. 261-267, 1983.

CNUBBEN, N.H.P.; RIETJENS, I.M.C.M.; WORTELBOER, H.; ZANDEN, J.; BLADEREN, P.J. The interplay of glutathione-released process in antioxidant defense. **Environ. Toxicol. Pharm.**; v. 10, p. 141 – 152, 2001.

COELHO-DE-SOUZA, A.N.; LAHLOU, S.; BARRETO, J.E.; YUM, M.E.; OLIVEIRA, A.C.; OLIVEIRA, H.D.; CELEDÔNIO, N.R.; FEITOSA, R.G.; DUARTE, G.P.; SANTOS, C.F.; DE ALBUQUERQUE, A.A.; LEAL-CARDOSO, J.H. Essential oil of *Croton zehntneri* and its major constituent anethole display gastroprotective effect by increasing the surface mucous layer. **Fundam. Clin. Pharmacol.**; 2012.

DARULIZA, K.M.; YANG, K.L.; LAM, K.L.; PRISCILLA, J.T. SUNDERASAN, E., ONG, M.T. Anti-Candida albicans activity and brine shrimp lethality test of Hevea brasiliensis latex B-serum. **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.**; v. 15, p. 1163-71, 2011.

DAVENPORT, H.W. Ethanol damage to canine oxytic glandular mucosa. **P Soc Exp Biol Med.**; v. 126, p. 657- 662, 1967.

DAVENPORT, H.W. Gastric mucosal hemorrhage in dogs. Effects of acid, aspirin, and alcohol. **Gastroenterology.**; v. 56, p. 439–449, 1969.

DAUT, J.; KLIEBER, H.G.; CYRYS, S.; NOACK, T.K. ATP channels and basal coronary vascular tone. **Cardiovasc Res.**; v. 28, p. 811-817, 1994.

DEMBINSK, A.; WARZECHA, Z.; CERANOWICZ, P.; BRZOZOWSKI, T.; DEMBINSK, M.; KONTUREK, S.J.; PAWLIK, W.W. Role of capsaicin- sensitive nerver and histamine H1, H2 and H3 receptors in the gastroprotective effects of histamine against stress ulcers in rats. **Eur J Pharmacol.**; v. 508, p. 211-221, 2005.

DING, M.; KINOSHITA, Y.; KISHI, K.; NAKATA, H.; HASSAN, S.; KAWANAMI, C.; SUGIMOTO, Y.; KATSUYAMA, M.; NEGISHI, M.; NARUMIYA, S.; ICHIKAWA, A.; CHIBA, T. Distribution of prostaglandin E receptors in the rat gastrointestinal tract. **Prostaglandins.**; v. 53, p. 199–216, 1997.

DOMSALLA, A.; MELZIG, M. F. Occurrence and properties of proteases in plant latices. **Planta Med.**; v.74, p.699-711, 2008.

DRUGDEX® Evaluations, *Sucralfate* MICROMEDEX® 1.0 (Healthcare Series). Disponível em: <http://www.thomsonhc.com/hcs/librarian/ND_T/H_S/ND_PR/Main/CS/9CEB05/DUPLICATIONSHIELDSYNC/25AEA6/ND_PG/PRIH/ND_B/HCS/SBK/7/ND_P/Main/PFActionId/hcs.common.RetrieveDocumentCommon/DocId/0630/ContentSetId/31/SearchTerm/sucralfate%20/SearchOption/BeginWith> Acesso em: 17 de Março de 2012.

DURSun, H.; BILICI, M.; ALBAYRAK, F.; OZTURK, C.; SAGLAM, B. M.; ALP, H.; SULEYMAN, H. Antiulcer activity of fluvoxamine in rats and its effect on oxidant and antioxidant parameters in stomach tissue. **Gastroenterol.**; v. 36, 2009.

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

EGWAIKHIDE, P.A.; OKENIYI, S.O.; GIMBA, C.E. Screening for anti-microbial activity and phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. **J Med Plants Res.**; v. 3, p.1088–1089, 2009.

EHRlich, K.; SICKING, C.; RESPONDEK, M.; PESKAR, B.M. Interaction of cyclooxygenase isoenzymes, nitric oxide, and afferent neurons in gastric mucosal defense in rats. **J Pharmacol Exp Ther.**; v. 308, p. 277-283, 2004.

ELLIOTT, R.J.; PORTER, A.G. A rapid cadmium reduction method for the determination of nitrate in bacon and curing brines. **Analyst.**; v.96, p. 522-527, 1971.

EVANGELHISTA, S. Role of sensory neurons in restitution and healing of gastric ulcers. **Curr Pharm Des.**; v. 12, p. 2977-84, 2006.

EZIKE, A.C.; AKAH, P.A.; OKOLI, C.O.; EZEUCHENNE, N.A.; EZEUGWU, S. Carica papaya (Paw-Paw) Unripe Fruit May Be Beneficial in Ulcer. **J Med Food.**; v. 12, p.1268–1273, 2009.

FARIA, F.M.; ALMEIDA, A.C.; FERREIRA, L.A.; DUNDER, R.J.; SILVA, M.A.; SALVADOR, M.J.; ABDELNUR, P.V.; EBERLIN, M.N.; VILEGAS, W.; TOMA, W.; SOUZA, A.R.B. Antioxidant Action of Mangrove Polyphenols against Gastric Damage Induced by Absolute Ethanol and Ischemia-Reperfusion in the Rat. **Scientific World Journal.**; 2012.

FLEMSTRÖM, G.; ISENBERG, J.I. Gastroduodenal mucosal alkaline secretion and mucosal protection. **News Physiol Sci.**; v. 16, p. 23-8, 2001.

FREITAS, D.T.; SOUZA, D.P.; ARAÚJO, E.S.; CAVALHEIRO, M.G.; OLIVEIRA, L.S.; RAMOS, M.V. Anti-oxidative and proteolytic activities and protein profile of laticifer cells of *Cryptostegia grandiflora*, *Plumeria rubra* and *Euphorbia tirucalli*. **Braz. J. Plant Physiol.**; v. 22, p.11-22, 2010.

FREITAS, F.F.B.P.; FERNANDESA, C.A.; PIAUILINO, S.S.; PEREIRA, K.I.M.; CARVALHO, M.H.; CHAVES, P.M.G.; MIURAD, J.R.S.A.; LEITE, R.C.M.; OLIVEIRA, F.A. Gastroprotective activity of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. in animal models. **J Pharmacol.**; v. 137, p. 700-708, 2011.

GIORDANI, R.; LAFON, L. Action of *Carica papaya* latex on cell wall glycosidases from *Lactuca sativa*. **Phytochemistry.**; v.34, p.1473-1475, 1993.

GLAVIN, G.B.; SZABO, S.; JOHNSON, B.R.; XING, P.L; MORALES, R.E.; PLEBANI, M.; NAGY, L. Isolated rat gastric mucosal cells: optimal conditions for cell harvesting, measures of viability and direct cutoprotection. **J Pharmacol Exp Ther.**; v. 276, p. 1174- 1179, 2006.

GREEN, L. C.; TANNENBAUN, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate syntesis in Parkinson´s disease using the model of the 6-hydroxydopamine and MPTP. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**; v. 899, p. 262-273, 2000.

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

GUEDES, M.M.; CARVALHO, A.C.; LIMA, A.F.; LIRA, S.R.; DE QUEIROZ, S.S.; SILVEIRA, E.R.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. Gastroprotective mechanisms of centipedic acid, a natural diterpene from *Egletes viscosa* LESS. **Biol Pharm Bull.**; v. 7, p. 1351-1355, 2008.

- GUSLANDI, M. Effect of ethanol on the gastric mucosa. **Dig. Disg.**; v. 5, p. 21-32, 1987.
- GUTH, P.H. Current concepts in gastric microcirculatory pathophysiology. **Yale J Biol Med.**; v.65, p. 677-688, 1992.
- HAGEL, J. M.; YEUNG, E. C.; FACCHINI, P. J. Got milk? the secret life of laticifers. **Trends in Plant Sci.**; v.13, p.631-639, 2008.
- HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; ARUOMA, O. J. The characterization of antioxidants. **Food Chem Toxicol.**; v. 33, p. 601-617, 1995.
- HAM, M.; KAUNITZ, J.D. Gastroduodenal defense. **Curr Opin Gastroenterol.**; v. 23, p. 607–616, 2007.
- HAM, A.W. Histologia. 9^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.
- HAMBURGER, M.O.; CORDELL, G.A.; RUANGRUNGSI, N. Traditional medicinal plants of Thailand. XVII. Biologically active constituents of *Plumeria rubra*. **J Ethnopharmacol.**; v. 33, p. 289-292, 1991.
- HAWKEY, C. J.; RAMPTON, D. S. Prostaglandins and the gastrointestinal mucosa: are they important in its function, disease, or treatment? **Gastroenterology.**; v. 89, p. 1162-1188, 1985.
- HAWKEY, C.J. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. **Gastroenterology.**; v. 119, p. 521-535, 2000.
- HAYES, J.D.; MCLELLAN, L.I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. **Free Radic Res.**; v. 31, p. 273-300, 1999.
- HIGUCHI. K.; UMEGAKI, E.; YODA, Y.; TAKEUCHI, T.; MURANO, M.; TOKIOKA, S. The role of prostaglandin derivatives in a treatment and prevention for gastric ulcers in the aged patients. **Nihon Rinsho.**; v. 68, p. 2071-5, 2010.
- HOGBEN, C.A.M.; KENT, T.H.; WOODWARD, P.A.; SILL, A.J. Quantitative histology of gastric mucosa: Man, dog, cat, guine pig, and frog. **Gastroenterology.**; v. 67, p. 1143-1154, 1974.
- HOLZER, P. Neural Emergency System in the Stomach. **Gastroenterology.**; v. 114, p.823–839, 1998.
- HOLZER, P. Role of visceral afferent neurons in mucosal inflammation and defense. **Curr Opin Pharmacol.**; v. 7, p.563–569, 2007.
- HUNTER, M.; GIEBISCH, G. Calcium-activated K-channels of *Amphiuma* early distal tubule: inhibition by ATP. **Pflugers Arch.**; v. 412, p. 331–333, 1988.

ISHIHARA, K.; KUWARA, H.; OHARA, S.; OHKAWA, H.; OKABE, H.; HOTTA, K. Mucus glycoprotein and mucosal protection. **J. Clin. Gastroenterol.**; v. 10, p. 24-27, 1988.

JAHANGIR, A.; TERZIC, A.; SHEN, W. Potassium channel openers: therapeutic potential in cardiology and medicine. **Expert Opin. Pharmacother.**; v. 2, p. 1995–2010, 2001.

JAHOVIC, N.; ERKANLI, G.; ISERI, S.; ARBAK, S.; ALICAN, I. Gastric protection by α -melanocyte-stimulating hormone against ethanol in rats: Involvement of somatostatina. **Life Sciences.**; v. 80, p. 1040 - 1045, 2007.

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

JEKEL, P. A.; HARTMANN, B. H.; BEINTEMA, J. J. The primary structure of hevamine, an enzyme with lysozyme/chitinase activity from *Hevea brasiliensis* latex. **Eur. J. Biochem.**; v.200, p.123-130, 1991.

JOHNSON, L. R. *et al.* **Physiology of the gastrointestinal track.** 4. ed.: Elsevier Inc., 2006.

JORGE, R.M.; LEITE, J.P.V.; OLIVEIRA, A.B.; TAGLIATI, C.A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifoli*. **Journal of Ethnopharmacology.**; v.94, p.93–100, 2004.

JUNIOR, R.L.; HOEHR, N.F.; VELLASCO, A.P.; KUBOTA, L.T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quím Nova.**; v. 24, p. 112-119, 2001.

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

KAGAWA, S.; AOI, M.; KUBO, Y.; KOTANI, T.; TAKEUCHI, K. Stimulation by capsaicin of duodenal HCO₃ secretion via afferent neurons and vanilloid receptors in rats. Comparison with acid-induced HCO₃ response. **Digestive Diseases and Sciences.**; v. 48, p. 1850 -1856, 2003.

KARNODO, L. B. S.; TSAURI, S.; PADMAWINATA, K.; PEZZUTO, J. M.; KSINGHORN, D. Cytotoxic constituents of the bark of *Plumeria rubra* collected in Indonesia. **Journal of Natural Products.**; v.53, p.1447-1455, 1990.

KAUNITZ, J.D.; AKIBA, Y. Gastroduodenal mucosal defense: role of endogenous mediators. **Gastroenterology.**; v. 20, p. 526–532, 2004.

KEKWICK, R.G.O. Latex and laticifers. **Encyclopedia of Life Science.**; Nature Publishing Group, p. 1-6, 2001.

KIS, B.; SNIPES, J.A.; BUSIJA, D.W. Acetaminophen and the Cyclooxygenase-3 Puzzle: Sorting out Facts, Fictions, and Uncertainties. **JPET.**; v. 315, p. 1–7, 2005.

KLAASSEN, C.D.; BRACKEN, W.M.; DUDLEY, R.E.; GOERING, P.L.; HAZELTON, G.A.; HJELLE, J.J. Role of sulfhydryls in the hepatotoxicity of organic and metallic compounds. **Fundam Appl Toxicol.**; v. 5, p. 806-815, 1985.

KOBAYASHI, K.; ARAKAWA, T. Arachidonic acid cascade and gastric mucosal injury, protection, and healing: topics of this decade. **J Clin Gastroenterol.**; v. 21, 1995.

KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Berne & Levy – Fisiologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. cap. 26-30, p. 491 – 543.

KOMASAKA, M.; HORIE, S.; WATANABE, K.; MURAYAMA, T. Antisecretory effect of somatostatin on gastric acid via inhibition of histamine release in isolated mouse stomach. **Eur J Pharmacol.**; v.452, p.235-243, 2002.

KOTARO KONNO. Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein. **Phytochemistry.**; v.7, p.1510–1530., 2011.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F.F.A.C.; CUNHA, B.C.A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. 2004/2005. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KO, J.K.S.; CHO, C.H.; LAM, S.K. Adaptive cytoprotection through modulation of nitric oxide in ethanol- evoked gastritis. **World J Gastroentero.**; v. 10, p. 2503- 2508, 2004.

KUIGOUA, G.M.; KOUAM, S.F.; NGADJUI, B.T.; SCHULZ, B.; GREEN, I.R.; CHOUDHARY, M.I.; KROHN, K. Minor secondary metabolic products from the stem bark of *Plumeria rubra* Linn. displaying antimicrobial activities. **Planta Med.**; v. 76, p. 620-625, 2010.

KUMAR, V.L.; SEHGAL, R. Calotropis procera latex-induced inflammatory hyperalgesia - effect of bradyzide and morphine. **Auton Autacoid Pharmacol.**; v.27, p. 143-149, 2007.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: Bench to bedside. **Gastroenterology.**; v. 135, p. 41-60, 2008.

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

LANAS, A. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract. **Arthritis Research & Therapy.**; v. 10, 2008.

LANDIS, G.N.; TOWER, J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. **Mechanisms of Ageing and Development.**; v. 126, p. 365-379, 2005.

LEIER, I.; JEDLITSCHKY, G.; BUCHHOLZ, U.; CENTER, M.; COLE, S.P.; DEELEY, R.G.; KEPPLER, D. ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump. **Biochemical Journal.**; v. 314, p. 433 - 437, 1996.

LEITE, G.O.; PENHA, A.R.; FERNANDES, C.N.; SOUZA, H.H.F.; COSTA, J.G.M.; CAMPOS, A.R. Gastroprotective mechanism of *Vanillosmopsis arborea* bark essential oil. **Fitoterapia.**; v. 80, p. 77-80, 2008.

LEITE, G.D., PENHA, A.S., DA SILVA, G.Q., COLARES, A.V., RODRIGUES, F.G., COSTA, J.G., CARDOSO, A.L., CAMPOS, A.R. Gastroprotective effect of medicinal plants from Chapada do Araripe, Brazil. **Journal of Young Pharmacists.**; v.1, p. 54-56, 2009.

LEMONS, L.M.S.; MARTINS, T.B; TANAJURA, G.H.; GAZONI, V.F.; BONALDO, J.; STRADA, C.L.; SILVA, M.G.; DALL'ÍOGLIO, E.L.; SOUSA JÚNIOR, P.T.; OLIVEIRA MARTINS, D.T.O. Evaluation of antiulcer activity of chromanone fraction from *Calophyllum brasiliense* Camb. **J Ethnopharmacol.**; v. 141, p. 432- 439, 2012.

LEWIS, S. M.; BAIN, B. J.; BATES, I. **Dacie and Lewis Practical Haematology**, 10^a Edição, 2006.

LEWINSOHN, T.M. The geographical distribution of plant latex. **Chemoecology.**; v.2, p.64–68, 1991.

LIMA, Z.P.; CALVO, T.R.; SILVA, E.F.; PELLIZZON, C.H.; VILEGAS, W.; BRITO, A.R.; BAUAB, T.M.; HIRUMA-LIMA, C.A. Brazilian medicinal plant acts on prostaglandin level and *Helicobacter pylori*. **J Med Food.**; v.11, p.701–708, 2008.

LIMA-FILHO, J.V.M.; PATRIOTA, J.M.; SILVA, A. F.; FILHO, N. T.; OLIVEIRA, R.S.B.; ALENCAR, N.M.N.; RAMOS, M.V. Proteins from latex of *Calotropis procera* prevent septic shock due to lethal infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **J Ethnopharmacol.**; v.129, p.327-334, 2010.

LIPOF, T.; SHAPIRO, D.; KOZOL, R.A. Surgical perspectives in peptic disease and gastritis. **World J Gastroenterol.**; v. 12, p. 3248-3252, 2006.

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.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 2. ed. São Paulo: **Instituto Planatarum.**; p. 250, 1999.

LU, S.C. Regulation of glutathione synthesis. **Curr Topics Cell Regulation.**; v. 36, p. 95 - 116, 2000.

LYNN, K. R.; CLEVETTE-RADFORD, N. A. Acid phosphatases from latices of Euphorbiaceae. **Phytochemistry.**; v.26, p.655-657, 1987.

MACMICKING, J.; XIE, Q.; NATHA, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu Rev Immunol.**; v. 15, p. 323–350, 1997.

MASUDA, E.; KAWANO, S.; NAGANO, K.; TSUJI, S.; TAKEI, Y.; TSUJII, M.; OSHITA, M.; MICHIDA, T.; KOBAYASHI, I.; NAKAMA, A. Endogenous Nitric Oxide Modulates Ethanol-Induced Gastric Mucosal Injury in Rats. **Gastroenterology.**; v. 108, p. 58-64, 1995.

MARQUES, L.M. Proteínas isoladas do látex de *himatanthus drasticus* (mart.) plumel (apocynaceae) protegem a mucosa gástrica de camundongos contra lesões induzidas por etanol: envolvimento da *via* no/gmpc/k_{atp} e da glutatona. **Universidade Federal do Ceará.**, 2012.

MATES, J.M.; PEREZ-GOMEZ, C.; DE CASTRO, I.N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry.**; v. 32, p. 595-603, 1999.

MATSUHASHI, T.; OTAKA, M.; ODASHIMA, M.; JIN, M.; KOMATSU, K.; WADA, I.; HORIKAWA, Y.; OHBA, R.; OYAKE, J.; HATAKEYAMA, N.; WATANABE, S. Protective effect of a novel rice extract against ethanol-induced gastric mucosal injury in rat. **Digest Dis Sci.**; v. 52, p. 434 – 441, 2007.

MATSUI, H.; SHIMOKAWA, O.; KANEKO, T.; NAGANO, Y.; RAI, K.; HYODO, I. The pathophysiology of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced mucosal injuries in stomach and small intestine. **J Clinical Biochem Nutr.**; v. 48, p. 107-111, 2011.

MEDEIROS, J.V.; GADELHA, G.G.; LIMA, S.J.; GARCIA, J.A.; SOARES, P.M.; SANTOS, A.A.; BRITO, G.A.; RIBEIRO, R.A.; SOUZA, M.H. 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.

MEDEIROS, J.V.R.; BEZERRA, V.H.; GOMES, A.S.; BARBOSA, A.L.R.; JUNIOR, R.C.P.L.; SOARES, P.M.G.; BRITO, A.C.; RIBEIRO, A.R.; CUNHA, F.Q.; SOUZA, M.H.L.P. Hydrogen Sulfide Prevents Ethanol-Induced Gastric Damage in Mice: Role of ATP Sensitive Potassium Channels and Capsaicin-Sensitive Primary Afferent Neurons. **J Pharmacol Exp Ther.**; v. 330, p. 764-770, 2009.

MELLO, V.J.; GOMES, M.T.R.; LEMOS, F.O.; DELFINO, J.L.; ANDRADE, S.P.; LOPES, M.T.P.; SALAS, C.E. The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*. **Phytomedicine.**; v. 15, p.237–244, 2008.

MORAIS, T.C.; PINTO, N.B.; CARVALHO, K.M.M.B; RIOS, J.B.; RICARDO, N.M.P.S.; TREVISAN, M.T.S.; RAO, S.V.; SANTOS, F.A. Protective effect of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale*) on ethanol-induced gastric damage in mice. **Chemico-Biological Interactions.**; v.183, p.264–269, 2010.

MORCELLE, R.S.; CAFFINI, N.O.; PRIOLO, N. Proteolytic properties of *Funastrum clausum* latex. **Fitoterapia.**; v.75, p.480–493, 2004.

MÖSSNER, J.; CACA, K. Developments in the inhibition of gastric acid secretion. **Eur J Clin Invest.**; v. 35, p. 469 – 475, 2005.

MOURSY, L.E. Insecticidal activity of *Calotropis procera* extracts of the flesh fly, *Sarcophaga haemorrhoidalis* fallen. **J Egypt Soc Parasitol.**; v.27, p.505-514, 1997.

MÓZSIK, G., SZOLCSÁNYI, J., DÖMÖTÖR, A. Capsaicin research as a new tool to approach of the human gastrointestinal physiology, pathology and pharmacology. **Inflammopharmacology.**; v. 15, p.232–245, 2007.

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

MUSUMBA, C.; PRITCHARD, D.M.; PIRMOHAMED, M. Review article: cellular and molecular mechanisms of NSAID-induced peptic ulcers. **Aliment Pharm Therap.**; v. 30, p. 517-531, 2009.

NAKAGIRI, A.; MURAKAMI, M. Roles of NADPH oxidase in occurrence of gastric damage and expression of cyclooxygenase-2 during ischemia/reperfusion in rat stomachs. **J Pharmacol Sci.**; v. 111, p. 352-360, 2009.

NASSINI, R.; ANDRÈ, E.; GAZZIERI, D.; DE SIENA, G.; ZANASI, A.; GEPPETTI, P.; MATERAZZI, S. A bicarbonate-alkaline mineral water protects from ethanol-induced hemorrhagic gastric lesions in mice. **Biol Pharm Bull.**; v. 33, p. 1319–1323, 2010.

NEWTON, J.L.; ALLEN, A.; WESTLEY, B.R.; MAY, F.E. The human trefoil peptide, TFF1, is present in different molecular forms that are intimately associated with mucus in normal stomach. **Gut.**; v. 46, p. 312-320, 2000.

NORDBERG, J.; ARNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Bio Med.**; v. 31, p. 1287-1312, 2001.

NOMA, A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. **Nature.**; v. 305, p. 147–148, 1983.

NYLANDER, O. The impact of cyclooxygenase inhibition on duodenal motility and mucosal alkaline secretion in anaesthetized rats. **Acta Physiologica.**; v. 2001, p. 179-192, 2011.

OLINDA, T.M.; LEMOS, T.L.G.; MACHADO, L.L.; RAO, V.S.; SANTOS, F.A. *Quebrachitol*-induced gastroprotection against acute gastric lesions: Role of prostaglandins, nitric oxide and K⁺ ATP channels. **Phytomedicine.**; v.15, p.327–333, 2008.

OLIVEIRA, F. A.; LIMA JÚNIOR, R.C.P.; SILVA, R. M. ; SANTOS, F. A.; RAO V.S.N. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacol Res.**; v. 49, p. 105-111, 2004.

OLIVEIRA, R.S.B.; FIGUEIREDO, I.S.T.; FREITAS, L.B.N.; PINHEIRO, R.S.P.; BRITO, A.C.; ALENCAR, N.M.N. Inflammation induced by phytochemical proteins from the latex of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) protects against *Salmonella* infection in a murine model of typhoid fever. **Inflamm Res.**; v. 61, p. 689-698, 2012.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature.**; v. 327, p. 524-526, 1987.

PALENCIA-HERREJÓN, E.; SÁNCHEZ, B.; ESCOBAR, I.; GÓMEZ-LUS, M.L. Proton pump inhibitors and infection risk. **Esp Quimioter.**; v.24, p.4-12, 2011.

PAGLIA, D.E.; VALENTINE, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **J Lab Clin Med.**; v.70, p.158-169, 1967.

PAN, J.S.; HE, S.Z.; XU, H.Z.; ZHAN, X.J.; YANG, X.N.; XIAO, H.M.; SHI, H.X.; REN, J.L. Oxidative stress disturbs energy metabolism of mitochondria in ethanol-induced gastric mucosa injury. **World J Gastroenterol.**; v. 14, p. 5857 -5867, 2008.

PERINI, R. F.; MA, L.; WALLACE, J. L. Mucosal Repair and COX-2 Inhibition. **Curr Pharm Design.**; v. 9, p. 2207-2211, 2003.

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.

PIEPER, G.M.; GOSS, G. Anti-free-radical and neutrophil-modulation properties of the nitrovasodilator, nicorandil. **Cardiovasc Drugs Therapy.**; v. 6, p. 225-232, 1992.

PINA, A.E.C.; ALVAREZ, G.R.T.; RAMIREZ, A.R.; NAVARRETE, A. Carbenoxolone gastroprotective mechanism: participation of nitric oxide/ cGMP/ K_{ATP} pathway in ethanol-induced gastric injury in the rat. **Fundamental & Clinical Pharmacology.**; v.25, p. 717-722, 2011.

PINSKY, D.J.; NANA, Y.; CHOWDHURY, N.C.; LIAO, H.; OZ, M.C.; MICHLER, R.E.; KUBASZEWSKI, E.; MALINSKI, T.; STERN, D.M. The nitric oxidercyclic GMP pathway in organ transplantation: critical role in successful lung preservation. **Proc Natl Acad Sci.**; v. 91, p. 12086-12090, 1994.

POLSON, J.B.; STRADA, S.J. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle. **Annu Rev Pharmacol.**; v. 36, p. 403-427, 1996.

POLTE, T.; OBERLE, S.; SCHRODER, H. Nitric oxide protects endothelial cells from tumor necrosis factor- α -mediated cytotoxicity: possible involvement of cyclic GMP. **FEBS Letters.**; v. 409, p. 46-48, 1997.

RAJI, Y.; HAMMED, A.I.; ADESANWO, J.K.; OGUNWANDE, A.I. Antiulcerogenic effects of *Tylophora conspicua* in male rats. **Phytother. Res.**; v. 14, p. 378-380, 2000.

RAMOS, M. V.; AGUIAR, V. C.; XAVIER A. A. S.; LIMA, M. W.; BANDEIRA, G. P. J.; ETCHHELLS, P.; NOGUEIRA, N. A. P.; ALENCAR, N. M. N. Latex proteins from the plant *Calotropis procera* are partially digested upon in vitro enzymatic action and are not immunologically detected in fecal material. **Fitoterapia.**; v.77, p.251-256, 2006.

RAMOS, M.V.; OLIVEIRA, J.S.; FIGUEIREDO, J.G.; FIGUEIREDO, I.S.T.; KUMAR, V.L.; BITTENCURT, F.S.; CUNHA, F.Q.; OLIVEIRA, R.S.B.; BOMFIM, L.R.; LIMA-FILHO, J.V.; RAMOS, M.V. Involvement of NO in the inhibitory effect of *Calotropis procera* latex protein fractions on leukocyte rolling, adhesion and infiltration in rat peritonitis model. **J Ethnopharmacol.**; v.125, p.1-10, 2009.

RAMOS, M.V.; VIANA, C.A.; SILVA, A.F.; FREITAS, C.D.; FIGUEIREDO, I.S.; OLIVEIRA, R.S.; ALENCAR, N.M.; LIMA-FILHO, J.V.; KUMAR, V.L. Proteins derived from latex of *C. procera* maintain coagulation homeostasis in septic mice and exhibit thrombin- and plasmin-like activities. **N-S Arch Pharmacol.**; v. 385, p. 455-463, 2012.

RAO, C.V.; OJHA, S.K.; RADHAKRISHNAN, K.; GOVINDARAJAN, R.; RASTOGI, S.; MEHROTRA, S.; PUSHPANGADAN, P. Antiulcer activity of *Urtica salicifolia* rhizome extract. **J Ethnopharmacol.**; v. 91, p. 243–249, 2004.

REPETTO, M. G.; LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.**; v. 35, p. 523-534, 2002.

REPETTO, M.; MARÍA, A.; GUZMÁN, J.; GIORDANO, O.; LLESUY, S. Protective effect of *Artemisia douglasiana* Besser extracts in gastric mucosal injury. **J Pharm Pharmacol.**; v. 55, p. 551-557, 2003.

RIOS ER, ROCHA NF, VENÂNCIO ET, MOURA BA, FEITOSA ML, CERQUEIRA GS, SOARES PM, WOODS DJ, DE SOUSA FC, LEAL LK, FONTELES MM. Mechanisms involved in the gastroprotective activity of esculin on acute gastric lesions in mice. **Chem Biol Interact.**; v. 188, p. 245-254, 2010.

ROCHA, N.F.M.; OLIVEIRA, G.V.O.; ARAÚJO, F.Y.R.; RIOS, E.R.V.R.; CARVALHO, A.M.R.; VASCONCELOS, L.F.; MACÊDO, D.S.; SOARES, P.M.G.; SOUSA, D.P.D.; SOUSA, F.C.F. (-)- α -Bisabolol-induced gastroprotection is associated with reduction in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity and neutrophil migration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences.**; v.44, p. 455–461, 2011.

RODRIGUES, P.A. Atividade gastroprotetora e antioxidante de extratos e constituintes químicos de *Byrsonima serica* DC. e *Plectranthus grandis* Cramer (Willdenow). **Universidade Estadual do Ceará**, 2008.

RODRIGUES, P.A.; MORAIS, S.M.; SOUZA, C.M.; SILVA, A.R.A.; ANDRADE, G.M.; SILVA, M.G. V.; ALBUQUERQUE, R.L.; RAO, V.S.; SANTOS, F.S. Gastroprotective effect of barbatusin and 3-beta-hydroxy-3-deoxybarbatusin, quinonoid diterpenes isolated from *Plectranthus grandis*, in ethanol-induced gastric lesions in mice. **J Ethnopharmacology.**; v. 127, p. 725-730, 2010.

RODRIGUES, P.A.; MORAIS, S.M.; SOUZA, C.M.; MAGALHÃES, D.V.; VIEIRA, I.G.P.; ANDRADE, G.M.; RAO, V.S.; SANTOS, F.A. Gastroprotective effect of *Byrsonima sericea* DC leaf extract against ethanol-induced gastric injury and its possible mechanisms of action. **An Acad Bras Cienc.**; v. 84, 2012.

RODRÍGUEZ, Z.B.Z.; ÁLVAREZ, R.G.; GUANCHE, D.; MERINO, N.; ROSALES, F.H.; CEPERO, S.M.; GONZÁLEZ, Y.A.; SCHULZ, S. Antioxidant mechanism is involved in the gastroprotective effects of ozonized sunflower oil in ethanol-induced ulcers in rats. **Mediat of Inflamm.**; v. 6, 2007.

ROZZA, A.L.; MORAES, T.M.; KUSHIMA, H.; TANIMOTO, A.; MARQUES, M.O.; BAUAB, T.M.; HIRUMA-LIMA, C.A.; PELLIZZON, C.H. Gastroprotective mechanisms of Citrus lemon (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and β -pinene: involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E₂. **Chem Biol Interact.**; v. 189, p.82-90, 2011.

ROWN, J.F.; HANSON, P.J.; WHITTLE, B.J.R. Nitric oxide donors increase mucus gel thickness in rat stomach. **Eur J Pharmacol.**; v. 223, p. 103-104, 1992.

ROWN, S. H. Tropical flowering tree list. Disponível em: <<http://lee.ifas.ufl.edu/Hort/GardenPubsAZ/FactSheet/PlumeriaRubraFrangipani.pdf>> Acesso em: 20 Jan. 2012.

SAEKI, T.; OHNO, T.; KAMATA, K.; ARAI, K.; MIZUGUCHI, S., KATORI, M.; SAIGENJI, K.; MAJIMA, M. Mild irritant prevents ethanol-induced gastric mucosal microcirculatory disturbances through actions of calcitonin gene-related peptide and PGI₂ in rats. **American Journal of Physiology: Gastrintestinal & Liver Physiology.**; v. 206, p. G38-G75, 2004.

SAIRAM, K.; RAO, C.V.; BABU, M.D.; GOEL, R.X. Prophylactic and curative effects of *Bacopa monniera* in gastric ulcer models. **Phytomedicine.**; v. 8, p. 423-430, 2001.

SAKAI, H.; KUMANO, E.; IKARI, A.; TAKEGUCHI, N. A gastric housekeeping Cl channel activated via prostaglandin EP3 receptor-mediated Ca²⁺ nitric oxide/ cGMP pathway. **J Biol Chem.**; v. 270, p. 18781– 18785, 1995.

SÁNCHEZ-MENDOZA, M.E.; REYES-RAMÍREZ, A.; CRUZ ANTONIO, L.; MARTÍNEZ JIMÉNEZ, L.; RODRÍGUEZ-SILVERIO, J.; ARRIETA, J. Bioassay-guided isolation of an antiulcer compound, Tagitinin C, from *Tithonia diversifolia*: role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. **Molecules.**; v. 16, p. 665–674, 2011.

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

SARAVANAN, R.; PRASAD, N.R.; PUGALENDI, K.V. Effect of Piper betle leaf extract on alcoholic toxicity in the rat brain. **J Med Food.**; v. 6, p. 261–265, 2003.

SAXENA, B.; SINGH, S. Investigations on gastroprotective effect of citalopram, an antidepressant drug against stress and pyloric ligation induced ulcers. **Pharmacol Rp.**; v. 63, p. 1413-1426, 2011.

SCHUBERT, M. L.; PEURA, D. A. Control of gastric acid secretion in health and disease. **Gastroenterology.**; v. 134, p. 1842-1860, 2008.

SEINO, S.; MIKI, T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. **Progr Biophys Mol Biol.**; v. 81, p. 133-176, 2003.

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

SHAH, V.; LYFORD, G.; GORES, G.; FARRUGIA, G. Nitric oxide in gastrointestinal health and disease. **Gastroenterology.**; v. 126, p. 903- 913, 2004.

SOARES, D.C.; ANDRADE, A.L.; DELORENZI, J.C.; SILVA, J.R.; FREIRE-DE-LIMA, L.; FALCÃO, C.A.; PINTO, A.C.; ROSSI-BERGMANN, B.; SARAIVA, E.M. Leishmanicidal activity of *Himatanthus sucuuba* latex against *Leishmania amazonensis*. **Parasitol Int.**; v. 59, p. 173-177, 2010.

SOUZA, J.P.; BASTOS, J.K.; ANDRADE, S.F. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. **J Ethnopharmacol.**; v. 110, p. 567-71, 2007.

STERNINI, C.; REEVE, J.R.; BRECHA, N. Distribution and characterization of calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the digestive system of normal and capsaicin-treated rats. **Gastroenterology.**; v. 93, p. 852–862, 1987.

SILVA, M.I.; MOURA, B.A.; NETO, M.R.A.; TOMÉ, A.R.; ROCHA, N.F.; CARVALHO, A.M.; MACÊDO, D.S.; VASCONCELOS, S.M.; SOUSA, D.P.; VIANA, G.S.B.; SOUSA, F.C. Gastroprotective activity of isopulegol on experimentally induced gastric lesions in mice: investigation of possible mechanisms of action. **N-S Archa Pharmacol.**; v. 3, p. 33–45, 2009.

SIMMONS, D.L. Variants of cyclooxygenase-1 and their roles in medicine. **Thromb Res.**; v.110, p. 265-268, 2003.

SOUZA, S.M.C.; AQUINO, L.C.M.; MILACH J.R.A.C.; BANDEIRA, M.A.M.; NOBRE, M.E.P.; VIANA, G.S.B. Antiinflammatory and Antiulcer Properties of Tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) in Rodents. **Phytother. Res.**; v. 21, p. 220–225, 2007.

SOUZA, G.E.P.; FERREIRA, S.H. Blockade Antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions.**; v. 17, p. 97-103, 1985.

SPRUCE, A.E.; STANDEN, N.B.; STANFIELD, P.R. Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. **Nature.**; v. 316, p. 736-738, 1985.

SRINIVAS, N. R. Antacid use and reduced bioavailability of oral drugs case studies, overview and perspectives. **Arzneimittel-Forsch.**; v. 59, p. 327-334, 2009.

SRITANYARAT, W.; PEARCE, G.; SIEMS, W. F.; RYAN, C. A.; WITITSUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D. Isolation and characterization of iso inhibitors of the potato protease inhibitor I family from the latex of the rubber tree, *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry.**; v.67, p.1644-1650, 2006.

STANDEN, N.B.; QUAYULE, J.M.; DAVIES, N.W.; BRAYDEN, J.E.; HUANG, Y.; NELSON, M.T. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle. **Science.**; v. 14, p. 177-180, 1989.

SUNG, J.J.Y.; KUIPERS, E.J.; EL-SERAG, H.B. Systematic review: the global incidence and prevalence of peptic ulcer disease. **Aliment Pharm Therap.**; v.29, p.938-946, 2009.

SUSSMAN, G. L.; BEEZHOLDB, D. H.; LISSC, G. Latex allergy: historical perspective. **Methods.**; v. 27, p.3-9, 2002.

SZABO, S.; TRIER, J.S.; BROWN, A.; SCHNOOR, J.; HOMAN, H.D.; BRADFORD, J.C. A quantification method for assessing the extent of experimental erosions and ulcers. **J Pharmacol Method.**; v. 13, p. 59-66, 1985.

SZABO, S. Mechanisms of mucosal injury in the stomach and duodenum: time-sequence analysis of morphologic, functional, biochemical and histochemical studies. **Scand. J Gastroenterol.**; v. 22 , p. 21-28, 1987.

SZABO, S. Gastroduodenal mucosal injury-acute and chronic: pathways, mediators and mechanism. **J Clin Gastroenterol.**; v.13, p. S1-S8, 1991.

SZALLASSI, A.; CORTRIGHT, D.N.; BLUM, C.A.; EID, S.R. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. **Nat Rev Drug Discov.**; v.6, p.357-372, 2007.

SZOLCSANYI, J.; BARTHO, L. Capsaicin-sensitive afferents and their role in gastroprotection: an update. **J Physiol.**; v. 95, p. 181-188, 2001.

TAGLIATI, C. A.; FÉRES, C. A. O. Pesquisas toxicológicas e farmacológicas. In: LEITE, J. P. V. (Ed.). *Fitoterapia: Bases científicas e tecnológicas*. São Paulo: Atheneu, 2009. Cap.5. p. 119-140.

TAHA, M.M.E.; SALGA, M.S.; ALI, M.H.; ABDULLA, M.A.; ABDELWAHAB, S.I.; HADI, A.H.A. Gastroprotective activities of *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. revisited: Role of arbutin. **J Ethnopharmacol.**; v. 141, p. 273-281, 2012.

TAN, G.T.; PEZZUTO, J.M.; KINGHORN, A.D.; HUGHES, S.H. Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase. **J Nat Prod.**; v.54, p.143-154, 1991.

TARNAWSKI, A.S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing: state of the art 2010. **Gastroenterol Polska.**; v. 17, p. 171-179, 2010.

TAYLOR, D.; OLOFINJANA, O.; RAHIMI, T. Use of antacid medication in patients receiving clozapine: A comparison with other second-generation antipsychotics. **J Clin Psychopharmacol.**; v. 30, p. 460-461, 2010.

TERZIC, A; JAHANGIR, A; KURACHI, Y. Cardiac ATP-sensitive K⁺ channels: regulation by intracellular nucleotides and K⁺ channel-opening drugs. **Am J Physiol.**; v.269, p.525-545, 1995.

THOMPSON, M.J.; HEIMENDINGER, J.; DIKER, A.; O'NEILL, C.; HAEGELE, A.; HEINECKE, B.; WOLFE, P.; SEDLACEK, S.; ZHU, Z.; JIANG, W. Dietary botanical diversity affects the reduction of oxidative biomarkers in women due to high vegetable and fruit intake. **J Nutr.**; v. 136, p. 2207-2212, 2006.

TIWARI, S.; SINGH, S.K.; SINGH, A. Toxicological effect and biochemical alterations induced by different fractions of Euphorbia royleana latex in freshwater harmful vector snail Lymnaea acuminata. **Indian J Exp Biol.**; v. 42, p.1220-1225, 2004.

TOMA, W.; GRACIOSO, J.S.; ANDRADE, F.D.P.; HIRUMA-LIMA, C.A.; VILEGAS, W.; BRITO, A.R.M.S. Antiulcerogenic activity of four extracts from the barks wood of Quassia amara L (Simaroubaceae). **Biol Pharm Bull.**; v. 25, p. 1151-1155, 2002.

TOMA, W.; HIRUMA-LIMA, C.A.; GUERRERO, R.O.; BRITO, A.R. Preliminary studies of Mammea americana L. (Guttiferae) bark/latex extract point to an effective antiulcer effect on gastric ulcer models in mice. **Phytomedicine.**, v.12, p. 345-350, 2005.

TOROUDI, H.P.; RAHGOZAR, M.; BAKHTIARIAN, A.; DJAHANGUIRI, B. Potassium channel modulators and indomethacin-induced gastric ulceration in rats. **Scand J Gastroenterol.**; v. 34, p. 962-966, 1999.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annu Rev Phytopathol.**; v.44, p.135-62, 2006.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiol Mol Plant Pathol.**; v.55, p.85-97, 1999.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem-Biol Interact.**; v. 160, p. 1-40, 2006.

VINCENT, J. L.; ZHANG, H.; SZABO, C.; PREISER, J. C. Effects of nitric oxide in septic shock. **Am J Respir Crit Care Med.**; v. 161, p. 1781-1785, 2000.

VYAWAHARE, N.S.; DESHMUKH, V.V.; GADKARI, M.R.; KAGATHARA, V.G. Plants with Antiulcer Activity. **Pharmacognosy Reviews.**; v.3, p.108-115, 2009.

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

WALLACE, J.L. Pathogenesis of NSAID-induced gastroduodenal mucosal injury. **Best Pract Res Cl Ga.**, v. 15, p. 691-703, 2001.

WALLACE, J.L. Nitric oxide, aspirin-triggered lipoxins and NO-aspirin in gastric Protection. **Inflamm Allergy Drug Targets.**, v. 5, p. 133–137, 2006.

WALLACE, J.L.; FERRAZ, J.G.P. New Pharmacologic Therapies in Gastrointestinal Disease. **Gastroenterol Clin N.**; v. 39, p. 709-720, 2010.

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.; MCKNIGHT, W.; WILSON, T.L.; DEL SOLDATO, P.; CIRINO, G. Reduction of shock-induced gastric damage by a nitric oxide-releasing aspirin derivative: role of neutrophils. **Am J Physiol.**; v. 273, p. 1246-1251, 1997.

WANG, Z.T.; QUN DU; XU, G.J.; WANG,R.J.; FU, D.Z.; TZI-BUN, N. Investigations on the protective action of *Condonopsis pilosula* (Dangshen) extract on experimentally-induced gastric ulcer in rats. **Gen. Pharmac.**; v. 28, p. 469-473, 1997.

WONG, D.; OGLE, C.W. Chronic parenterally administered nicotine and stress- or ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. **Eur J Pharmacol.**; v. 292, p. 157-62, 1995.

YANAKA, A.; MUTO, H.; FUKUTOMI, H.; ITO, S.; SILEN, W. Role of nitric oxide in restitution of injured guinea pig gastric mucosa in vitro. **Am J Physiol.**; v. 268, p. 933-942, 1995.

YEANG, H. Y.; ARIF, S. A. M.; YUSOF, F.; SUNDERASAN, E. Allergenic proteins of natural rubber latex. **Methods.**; v.27, p.32-45, 2002.

YOKOSHIKI, H.; SUNAGAWA, M.; SEKI, T.; SPERELAKIS, N. ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. **Am J Physiol.**; v. 274, p. 25–37, 1998.

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

ZAKARIA, Z.A.; HISAM, E.E.A.; NORHAFIZAH, M.; ROFIEE, M.S.; OTHMAN, F.; HASIAH, A.H.; VASUDEVAN, M. Methanol extract of *Bauhinia purpúrea* leaf possesses anti-ulcer activity. **Med Princ Pract.**; 2012.