

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA DA CROTONINA SEMI-
SINTÉTICA OBTIDA A PARTIR DA DESIDROCROTONINA
ISOLADA DAS CASCAS DE *Croton cajucara* BENTH

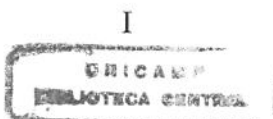
Aluna: Ana Beatriz Albino de Almeida

Orientadora: Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Bióloga Ana Beatriz Albino de Almeida.

Campinas, 02 de maio de 2001.

Alba Monteiro
Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito
- Orientadora -



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

**ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA DA CROTONINA SEMI-
SINTÉTICA OBTIDA A PARTIR DA DESIDROCROTONINA
ISOLADA DAS CASCAS DE *Croton cajucara* BENTH**

**Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação em Farmacologia da
Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas
para a obtenção do Título de Mestre em
Farmacologia**

Aluna: Ana Beatriz Albino de Almeida

Orientadora: Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Campinas, 2001

200101757

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

Al64a

Almeida, Ana Beatriz Albino de

Atividade antiulcerogênica da crotonina semi-sintética obtida a partir da desidrocrotonina isolada das cascas de *Croton cajucara* Benth / Ana Beatriz Albino de Almeida. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador : Alba Regina Monteiro Souza Brito

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Ulceras. 2. Toxicidade - Testes. 3. Mucosa gástrica. I. Alba Regina Monteiro Souza Brito. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Membros:

Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Prof. Dr. Wagner Vilegas

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 02/05/01

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

(...) Não viemos a este mundo tão somente para ser um elo das correntes do Universo ou transportar genes geração após geração, como fazem o polvo, o caracol, o ipê. A cada ser humano é concedido o privilégio de degustar o Universo, de ser co-autor no mistério da criação que, incessantemente, se desenrola através da História da Humanidade; a cada um de nós é oferecida a chance única de auscultar o coração do Universo e com isso ser capaz de vislumbrar a essência comum que perpassa tudo e todos. Somos seres singulares na Natureza, mas no âmago de nossa singularidade a totalidade imprimiu suas marcas (...)

Gisela B. D. Breno

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Ao meu pai (in memoriam) que no silêncio de sua presença carregou-me com seu amor.

À minha mãe pelo universo de bondade, determinação, cuidado e amor que a sua presença representa em minha vida.

Ao André, irmão e amigo, parceiro de vida e ideais.

*À Profa. Dra. Alba R. M. Souza Brito pelos
contínuos ensinamentos e por sua
competência profissional. Minha admiração e
gratidão pelas valiosas sugestões e amizade*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não teria sido elaborado sem o auxílio de diversas pessoas e algumas entidades, às quais quero expressar meus sinceros agradecimentos:

Ao Prof. Domingos Sávio Nunes, do Departamento de Química da UEPG, pelo material fitoquímico.

À Profa. Marcela Haun, Patrícia S. Melo e João B. F. Neto, do Departamento de Bioquímica - Unicamp, pela colaboração na realização dos ensaios in vitro de cultura de células.

À Profa. Regina C. Spadari-Bratfisch, Alexandre M. Miotto e Iraides N. Santos, do Departamento de Fisiologia e Biofísica - Unicamp, pelas sugestões e auxílio nos ensaios de órgãos isolados realizados no Laboratório de Estudos do Estresse.

À Equipe do Laboratório de Produtos Naturais (Leonia, Clélia, Juliano, Janaina, Walber, Luciana, Ana Claudia, Fernanda e Ricardo) pela colaboração nas atividades laboratoriais e pela contribuição científica para o meu processo de formação profissional.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica - Unicamp, por permitir a utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura.

Ao Departamento de Histologia - Unicamp, por possibilitar a utilização do Microscópio de Polarização.

Ao Prof. Angelo Luis Cortelazzo e Prof. João Marcos de Araújo, Departamento de Biologia Celular – Unicamp, pela colaboração, dedicação e empenho no trabalho de Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia de Polarização;

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica – Unicamp, pelo carinho e auxílio prestados.

À Zefa, Sr. Chico e Machado (in memorian) pelo cuidado e dedicação no tratamento dos animais.

Ao Wanderlei, funcionário do Departamento de Farmacologia – Unicamp, pelos serviços prestados.

Aos colegas de Departamento e Docentes pela colaboração na formação profissional.

À Fapesp pela apoio financeiro concedido para a realização do Projeto de Mestrado.

Ao Assessor(a) da Fapesp pelas significativas contribuições atribuídas nas análises dos relatórios.

Aos animais e às plantas, por exercer um papel fundamental para o desenvolvimento da ciência.

Às inúmeras pessoas que participaram direta ou indiretamente da execução do trabalho.

ÍNDICE

Resumo	18
Abstract	20
INTRODUÇÃO	22
I. Farmacologia da Secreção Ácida Gástrica	23
1. Bases Celulares da Secreção Ácida	
2. Regulação da Secreção Ácida	25
3. Sistema de Receptores da Célula Parietal	26
3.1. Receptor Muscarínico e seu segundo mensageiro	
3.2. Receptor de Histamina e seu segundo mensageiro	27
3.3. Receptor de Gastrina e seu segundo mensageiro	28
3.4. Receptor de Prostaglandina	29
3.5. Receptor de Fator de Crescimento Epidermal (EGF)	
3.6. Receptor de Somatostatina	30
II. Transdução de Sinal e Ativação da Secreção Ácida na Célula Parietal	
1. Ativação de PKA	
2. Agentes Reguladores da Secreção Ácida	31
III. Mecanismos de Defesa do Estômago	32
1. Ácido	
2. Muco e Bicarbonato	33
3. Fosfolipídeos Ativos na Superfície	34
4. Epitélio	35
5. Fluxo Sanguíneo da Mucosa	36
6. Reconstituição	37
7. Prostaglandinas e Óxido Nítrico	38
IV. Citotoxicidade	39
V. Espécie Estudada	40
1. Preparação do Material Vegetal	42
2. Fotomicrografias de DHC e 4SRC	43
2.1. Microscopia de Polarização	
2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura	46
VI. Modelos Experimentais	47
1. Estudo da atividade antiulcerogênica	
2. Estudo dos mecanismos de ação	48
OBJETIVOS	49
METODOLOGIA E RESULTADOS	51
1. Antiulcerogenic and cytotoxicity activity of semi-synthetic crotonin of <i>Croton cajucara</i> Benth	52
2. Effect of semi-synthetic crotonin obtained from <i>Croton cajucara</i> Benth upon gastric secretion in cholinergic and histaminergic receptors	64
DISCUSSÃO	76
CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	89

Resumo

A úlcera é uma lesão produzida pelo desequilíbrio da secreção ácida e fatores protetores da mucosa gástrica. Esse desequilíbrio é originado por diversos fatores tais como: estilo de vida, tabagismo, presença da *Helicobacter pylori* e antiinflamatórios não-esteroidais.

Por ser uma patologia de grande incidência, com tempo de tratamento prolongado e de constante recidiva, muitas vezes promovendo agravações que levam o paciente à cirurgia, novas drogas vem sendo isoladas e sintetizadas, a fim de atenuar e/ou abolir essa afecção. Várias são as fontes naturais fornecedoras de constituintes químicos com função antiulcerogênica, sendo que as plantas, devido a sua diversidade e utilização popular, destacam-se nesse aspecto.

O nosso objeto de estudo é a espécie *Croton cajucara*, conhecida popularmente como sacaca, típica da região Amazônica, com centro de dispersão em Belém-PA. Estudos prévios demonstraram que a trans-desidrocrotonina (DHC), substância isolada das cascas da *Croton cajucara*, apresenta atividade antiulcerogênica eficaz, acompanhada de alta toxicidade (Souza Brito et al., 1998; Hiruma-Lima et al., 1999; Jaime and Haun, 1999). A partir desses resultados isolamos a crotonina semi-sintética (4SRC) a partir da DHC, a fim de verificarmos se essa substância apresentava atividade antiulcerogênica similar, com uma diminuição da toxicidade. Não utilizamos a crotonina natural devido ao seu baixo rendimento.

Ao avaliar os efeitos da 4SRC (50, 100 e 200 mg/kg) nos modelos de úlcera induzida por etanol, etanol/HCl e estresse, em camundongos Swiss e ratos Wistar machos, foi verificado uma atividade antiulcerogênica significativa, sugerindo uma possível ação antissecretora promovida pela substância. Por essa razão, foi avaliada a ação da 4SRC sobre os receptores colinérgicos e histaminérgicos.

Ao observar o efeito da 4SRC sobre os receptores histaminérgicos em átrio direito de cobaio foi observado um deslocamento da curva à direita da curva-padrão (histamina), acompanhada de uma diminuição significativa da resposta máxima, o que sugere um comportamento de droga antagonista não-competitivo. Ao ser analisado a ação da 4SRC sobre os receptores muscarínicos, em fundo de estômago de rato, foi observado um deslocamento da curva à direita da curva-padrão (carbacol) sem diminuição da resposta máxima, sugerindo um comportamento de droga antagonista competitiva.

A atividade da 4SRC (50, 100 ou 200 mg/kg) foi também avaliada no modelo de úlcera induzida por indometacina, no qual foi verificado significativa diminuição do índice de lesão

ulcerativa nas doses de 100 e 200 mg/kg, sugerindo que a 4SRC atue como estimulador da síntese de prostaglandina. Para verificarmos essa hipótese, avaliamos a ação da 4SRC (100 mg/kg) sobre a síntese de prostaglandina e sobre a produção de muco livre, entretanto não foi observadas diferença significativa quando comparada ao grupo controle.

A citotoxicidade da 4SRC foi avaliada em cultura de células V79 de pulmão de hamster chinês e cultura primária de hepatócitos de ratos Wistar, através dos testes de conteúdo de DNA (NAC), incorporação de vermelho neutro (NRU) e redução do sal tetrazolium MTT.

Ao avaliar a viabilidade de células V79 incubadas com diferentes concentrações de 4SRC foi observado que para os testes de NRU e MTT a substância apresentou uma $IC_{50}=500\text{ }\mu\text{M}$, e no teste NAC uma $IC_{50}=200\text{ }\mu\text{M}$. Ao analisar a viabilidade dos hepatócitos de ratos Wistar após o tratamento com a 4SRC, observamos que a $IC_{50}=10-500\text{ }\mu\text{M}$ para os testes de NAC e MTT, e para o NRU uma $IC_{50}=120\text{ }\mu\text{M}$. Posteriormente as células V79 foram incubadas com o metabólito produzido pelos hepatócitos tratados com diferentes concentrações de 4SRC. Após 4h de incubação observamos uma $IC_{50}=500\text{ }\mu\text{M}$ para os testes de MTT e NRU, e uma $IC_{50}=370\text{ }\mu\text{M}$ para o teste de NAC.

Com a obtenção desses resultados é possível sugerir que a 4SRC atua através de um antagonismo em receptor histaminérgico e colinérgico, apresentando características de citotoxicidade menores que a DHC.

Abstract

The ulcer is a lesion produced by unbalance of acid secretion and protector factors of gastric mucous. This unbalance is original by various causes as: tobacco, *Helicobacter pylori*, stress.

Just be a pathology of large incidence, with prolonged time of treatment; many times aggravations promoting, witch lead the patient to surgery. New drugs being isolated and synthesized, in order to attenuate and/or to abolish this affection. The natures fountain are furnishers of chemist constituent, in special the plants, due its innumerable diversity and popular utilization.

The object of this study is the *Croton cajucara*, known popularly as sacaca, typical of Amazon region, with dispersion center in Belém – PA. Previous studies demonstrated that the *trans*-dehydrocrotonin (DHC), isolated substance of *Croton cajucara* bark, present efficacious antiulcerogenic activity, accompany of high toxicity (Souza Brito et al., 1998; Hiruma-Lima et al., 1999; Jaime and Haun, 1999). From these results we isolated the semi-synthetic crotonin (4SRC) obtained of DHC, it to verify if this substance present similar antiulcerogenic activity, with a decrease toxicity. We didn't utilize the natural crotonin, due to its low revenue.

To evaluate the 4SRC effects (50, 100 and 200 mg/kg) on ethanol, ethanol/HCl and stress-induced ulcer models, in Swiss and rats Wistar male. We verified a significative antiulcerogenic activity, suggesting a possible antisecretory action promoted by substance. For this reason, the 4SRC action was evaluated on cholinergic and histaminergic receptors.

To observe the 4SRC effect on histaminergic receptors, we utilized isolated guinea pig right atria and observed a shift to the right in the concentration response curves to histamine, accompany of significative decrease of maximum response, that suggest that this compound may act as an H₂ antagonist receptor.

The 4SRC activity (50, 100 or 200 mg/kg) was appraised in the ulcer model induced by indomethacin, which we verificated decrease significative of ulcerative

lesion index in the 100 and 200 mg/kg, suggesting that 4SRC action as stimulator of synthesis and/or discharge of prostaglandin. For this reason, we verified the 4SRC action (100 mg/kg) on prostaglandin synthesis on free mucus production, however we didn't observe significative difference, when it was compared to control group.

The cytotoxic effect of semi-synthetic crotonin, expressed as cell viability, was assessed in a lung fibroblast cell line (V79) derived from Chinese hamsters that is commonly used for cytotoxicity studies (Souza Brito et al., 1998; Rodriguez and haun, 1999); and rat hepatocytes were isolated from male Wistar rats. After treatment, cell viability was determined by tetrazolium reduction (MTT), total acid content (NAC) and neutral red uptake (NRU) assays.

To evaluate the V79 cell viability incubated with different 4SRC concentration was observed that to the NRU and MTT tests the substance presented a $IC_{50}=500\text{ }\mu\text{M}$, and in the NAC a $IC_{50}=200\text{ }\mu\text{M}$. To analyze the hepatocyte viability of Wistar rats after treatment with the 4SRC, we observed a $IC_{50}=10\text{-}500\text{ }\mu\text{M}$ to the NAC and MTT tests and, to NRU, a $IC_{50}=120\text{ }\mu\text{M}$. Next stage, the V79 cells were incubated with the metabolites produced by hepatocytes treated with different 4SRC concentration. After 4 h incubation, we observed a $IC_{50}=500\text{ }\mu\text{M}$ to the MTT and NRU tests, and a $IC_{50}=370\text{ }\mu\text{M}$ to NAC test.

This results suggest that 4SRC act through of a histaminergic and cholinergic antagonism, presenting characteristics of citotoxicity low than DHC.

I. Farmacologia da Secreção Ácida Gástrica

As doenças ulcerativas do trato gastrointestinal dependem de duas condições: presença de ácido e predisposição das mucosas a lesões por fatores diversos. Não há maneiras estabelecidas de interferir farmacologicamente com as predisposições, genéticas ou não, da mucosa a danos. Assim sendo, terapias preventivas continuam sendo o meio mais utilizado de controle da secreção ácida, pois reverter os danos causados à mucosa e controlar os eventos inflamatórios que se sucedem após a instalação das lesões são tarefas bem mais complexas.

As alternativas terapêuticas disponíveis para regulação da secreção ácida buscam modificar a influência neural, por meio de cirurgias, ou alterar os mecanismos que envolvem os segundos mensageiros na célula parietal, através da utilização de antagonistas muscarínicos ou histamínicos; alterar o último evento da cascata de reações envolvidas com a secreção pode ser conseguida com o uso dos inibidores da bomba protônica (Hirschowitz et al., 1995).

1. Bases Celulares da Secreção Ácida

Nos 25 primeiros anos do século vinte foram desvendados os principais eventos envolvidos com a estimulação da secreção ácida. A gastrina, um hormônio liberado a partir do antro (Edkins, 1906), e a acetilcolina liberada a partir do nervo vago (Loewi et al., 1921), foram respectivamente identificadas como agentes responsáveis pelas regulações periférica e central da secreção ácida; pouco antes desta última descoberta, o papel da histamina como potente secretagogo já havia sido descrito (Popielski, 1920).

A terapêutica para regulação da secreção ácida, até 1973, dependia de intervenção cirúrgica ou da utilização de bloqueador vagal, o extrato de *Atropa beladonna* que contem a atropina, quando surgiu a cimetidina, o primeiro antagonista de receptores H_2 . A introdução desta droga modificou os tratamentos até então empregados na úlcera, assim como contribuiu no sentido de melhorar a compreensão da fisiologia regulatória das secreções gástricas. Esse antagonista de receptor H_2 não somente bloqueou a secreção ácida induzida por histamina, como também aquela induzida por gastrina e, parcialmente, aquela induzida por mediação vagal. É importante ressaltar que as moléculas de histamina não se assemelham nem à gastrina e nem à acetilcolina; podendo-se afirmar que a liberação de histamina é o maior evento regulatório na estimulação da secreção ácida (Sachs et al., 1994).

Experimentos *in vivo* sugerem que a gastrina e a acetilcolina estimulam uma célula da mucosa gástrica, denominada enterocromafin “like” (ECL), a liberar histamina. A liberação de gastrina, a partir

da célula G antral, é o evento responsável pela estimulação de histamina a partir das células ECL *in vivo*, tornando-se fundamental para a estimulação da secreção ácida. A somatostatina, contida nas células D localizadas no fundo e antro do estômago, inibe a gastrina e, conseqüentemente, a estimulação da secreção ácida através de sua ligação às células ECL (Hakanson et al., 1986).

A regulação da secreção ácida por células endócrinas gástricas envolve, portanto, interações positivas e negativas entre o trio vital de células G, ECL e D.

2. Regulação da Secreção Ácida

O Sistema Nervoso Central (SNC) regula a atividade parassimpática no plexo mioentérico da parede gástrica. A regulação é realizada por modulação da atividade dos núcleos do hipotálamo através de peptídeos e transmissores químicos. A modificação da atividade vagal afeta a secreção ácida através de alterações nas complexas redes dos sistemas reflexos aferentes e eferentes (Tache et al., 1990).

Há dois agonistas com seus respectivos receptores que são fundamentais na ativação das células parietais: histamina em receptores histaminérgicos H_2 e acetilcolina em muscarínicos M_3 . É relatado que as atividades da acetilcolina, liberada a partir das fibras neurais, sobre o receptor M_3 e a da histamina, liberada a partir das ECL, sobre o receptor histaminérgico H_2 , regulam a secreção ácida sobre a mucosa (Hakanson et al., 1986). A liberação de histamina é realizada através da ligação de gastrina ou acetilcolina aos seus respectivos receptores presentes na membrana destas células (Berqvist et al., 1980). Já a regulação da secreção ácida gástrica, pela ligação direta da gastrina aos seus receptores nas células parietais, tem importância menor do que aquela produzida por sua ligação aos receptores de gastrina presentes nas células ECL do fundo do estômago.

A gastrina é liberada em resposta a produtos da digestão tais como aminoácidos; sua inibição é promovida pela somatostatina (produzida pelas células D) quando o pH cai abaixo de 3 no antro. O ácido aplicado diretamente à célula G inibe a secreção de gastrina; já na célula D, o mesmo procedimento estimula a secreção de somatostatina, o que conseqüentemente inibe a liberação de gastrina (Walsh et al., 1975).

A inibição da ativação de receptor de histamina H_2 é um meio efetivo e seguro de regular a secreção ácida gástrica. Ligantes colinérgicos não somente estimulam a liberação de histamina a partir das células ECL, como também estimulam diretamente a célula parietal por ativação do receptor M_3 na superfície celular (Wilkes et al., 1991). Por essa razão, um antagonista do receptor M_3 pode inibir

completamente, tanto diretamente quanto indiretamente, a secreção ácida visto que as vias de estimulação da célula parietal não são distintas.

A adenilatociclase, ativada pela histamina, pode também ser ativada por ação da gastrina na célula parietal. Se a estimulação de histamina é permissiva às outras vias dependentes de cálcio, pode ser possível, através dela, inibir completamente a secreção ácida gástrica utilizando-se um antagonista de receptor H_2 ; igualmente, se a elevação do cálcio intracelular é necessária para estimulação da secreção gástrica pela histamina, a supressão destes estoques intracelulares de cálcio pode também ter efeito pleiotrópico na estimulação da secreção ácida pela via do adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) (Chew et al., 1986). Além disso, receptores estão sujeitos à regulação por internalização ou modificação em sua taxa de síntese. Tem sido observada tolerância para antagonistas de receptores H_2 , talvez devido a "up regulation" de alternância das vias de estimulação da secreção ácida (Nwokolo et al., 1990).

3. Sistema de Receptores da Célula Parietal

A ligação de agonistas aos receptores da membrana da célula parietal é responsável por estimular a secreção ácida gástrica; estes secretagogos são acetilcolina, histamina e gastrina; entretanto, sabe-se agora que a prostaglandina (PG) e o fator de crescimento epidermal (EGF) ligam-se a receptores específicos de inibição da secreção ácida gástrica. A interação dos diferentes agentes com seus receptores desencadeia reações em cascata conhecidas como "segundos mensageiros" os quais levarão, em conjunto, à estimulação da secreção ou à sua inibição.

3.1. Receptor muscarínico e seu segundo mensageiro

Devido à eficácia de antagonistas do receptor H_2 , o receptor muscarínico tem sido pouco estudado em relação à secreção ácida gástrica. Somente em 1971 foi aceito, na terapêutica, que esse receptor pudesse estar envolvido na regulação da secreção.

Cinco subtipos de receptor muscarínico (M_1 - M_5) foram clonados (Kajimura et al., 1992). Receptores muscarínicos e seus subtipos tem sido encontrados na mucosa gástrica de muitas espécies, especificamente nas células parietais, principais e endócrina. Há três receptores definidos por antagonistas muscarínicos seletivos: M_1 , M_2 e M_3 . Mecanismos ligados aos receptores M_1 , M_3 e M_5 envolvem ativação da fosfolipase (PL) C por liberação intracelular de cálcio, ativação da PLA_2 com elevação do ácido aracdônico, e liberação do cálcio intracelular dos reservatórios. Os receptores M_2 e M_4 inibem a adenilato ciclase e a ativação dos canais de potássio (Peralta et al., 1988). Esses receptores

estão acoplados à proteína G, com sete alças transmembrânicas, estando o segmento N-terminal localizado na parte extracitoplasmática.

Utilizando-se antagonistas seletivos, alguns estudos detectaram diferentes subtipos de receptores muscarínicos, sendo o receptor M_3 expresso nas células parietais (Kajimura et al., 1992). Esses receptores estão presentes tanto em células secretoras, quanto no músculo liso. A liberação de histamina, a partir das células ECL, parece ser sensível aos antagonistas M_1 e, por essa razão, explica-se a eficiência da pirenzepina na inibição da secreção ácida (Hirchowitz et al., 1995).

Receptores muscarínicos do tecido gástrico estão acoplados ao sistema de segundo mensageiro fosfoinosítídeo (IP_3) estimulatório e aumento da secreção de íons de hidrogênio (H^+), pepsinogênio e muco (Seidler et al., 1991); alterações na membrana dos receptores e em seus acoplamentos com os agonistas tem sido intensivamente investigadas. A princípio, modificações sutis no sistema de segundo mensageiro podem resultar em alterações consideráveis na resposta fisiológica; exemplo disto é a interação sinérgica entre AMP_C e Ca^{2+} , como sistema de segundo mensageiro na célula parietal, podendo gerar redução da resposta celular (Pfeiffer et al., 1995).

A ação agonista sobre o receptor M_3 na célula parietal não depende somente da liberação temporária de Ca^{2+} , que é determinada pela ativação da PLC e formação de IP_3 , mas depende ainda da entrada de cálcio modulada por outros compostos (Wilkes et al., 1991). Com a utilização de um antagonista colinérgico, o 4-DAMP, foi possível demonstrar a dissociação entre a liberação de cálcio, a partir dos estoques intracelulares, e a entrada de cálcio através da membrana da célula parietal. Por essa razão, acredita-se que hajam dois subtipos diferentes de receptor M_3 ou dois diferentes tipos de acoplamentos do mesmo receptor às proteínas, resultando em afinidades ligantes distintas (Kajimura et al., 1992).

Ainda que antagonistas muscarínicos tenham sido pouco utilizados na terapêutica de doenças relacionadas à acidez gástrica, tem sido demonstrado em cães que altas doses de antagonistas não seletivos, como a atropina, são capazes de abolir a secreção ácida tão eficazmente quanto os antagonistas H_2 (Hirchowitz et al., 1969). A eficácia do antagonismo seletivo M_1 , obtido por exemplo com pirenzepina, provavelmente se deve à inibição da secreção, por interferência com a liberação de histamina a partir das células ECL, ou por inibição pré-ganglionar através da ação direta na célula parietal, a qual possui receptor M_3 relativamente insensível à pirenzepina. A ação da estimulação vagal na célula parietal e na ECL pode ser demonstrada por meio da supressão efetiva promovida por atropina; outros antagonistas clinicamente efetivos como a pirenzepina e a telenzepina, tem maior

seletividade sobre os receptores M_1 , mas são menos eficazes que a atropina em suprimir os efeitos da estimulação vagal.

O efeito do antagonista muscarínico na regulação da secreção ácida coloca em discussão a importância do papel do cálcio na sua estimulação.

3.2. Receptor de Histamina e seu segundo mensageiro

A histamina é o principal estimulante parácrino da secreção ácida gástrica; ao ser liberada a partir da mucosa fúndica, presumivelmente das células ECL, estimula a secreção ácida por interação com receptor H_2 localizado na membrana da célula parietal (Vuyuru et al., 1997). Em ratos, as células ECL representam 80% das células contendo histamina, enquanto que no homem e no cão apenas 20%. Receptores de histamina tem sido subdivididos em três subclasses: H_1 , H_2 e H_3 .

A utilização de antagonistas seletivos e competitivos para receptores H_2 , como a cimetidina e a ranitidina, resulta na supressão efetiva da secreção ácida em algumas doenças relacionadas à acidez. A descoberta dessas drogas tem contribuído para esclarecer algumas das vias fisiológicas envolvidas na estimulação ácida. Por exemplo: na década de 60 considerava-se a gastrina como o maior mediador da secreção ácida; entretanto, esta idéia foi descartada pela demonstração do potencial de inibição da secreção gástrica por antagonistas dos receptores H_2 da histamina (Black et al., 1972). Antagonistas H_2 são também capazes de bloquear, ainda que parcialmente, a estimulação colinérgica, sugerindo que a ativação da secreção por gastrina e aquela produzida por estimulação do nervo vago, via acetilcolina, seja mediada inteiramente ou em parte pela liberação de histamina liberada a partir das células ECL (Hirshowitz et al., 1995).

Algumas especulações foram feitas sobre outro subtipo de receptor histaminérgico, o receptor H_3 . A R- α -metil histamina, um agonista seletivo do receptor H_3 , foi capaz de inibir a secreção estimulada por gastrina; esta inibição foi revertida por um antagonista H_3 , a tioperamida (Bado et al., 1991). Em glândulas gástricas de coelho, a interação do antagonista com o receptor H_3 aumenta, enquanto que aquela do agonista diminui, tanto a liberação de histamina, quanto a secreção ácida. Essas descobertas são devidas ao fato de que as células ECL tem um receptor H_3 inibidor da liberação de histamina estimulada por gastrina.

Alguns estudos explicam esses dados: a hipótese é que a histamina seria capaz de regular sua própria síntese e liberação, via autoreceptor H_3 (Hollande et al., 1993). Por outro lado, estudos prévios realizados em segmentos de mucosa do fundo de estômago de rato, indicam que a histamina, ou outro

agonista seletivo de receptor H_3 , é capaz de inibir a secreção de somatostatina e, então, estimular a secreção de histamina (Schubert et al., 1993). Parece que na mucosa fúndica intacta, o efeito estimulatório na secreção de histamina, mediada por inibição da somatostatina, predomina sobre o efeito inibitório autócrino da secreção de histamina na célula ECL.

Tem-se demonstrado que o receptor H_2 está acoplado à via do AMP_C , enquanto que o acoplamento dos receptores H_1 é via Ca^{2+} ; demonstrou-se também que o receptor H_2 é capaz de elevar a mobilização intracelular de Ca^{2+} (Negulesco et al., 1988). O papel dessa elevação de $[Ca^{2+}]_i$ na secreção ácida gástrica é desconhecido; entretanto, isso implica no fato de que o receptor possa estar acoplado não somente à adenilato ciclase, como também à PLC na célula parietal.

Como resultado da elevação do AMP_C na subunidade regulatória, uma variedade de proteínas é fosforilada, o que pode ser relevante para a ativação da secreção. A ação do AMP_C é mais efetiva que aquela produzida pela estimulação do receptor muscarínico e ativação do transporte de KCl (Hirchowitz et al., 1995).

É aceito na clínica médica que cerca de 10% dos pacientes portadores de úlcera duodenal tem cicatrização mais lenta que o padrão de oito semanas, quando o tratamento é feito com este tipo de substância. Esse quadro pode ser resultante da resistência do receptor H_2 ao antagonista. A base para esse fenômeno não é conhecida; entretanto, considerações em relação à farmacologia da célula parietal podem clarear alguns aspectos. Além disso, como são duas vias paralelas envolvidas na estimulação da célula, uma mediada vagalmente e a outra mediada por liberação de histamina a partir da célula parácrina, provavelmente a alteração na predominância da secreção por uma ou outra via seja devida à resistência ao antagonismo.

A “up-regulation” dos receptores H_2 ou de suas vias celulares, ainda que altas doses de antagonista de receptor H_2 não demonstrem promover resistência ao tratamento, pode ser uma das explicações. Outro fenômeno que tem sido descrito envolve tolerância aos antagonistas do receptor H_2 . Tolerância a antagonistas pode novamente estar relacionado a “up-regulation” de receptores alternativos, tais como receptor M_3 na célula parietal, ou dessensibilização de receptor H_2 .

3.3. Receptor de Gastrina e seu segundo mensageiro

A interação da gastrina ao receptor, presente na mucosa gástrica, é responsável pela liberação da maior fração do ácido gástrico. Contudo, parece que o maior efeito da secreção ácida no estômago é exercido por ativação da liberação de histamina das células ECL antes da ativação da célula parietal (Kopin et al., 1992).

A ação de agonistas nos receptores de gastrina tem mostrado que seu papel está relacionado à mudança da concentração intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Outras alterações, verificadas a partir da interação da gastrina ao seu receptor, ocorrem através do estímulo produzido por este secretagogo sobre a célula parietal; exemplo clássico deste fato é a elevação do AMP_C . Alterações similares são observadas por estimulação muscarínica, mas estas não requerem necessariamente AMP_C . É possível que outras vias, em adição às aquelas indutoras de modificações na $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sejam ativadas por vias muscarínicas (Wilkes et al., 1991). Remoção de cálcio extracelular, contudo, inibe a secreção ácida estimulada por um agonista muscarínico, carbachol, sugerindo que a alteração do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ seja necessária, mas não suficiente, para estimular a secreção da célula parietal.

3.4. Receptor de Prostaglandina

A demonstração de que baixas concentrações de PG, do subtipo E_2 , inibem a secreção ácida criou uma grande expectativa de que esses compostos possuiriam atividade antiúlcera.

Doses antissecretoras de PG exercem um efeito conhecido como citoproteção, o qual ocorre com níveis baixos de prostaglandina; a citoproteção foi observada a partir de modelos de indução de hemorragias gástricas por várias substâncias como etanol e ácido; essas hemorragias foram bem menores quando administrou-se, previamente, uma baixa concentração de prostaglandina do subtipo E_2 . Contudo, experiências clínicas mostram que esse efeito protetor foi de pequena relevância na doença humana, exceto na prevenção da úlcera gástrica induzida por DAINes (drogas anti-inflamatórias não esteroidais). As DAINes bloqueiam a via da ciclooxigenase e esse efeito pode contribuir para os danos gástricos induzidos, por exemplo, pela aspirina (Rainsford et al., 1980).

Os receptores da prostaglandina gástrica são do subtipo EP_3 , e os mesmos são acoplados à proteína G_i a qual inibe a adenilato ciclase estimulada por histamina na mucosa gástrica (Chen et al., 1988).

3.5. Receptor de Fator de Crescimento Epidermal (EGF)

Esse membro da família de receptores da tirosina quinase está presente na célula parietal de mamíferos. Tem sido postulado que EGF e seu homólogo, o fator de transformação do crescimento ($\text{TGF}\alpha$), atuam como importantes moduladores endógenos da secreção ácida gástrica, bem como na regulação mitótica das células epiteliais gástricas (Barnard et al., 1995). EGF/ $\text{TGF}\alpha$ parecem modular as funções da célula parietal de maneira autócrina (Beauchamp et al., 1989).

O tratamento crônico com EGF aumenta a produção ácida da cultura de célula parietal, enquanto que a estimulação aguda de receptor EGF inibe a secreção ácida estimulada por histamina, através do acoplamento a proteína G_i (Chew et al., 1994). EGF sozinho causou uma estimulação

transitória da secreção ácida idêntica à produzida pelo carbacol (Lewis et al., 1990), sem afetar a $[Ca^{2+}]_i$ na célula parietal ou naquelas estimuladas pela via do carbacol (Wang et al., 1996). Ainda que a situação seja caótica no presente, análises do efeito do EGF parecem ser uma área atrativa de estudos.

3.6. Receptor de Somatostatina

A somatostatina, liberada a partir de células D do antro e do fundo do estômago, é considerada como um hormônio inibitório da secreção ácida do mesmo modo que a gastrina é considerada como hormônio estimulatório (Prinz et al., 1993).

Sendo assim, a regulação periférica da secreção ácida depende principalmente da integração dos hormônios e da liberação de transmissores a partir dos 3 tipos de célula: célula ECL, célula G e células D do fundo e do antro.

II. Transdução de Sinal e Ativação da Secreção Ácida na Célula Parietal

A célula parietal, com seus distintos receptores, continua a fascinar fisiologistas, biólogos celulares e bioquímicos. Apesar desta célula ser bastante estudada incluindo o potencial eletroquímico que culmina com sua secreção, alguns aspectos continuam pouco claros, principalmente em relação à origem e aos mecanismos moleculares envolvidos (Black, 1993). Exemplo disto são as interações dos vários agentes secretagogos com seus receptores específicos, envolvendo séries imensas de reações em cascata que conduzirão, finalmente, à secreção gástrica ou à sua inibição.

Acredita-se que no caso da histamina, o receptor H_2 esteja acoplado a proteína G_s , a qual ativa adenilato ciclase (ACase) produzindo (AMPc) e subsequente ativação de proteína quinase A dependente de AMPc (PKA); quando a acetilcolina interage com o receptor M_3 a via de sinalização também envolve proteína G, já que este receptor está acoplado ao sistema G/G_i , provavelmente G_q , para ativar a PLC produzindo 1,4,5-trifosfato inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG); IP_3 leva à liberação de $[Ca^{2+}]_i$ do retículo endoplasmático e, DAG junto com o Ca^{2+} ativam a (PKC) ou proteína quinase C (Urushidani et al., 1997). No caso da gastrina, o segundo mensageiro envolvido é o $[Ca^{2+}]_i$, embora outras vias não possam ainda ser descartadas (Wilkes et al., 1991).

1. Ativação de PKA

Há consenso de que a histamina, a principal via estimulatória da cascata secretora, estimula receptores H_2 para ativar proteínas G_s , acopladas à ACase, levando à produção de PKA dependente de AMPc, embora alguns outros receptores demonstrem estar acoplados também à proteína G_s (Yokotani

et al., 1994). Há dois tipos de PKA: tipo I e tipo II, com diferentes subunidades regulatórias, RI e RII, respectivamente. Tem sido postulado que o primeiro é predominantemente citosólico, enquanto o último associa-se ao citoesqueleto ou às membranas. Chew (1985) foi o primeiro a relatar que o tipo quinase I é seletivamente ativado por estimulação de histamina na célula parietal, enquanto que o estudo subsequente revelou que a desfosforilação do RII, a qual leva à liberação da subunidade catalítica, ocorre durante a estimulação pela via do AMPc, sugerindo que a PKA tipo II pode ter também importante papel regulatório (Goldenring et al., 1992).

Há ainda dados, obtidos a partir da literatura clínica experimental, mostrando que os antagonistas de receptor H_2 são inibidores mais potentes da secreção gástrica *in vivo* do que os antagonistas de gastrina ou de acetilcolina (Hirschowitz et al., 1995).

Quando se trata do papel do Ca^{2+} em potencializar a via do AMPc/PKA, no entanto, os dados já não são tão claros. O mecanismo pelo qual os mensageiros intracelulares promovem sua ação fisiológica final é ainda desconhecido. Apesar de existirem vários estudos sobre sua ação intracelular, o papel do Ca^{2+} não foi claramente estabelecido em relação às diferentes etapas dos eventos secretores. Alguns dados sugerem que a via do cálcio não é, por si só, responsável pela maquinaria secretora, mas que o cátion poderia atuar como um fator potencializador da via do AMPc (Cabero et al., 1995).

A estimulação de receptores muscarínicos M_3 promove uma elevação do cálcio; entretanto, essa elevação leva somente a um pequeno estímulo da secreção ácida (Negulescu et al., 1989). Por outro lado, estímulos ao receptor M_3 usualmente provocam uma resposta bifásica simples de $[Ca]_i$, isto é, um aumento inicial transitório devido à liberação a partir dos depósitos intracelulares, seguido de um “plateau” que é sustentado graças a um posterior influxo de cálcio. Este evento já havia sido demonstrado anteriormente em outro tipo de músculo liso, o ducto deferente de rato (Souza Brito et al., 1986).

2. Agentes Reguladores da Secreção ácida

Além dos agonistas e seus receptores envolvidos com a estimulação da secreção gástrica, há agonistas e, conseqüentemente, receptores que estão envolvidos com sua inibição; são eles: somatostatina, PG's e EGF/TGF α . Outros fatores antissecretores endógenos promoveriam esses efeitos, direta ou indiretamente, em outros sítios da célula parietal: por exemplo, fluxo sanguíneo ou secreção alcalina. Ainda que tenha sido demonstrado que a ativação de receptores A_1 de adenosina, em células

parietais, leva à inibição da secreção ácida, possivelmente via G_i , o meio fisiológico do receptor não está muito claro (Gerber et al., 1988).

III. Mecanismos de Defesa do Estômago

Os vários componentes de defesa da mucosa podem ser visualizados e organizados hierarquicamente correspondendo ao arranjo anatômico da mucosa.

- o primeiro nível consiste de fatores secretados dentro do lúmen incluindo ácido, bicarbonato, muco e fosfolípídeos ativos superficiais;
- no segundo nível encontra-se o epitélio, o qual é resistente às injúrias induzidas por ácido, formando uma barreira impermeável à difusão passiva; sendo capaz de promover reparos se sua continuidade for rompida;
- no terceiro nível estão a microcirculação da mucosa e sua associação aos nervos aferentes sensoriais dentro da mucosa e submucosa; o refluxo de ácido ou toxinas para dentro da mucosa resulta em elevação, neuronalmente mediada, do fluxo de sangue da mucosa para limitar os danos e facilitar o reparo;
- o sistema imune consiste de várias “células alarme”, tais como mastócitos e macrófagos, que ao detectarem a entrada de um material estranho dentro da mucosa, organizam uma resposta inflamatória apropriada; este seria o quarto nível de arranjo anatômico da mucosa.
- no quinto e último nível de organização estariam fatores de reparo/crescimento: quando os danos da mucosa se estendem profundamente, estes fatores são capazes de proporcionar: a) crescimento e regeneração das glândulas gástricas; b) regeneração da inervação do sistema nervoso extrínseco e intrínseco; e c) restabelecimento da microcirculação.

1. Ácido

A função primária do ácido gástrico é bactericida em relação às bactérias ingeridas. Com exceção de *Helicobacter pilory*, o ácido gástrico é bastante efetivo na minimização da colonização bacteriana do estômago. Hipocloridria e acloridria predispõem à exacerbação de severidade das infecções bacterianas e de certas infecções parasitárias. Evidências indiretas da importância da ação bacteriana do ácido gástrico podem ser obtidas a partir dos estudos com a cimetidina, nos quais demonstrou-se um

aumento de cinco vezes na diarreia de pacientes que tomaram drogas antissecretoras por um período de tempo prolongado.

O ácido também pode agir como fator limitante para a entrada de material antigênico no interior do intestino. A secreção ácida aumenta quando o material antigênico é administrado intragastricamente em ratos sensibilizados. Nesses casos, observou-se uma demora no esvaziamento gástrico e, conseqüentemente, aumento no tempo de exposição do antígeno à acidez gástrica.

A *H. pilory* não só possui um mecanismo de sobrevivência em meio ácido, como também é capaz de alterar a secreção ácida. O mecanismo responsável por elevar a secreção ácida gástrica em pacientes infectados com *H. pilory* não está completamente elucidado, mas há evidências de alteração na liberação de gastrina e de somatostatina, quando essas bactérias colonizam o antro gástrico. A elevação da secreção ácida, como resultado da infecção da *H. pilory*, pode contribuir na patogênese da úlcera duodenal.

2. Muco e Bicarbonato

A função da chamada “barreira muco-bicarbonato” na proteção da mucosa a partir das injúrias induzidas por ácido e pepsina, é um dos aspectos mais controversos da defesa da mucosa. Há algumas dúvidas em relação à função do muco como um agente de restrição à movimentação de bactérias para a superfície epitelial: as bactérias se prenderiam ao muco e, eventualmente, seriam excretadas nas fezes.

Foi proposto que o muco seria o agente responsável por uma contínua “cobertura” na superfície da mucosa, a qual secreta bicarbonato pelo epitélio; por essa razão, o muco agiria como camada por onde ocorre difusão do ácido luminal e sua conseqüente neutralização. Essa hipótese é sustentada pela demonstração do gradiente de pH que atinge níveis abaixo de 2, enquanto que a superfície do epitélio permanece com pH próximo à neutralidade.

Entretanto, essa teoria vem sendo questionada por diversas razões:

- (i) é questionável a formação de uma camada contínua de muco na superfície do estômago;
- (ii) um gradiente de pH não pode ser detectado na superfície da mucosa se o pH luminal for reduzido, como é freqüente em situações fisiológicas;
- (iii) existem circunstâncias experimentais nas quais o gradiente de pH não pode ser detectado, pois o epitélio resiste às injúrias induzidas por uma alta concentração de ácido, isto é, a barreira de muco-bicarbonato é funcionalmente redundante;

- (iv) discute-se que altas concentrações de ácido são encontradas nas glândulas gástricas na região da célula parietal e que essa é também uma região de alta concentração de pepsina; nesse local, no entanto, não há células secretoras de muco e, portanto, as células expostas a uma alta concentração de ácido e pepsina devem possuir mecanismos adicionais de resistência às lesões; e
- (v) se o muco forma uma camada contínua sobre a superfície da mucosa, como a condução do ácido poderia ocorrer, a partir das glândulas gástricas, em direção ao lúmen? Discute-se, assim, que o movimento do ácido em direção oposta esteja retardado em função da presença do muco.

Holm (1992) demonstrou experimentalmente que a pressão hidrostática, dentro das glândulas gástricas de rato, aumentou após estimulação da secreção ácida, sugerindo uma resistência do fluxo sobre parte da glândula. O autor propôs que a pressão hidrostática direciona o ácido e a pepsina através de canais na camada de muco. Fibras do músculo liso, arranjas em padrões como “cestos” ao redor das glândulas gástricas, podem ser responsáveis por gerar essa pressão. Bhaskar (1992) realizou uma base físico-química para a formação de canais de ácido através de um revestimento de muco na forma de gel. Ácido hidrocloreídrico, injetado em mucina gástrica de porco, mostrou ser capaz de formar canais discretos.

Um elemento adicional à defesa da mucosa é a junção de diversos mecanismos de defesa. Nervos aferentes sensoriais, ao detectarem a presença de ácido na lâmina própria, promoveriam um aumento da secreção de bicarbonato no epitélio. A via neuronal eferente está envolvida nesses processos, os quais só estão inicialmente delineados, embora já esteja claro que essa estimulação deva-se a um processo dependente de prostaglandina. Ren (1993) sugeriu que os nervos aferentes sensoriais também contribuem para a junção da secreção do ácido e defesa, via mecanismos neuroendócrinos. A estimulação desses nervos com capsaicina resulta na liberação antral de somatostatina, inibindo a liberação de gastrina e descarga de acetilcolina. Um exemplo de tais junções é o fato dos secretagogos das células parietais estimularem a síntese de mucina e liberarem fosfolípídeo ativo na superfície de células mucosas caninas isoladas.

3. Fosfolípídeos Ativos na Superfície

Hills (1983) propôs a existência de uma superfície luminal no estômago como uma camada de surfactante, moléculas que tornam uma das superfícies da mucosa hidrofóbica e, por essa razão,

resistente a danos induzidos por ácido luminal. Além disso, Goddard (1987) demonstrou que substâncias ulcerogênicas tais como aspirina e sais biliares, causam uma dissipação dessa camada, levando a um retorno do ácido e, posteriormente, à uma necrose da mucosa. Kao (1993) demonstrou que PG E₂ e seus análogos aumentam o volume de certas organelas dentro das células epiteliais da superfície gástrica. Essas organelas são consideradas como sítios de armazenamento para o surfactante gástrico. Íons de amônia e enzimas, como a fosfolipase elaborada por *H. pilory*, possuem a capacidade de atenuar o revestimento hidrofóbico e, por essa razão, pode-se explicar a diminuição da hidrofobicidade da superfície da mucosa em indivíduos infectados por *H. pilory*. Como extensão do estudo de fosfolipídeos ativos da superfície na defesa da mucosa, Lichtenberger (1995) relatou que as DAINes, pré associadas a fosfolipídeos, tem reduzido marcadamente a toxicidade gastrointestinal.

4. Epitélio

O estômago possui várias formas de se proteger, quando exposto continuamente a altas concentrações de ácido; uma das mais importantes é o epitélio gástrico. Ele é frequentemente renovado, com células “velhas” sendo deslocadas em direção ao lúmen. O epitélio gástrico humano renova-se completamente a cada 2-4 dias. A habilidade em permitir que as células velhas sejam repostas por células mais jovens, sem quebra significativa da barreira, é atribuída a um processo de extensão celular, ou seja, as células vizinhas gradualmente “apertam” as células envelhecidas na base.

Há uma hipótese de que a barreira de muco-bicarbonato ofereceria proteção considerada como essencial na defesa da mucosa contra o ácido presente na superfície celular epitelial, que muitas vezes, está com pH de 0,8. Utilizando cultura de células principais, Sanders (1985) demonstrou que a membrana apical dessas células era muito resistente à ação do ácido; contudo, quando a membrana basolateral dessas células foi exposta à uma solução com pH 5.5, as lesões ocorreram muito rapidamente. Esses dados sugerem que a membrana apical da célula epitelial é capaz de resistir à injúria provocada por alta concentração do ácido, independente de qualquer contribuição do muco, bicarbonato ou fluxo sanguíneo.

Essa propriedade foi estudada por Chen (1994), em monocamadas de células oxínticas da mucosa de cão, para verificar o efeito da permeabilidade da membrana apical e seu comportamento frente à exposição ao ácido. Como o pH apical foi reduzido de 7.0 para 2.5, a resistência elétrica da monocamada aumentou, indicando redução da permeabilidade paracelular. Além disso, a redução do pH

para 1.7 resultou em diminuição marcante da resistência da monocamada, além de um aumento da permeabilidade.

5. Fluxo Sangüíneo da Mucosa

O papel da densa rede de capilares é fundamental na superfície do epitélio do estômago. Em adição à sua função fornecedora de oxigênio e nutrientes para o epitélio, a microcirculação também remove, dilui e neutraliza substâncias tóxicas que se difundem de dentro da mucosa para o lúmen. Quando o epitélio é danificado, a microcirculação também exerce um papel importante que é o de criar um microambiente sobre o local lesado conduzindo a um reparo (Wallace et al., 1996).

Segundo Gannon e colaboradores (1984), a arquitetura vascular da mucosa é idealmente adaptada à “entrega” do bicarbonato no epitélio. Arteriolas passam próximas às membranas das células parietais, onde 1 mol de bicarbonato é secretado dentro do sangue para cada mol de ácido clorídrico secretado. Esse bicarbonato é carregado então para a superfície luminal onde pode se difundir dentro das células epiteliais e ser ativamente transportado dentro do lúmen, lançando-se sobre a camada de muco. O aumento da “entrega” de bicarbonato para a superfície do epitélio, durante a secreção do ácido, é referido como “fluxo alcalino”.

O fluxo sangüíneo da mucosa é modulado por algumas substâncias endógenas; dentre as mais importantes estão peptídeos relacionados ao gene calcitonina (CGRP), prostaglandina e óxido nítrico. Quando a mucosa é exposta a um irritante ou quando ocorre retorno do ácido, um rápido aumento de fluxo sangüíneo pode ser detectado. Esse aumento de fluxo sangüíneo parece estar relacionado à remoção de toxinas e à diluição ou neutralização do ácido. A restrição mecânica do fluxo sangüíneo leva ao desenvolvimento de necroses hemorrágicas. Holzer (1991) realizou uma série de estudos que caracterizou o mecanismo responsável por essa importante resposta. Nervos aferentes sensoriais, os quais possuem suas terminações abaixo do epitélio, podem detectar a entrada de ácido (e, possivelmente, de outras toxinas) para dentro da mucosa; isso resulta em ativação desses nervos. Ao retornar para o SNC, os impulsos nervosos gerados afetam diretamente o tônus das arteriolas da submucosa; o tônus desses vasos é que irá regular o fluxo sangüíneo.

Liberação de CGRP, a partir dos neurônios aferentes sensoriais, resulta na produção de óxido nítrico (NO), presumivelmente por células endoteliais que revestem a submucosa das arteriolas (Li et al., 1992; Lippe et al., 1992). A difusão do NO (para dentro das células dos vasos adjacentes do músculo liso) promove estimulação da guanilato ciclase solúvel aumentando os níveis intracelulares de GMP_C ,

gerando relaxamento. Interferência com algum aspecto dessa via irá influenciar tanto a produção de hiperemia reativa, quanto a resistência da mucosa às lesões. Por exemplo: abalos prévios nos nervos aferentes sensoriais, através do tratamento com capsaicina, abolem a resposta hiperêmica e aumentam significativamente a susceptibilidade da mucosa às lesões (Holzer, 1991).

Outro exemplo de ligação da resposta defensiva à estimulação da secreção ácida pelo NO, é o fato de que o mesmo tem sido demonstrado ser promotor da “down-regulation” da liberação de histamina e de outros mediadores. Além disso, o aumento do fluxo sanguíneo da mucosa em resposta à estimulação da secreção ácida, age como um “feedback” inibidor da secreção através da supressão da liberação de histamina.

6. Reconstituição

O termo “reconstituição” refere-se ao processo de reparo epitelial da mucosa, que envolve migração rápida de células cicatrizantes aos locais lesionados na base da membrana desprotegida. As células gástricas estão ligadas à membrana basal da célula epitelial e este local é bastante sensível aos danos induzidos por ácido.

Tendo ocorrido dano na mucosa, forma-se uma “capa mucóide” sobre o local lesionado, que consiste de fragmentos celulares, muco e plasma (incluindo proteínas tais como fibrina e albumina). A capa mucóide provém de um microambiente que conduz à reconstituição epitelial; o pH da capa mucóide é mantido em torno de 5 (Wallace et al., 1991). A manutenção desse pH relativamente alto, nesse microambiente, é dependente de um suprimento contínuo de sangue na região. É comum que o plasma proveniente dos vasos sanguíneos seja responsável por tamponar algum ácido que se difunda de dentro da capa mucóide; mantendo assim o pH nesse microambiente. A capa mucóide serve para “capturar” o plasma e para interromper, ainda que brevemente, o fluxo sanguíneo; sem a capa ocorre uma queda do pH. A progressão dos danos do epitélio superficial acabará por abranger também a mucosa, causando uma lesão hemorrágica grave.

Evidências têm sugerido que certos fatores de crescimento podem contribuir para esse processo; por exemplo: o fator de crescimento fibroblástico (FGF) tem sido demonstrado comportar-se como uma influência positiva na reconstituição. Paimela (1993) demonstrou que a aplicação luminal de protamina ou suramina, as quais interferem com a ação de bFGF endógeno, inibiu significativamente a recuperação funcional da célula epitelial após danos da mucosa induzidos por salina hipertônica. Por outro lado,

sucralfato aplicado luminalmente, pode se ligar ao bFGF e, desse modo, prevenir essa degradação pelo ácido, permitindo a reconstituição epitelial que pode ocorrer no pH luminal de 3.

7. Prostaglandinas e Óxido Nítrico

Ainda que alguns mediadores químicos participem na produção coordenada e efetiva da resposta da mucosa à injúria, há uma influência dominante da prostaglandina e do óxido nítrico nesse processo; tanto PG's quanto NO, são moduladores essenciais na defesa da mucosa. Essas substâncias influenciam cada um dos componentes de defesa da mucosa: inibem a secreção ácida, estimulam a secreção do muco e de bicarbonato, elevam o fluxo sangüíneo da mucosa e aceleram a cicatrização da úlcera. Exibem também efeito inibitório na atuação de mastócitos e na aderência de leucócitos ao endotélio vascular. É provável que ajam como imunomoduladores. A supressão da síntese e/ou liberação de prostaglandina ou de NO rende à mucosa maior susceptibilidade à injúria (Whittle et al., 1990).

Alguns estudos têm demonstrado que existem múltiplas formas de enzimas responsáveis pela síntese de prostaglandina e NO. No caso da síntese de prostaglandina, no mínimo duas formas da enzima ciclooxigenase (COX) têm sido caracterizadas (Mitchell et al., 1993). A forma predominante dessa enzima no estômago é COX-1, a qual é constitutivamente expressa. COX-2 é induzida por exposição a certas citocinas, mitógenos e endotoxinas, sendo encontrada nos locais de inflamação. A COX-2 é expressa no estômago inflamado e a contribuição da prostaglandina, derivada a partir dessa enzima, está em promover defesa da mucosa.

A óxido nítrico sintase (NOS) também existe nas formas induzida (iNOS) e constitutiva (Miller et al., 1995). No estômago, a forma constitutiva é encontrada no endotélio (eNOS) e neurônio entérico (nNOS). Estímulos apropriados, tais como na exposição à endotoxina, fazem com que a iNOS possa ser detectada (Brown et al., 1994). Isso sugere que o NO, derivado da iNOS, poderia exercer efeito citoprotetor no estômago; por outro lado, sugere-se que essa enzima produz níveis citotóxicos de NO (Tepperman et al., 1994), o que permanece pouco claro.

A respeito da importância do NO e da PG para a defesa da mucosa, tem sido demonstrado que estes mediadores podem regular a síntese um do outro: o NO pode estimular a atividade da COX, aumentandoconsequentemente a síntese de PG (Salvemini et al., 1993). Isso levanta a possibilidade de que drogas possam ser desenvolvidas através da estimulação de produção de PG's e/ou NO, as quais aumentariam a habilidade da mucosa gástrica para resistir às lesões induzidas por irritantes presentes no lúmen.

IV. Citotoxicidade

A cultura primária de células pode ser utilizada para a avaliação basal da citotoxicidade e da toxicidade em órgãos alvos. A maioria dos compostos químicos exerce seus efeitos tóxicos através da modificação do metabolismo celular e/ou por danos nas estruturas celulares. Por isso, um fator importante na citotoxicidade de compostos químicos é a relação entre o tipo celular estudado e o órgão alvo *in vivo* (Seibert et al., 1994). Outro fator importante em citotoxicidade é adequar as células para biotransformar xenobióticos em metabólitos mais ou menos tóxicos, processo conhecido como metabolização da droga ou biotransformação.

Drogas e outros agentes químicos são metabolizados no fígado por várias rotas, as quais são classificadas em dois grupos: reação de fase I, principalmente catalisada pela enzima citocromo P-450 e as reações de fase II ou conjugação. As atividades presentes nas fases I e II têm sido demonstradas em cultura de hepatócitos, provendo bons modelos para avaliar a citotoxicidade através do metabolismo (Roguet, 1993; Huvereers-Oorsprong, 1997).

Hepatócitos recém isolados (com menor idade de cultura) são melhores que aqueles com maior tempo em cultura, devido à perda seletiva de funções específicas das células no decorrer do tempo; a perda da enzima citocromo P450 ou diminuição de sua atividade é limitante para o uso de hepatócitos; isto pode ser minimizado ao adicionar o composto teste imediatamente após a adesão celular, verificando-se a toxicidade 24 h depois (Fry & Hammond, 1995). Neste sentido, a Organização Mundial de Saúde recomenda que os estudos do metabolismo de fármacos constituam parte obrigatória dos programas de avaliação pré-clínica e clínica de todos os medicamentos.

As transformações na estrutura química dos fármacos, promovidas enzimaticamente, podem acarretar profundas alterações na resposta biológica dado que modificações moleculares, ainda que singelas, podem alterar significativamente o farmacóforo. Alterações assim descritas dificultariam a interação do fármaco com o biorreceptor original, favorecendo novas interações com outras biomoléculas ou poderiam levar a novos e distintos efeitos biológicos, os quais são algumas vezes responsáveis por efeitos deletérios de um fármaco.

A técnica de incorporação do corante Vermelho Neutro permite verificar a função metabólica celular, uma vez que o método avalia a integridade lisossomal, refletindo a capacidade de células viáveis incorporarem o corante dentro de seus lisossomas. Esta técnica vem sendo largamente empregada nos

ensaios de citotoxicidade. Alterações provocadas pela ação de drogas, na superfície celular ou na membrana lisossomal, modificam a captação e ligação do corante, possibilitando a distinção entre células viáveis e células lesadas ou mortas. Há uma relação linear entre o Vermelho Neutro incorporado e o número de células viáveis nesta cultura (Borefreund & Puerner, 1984; Renzi, 1993; Roguet, 1993).

A redução do sal tetrazolium MTT para um produto colorido (formazan), pelo complexo enzimático succinato desidrogenase mitocondrial (Mosmann, 1983), também é potencialmente útil para ensaios de sobrevivência e proliferação celular. A conversão se realiza somente em células viáveis e a quantidade de formazan produzida é proporcional ao número de células presentes.

V. Espécie Estudada

Croton cajucara Benth. é uma espécie pertencente à família Euphorbiaceae; ela é popularmente comercializada no “Ver o Peso” de Belém do Pará, sob a denominação de “sacaca”. A planta é utilizada, para fins medicinais, pelos indígenas da região amazônica e seu nome significa “feitiço” (Simões et al., 1979).

A sacaca é um arbusto grande (Figura 1) que pode alcançar de 4 a 6 metros de altura com folhas pecioladas, biglandulosas, estipuladas, lanceoladas, longo-agudíssimo-acuminadas, perinervadas, verdes ou pardacentas, com até 14 cm de comprimento. As flores são reunidas em inflorescências dispostas em racemos terminais de 6 a 9 cm de comprimento e os frutos são tri-loculares (Pio-Correa, 1984). Esta planta é endêmica da região amazônica com centro de dispersão no Estado do Pará (Simões, 1979).



Figura 1: *Croton cajucara* em seu habitat

Em Belém, a utilização da sacaca está relacionada a problemas hepáticos tais como icterícia, hepatite, malária, além de diabetes. Além disso, existem várias outras indicações, na região amazônica, do uso do chá das cascas (Figura 2) e folhas para dores estomacais, gastrites e úlceras gástricas (Simões et al., 1979; Di Stasi, 1989; Van der Berg, 1982).



Figura 2: As cascas do caule de *Croton cajucara*

Uma revisão bibliográfica do gênero *Croton* mostrou que na espécie *C. sublyratus* foram isoladas diterpenolactonas (Figura 3) denominadas de plaunol A, B, C, D e E (Kitasawa et al., 1980), as quais foram patenteadas como drogas antiúlcera; a estrutura química dos plaunóis ativos mostra que os mesmos são muito semelhantes à desidrocrotonina (DHC), uma lactona sesquiterpênica isolada da *Croton cajucara*.

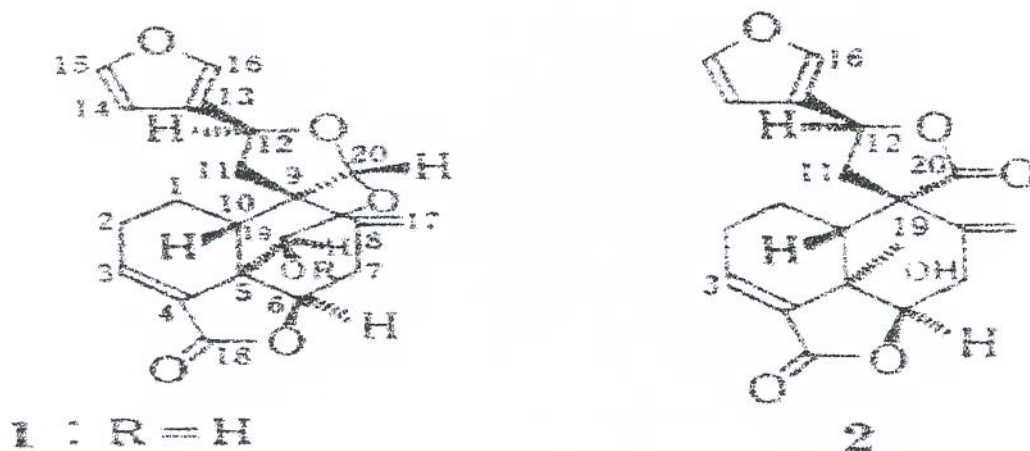


Figura 3 - Estruturas químicas do Plaunol A (1) e B (2).

1. Preparação do Material Vegetal

As cascas secas do caule de *Croton cajucara* foram submetidas à um processo de extração com hexano a quente, em soxhlet, por 12 h; o composto bruto foi obtido por cristalização direta e re-cristalizada três vezes com isopropanol. Na forma cristalina e com 98% de pureza, a substância foi identificada, por métodos espectroscópicos (RMN, IV, UV e EM), como trans-desidrocrotonina e codificada como DHC (Figura 3A); o rendimento do processo de obtenção de DHC a partir das cascas foi de 0,5%. Em seguida, a DHC foi submetida a uma reação química de adição de hidrogênio em alcenos (reação de hidrogenação catalítica), dando origem a um novo centro quiral na posição C4 com ambas as estereoquímicas (C4S e C4R). A crotonina semi-sintética codificada como **4SRC** continua trans na junção dos anéis A e B. A crotonina natural isolada não será utilizada pois tem rendimento extremamente baixo, quando comparada à DHC.

As estruturas químicas da DHC e da **4SRC** estão apresentadas a seguir:

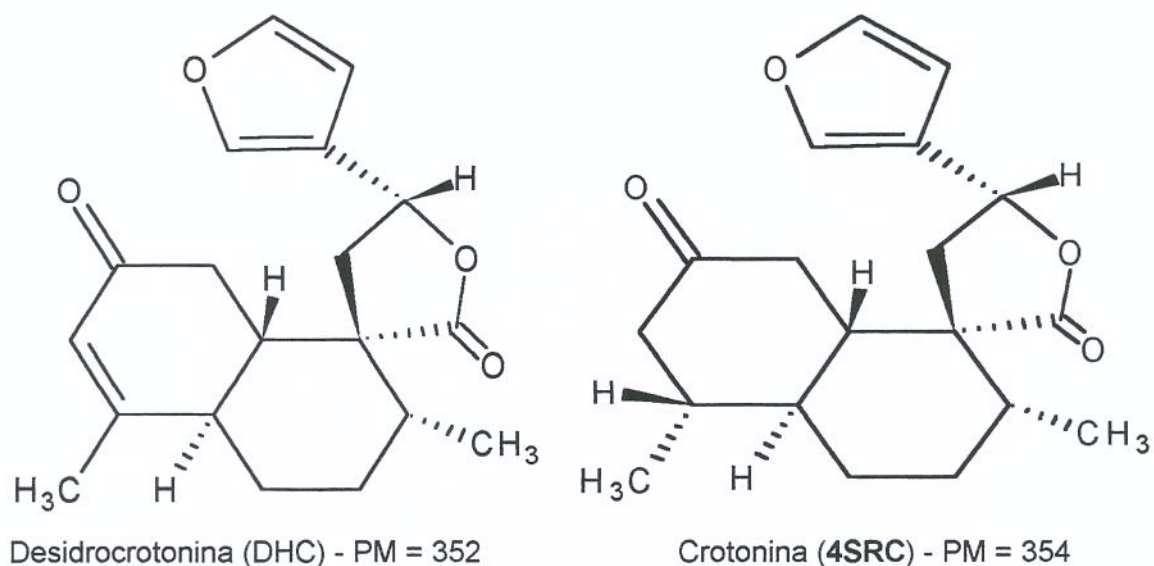


Figura 4 - Estruturas químicas da DHC (A) e da crotonina ou 4SRC (B) e seus respectivos pesos moleculares (PM).

2. Fotomicrografias de DHC e 4SRC

As imagens foram analisadas para o estudo da morfologia dos cristais.

2.1. Microscopia de Polarização

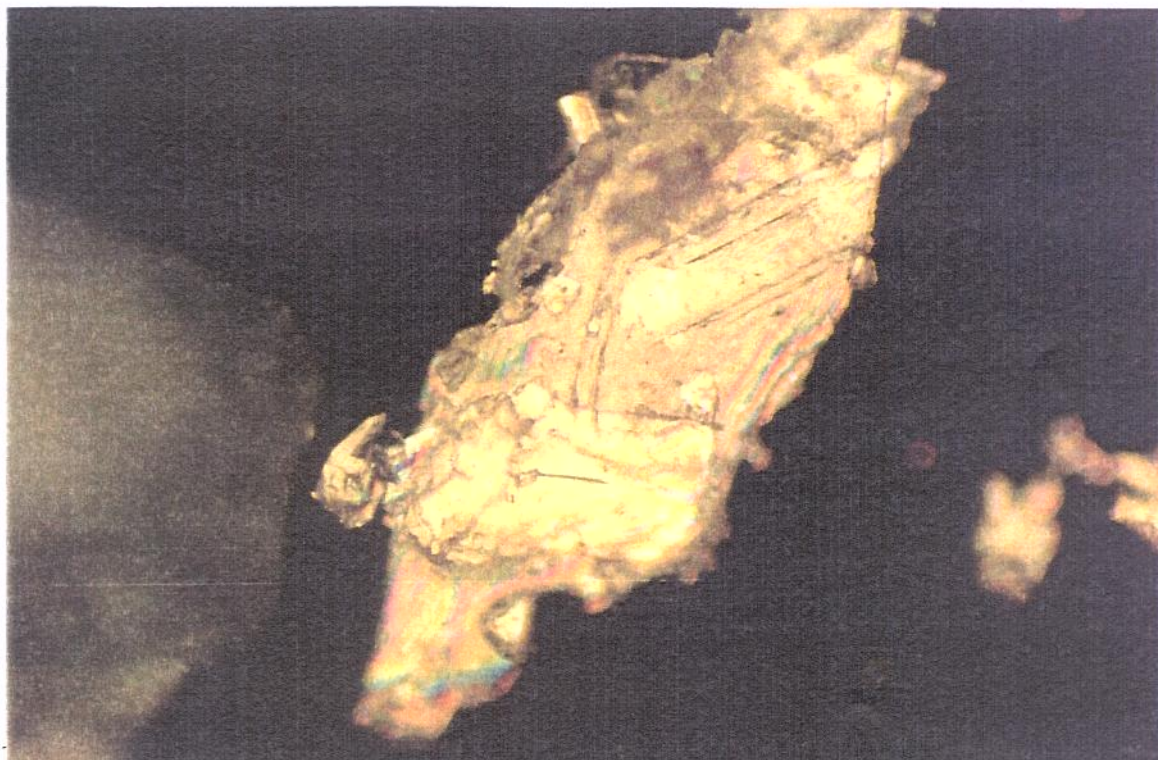
Para verificar a birrefringência do material foi utilizado um microscópio de polarização com compensador vermelho de 1ª ordem, cedido pelo Departamento de Histologia, IB/UNICAMP. Esse compensador é um cristal de quartzo, de espessura determinada, e cuja direção γ de propagação (maior índice de refração) forma um ângulo de 45° com a direção de propagação da luz plano-polarizada, introduzindo um retardo óptico constante e igual a 551 nm (Bennet, 1967), o que corresponde a cor vermelha de 1ª ordem.

Com a introdução de um material birrefringente positivo (como é o caso da maioria dos compostos biológicos), com o seu maior eixo direcionado paralelamente à direção γ de propagação do compensador, haverá uma somatória de retardos, que passarão a apresentar valores superiores a 550 nm e a cor da birrefringência será de 2ª ordem, o que em termos de cores da birrefringência nas espessuras normalmente utilizadas nos cortes (7-10 μm), corresponde ao azul de 2ª ordem ($\lambda=600-700$ nm). Da mesma forma, ao posicionar o material analisado com sua direção α de propagação (menor eixo neste caso) paralela a aquele do compensador tem-se um efeito de subtração de retardos que passarão a

valores inferidos a 551 nm (Bennet, 1967). Para os cortes em geral, é freqüente a obtenção da cor amarela de 1ª ordem ($\lambda=300-450$ nm).

O emprego de um feixe luminoso polarizado permite estudar certos aspectos da organização molecular da substância. Ao atravessar a 4SRC e a DHC, o feixe de luz passou por estruturas cristalinas, constituídas por cristais alongados e paralelos, que dividiram o feixe polarizado em dois, com planos de propagação da luz perpendiculares entre si. Quando os cristais foram observados com compensador “red plate one” (vermelho de 1ª ordem), com a direção γ de propagação paralela ao maior eixo do cristal, eles originaram cores de 2ª ordem (azul/verde) e quando perpendiculares a essa direção, originaram cores de comprimento de onda mais curta.

Os dados assim obtidos permitiram inferir que essas substâncias são birrefringentes positivas, como é o caso da celulose, do amido e do colágeno (Cortelazzo, 1991), devido ao seu eixo óptico ser paralelo ao eixo da estrutura molecular das substâncias. A 4SRC, entretanto, apresentou um arranjo molecular que permitiu uma organização espacial da molécula bastante definida, possibilitando a visualização dos cristais; isto não ocorreu com a DHC, cujos cristais apresentaram-se justapostos, não permitindo uma visualização conformacional definida da molécula (Prancha 1).



A



B

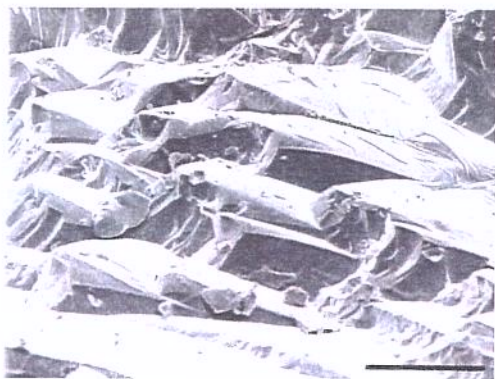
Prancha 1: Cristais de DHC (A) e de 4SRC ou crotonina semi-sintética (B) observados por Microscopia de Polarização com analisador e polarizador cruzados.

2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

Após a montagem dos cristais de DHC e de 4SRC em “strubs” apropriados, procedeu-se à deposição metálica, utilizando o Sputter Coater SCD 050 (Balzers) do laboratório de Microscopia Eletrônica do IB/UNICAMP.

As amostras foram levadas para observação ao microscópio eletrônico de varredura, marca JEOL, modelo JSM 5800 LV. Os registros fotográficos foram feitos em filme T-MAX 100 e em papel Kodabrome Print RCF3.

Os cristais de 4SRC apresentaram-se com uma estrutura geométrica mais definida, tanto na vista panorâmica quanto no detalhe, em relação aos cristais da DHC (Prancha 2).



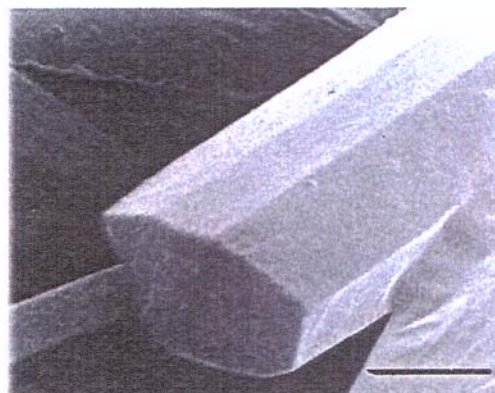
A



B



C



D

Prancha 2: Cristais de DHC e de 4SRC ou crotonina semi-sintética observados ao Microscópio Eletrônico de varredura: cristais de DHC (A) e de 4SRC (B) visualizados em menor aumento; cristais de DHC (C) e de 4SRC (D) observados em detalhe.

As transformações promovidas na estrutura química dos fármacos, observadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura e Polarização, podem acarretar profundas alterações na resposta biológica, - como veremos nos resultados obtidos pela 4SRC quando comparado a DHC - uma vez que modificações moleculares, ainda que singelas, podem alterar significativamente o farmacóforo, dificultando sua interação com o biorreceptor original, ou ainda, favorecendo novas interações com outras biomacromoléculas (Barreiro et al., 1996), correspondendo a novos e distintos efeitos biológicos, algumas vezes responsáveis pelos efeitos deletérios de um fármaco.

VI. Modelos Experimentais

Vários modelos foram utilizados para o estudo da úlcera péptica. Essa patologia expressa-se na vida diária do ser humano por mecanismos distintos. Os ensaios realizados ao longo dessa dissertação serão rapidamente descritos, uma vez que os detalhes foram apresentados nos artigos correspondentes. Os modelos empregados neste trabalho de modo geral, mimetizam as maiores causas da patologia ulcerativa gástrica no homem.

1. Estudo da atividade antiulcerogênica

- Etanol e etanol/HCl – ambos são agentes irritantes moderados que possuem ação necrotizante direta sobre a mucosa gástrica (Morimoto et al., 1991; Mizui e Doteuchi, 1983);
- Indometacina /betanecol – no caso da indometacina, uma DAINE, as lesões na mucosa gástrica são decorrentes da inibição da síntese de PG's e, conseqüentemente, da diminuição dos mecanismos de citoproteção da mucosa gástrica mediados por estas substâncias. Além desse fator, ao efeito de redução da citoproteção podem também ser agregados aumento da motilidade gástrica e ativação de neutrófilos que, conjuntamente, atuam na indução da ulcerogênese (Hayden et al., 1978; Morimoto et al., 1994); já o betanecol é um agente parassimpatomimético que atua sensibilizando a mucosa gástrica através do estímulo da secreção ácida e pepsina facilitando, assim, a irritação gástrica causada por DAINEs (Rainsford, 1987);
- Estresse por imobilização e frio – neste tipo de lesão gástrica ocorrem alterações no fluxo sangüíneo da mucosa gástrica, além de estímulo da secreção ácida, ambos fatores promotores de lesões (Levine, 1971)

- Ligadura de Píloro – neste ensaio as lesões obtidas são usadas na determinação da concentração de ácido total, pH e volume gástrico (Shay et al., 1945).

2. Estudo dos mecanismos de ação

- Determinação do muco da parede gástrica – drogas são testadas no sentido de verificar se a droga teste tem habilidade de alterar as barreiras protetoras, ou seja, se as drogas alvo são capazes de interferir com as barreiras protetoras de lesões gástricas (Corne et al., 1974)
- Antagonismo ao receptor de Histamina – estuda-se o efeito da substância teste sobre o receptor H_2 da histamina, a fim de aumentar a eficácia do tratamento de úlcera gástrica através da síntese de novos antagonistas seletivos (Krielaart et al., 1990; Bado et al., 1995).
- Antagonismo ao receptor Muscarínico – neste caso, objetiva-se estudar os efeitos da droga teste sobre os receptores da acetilcolina já que os agentes colinérgicos, em contraposição à gastrina, aumentam ao máximo a secreção ácida estimulada por histamina. A ação do dois secretagogos promove um efeito potencializador sobre a célula parietal (Vane, 1957; Dial et al., 1981);
- Determinação da produção de Prostaglandina – estuda-se, indiretamente, a habilidade da droga teste em estimular a secreção de muco e bicarbonato no estômago, e inibir a secreção de histamina (Curtis et al., 1995; Takeuchi et al., 1997);
- Determinação da produção de Óxido Nítrico – o NO tem um papel crucial na defesa da mucosa gástrica, que é a resposta hiperêmica à irritação luminal, razão pela qual o efeito da droga teste é avaliado como um dos possíveis mecanismos da ação antiulcerogênica.

Dentro de um estudo de relação estrutura-atividade envolvendo lactonas, que vem sendo realizado no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Fisiologia e Biofísica do IB/UNICAMP, o objetivo geral é o de encontrar substâncias semelhantes à DHC que tenham a mesma potência em relação à atividade farmacológica, sem apresentar os efeitos tóxicos da mesma, os quais foram observados em estudos de citotoxicidade de curto e médio prazo.

O objetivo específico deste trabalho foi o de estudar a atividade farmacológica da 4SRC ou crotonina semi-sintética, obtida a partir da DHC isolada da *Croton cajucara*, investigando:

- sua atividade antiulcerogênica em modelos experimentais de úlcera induzida por diferentes agentes em camundongos e ratos;
- seus mecanismos de ação antiulcerogênica, em modelos experimentais diversos.

Antiulcerogenic effect and cytotoxic activity of semi-synthetic crotonin obtained from *Croton cajucara* Benth.

¹Almeida, A.B.A.; ²Melo, P.S.; ⁵Hiruma-Lima, C.A.; ³Gracioso, J. S.; ⁴Carli, L. ⁴Nunes, D.S., ²Haun, M.; ³Souza Brito, A.R.M.* ¹Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, ²Departamento de Bioquímica, ³Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil; ⁴Departamento de Química, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa, PR, Brasil, ⁵ Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

E-mail: abrito@unicamp.br

FAX: 55- 19-2316899

PHONE: 55-19-7887894

*Cidade Universitária “Zeferino Vaz” - Departamento de Fisiologia e Biofísica – Instituto de Biologia – UNICAMP – C.P. 6109 - Distrito de Barão Geraldo - CEP. 13083-970, Campinas, SP, Brasil

Abstract

Trans-dehydrocrotonin (DHC), the major diterpene isolated from the bark of *Croton cajucara* has demonstrated a good antiulcerogenic activity, however accompany by toxic effects. From these results, the semi-synthetic crotonin, named 4SRC, was prepared to verify if this substance presents similar antiulcerogenic activity without or with less toxicity. The natural crotonin was also isolated from the bark of *C. cajucara*, but it was not used due its low incoming. The cytotoxic effects of semi-synthetic crotonin, expressed as cell viability, was assessed in a) lung fibroblast cell line (V79) derived from Chinese hamsters that it is commonly used for cytotoxicity studies and b) rat hepatocytes isolated from male Wistar rats. After treatment, cell viability was determined by tetrazolium reduction (MTT), total acid content (NAC) and neutral red uptake (NRU) assays. To evaluate the V79 cell viability different concentrations of 4SRC were incubated with the cells. It was observed that to the NRU and MTT tests the substance presented a $IC_{50}=500\text{ }\mu\text{M}$, and in the NAC a $IC_{50}=200\text{ }\mu\text{M}$. To analyze the hepatocyte viability after treatment with the 4SRC at different concentrations, we observed a $IC_{50}=10\text{-}500\text{ }\mu\text{M}$ to the NAC and MTT tests and a $IC_{50}=120\text{ }\mu\text{M}$ to NRU test. In another experiment, V79 cells were incubated with the metabolites produced by hepatocytes treated with different concentrations of 4SRC. After 4 h incubation, we observed a $IC_{50} = 500\text{ }\mu\text{M}$ to the MTT and NRU tests, and a $IC_{50}=370\text{ }\mu\text{M}$ to NAC test. To evaluate the 4SRC (50, 100 and 200 mg/kg) antiulcerogenic effects we used the models of ethanol/HCl, stress, indomethacin/bethanecol and ethanol-induced gastric ulcer, in male Swiss mice and Wistar male rats, respectively. The substance presented a significant antiulcerogenic activity in all of the studied models, suggesting both, possible antisecretory

combined with a citoprotective effects. For this reason, the 4SRC was also evaluated on the biochemical parameters of gastric juice and gastric wall mucus, both obtained from pylorus-ligated mice. We didn't observed any significant differences in both, biochemical parameters of gastric juice and gastric wall mucus, when the results of 4SRC were compared with that to control group. In conclusion, 4SRC presented a significant preventive effect on gastric ulcer induced by different agents. These effects apparently were not related with changes in gastric acid or mucus release. On the other hand, our data about citotoxicity showed that 4SRC is a little less toxic than DHC and that the age of isolated hepatocytes culture reduced the cytotoxic effects of crotonin.

Key words: semi-synthetic crotonin, V79 cells citotoxicity, hepatocytes toxicity, gastric ulcers.

Introduction

The *Croton cajucara* Benth. occurs widely in the Amazon region of northern of Brazil, where it is popularly known as "sacaca". This plant has a history of safe use in folk medicine in the form of a tea for ailments such as diarrhea, diabetes, gastrointestinal disorders and inflammation of the liver (Van der Berg, 1993).

Previous studies with "sacaca" have been showed that at the bark, the major component is t-dehydrocrotonin (Itokawa et al., 1989; Itokawa et al., 1990; Ichihara et al., 1992); among the minor constituents is clerodane t-crotonin (Itokawa et al., 1989; Itokawa et al., 1990). The nor-clerodane diterpene trans-dehydrocrotonin (DHC) is present in sacaca bark tea, suggesting an important role for these compounds in the traditional preparation (Souza Brito et al., 1998).

Souza Brito et al. (1998) have shown that trans-dehydrocrotonin (DHC) has an significant

antiulcerogenic activity. The probable mechanisms involved with the DHC antiulcerogenic activity are related with its antisecretory and gastroprotective actions (Hiruma-Lima et al., 1999). However, it was also demonstrated that DHC presented cytotoxic effects (Rodriguez and Haun, 1999). The natural crotonin presents a low incoming at the bark extract and it has a chemical structure similar to that of DHC. For this reason, semi-synthetic crotonin, named here just as 4SRC, was prepared in with the finality of to verify if the antiulcerogenic activity of the DHC remains and if its citotoxicity decreases.

Materials and Methods

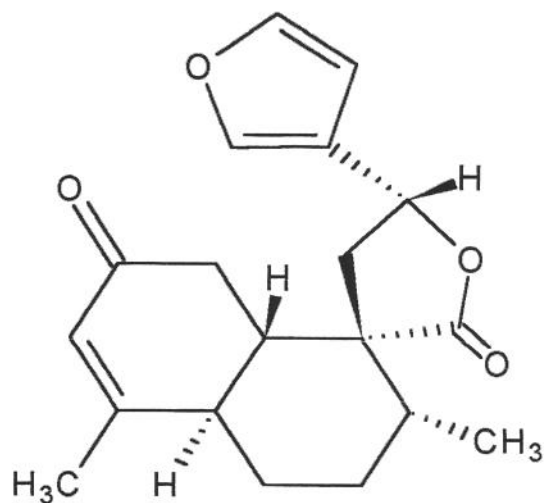
Animals

Male Wistar rats (150-200 g) and male Swiss mice (30-35 g), all obtained from the Central Animal House of the State University of Campinas (CEMIB/UNICAMP), were used in these experiments. Animals were fed normal rodent chow (NUVILAB CR-a[®]), with free access to tap water. They were fasted before the experiments because the drugs or test substances were always administered orally, except on the pylorus ligation ulcer. All experimental protocols were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation (CEEa) of the Institute of Biology (IB), State University of Campinas (UNICAMP).

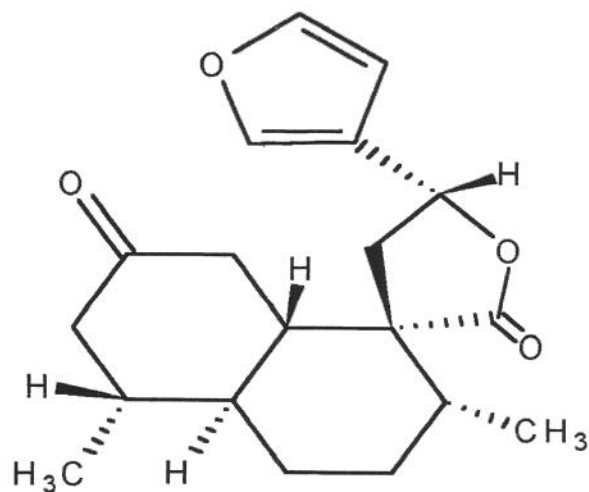
Obtainment of semi-synthetic crotonin

The bark of *Croton cajucara* Benth. was collected from an experimental plantation in Benfica, near Belém, in the state of Pará, Brazil, and was identified by Dr. Nelson A. Rosa. A voucher herbarium specimen was deposited in the herbarium of the Museu Paraense Emílio Goeldi (accession number 247). Trans-dehydrocrotonin (DHC) was isolated from the bark as described by Souza Brito et al (1998). To obtain trans-crotonin, 12 g DHC were submitted to reduction at room

temperature during 12 h with 4 atm H₂, CHCl₃ as solvent and Pd (10%) as catalisator. The product of this reaction was purified in a silicagel 60 column (50 x 3cm), eluted with a mixture of hexane/AcOEt (75/25) using air pression of 4 psi to maintain the eluent flux around 30 mL/min and collecting 33 fractions of 50 mL. Pure trans-crotonin was isolated in the fractions 3 to 13, showing only one spot in several TLC conditions and presenting very good accordance with the published physicochemical properties of the natural diterpene (Itokawa, H. et al., 1989). The semi-synthetic crotonin, was classified as 4SRC and remained *trans* at the junction of rings A and B (Figure1).



Dehydrocrotonin (DHC) - PM = 352



B. Crotonin (4SRC) - PM = 354

V79 fibroblast cultures

The cytotoxic effect of semi-synthetic crotonin, expressed as cell viability, was assessed in a lung fibroblast cell line (V79) derived from Chinese hamsters that is commonly used for cytotoxicity studies (Souza Brito et al., 1998; Rodriguez and Haun, 1999). The V79 fibroblasts were grown as monolayers in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 100 IU penicillin/ml and 100 µg streptomycin/ml in a humidified incubator with a 5% CO₂ atmosphere at 37°C. The cells were plated at a density of 3×10^4 per ml in 96-well plates. The medium was removed 48 h after cell seeding and replaced with one containing 4SRC (80-400 µM), initially dissolved in methanol and then diluted in DMEM. The final concentration of methanol in the test and control media was 1%. The cells were exposed for 24 h to the test medium with or without 4SRC (control). Each drug concentration was tested in eight replicates, and in three experiments. At the end of incubation, three independent endpoints for cytotoxicity, tetrazolium reduction (MTT), total acid content (NAC) and neutral red uptake (NRU) were evaluated and each one was represented in the form of IC₅₀.

NAC: The number of cells in control and treated wells was estimated from their total nucleic acid content according to Cingi et al. (1991). The cells were washed twice with cold phosphate buffered saline (PBS) and a soluble nucleotide pool was extracted with cold ethanol. The cell monolayers were then lysed by incubating in 0.5 M NaOH for 1 h at 37°C. The absorbance of the NaOH fraction at 260 nm was used as an index of cell number (Bianchi et al., 1990).

MTT: The tetrazolium reduction assay was performed using the method of Denizot and Lang (1986). Briefly, fibroblasts were washed once with phosphate buffered

saline (PBS) before adding 0.1 ml of serum-free medium containing MTT (1 mg/mL) to each well. Following incubation for 4 h, the supernatant was removed and the blue formazan product obtained was dissolved in 1 ml of ethanol with stirring for 15 min on a microtitre plate shaker and absorbance was read at 570 nm.

NRU: The neutral red uptake assay was performed as described by Borenfreund and Puerner (1984). After 4 h of incubation with serum-free medium containing 50 µg of neutral red/ml, the cells were washed quickly with PBS and then 0.1 ml of an aqueous solution of 1% (v/v) acetic acid: 50% (v/v) ethanol was added to each well to extract the dye. After rapid shaking in a microtitre plate shaker, the absorbance was read at 540 nm.

Primary culture of rat hepatocytes

Hepatocytes were isolated from male Wistar rats (200-250 g) by the two-step collagenase perfusion method described by Guguen-Guillouzo and Guillouzo (1986). Cell viability measured by the Trypan blue exclusion test was greater than of 90%. The cells were seeded at a density of 3×10^5 cells/ml in 96-well plates in Ham F-12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 0.2% bovine serum albumin, 0.1 IU bovine insulin/ml, 10⁻⁶ M dexamethasone, 50 IU penicillin/ml and 50 µg streptomycin/ml and incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. After allowing 4 h for cell attachment, the medium was changed to serum-free medium containing different concentrations of 4SRC followed by incubation for 20 h; each concentration was tested in eight replicates in three different experiments. In all cases wells containing serum-free medium without 4SRC were used as controls. At the end of the incubation period, three endpoints for cytotoxicity (MTT reduction, NRU and NAC) were evaluated. The cytotoxicity of 4SRC on "aged" hepatocyte cultures was also studied. In this case, hepatocytes were plated onto three 96 well

plates and 4 h after seeding the medium was replaced with serum-free medium and 24 h later the cells were incubated with different concentrations of 4SRC for 20 h. After treatment, MTT reduction, NAC and NRU were determined as described above.

V79 fibroblasts cultured with conditioned medium from rat hepatocytes

The study was performed as described by Rodriguez and Haun (1999). Rat hepatocytes were isolated and cultured as described above. Four hours after plating, the cells were incubated with serum-free medium containing different concentrations of 4SRC. After 20 h, the medium was removed and used to treat semiconfluent cultures of V79 cells for 24 h as described above. After treatment, cell viability was determined by the MTT reduction, NRU and NAC assays.

Acute gastric lesions

The antiulcerogenic activity of different doses of 4SRC (50, 100 or 200 mg/kg) was assessed in four experimental models of acute gastric ulcer. In all of the experiments the doses of 4SRC were diluted in 12% Tween 80 and a positive control group was used. After animal sacrifice, the stomachs were removed and opened along the greater curvature to determine the ulcerative index (UI) as described by Szeleni and Thiemer.

HCl/ethanol-induced ulcers: The antiulcerogenic activity of 4SRC in HCl/ethanol-induced gastric ulcers was assessed in mice as described by Mizui and Doteuchi (1983). Groups of 6-12 mice were fasted for 24 h before receiving an oral dose of the vehicle, 12% Tween 80 (10 ml/kg), lansoprazole (30 mg/kg) or 4SRC (50, 100 or 200 mg/kg). After 50 min, all groups were treated orally with 0.2 ml of a 0.3 M HCl/60% ethanol solution (HCl/ethanol) to induce gastric ulcers. All the animals were killed 1 h after the administration of HCl/ethanol, and the stomachs were excised and inflated by the injecting saline (2 ml). The UI was then determined.

Ethanol-induced ulcers: This ulcer assay was performed in groups of 7 rats each, using the method of Morimoto et al. (1991). Rats were randomly divided into two groups and fasted for 24 h before the experiment. One milliliter of 99.5 % ethanol was orally administered to rats treated 1 h previously with 4SRC (100 mg/kg) or with vehicle, 12% Tween 80 (10 ml/kg). One hour after the administration of ethanol, the rats were killed, the stomachs were removed, opened and the UI was determined as previously described.

Hypothermal-restraint stress ulcers: The antiulcerogenic activity of 4SRC was assessed in the hypothermic restraint stress-induced gastric ulcer model in mice according to the method of Levine (1971), with some modifications. Mice were fasted for 36 h and then received an oral dose of 4SRC (50, 100 or 200 mg/kg), cimetidine (100 mg/kg) or vehicle, 12% Tween 80 (10 ml/kg). One hour after the treatments, gastric ulceration was induced by immobilizing the animals in a closed cylindrical cage at 4°C. After 3 h, the mice were killed by cervical dislocation, the stomachs removed and examined for ulcers as described previously.

NSAID-induced gastric ulcers in cholinomimetic-treated mice: A total of thirty-five mice distributed in 5 groups was fasted for 24 h with free access to water. Thirty minutes after the oral administration of 4SRC (50, 100 or 200 mg/kg), cimetidine (100 mg/kg) or vehicle, 12% Tween 80 (10 ml/kg), an indomethacin solution (30 mg/kg, dissolved in 5% sodium bicarbonate) was administered subcutaneously to each group, as described by Rainsford et al. (1978). Bethanecol chloride was administered orally 15 min before the indomethacin administration. The animals were killed 4 h later, the stomachs removed, opened and the gastric lesions were determined as described above.

Pylorus ligation: Male Swiss mice were fasted for 24 h. Thirty minutes after intraduodenal treatment with cimetidine (100 mg/kg), 4SRC (50, 100 or 200 mg/kg) or vehicle, 12% Tween 80 (10 ml/kg), the pylorus was ligated using the Shay method (Shay et al., 1945). All animals were sacrificed 4 h later, the stomachs removed and the contents drained into a graduated centrifuge tube via a small incision. The volume of gastric secretion was recorded, the pH determined and the total acid output calculated by titrating the pH to 7.0 with 0.05 N NaOH.

Gastric wall mucus determination: Alcian blue binding to the gastric wall mucus was determined by a modified method of Corne et al. (1974). The test drugs, 4SRC (50 and 100 mg/kg) or vehicle, 12% Tween 80 (10 ml/kg), were given intraduodenally to pylorus-ligated mice. The mice were killed 4 h after chirurgic procedure and the glandular segments from the stomachs were removed and weighed. Each segment was transferred immediately to 0.1% alcian blue solution (0.16 M sucrose in 0.05 M sodium acetate, pH 5.8), and incubated for 24 h. Alcian blue binding 4SRC were centrifuged at 3000 rpm for 10 min and the absorbance of the supernatants was measured at 615 nm. The amount of alcian blue extracted per gram of glandular tissue was then calculated.

Statistical analysis

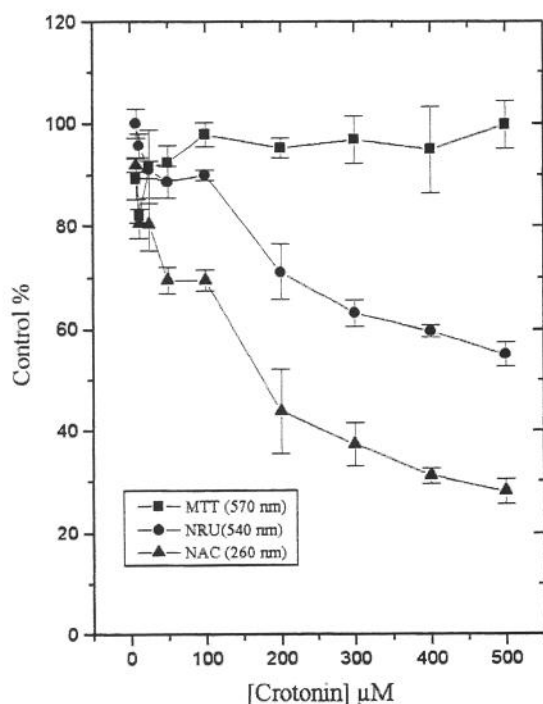
The results of *in vitro* experiments are expressed as IC₅₀ values (concentration that produced a 50% inhibitory effect on the evaluated parameter). These values were calculated by expressing the results as a percentage of the controls and then determining the values graphically from the dose-response curves. The results of *in vivo* experiments are expressed as the mean $\pm$ SD. Statistical significance was determined by Student's test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test, with the level of significance set at $p < 0.05$, depending on number of employed groups.

Results and Discussion

The balance between the therapeutic *versus* the toxicological effects of a compound is an important parameter for the determination of its applicability as an anti-ulcer or any other pharmacological agent. The toxicological studies has been accomplish in cultured cells, which can be used to evaluate cytotoxicity (Ekwall et al., 1988) and target organ toxicity. In some cases, cultured cells may also provide information about the lethal dose *in vivo* (Shrivastava et al., 1991). We used V79 fibroblasts in our essays because this cell line is well characterized and commonly used in mutagenicity and toxicity studies (Cingi et al., 1991).

The viability assays, which measure the "killing capacity" or the "metabolic capacity" of a given chemical, were used over a broad range of concentrations, as is usual when starting toxicity studies of an unknown compound (Cingi et al., 1991). The cytotoxic effects of crotonin were measured by the MTT reduction, NAC and NRU assays on V79 cells and hepatocytes. The results indicated that there is loss of viability of V79 fibroblasts after 24 h exposure with 4SRC (Figure 2); besides, this loss of viability was dose-dependent causing the detachment and death of the cells.

Figure 2. Viability of V79 fibroblasts after treatment with 4SRC for 24 h. Endpoints evaluated: neutral red uptake (NRU), nucleic acid content (NAC) and MTT reduction. Each point represents the mean $\pm$ SD of three experiments in eight replicates.



It was also possible to verify in Figure 2 that 4SRC had greater toxicity based on the NAC ($IC_{50} = 200 \mu M$) than on the NRU ($IC_{50} = 500 \mu M$) and apparently no toxicity on V79 fibroblasts as evaluated by MTT reduction.

Primary cultures of mammalian hepatocytes suffer a rapid and gradual loss of cytochrome P450 content without the severe initial decline in the levels of phase II enzymes following isolation. Hepatocyte cultures of different ages (24 h and 72 h) have been used to determine the involvement of cytochrome P450 in the toxic effects of chemicals. To assess the involvement of cytochrome P450 in the bioactivation of 4SRC, 24 h old hepatocyte cultures were treated with different doses of 4SRC for 20 h as described by Hammond and Fry (1996). The cytotoxicity based on the MTT reduction ($IC_{50} = 10\text{-}500 \mu M$) and NAC ($IC_{50} = 10\text{-}500 \mu M$) tests in the 4 h rat hepatocytes culture was similar to that obtained for V79 fibroblasts after 24 h exposure with 4SRC (Table 1).

Table 1. Influence of hepatocytes culture age on the cytotoxicity of 4SRC.

Hepatocyte age (h)	NAC (IC_{50})	NRU (IC_{50})	MTT (IC_{50})
04	10-500 μM	120 μM	10-500 μM
24	> 500 μM	> 500 μM	> 500 μM

The IC_{50} in these assays began at 10 μM and extended up to 500 μM for the MTT and for NAC; the IC_{50} for the NRU was 120 μM . A significant loss of cytotoxicity was also observed as the hepatocytes aged. This result suggests that 4SRC, such as DHC (Rodriguez and Haun, 1999), is bioactivated by the cytochrome P450 microsomal system and generates less toxic metabolites in function of time.

To investigate whether the metabolites of 4SRC are potentially toxic or not to other cell types, a co-culture system of hepatocytes and V79 cells was used. The co-culture technique is a useful tool for assessing the toxicity of products resulting from hepatic bioactivation in target cells (Fry et al., 1995). The medium from cultured hepatocytes treated with 4SRC had the same toxic effect on V79 fibroblasts as 4SRC itself as judged by the NAC and NRU tests. The results of this experiment are demonstrated in Figure 3.

Figure 3. Viability of V79 fibroblasts after treatment with conditioned medium resulting from 4 h rat hepatocytes culture. Endpoints evaluated: neutral red uptake (NRU), nucleic acid content (NAC) and MTT reduction. Each point represents the mean $\pm$ SD of three experiments in eight replicates.

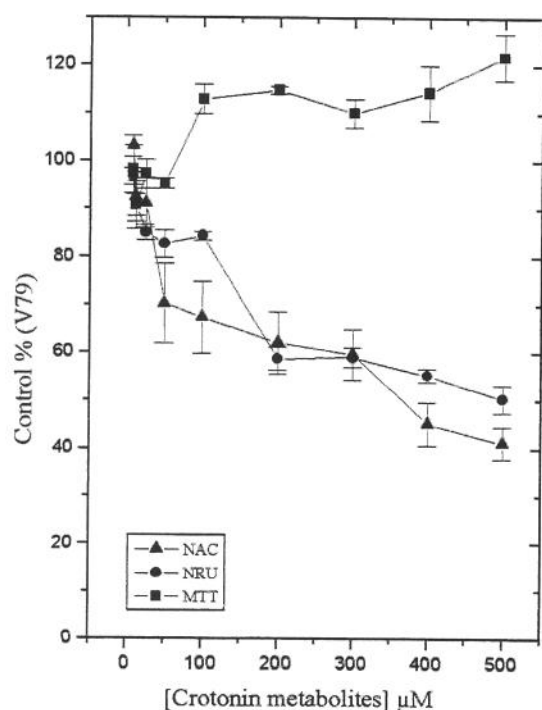


Table 2. Effects of semi-synthetic crotonin (4SRC) on models of gastric lesions induced in mice and rats.

Method	Treatment	n	Dose (mg/kg)	ILU
HCl/ethanol (mice)	Control	12	-	15.6 $\pm$ 4.44
	Lanzoprazole	12	30	4.6 $\pm$ 1.51**
	4SRC	12	50	9.4 $\pm$ 2.07*
		12	100	6.6 $\pm$ 2.88**
		13	200	4 $\pm$ 2**
Ethanol (rats)	Control	6	-	30.33 $\pm$ 13.26
	4SRC	5	100	6.2 $\pm$ 6.9 ^a
Indomethacin (mice)	Control	9	-	8.44 $\pm$ 2.24
	Cimetidine	10	100	3.7 $\pm$ 1.82**
	4SRC	11	50	7.09 $\pm$ 2.62
		10	100	4.5 $\pm$ 2.06*
		9	200	5 $\pm$ 1.57*
Hypothermic restraint stress (mice)	Control	8	-	8.75 $\pm$ 1.56
	Cimetidine	6	100	3 $\pm$ 0.81**
	4SRC	8	50	3.5 $\pm$ 2.14*
		8	100	1.62 $\pm$ 0.99**
		7	200	2.28 $\pm$ 1.27**

* $p < 0.01$ and ** $p \leq 0.001$ compared to control group (Dunnett's test); ^a $p < 0.01$ compared to control group (Student's test).

The obtained result indicates that the toxicity of the metabolites was similar to that of 4SRC itself. Slight stimulatory effect on the ability of V79 cells to reduce MTT was observed after incubation with the medium from hepatocytes cultured for 4 h. Hepatic metabolism of xenobiotics is known to generate superoxide anion and free radicals, with the former being able to reduce tetrazolium compounds such as MTT (Andrews et al., 1997). Our findings support the presence of MTT reducing metabolites in the medium from hepatocytes treated with 4SRC and confirm the results obtained by Rodriguez and Haun (1999) with DHC.

To establish a general profile of the antiulcerogenic activity of 4SRC, it was administered, orally, at three doses (50, 100 or 200 mg/kg) in different gastric ulcer models in mice and rats. Table 2 presents the antiulcerogenic actions of 4SRC, cimetidine or lanzoprazole used as positive control, on the gastric lesions induced by HCl-ethanol, indomethacin-betanechol, hypothermic restraint stress and ethanol.

The 4SRC presented a potent protective effect against acute gastric lesions induced by HCl/ethanol in mice. This activity was as effective as that of lanzoprazole, the

positive control. The oral administration of an HCl/ethanol solution to the control group produced the expected characteristic zonal necrotizing mucosal lesions; however, 4SRC at doses of 50, 100 or 200 mg/kg presented a significant protection against the injurious agent. To obtain a confirmation of this result, the 4SRC effect was verified in ethanol induced-ulcer in rat, a most severe injury model (Table 2). Pretreatment with a single dose of 4SRC (100 mg/kg) before ethanol administration, significantly inhibited the ulcer formation in 79%, confirming the citoprotective properties previously observed. It had been admitted that ethanol is responsible for to stimulate, in a reflex way through sensitive terminals present on gastric and oral mucosal, the gastric and oral secretion, and the gastrin and histamine release, consequently stimulating the gastric secretion. Based on this mechanism attributed to the ethanol injury, we are suggesting that 4SRC can be acting on gastric mucosal such as an antisecretory agent. Another action promoted by ethanol is its ability to damage the gastric mucosal by a mechanical injury; then, 4SRC can also be acting as citoprotective agent, because drugs like misoprostol are active on this model (Morimoto et al., 1991).

We also investigated the possible 4SRC gastroprotective activity in NSAID-induced gastric ulcers model (Table 2). The presence of gastric acid, the overproduction of leukotrienes, the inhibition of prostaglandin (PG) synthesis and the consequent disruption of the gastric mucosal barrier are the main factors involved with the pathogenesis of ulcer induced by indomethacin, a non-selective cyclooxygenase inhibitor (Dajani et al., 1995). In this model, 4SRC (50, 100 and 200 mg/kg) significantly inhibited ulcer formation by 16, 47 and 41%, respectively. This effect on ulcer induced by indomethacin suggested a possible involvement of

prostaglandins, because there is evidences of a relationship between the levels of certain prostaglandins and the resistance of the gastric mucosal to ulcerogenic agents (Wallace et al., 1996).

According to Whittle et al. (1987) and Motilva et al. (1996), among the probable antiulcer mechanisms, prostaglandins may make the mucosal more resistant to damage by a) stimulating bicarbonate and mucus production, b) maintaining an adequate blood flow, c) inhibiting the removal of mast cell-derived inflammatory mediators and d) decreasing the production of free radicals. In order to verify this point we performed the determination of prostaglandin E₂ in the gastric mucosal of rats submitted to Shay method (Table 3).

Table 3. Effects of semi-synthetic crotonin (4SRC) on the biochemical parameters of gastric juice obtained from pylorus-ligated mice. The results are reported as means $\pm$ SD.

Method	Treatment	Dose (mg/ kg)	pH	Total gastric acid (mEq/ ml/ 3h)	Gastric ju Volume (mg)
Pyloric ligation	Control	-	3.83 $\pm$ 0.34	9.42 $\pm$ 2.8	424.2 $\pm$ 34
	Cimetidine	100	4.68 $\pm$ 0.36*	4.47 $\pm$ 2.2*	440.4 $\pm$ 18
	4SRC	50	3.57 $\pm$ 0.38	8.14 $\pm$ 1.5	412.7 $\pm$ 16
		100	3.77 $\pm$ 0.34	12.09 $\pm$ 5.4	282.5 $\pm$ 16
Gastric wall mucus	Control	-	3.0 $\pm$ 0.8	-	690.9 $\pm$ 84
	Cimetidine	100	4.5 $\pm$ 0.7*	-	559.9 $\pm$ 16
	4SRC	50	3.2 $\pm$ 1.0	-	401.7 $\pm$ 15
		100	2.4 $\pm$ 0.7	-	467.9 $\pm$ 22

*p<0.05 compared to control group (Dunnett's test).

Besides our expectation, 4SRC (50 or 100 mg/kg) didn't modify the free mucus produced by gastric mucous on the contrary of indomethacin, a classic cyclooxygenase inhibitor.

The next step was to evaluate 4SRC in relation to its antisecretory activity. This effect was performed on hypothermic-restraint-stress induced ulcer in mice. Pretreatment with 4SRC, at doses of 50, 100 or 200 mg/kg, significantly inhibited the formation of gastric ulcers induced by hypothermic-restraint-stress by 60%, 81.5% and 74%. These data can be seen in Table 2. Cimetidine (100 mg/kg), the reference antiulcerogenic agent, significantly inhibited (66%) the ulceration induced at this model. Stress-induced ulcers are probably caused by the release of histamine, an enhanced acid secretion and a reduction in mucus production (Pal et al., 1991). The involvement of histamine in hypothermal-restraint stress-induced ulceration was strengthened by the observation that cimetidine, an H₂ receptor antagonist, completely inhibited the ulceration induced by hypothermic-restraint stress. Probably, the citoprotective action of 4SRC can be due to an antagonism on histaminergic and/or cholinergic receptors.

After that, we investigated the effects of 4SRC on the biochemical parameters of gastric acid secretion (pH, total gastric acid, gastric juice volume), using pylorus ligation method (Shay et al., 1945). As shown in Table 3, the volume, pH and acidity of gastric secretion were not significantly affected by 4SRC (50, 100 and 200 mg/kg), whereas cimetidine (100 mg/kg) increased pH and reduced the acidity of this secretion. These results suggest that the antisecretory mechanism of 4SRC intraduodenally administered at these doses are opposite with obtained for DHC, which inhibits gastric acid secretion (Souza Brito et al., 1998; Hiruma-Lima et al., 1999).

In conclusion, the results show that 4SRC has a citoprotective activity similar to DHC, and cytotoxicity lightly less compared to DHC (Souza Brito et al., 1998; Hiruma-Lima et al., 1999). However, it seems that the

involved mechanisms with the antiulcerogenic action are different for 4SRC and DHC. Further studies are necessary to investigate other possible mechanism(s) involved with this 4SRC antiulcerogenic action and they are now in progress.

Acknowledgement:

This study was financed by the Brazilian agencies FAPESP (n° 9803442-2).

References

- Andrews, M.J., Garle, M.J., Clothier, R.H., 1997. Reduction of the new tetrazolium dye, alamar blueTM, in cultured rat hepatocytes and liver fractions. *Toxicology In Vitro* 4, 9-16.
- Bianchi, V., Fortunat, E., 1990. Cellular effects of an anionic surfactant detected in (V79) fibroblasts by different cytotoxicity tests. *Toxicology In Vitro* 4, 9-16.
- Borefreund, E., Puerner, J.A., 1984. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR90). *Journal of Tissue Culture Methodology* 9, 7-9.
- Cingi, M.R., De Angelis, I., Fortunati, E., Reggiani, D., Bianchi, V., Tiozzo, R., Zucco, F., 1991. Choice and Standardization of test protocols in cytotoxicology - a multicenter approach. *Toxicology In Vitro* 5, 119-125.
- Corne, S.J., Morrissey, S.M., Woods, K.J., 1974. A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. *Journal of Physiology* (London) 242, 116-117.
- Dajani, E.Z., Agrawal, N.M., 1995. Prevention and treatment of ulcers induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: an update. *Journal of Physiology and Pharmacology* 46, 3-16.



- Denizot, F., Lang, R., 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunology Methods* 89, 271-277.
- Ekwall, B., Ekwall, K., 1988. Comments on the use of diverse cell systems in toxicity testing. *ATLA* 15, 193-200.
- Fry, J.R., Hammond, A.H., Atmaca, M., Dhanjal, P., Wilkinson, D.J., 1995. Toxicity testing using hepatocytes some methodological aspects. *ATLA* 23, 91-96.
- Goel, R.K., Banerje, R.S., Acharya, S.B., 1990. Antiulcerogenic and antiinflammatory studies with shilajit. *Journal of Ethnopharmacology* 29, 95-103.
- Guguen-Guillouzo, C., Guillouzo, A., 1986. Isolated and cultured hepatocytes. In: *Guillouzo, A., Guguen-Guillouzo, C. (Eds), pp. 1-12.*
- Hammond, A.H., Fry, J.R., 1996. Toxicity of dichloropropanols in rat hepatocyte cultures. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 1, 39-43.
- Hayden, L.J., Thomas, G., West, G.B., 1978. Inhibitors of gastric lesions in the rat. *Journal Pharmacy Pharmacology* 30, 244-246.
- Hiruma-Lima, C.A., Spadari-Bratfisch, R.C., Kassisse, D.M., Souza-Brito, A.R.M., 1999. Antiulcerogenic mechanisms of dehydrocrotonin, a diterpenelactone obtained from *Croton cajucara* Benth. *Planta Medica* 65, 325-330.
- Itokawa, H., Ichihara, Y., Kogima, H., Watanabe, K., Takeya, K., 1989. *Phytochemistry* 28, 1667.
- Itokawa, H., Ichihara, Y., Takeya, K., Motidome, M., 1990. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 38, 701.
- Kubo, I., Asaka, Y., Shibata, K., 1991. Insect growth inhibitory nor-diterpenes, cys-dehydrocrotonin and trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara*. *Phytochemistry* 30, 2545-2546.
- Levine, R.J., 1971. A method for rapid production of stress ulcer in rats. In: *Peptic Ulcer*, Pfeiffer, C.J. (ed.), pp. 92-97.
- McGuigan, J.E., 1991. Peptic ulcer and gastritis. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, Wilson, J.D., Braun Wald, E., Isselbacher, K.J., Petersdorf, R.G., Martin, J.B., Fauchi, A.S., Root, R.K. (Eds.), pp. 1229-1243.
- Mizui, T., Doteuchi, M., 1983. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesion in rats. *Japanese Journal of Pharmacology* 33, 939-945.
- Morimoto, Y., Shimohara, K., Oshima, S., Sukamoto, T., 1991. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of tepreone and cimetidine. *Japanese Journal of Pharmacology* 57, 495-505.
- Motilva, V., López, A., Martín, M.J., LaCasa, C., Alacón de la Lastra, C., 1996. Cytoprotective activity of cisapride on experimental gastric mucosal lesions induced by ethanol. Role of endogenous prostaglandins. *Prostaglandins* 52, 63-74.
- Pal, S., Nagchaudhury, A.K., 1991. Studies on the anti-ulcer activity of a *Biyophyllum pinnatum* leaf extract in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology* 33, 97-102.
- Piper, D.W., Stiel, D., 1986. Medical Progress through Technology 2, 7-10.
- Shay, H., Komarov, S.A., Fels, S.S., Meranze, D., Gruenstein, M., Siplet, H., 1945. A simple method

- for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterology* 5, 43-61.
- Shrivastava, R., John, G.W., Rispat, G., Chevalier, A., Massingham, R., 1991. Can the *in vivo* maximum tolerated dose be predicted using *in vitro* techniques – a working hypothesis. *ATLA* 19, 393-402.
- Souza-Brito, A.R.M.; Rodriguez, J.A.; Hiruma-Lima, C.A.; Haun, M.; Nunes, D.S., 1998. Antiulcerogenic activity of trans-Dehydrocrotonin from *Croton cajucara* Benth. *Planta Medica* 64, 126-129.
- Vane, J.R.; Botting, R.M., 1995. New insights into the mode of action of antiinflammatory drugs. *Inflammation Research* 44, 1-10.
- Wallace, J.L.; Granger, N., 1996. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense *FASEB Journal* 10, 731-740.
- Whittle, B.J.R.; Vane, J.R., 1987. Prostanoids as regulators of gastrointestinal function. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, L.R. Johnson, L.R. (Ed.). 2nd ed., Raven Press, New York, pp. 143-180.

**Mechanism of antiulcerogenic activity of semi-synthetic crotonin obtained from
Croton cajucara Benth**

¹*Almeida, A.B.A.; ²Miotto, A.M.; ³Hiruma-Lima, C.A.; ²Paula, A.C.B.; ²Toma, W.; ²Gracioso, J.S.;
⁴Nunes, D.S.; ²Spadari-Bratfisch, R.C.; ²*Souza Brito, A.R.M. ¹Departamento de Farmacologia,
F.C.M., UNICAMP; ²Departamento de Fisiologia e Biofísica, I.B., UNICAMP; ³Instituto de Biologia e
Saúde Pública, Fundação Universidade do Tocantins; ⁴Departamento de Química, UEPG.

E-mail: abrito@unicamp.br

FAX: 55-19-2316899

PHONE: 55-19-7887894

*Cidade Universitária "Zeferino Vaz" - Departamento de Fisiologia e Biofísica – Instituto de Biologia –
UNICAMP - C.P. 6109 - Distrito de Barão Geraldo - CEP. 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

Abstract

The bark of *Croton cajucara* Benth is used in Brazilian folk medicine to treat gastrointestinal disorders. *Trans*-dehydrocrotonin (DHC) isolated from the bark of *Croton cajucara* has antiulcerogenic activity (Souza Brito et al., 1998). The presence of similar activity in semi-synthetic crotonin obtained from dehydrocrotonin from *Croton cajucara* was observed in gastric ulcer-induced models (HCl/ethanol, ethanol, indomethacin, stress and pylorus ligation). The aim of the present study was to assess the mechanisms involved in the antiulcerogenic activity of semi-synthetic crotonin. We investigated the effects of semi-synthetic crotonin on the response to histamine of right atria isolated from guinea pigs and on the response to carbachol of stomach fundus strips from rats. Semi-synthetic crotonin (3, 10 or 30 μ M) induced a shift to the right in the concentration-response curves to carbachol in the isolated rat stomach at the pD_2 level (pD_2 : 5.42 ± 0.05 , 5.76 ± 0.061 , 5.77 ± 0.076 , 6.48 ± 0.012 , respectively), without any alteration in the maximum response. Semi-synthetic crotonin also induced a shift to the right in the concentration-response curves to histamine in guinea pig right atria, pD_2 (5.54 ± 0.06 , 6.01 ± 0.06 , 5.89 ± 0.06 , 5.92 ± 0.03) and (%) maximum response (80 ± 6.18 , 118 ± 6.18 , 114 ± 6.18 , 122 ± 1.4), respectively. We also studied the ability of semi-synthetic crotonin (100 mg/kg) to increase PGE_2 release from rat stomach mucous cells. We observed that semi-synthetic crotonin did not induce a significant increase in PGE_2 production. Thus, the protective effect of semi-synthetic crotonin on induced gastric lesions could be due to antagonism of histaminergic and cholinergic effects on gastric secretion.

Key words: crotonin, histaminergic receptor, cholinergic receptor, gastric secretion

Introduction

Since the beginning of this century it has been recognized that ulcer disease of the upper gastrointestinal tract depends on two sets of conditions: the presence of acid and the presence of predisposing factors, collectively thought of as reduction of mucosal defense. Therapy in the foreseeable future will continue to have control of acid secretion and subsequent reversal of mucosal damage and inflammation (Hirschowitz et al., 1995). According to these authors, available means of therapeutic regulation of acid secretion include alteration of neural influences by means of surgery and alteration of parietal cell second-messenger levels by receptor antagonists such as antimuscarinic or antihistaminic agents and by acid pump inhibitors.

The parietal cell is considered to have at least three types of activating receptors on its basolateral membrane, i.e., histamine H_2 receptor, acetylcholine M_3 , and gastrin CCK_B , although much of the action of acetylcholine or gastrin is mediated by release of endogenous histamine. There is a consensus that histamine, the main stimulant for the acid secretory cascade, stimulates the H_2 receptor to activate G_s coupled with adenylate cyclase, leading to the production of cAMP to PKA (Urushidani et al., 1997), and that somatostatin is the principal paracrine inhibitor of gastric acid secretion (Schubert et al., 1996).

Muscarinic receptors and their subtypes have been shown in the gastric mucosa of numerous species and have been localized to parietal, chief, mucous, and endocrine cells. Muscarinic receptors in gastric tissue are coupled to the stimulatory phosphoinositide second messenger system and increase the secretion of hydrogen ions, pepsinogen, and mucus (Pfeiffer et al., 1995). Of the five subtypes of muscarinic receptors known to occur in rats and humans, the M_3 receptor has recently been

shown to mediate the secretion of gastric acid in rat parietal cells (Pfeiffer et al., 1990). Agents with high affinity for muscarinic M_3 receptors have utility in the treatment of a range of disorders associated with altered smooth muscle contractility and tone such as urinary incontinence, irritable bowel syndrome and chronic obstructive airway disease. Selective M_3 antagonists have the potential to inhibit smooth muscle contractility in the absence of M_3 - and M_2 -mediated side effects (Wallis et al., 1999).

Successful therapy of peptic ulcer depends on the reconstruction of mucosal architecture resulting from either reduction of the aggressive forces or enhancement of the defensive processes in the gastric mucosa (Konturek et al., 1997). Traditionally, this is accomplished by reducing the bulk of intraluminal acid with antacids or by inhibiting the ability of parietal cells to secrete acid using anticholinergics, histamine H_2 -receptor antagonists, or proton pump blockers. Stable prostaglandin (PG) E_1 and E_2 analogs, such as arbaprostil, enprostil, misoprostol, and rioprostil, have been developed for the treatment of peptic ulcers, partly because of their antisecretory activity and partly because of their cytoprotective activity (Howden et al., 1988). Prostaglandins (PGs) are present throughout the gastrointestinal tract. Among them, PGE_2 is one of the major PGs produced, and is well known to bring about a wide variety of actions in the gut (Ding et al., 1997).

The use of plants for the treatment of medical disease is a very common practice in the Brazilian population (Souza-Formigoni et al., 1991). Natural products of plant and mineral origin provide an alternative strategy for the treatment of peptic ulcer disease (Mitra et al., 1996).

The bark and leaves of *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae), an Amazonian medicinal plant commonly called "sacaca", are used traditionally to treat a wide range of gastrointestinal symptoms (Van der

Berg, 1993). The nor-clerodane diterpene *trans*-dehydrocrotonin (DHC) is present in sacaca bark as the major secondary metabolite suggesting an important role for this compound in the traditional preparation (Souza Brito et al., 1998). Previous studies have established the antiulcerogenic effect of DHC (Souza Brito et al., 1998), probably by suppressing acid secretion through non-competitive antagonism with receptors involved in gastric acid secretion and by protecting the gastric mucosa by an increase of PGE_2 (Hiruma-Lima et al., 1998).

The presence of similar activity in semi-synthetic crotonin obtained from dehydrocrotonin from *Croton cajucara* was observed in models of gastric ulcer induced by HCl/ethanol, ethanol, indomethacin, stress and pylorus ligation (Almeida et al., 2000).

Therefore, the aim of this study was to assess the possible mechanisms involved in these pharmacological properties by investigating the effect of the semi-synthetic crotonin on both the mechanism of gastric acid secretion and on the protection factors. We studied the effects of semi-synthetic crotonin on gastric acid secretion using separate preparations of histaminic and muscarinic receptors. We also investigated if the antiulcer effect of semi-synthetic crotonin could be mediated by prostaglandins as factors enhancing mucosal defense.

Materials and Methods

Animals

Male Wistar rats weighing 150-250 g from the Centro de Bioterismo of the Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) were used. Male guinea pigs (250-350 g) from the ANILAB were also used. The animals were fasted prior to all assays involving the stomach because standard drugs or semi-synthetic crotonin were always administered orally (by gavage - 10 ml/kg) using a 12%

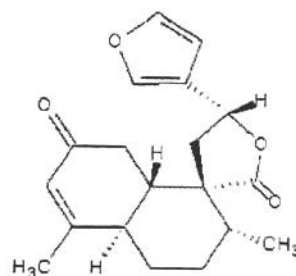
solution of Tween 80 as vehicle. Animals received a certified Nuvilab CR-a® (Nuvital) diet and water ad libitum under standard conditions of 12 h dark-12 h light, humidity (55%) and temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$).

Drugs and chemicals

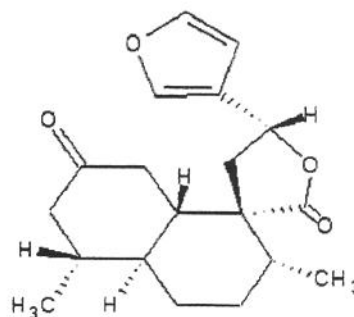
The following drugs were used: 12% Tween 80® (Synth, Brazil), histamine, propranolol, pyrenzepine and indomethacin (Sigma Chem. Co, U.S.A.). The chemicals used in the nutritive solutions were all of analytical grade.

Isolation of semi-synthetic crotonin

Trans-crotonin from trans-dehydrocrotonin The bark of *Croton cajucara* Benthham was collected from an experimental plantation in Benfica, near Belém, in the state of Pará, Brazil, and was identified by Dr. Nelson A. Rosa. A voucher herbarium specimen was deposited in the herbarium of the Museu Paraense Emílio Goeldi (accession number 247). Trans-dehydrocrotonin (DHC) was isolated from the bark as described by Souza Brito et al (1998). To obtain trans-crotonin, 12g DHC were submitted to reduction at room temperature during 12 hs with 4 atm H_2 , CHCl_3 as solvent and Pd (10%) as catalisator. The reaction product was purified in a silicagel 60 column (50x3cm) eluted with a mixture of hexane/AcOEt (75/25) using air pression of 4 psi to maintain the eluent flux around 30 mL/min and colecting 33 fractions of 50 mL. Pure trans-crotonin was isolated in the fractions 3 to 13, showing only one spot in several TLC conditions and presenting very good accordance with the published physicochemical properties of the natural diterpene (Itokawa, H. et al., 1989). The semi-synthetic crotonin, classified as 4SRC, remained *trans* at the junction of rings A and B (Figure 1).



(A) Desidrocrotonin



(B) Crotonin or 4SRC

Isolated guinea-pig right atria

This experiment was conducted as previously described by Krielaart et al (1990). Male guinea-pigs were killed by cervical dislocation. Hearts were immediately removed and dissected and the atria were mounted under 0.5 g resting tension in 20 ml organ baths containing Krebs-Henseleit solution oxygenated with 95% O_2 -5% CO_2 at $36.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$. The increase in heart rate (beats min^{-1}) induced by histamine in a cumulative dosing schedule was measured with an isometric transducer (Narco Bio-System) coupled to a polygraph (Narco Bio-System). The β -adrenoceptors were blocked with 1 μM propranolol previously added to the Krebs-Henseleit solution. After obtaining the cumulative dose-response curve for histamine the preparations were washed for 1 h with

four changes of bathing solution. The atria were pre-equilibrated with one of three different concentrations of semi-synthetic crotonin (3, 10 or 30 μ M) or 12% Tween 80 (30 μ l) for 60 min before determination of another dose-response curve for the same agonist.

Isolated rat fundus stomach

The experiments were performed according to the method described by Korolkiewicz et al (1997). Animals were killed by cervical dislocation. The abdomen was opened by a midline incision, the stomach excised, and the fundus dissected out and cut into longitudinal strips according to the method described by Vane (1957). The strips were placed in Krebs-Henseleit solution as described for the atrium experiment. One end of the strip was attached to a fixed support and the free end to a lever connected to an isometric transducer coupled to a polygraph. The contractions induced by carbachol were measured as the tension developed by the tissue. Tissues were left to equilibrate for 30 min before the beginning of the experiment. The nutritive solution was changed every 15 min, except during the 1 h of contact with the semi-synthetic crotonin (3, 10 or 30 μ M), pyrenzepine (10^{-6} M) or 12% Tween 80 (30 μ l). Dose-response curves for carbachol were obtained in the absence and presence of different concentrations of test drugs.

Prostaglandin synthesis determination

All rats were deprived of food for 24 h prior to the experiment. Five groups consisting of at least 5 rats received one or more of the following solutions: 12% Tween 80 solution (vehicle, p.o.), indomethacin (30 mg/kg, s.c.) used as a positive control, and semi-synthetic crotonin (100 mg/kg, p.o.). In the assay with the combination of semi-synthetic crotonin and indomethacin, indomethacin was administered 30 min after crotonin. Indomethacin was dissolved in 5% sodium bicarbonate solution. We introduced sham animals to observe the PGE₂ level in animals without

treatment. Thirty minutes after treatment, all animals were sacrificed. A sample of the corpus (full thickness) was excised, weighed, and suspended in 1 ml of 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4. The tissue was finely minced with a scissors and then incubated at 37 °C for 20 min, followed by centrifugation for 20 min at 2000 rpm. PGE₂ in the buffer was measured by enzyme immunoassay (EIA; RPN222 – Amersham). The absorbance was read at 450 nm as previously described by Curtis et al (1995).

Determination of role of nitric oxide (NO) in cytoprotection afforded by semi-synthetic crotonin

Male Swiss mice (25-30 g), fasted for 24 h with free access to water, were divided in groups according to the respective treatment. The control group received an intravenous injection of saline solution and the others, an injection of L-NAME, a NO-synthase inhibitor, by the same route. After 30 min, all animal groups received orally the respective treatment (saline and semi-synthetic crotonin). After 1 h, the animals were orally administered with ethanol/HCl. These animals were sacrificed 1 h later and their stomachs were removed and opened along the greater curvature. The lesions were evaluated and the ulcerative index lesion was calculated according to the methodology described by Gamberini et al. (1991).

Statistical Analysis

Results are expressed as means $\pm$ S.E.M. Statistical significance was determined by the Student "t" test and by one-way analysis of variance followed by the Dunnett test, with the level of significance set at $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using the Statistic 5.1 software (StatSoft, Inc.).

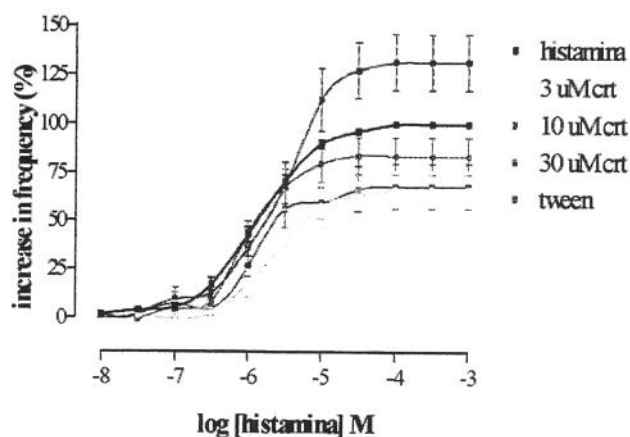
Results and Discussion

We have previously demonstrated the antiulcerogenic and cytotoxic properties of semi-synthetic crotonin obtained from dehydrocrotonin from *Croton cajucara* Benth. The semi-synthetic crotonin inhibits the gastric lesions induced in rats by ethanol and in mice by hypothermic restraint stress, ethanol/HCl, indomethacin and pylorus ligation; with respect to cytotoxicity, aging reduced the cytotoxic effects of crotonin on isolated hepatocytes, suggesting that P450-mediated crotonin biotransformation may lead to the formation of more toxic metabolites (Almeida et al., 2000).

In the gastric mucosa, the source of histamine mediating acid secretion is currently considered to be the ECL cell (Rangachari, 1992). Both gastrin and acetylcholine stimulate histamine release from these cells (Prinz et al., 1993), explaining the prominent role played by histamine as a physiological stimulator of gastric acid secretion. The pharmacology of this H_2 -receptor has been extensively studied and specific antagonists have been synthesized that have proved to be of considerable interest in the treatment of ulcer diseases (Bado et al., 1995).

The antagonist property of the test compound (at concentrations of 3, 10 or 30 μ M) on histaminergic receptors was determined by inhibition of the chronotropic effect of histamine in isolated guinea pig right atria. Our data showed that semi-synthetic crotonin (3 μ M) produced a shift to the right in the concentration response curves to histamine in guinea pig right atria, suggesting that this compound may act as an H_2 receptor antagonist (Figure 2).

Figure 2. Cumulative concentration-response curves for histamine in the absence and presence of different concentration of semi-synthetic crotonin (crt). Each point represents the mean $\pm$ SEM.



The combination of rightward displacement of the concentration-response curve with depression of the maximal effect (Table 1) could be explained by impairment of the intracellular stimulus-transfer process by the antagonist (Blanck et al., 1986).

Table 1. Maximum Response (MR) and pD_2 to carbachol, pirenzepine, tween and semi-synthetic crotonin in rat isolated gastric fundus.

Substance	Dose	Maximum Response mN/ 100 mg	pD_2	n
Carbachol	1×10^{-4} M	19.7 ± 0.38	6.48 ± 0.01	25
Pirenzepine	1×10^{-6} M	19.2 ± 1.94	$5.04 \pm 0.06^{**}$	5
Tween	30 μ l	15.6 ± 1.94	$5.40 \pm 0.06^{**}$	5
Crotonin	3 μ M	10.5 ± 1.61	$5.42 \pm 0.05^{**}$	6
	10 μ M	30.3 ± 1.94	$5.76 \pm 0.06^{**}$	5
	30 μ M	11.1 ± 2.42	$5.77 \pm 0.07^{**}$	4

Expressed as means $\pm$ SEM. ANOVA: $F_{(5, 44)} = 2.955$ (MR) and 31.397 (pD_2) for $p < 0.05$, followed by Dunnett's test, $^{**}p < 0.01$.

Another important and extensively studied histaminergic receptor regulator of gastric secretion is the subtype H_3 . The role of H_3 -receptors in the regulation of gastric secretion remains unclear. Recent studies on enriched suspensions of ECL cells derived from rat and rabbit fundus indicate that histamine is capable of down-regulating its own synthesis and release via H_3 -receptors (Prinz et al., 1993). Preliminary studies confirming this

hypothesis in rat mucosal fundic segments suggest that histamine and the selective H₃-receptor agonist acting via H₃-receptors are capable of inhibiting somatostatin secretion thus, stimulating endogenous histamine secretion (Schubert et al., 1993), and consequently acid secretion. Studies by Vuyyuru et al (1997) showed that histamine stimulates acid secretion directly via H₂-receptors on parietal cells as well as indirectly, via H₃-receptors, suppressing somatostatin secretion and leading to a further increase in histamine secretion. Therefore, the semi-synthetic crotonin probably acts like a histaminergic receptor (H₂) antagonist, blocking the main pathway of acid secretion stimulation, and/or H₃, permitting the action of somatostatin on histamine secretion. One of the main stimulator of acid secretion from the parietal cell is acetylcholine, which stimulates acid secretion by interacting with a muscarinic receptor of the M₃ subtype (Kajimura et al., 1992; Bado et al., 1995). The cholinergic agents, in contrast to gastrin, do augment maximal histamine-stimulated acid secretion in the isolated rat stomach (Kleveland et al., 1987). The magnitude of parietal cell stimulation by histamine and acetylcholine may vary among species; however, the combination of the two secretagogues elicits a potentiating effect on the parietal cell (Dial et al., 1981). The role of muscarinic receptors is mediated by interaction with G protein family members and, thus, by alteration induced by this protein in several effector molecule functions linked to the membrane. Subtypes M₁, M₃ and M₅ activate a G protein (G_{q/11}), which is responsible for the stimulation of phospholipase C activity, so, that these receptors provoke Ca²⁺ dependent phenomena like smooth muscle contraction and secretion (Berridge, 1993).

To better study the action of semi-synthetic crotonin on the stomach muscarinic receptor longitudinal strips were obtained from the stomach fundus, a site with a large a

great portion number of oxyntic cells. The contractions induced by cumulative doses (10⁻⁴M) of carbachol, a muscarinic agonist, were measured on the basis of 1 gf tension developed on the tissue.

Continuous cell stimulation with a agonist usually unsensitizes them, in such a way the effect is reduced after constant or subsequent exposure to the same drug. Therefore, the contracted smooth muscle relaxes spontaneously when the contractile agonist is removed (Oishi et al., 1999). On this basis, discontinuation of these drugs for a long period of time permits that the cell to "readjust" its response capacity, and the "recovery" of the response is usually be complete. After this "readjustment" the stomach was incubated for 1 h with following substances: 12% Tween 80, semi-synthetic crotonin (3, 10 or 30 µM) or pyrenzepine (10⁻⁶ M), in order to determined the type of binding to the muscarinic receptor.

The different treatments presented the same efficacy, represented by a maximum response (%) compared to the control group (Table 2); nevertheless, as proposed by the Stephenson theory (1956), although there was no significant difference between the various treatments, the substances may occupy different percentages of the receptor population.

Table 2. Maximum Response (MR), Basal Rate (BR) and pD₂ to histamine, tween and semi-synthetic crotonin in guinea pig isolated atrium system.

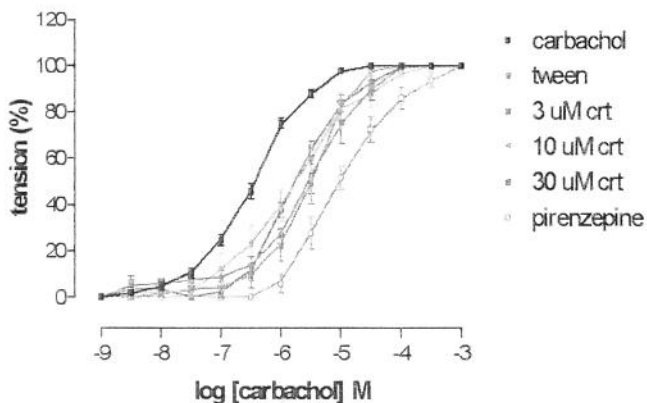
Substance	Dose	Maximum Response (beats/min)	Basal Rate (beats/min)	pD ₂	n
Histamine		122 ± 1.4	199 ± 0.95	5.92 ± 0.01	22
Tween	30 µl	134 ± 4.4	197 ± 3	5.6 ± 0.04*	7
Crotonin	3 µM	80 ± 6.2*	210 ± 4.2	5.54 ± 0.06*	5
	10 µM	118 ± 6.2	194 ± 4.2	6.01 ± 0.06	5
	30 µM	114 ± 6.2	192 ± 4.2	5.89 ± 0.06	5

Expressed as means ± SEM. ANOVA: F_(4, 39) = 2.49 (MR); 0.566 (BR) and 3.531 (pD₂) for p<0.05, followed by Dunnett's test, *p<0.05.

Semi-synthetic crotonin produced a shift to the right of the carbachol concentration-response curves in the isolated rat stomach (Figure 3), without any alteration in the maximum response, a common effect of antagonists that link reversibly to the receptor. According to Stephenson, the classic competitive antagonists have zero efficacy, which is confirmed by the non-significant results represented by the maximum response.

Studies by Lin et al (1997) indicate that the expression of muscarinic receptor subtypes differs between tissues, showing that M_2 and M_3 receptors are widely distributed in gastrointestinal smooth muscle cells. Muscarinic receptor subtypes were shown to display differences in the intracellular signaling mechanisms.

Figure 3. Cumulative concentration-response curves for carbachol in the absence and presence of different concentration of semi-synthetic crotonin (crt). Each point represents the mean $\pm$ SEM.



Thus, the M_3 receptor appears to regulate positively the phospholipid metabolism and intracellular Ca^{2+} in the parietal cells (Pfeiffer et al., 1990).

Since semi-synthetic crotonin reduces muscle contraction, we may suggest that this compound acts like a muscarinic receptor antagonist, probably the M_3 subtype. These results confirm data reported by Berstein et al (1990), who described smooth muscle contraction in the small

intestine and secretion in exocrine glands activated by the M_3 muscarinic receptor subtype.

Studies (Weigert et al., 1994) with rabbit antral G-cells in primary culture confirm the gastrin release through stimulation by acetylcholine receptor agonists. The utilization of atropine, which has high affinity for glandular muscarinic M_3 receptors, completely inhibited the gastrin release induced by carbachol, a stable acetylcholine analogue. This pharmacological profile suggests that muscarinic stimulation of gastrin release from antral G-cells is mediated via muscarinic M_3 receptors. Thus, semi-synthetic crotonin may be interacting with the M_3 receptor of G cells, interrupting or obstructing one of the main pathways of acid secretion stimulation.

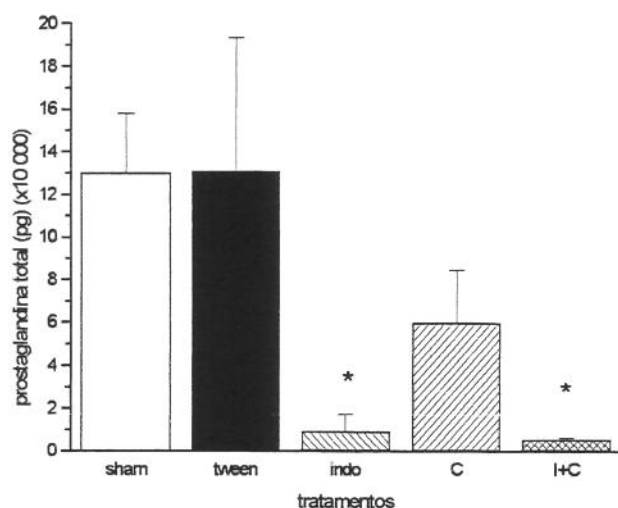
Another subtype of muscarinic receptor widely studied is M_1 . Shamburek et al (1993) stated that the muscarinic M_1 receptors are located predominantly on intramural postganglionic neurons, mediating the effects of ganglionic transmitters by the release of stimulatory substances, such as acetylcholine. Results from studies with pyrenzepine (Ren et al., 1994) indicate the existence of presynaptic M_1 receptors that are involved in positively modulating basal acetylcholine release. These observations are consistent with recent findings (Kilbinger et al., 1986) that there exist at least two types of neuronal (M_1 e M_2) muscarinic receptors that modulate acetylcholine release from cholinergic neurons. For this reason, we may speculate that muscarinic M_1 receptor blockade by semi-synthetic crotonin, for example, would permit the activation of other stimulatory muscarinic receptors or facilitate non-cholinergic stimulation by modulation of sympathetic ganglia or autoreceptors, supporting data reported by Mertz-Nielsen et al (1995), who demonstrated that muscarinic M_1 receptor blockade with pyrenzepine

significantly increases gastric PGE₂ output in humans. In addition, these investigators have previously observed that muscarinic M₁ receptor inhibition increases gastric PGE₂ synthesis during acid exposure (Mertz-Nielsen et al., 1989). Theoretically, such effects are potentially beneficial and may contribute to the gastroprotective effects of semi-synthetic crotonin.

Prostaglandins (PGs) stimulate the secretion of mucus and bicarbonate in the stomach (Takeuchi et al., 1997) and inhibit the secretion of acid. The PGs have been shown to inhibit histamine secretion from the isolated perfused rat stomach (Sandvik et al., 1988), isolated canine oxyntic mucosal cells (Soll et al., 1994), and isolated rat ECL cells (Prinz et al., 1997). The data obtained for detection of PGE₂ production using EIA by gastric tissue are shown in Figure 4.

The treatment with semi-synthetic crotonin (100 mg/kg) did not produce an increase in PGE₂ production compared with the control group (Tween). The pre-treatment of these animals with indomethacin, an inhibitor of the cyclooxygenase enzyme, was efficient in inhibiting PGE₂ production.

Figure 4. Effects of administration of Tween, semi-synthetic crotonin (C) and indomethacin (indo) on gastric PGE₂ production in rats. Each value is the mean $\pm$ SD. Student's test, *P<0.05.



However, in the spite of cholinergic antagonism promoted for semi-synthetic crotonin, we resolve to evaluate the substance role upon nitric oxide.

The literature relate the crucial importance of existence of a dense network of capillaries in the surface epithelium of the stomach. In addition to supplying nutrients and oxygen to the epithelium, the microcirculation also removes, dilutes, and neutralizes toxic substances that have diffused into the mucosa from the lumen. When the epithelium is damaged, the microcirculation also plays a critical role in creating a microenvironment over the site of injury conducive for repair (Wallace et al., 1996).

Mucosal blood flow can be modulated by many endogenous substances. Among the more important of these are calcitonin gene-related peptide (CGRP), prostaglandins, and nitric oxide. CGRP and nitric oxide play critical roles in mediating an essential component of mucosal defense, namely, the hyperemic response to luminal irritants. When the mucosa is exposed to an irritant or when acid back-diffusion occurs, a profound and rapid increase in mucosal blood flow can be detected (Bruggeman et al., 1979). This increase in blood flow appears to be directed at removing the back-diffusing toxin and diluting neutralizing it. It is also clear that this response is critical for mucosal defense, in that prevention of the response through mechanical restriction of blood flow leads to the development of hemorrhagic necrosis (Wallace et al., 1996). Sensory afferent nerves, which have their endings just beneath the epithelium, can sense the entry of acid (and possibly other toxins) into the mucosa. This results in activation of these nerves. Release of CGRP from sensory afferent neurons (Li et al., 1992) results in the generation of nitric oxide, presumably by endothelial cells lining the submucosal arterioles (Lippe et al., 1992). Nitric oxide diffuses to the adjacent vascular smooth muscle cells

where, through stimulation of soluble guanylate cyclase (increasing intracellular cGMP levels), it causes them to relax. Interference with any aspect of the pathway will interfere with the generation of the reactive hyperemia and, in turn, with the resistance of the mucosa to injury (Wallace et al., 1996).

For this reason, we test the semi-synthetic crotonin (100 mg/kg) role upon the nitric oxide action. We observed the crotonin didn't showed significative difference to control in the model studied (Table 3).

Table 3. Effect of semi-synthetic upon gastric mucosal blood flow in mice.

Substances	Dose (mg/kg)	n	ILU	Inhibition (%)
Tween (po)+Saline (iv)		7	27.4 ± 13.2	-
Tween (po) + L-NAME(iv)	10	10	66.3 ± 27.1*	0
Crotonin (po) + L-NAME (iv)	100	10	21.4 ± 12.5	0

Expressed with mean ± SEM. ANOVA: $F_{(2, 24)} = 15.216$ for $p < 0.05$, followed by Dunnett's test, * $p < 0.05$.

The results indicate that the crotonin is related to the endogenous NO, which is involved in the acid secretory response induced by histamine released from histamine-containing cells (Hasebe et al., 1998). Many studies has shown that exogenous NO inhibits neurally mediated gastric acid secretion in vivo in rats (Barrachina et al., 1994), as well as the acid secretory response to histamine in rat isolated parietal cells (Brown et al., 1993; Kim et al., 1996). It is reported that endogenous NO may contribute to the gastroprotection by pentagastrin against ethanol-induced gastric mucosal damage (Stroff et al., 1994), and endogenous NO is suggested to be, although not directly, involved in the pentagastrin-stimulated gastric acid secretion through mucosal vasodilation (Pique et al., 1992).

Acknowledgement:

This study was financed by the Brazilian agency FAPESP (n° 9803442-2)

References

- Almeida, A.B.A.; Melo, P.S.; Gracioso, J.S.; Nunes, D.S.; Haun, M.; Souza Brito, A.R.M. (2000) Antiulcerogenic and cytotoxic activity of semi-synthetic crotonin of *Croton cajucara* Benth. (submitted).
- Bado, A.; Laigneau, J.P.; Moizo, L.; Cherifi, Y.; Lewin, M.J.M. (1995) H_3 -Receptor activation inhibits cholinergic stimulation of acid secretion in isolated rabbit fundic glands. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 275: 1099-1103.
- Barrachina, D.; Calatayud, S.; Espulgues, J.; Whittle, B.J.R.; Moncada, S.; Espulgues J.V. (1994) Nitric oxide donors preferentially inhibit neurally mediated rat gastric acid secretion. *Eur. J. Pharmacol.* 262, 181-183.
- Bennett, H.S. (1967) The microscopical investigations of biological materials with polarized light. In: McGlun's Jones, R. ed. *Handbook of microscopical technique*. 3 ed. Hafner Publishing Co., New York, p. 591-677.
- Berridge, M.J. (1993) Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature*, 361: 315-325.
- Berstein, G.; Haga, T. (1990). Molecular aspects of muscarinic receptors. In: *Current Aspects of Neurosciences*. Vol. 1, NMOsborne (eds). New York. Macmillan Press, 245-84.
- Blanck, J.W.; Gerskowitch, V.P.; Leff, P.; Shankley, N.P. (1986) *Br.J.Pharmacol.* 89: 547-555.
- Brown, J.F.; Hanson, P.J.; Whittle, B.J.R. (1993) The nitric oxide donor *S*-nitroso-*N*-acetyl-penicillamine, inhibits secretory activity in rat isolated parietal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195, 1354-1359.
- Curtis, G.H.; MacNaughton, W.K.; Gall, D.G.; Wallace, J. (1995) Intraluminal pH modulates gastric prostaglandin synthesis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 73: 130-134.
- Dial, E.W.; Thompson, W.J.; Rosenfeld, G.C. (1981). Isolated parietal cells: histamine response and pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 219: 585-90.
- Ding, M.; Kinoshita, Y.; Kishi, K.; Nakata, H.; Hassan, S.; Kawanami, C.; Sugimoto, Y.; Katsuyama, M.; Negishi, M.; Narumiya, S.; Ichikawa, A.; Chiba, T. (1997) *Prostaglandins* 53: 199-216.
- Hasebe, K.; Horie, S.; Yano, S.; Watanabe, K. (1998) Inhibitory effect of N^w -nitro-L-arginine on gastric secretion induced by secretagogues and vagal

- stimulation in the isolated stomach. *European Journal of Pharmacology*, 350: 229-236.
- Hirschowitz, B.I.; Keeling, D.; Lewin, M.; Okabe, S.; Parsons, K.; Wallmark, B.; Sachs, G. (1995) Pharmacological aspects of acid secretion. *Digestive Diseases and Sciences*, 40: 3S-23S.
- Hiruma-Lima, C.A.; Spadari-Bratfisch, R.C.; Nunes, D.S.; Grassi-Kassisse, D.M.; Souza Brito, A.R.M. (1999) Antiulcerogenic mechanisms of dehydrocrotonin, a diterpene lactone obtained from *Croton cajucara*. *Planta Medica*, 65: 325-330.
- Howden, C.W.; Jones, D.B.; Peace, K.E. (1988) *Dig. Dis. Sci.* 33: 619-24.
- Itokawa, H.; Ichihara, Y.; Kojima, H.; Watanabe, K.; Takeya, K. (1989) Nor-Clerodane diterpenes from *Croton cajucara*. *Phytochemistry*, 28(6):1667-1669.
- Kajimura, M.; Reuben, M.A.; Sachs, G. (1992) The muscarinic receptor gene expressed in rabbit parietal cells is the M₃ subtype. *Gastroenterology*, 103: 870-875.
- Karnorsky, M.J. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 27: 137A.
- Kilbinger, H.; Nafziger, M. (1986). Two types of neuronal muscarine receptors modulating acetylcholine release from guinea-pig myenteric plexus. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 328: 304-9.
- Kim, H.; Kim, K.H. (1996) Effects of a nitric oxide donor and nitric oxide synthase inhibitors on acid secretion of isolated rabbit gastric glands. *Pharmacology* 53: 331-339.
- Kleveland, P.M.; Waldum, H.L.; Larsson, H. (1987). Gastric acid secretion in the totally isolated, vascularly perfused rats stomach. *Scand. J. Gastroenterol.* 22: 705-13.
- Konturek, J.W.; Hengst, K.; Konturek, S.J.; Domschke, W. (1997) *Scand. J. Gastroenterol.* 32: 980-984.
- Korolkiewicz, R.; Sliwinski, W.; Rekowski, P.; Halama-Borowiec, A.; Mucha, P.; Szczurowicz, A.; Korolkiewicz, K.Z. (1997) Galanin, galantinde ND galanin (1-14)-[α -aminobutyric acid]-scylorhinin-1: structure dependent effects on the rat isolated gastric fundus. *Pharmacol. Res.*, 35: 7-16.
- Krielaart, M.J.; Veenstra, D.M.J.; Van Buuren, K.J.H. (1990) Mechanism of action of H₂-receptors of spontaneously beating guinea-pig atrium. *Agents Actions*, 31: 23-34.
- Kubo, I.; Asaka, Y.; Shibata, K. (1991) *Phytochemistry* 30: 2545-2546.
- Lin, S.; Kajimura, M.; Takeuchi, K.; Kodaira, M.; Hanai, H.; Kaneko, E. (1997). Expression of muscarinic receptor subtypes in rat gastric muscle – Effect of M₃ selective antagonist on gastric motility and emptying. *Digestive Diseases and Sciences*, 42: 907-14.
- Mertz-Nielsen, A.; Hillingsø, J.; Eskerød, O.; Bukhave, K.; Raskmadsen, J. (1995). Muscarinic M₁ receptor inhibition reduces gastroduodenal bicarbonate secretion and promotes gastric prostaglandin E₂ synthesis in healthy volunteers. *Gut*, 36: 528-33.
- Mertz-Nielsen, A.; Munck, L.K.; Bukhave, K.; Raskmadsen, J. (1989). Muscarinic M₁ – receptors regulate gastric mucosal prostaglandin E₂ formation. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 1: 57-62.
- Mitra, S.K.; Gopumadhavan, S.; Hemavathi, T.S.; Muralidhar, T.S.; Venkataranganna, M.V. (1996) Protective effect of UL-409, a herbal formulation against physical and chemical factor induced gastric and duodenal ulcers in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 52: 165-169.
- Oishi, K.; Ishibashi, T.; Nakamura, S.; Mita, M.; Uchida, M.K. (1999). Protein kinase C promotes spontaneous relaxation of streptolysin-o-permeabilized smooth muscle cells from the guinea-pig stomach. *Life Sciences* 64: 1975-87.
- Pfeiffer, A.; Kromer, W.; Friemann, J.; Ruge, M.; Herawi, M.; Schatzl, M.; Schwegler, U.; May, B.; Schatz, H. (1995) Muscarinic receptors in gastric mucosa are increased in peptic ulcer disease. *Gut*, 36: 813-818.
- Pfeiffer, A.; Rochlitz, H.; Noelke, B.; Tacke, R.; Moser, U.; Mutschler, E. (1990) Muscarinic receptor mediating acid secretion are of M₃ type. *Gastroenterology*, 98: 218-22.
- Pique, J.M.; Espulgues, J.V.; Whittle, B.J.R. (1992) Endogenous nitric oxide as a mediator of gastric mucosal vasodilatation during acid secretion. *Gastroenterology* 102, 168-174.
- Prinz, C.; Kajimura, M.; Scott, D.R.; Mercier, F.; Helander, H.F.; Sachs, G. (1993) Histamine secretion from rat enterocromaffinlike cells. *Gastroenterology*, 105: 449-461.
- Prinz, C.; Neumayer, N.; Mahr, S.; Classen, M.; Schepp, W. (1997) *Gastroenterology*, 112: 364-375.
- Rangachari, P.K. (1992) Histamine: Mercurial messenger in the gut. *Am. J. Physiol.*, 262: G1-G13.

- Ren, J.; Harty, R.F. (1994). Presynaptic muscarinic receptors modulate acetylcholine release from rat antral mucosal/submucosal nerves. *Digestive Diseases and Sciences*, 39: 1099-1106.
- Sandvik, A.K.; Waldum, H.L. (1988) *Scand. J. Gastroenterol.* 23: 696-700.
- Schubert, M.L.; Harrington, L.; Makhlof, G.M. (1993) Reciprocal paracrine pathways link histamine and somatostatin secretion in the fundus of rat stomach. *Gastroenterology*, 104: A188.
- Schubert, M.L.; Makhlof, G.M. (1996) Neural and paracrine regulation of gastrin and gastric acid secretion. *Gastroenterology*, 111: 837-838.
- Shamburek, R.D.; Schubert, M.L. (1993) Pharmacology of gastric acid inhibition. *Baillieres Clin. Gastroenterol.*, 7: 23-54.
- Soll, A.H.; Berglindh, T. (1994) In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Ed. Johnson, L.R., 2: 1139-1169.
- Souza Brito, A.R.M.; Rodriguez, J.A.; Hiruma-Lima, C.A.; Haun, M.; Nunes, D.S. (1998) Antiulcerogenic activity of *trans*-dehydrocrotonin from *Croton cajucara*. *Planta Medica*, 64: 126-129.
- Souza-Formigoni, M.L.O.; Oliveira, M.G.M.; Monteiro, M.G.; Silveira-Filho, N.G.; Braz, S.; Carlini, E.A. (1991) *Journal of Ethnopharmacology* 34: 21-27.
- Stephenson, R.P. (1956) A modification of receptor theory. *Br. J. Pharmacol.*, 11: 379-393.
- Stroff, T.; Lambrecht, N.; Peskar, B.M. (1994) Nitric oxide as mediator of the gastroprotection by cholecystokinin-8 and pentagastrin. *Eur. J. Pharmacol.* 260, R1-R2.
- Takeuchi, K.; Yagi, K.; Kato, S.; Uakawa, H. (1997) *Gastroenterology* 113: 1553-1559.
- Tanaka, K. (1989) High resolution scanning electron microscopy of the cell. *Biol. Cell*, 65: 89-98.
- Urushidani, T.; Forte, J.G. (1997) Signal transduction and activation of acid secretion in the parietal cell. *J. Membrane Biol.*, 159: 99-111.
- Van der Berg (1993) *Plantas medicinais da Amazônia – Contribuição ao seu conhecimento sistemático*. Museu Paraense Emilio Goeldi, Belém, p. 223.
- Vane, J.R. (1957) A sensitive method for the assay of 5-hydroxy-tryptamine. *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, 12: 344-349.
- Vuyyuru, L.; Schubert, M.L. (1997) Histamine, acting via H₃ receptors, inhibits somatostatin and stimulates acid secretion in isolated mouse stomach. *Gastroenterology*, 113: 1545-1552.
- Wallis, R.M.; Napier, C.M. (1999) Muscarinic antagonists in development of disorders of smooth muscle function. *Life Sciences*, 64: 395-401.
- Weigert, N.; Schaffer, K.; Wegner, U.; Schusdziarra, V.; Classen, M.; Schepp, W. (1994) Functional characterization of muscarinic receptor stimulating gastrin release from rabbit antral G-cells in primary culture. *European Journal of Pharmacology*, 264: 337-344.

O equilíbrio entre os efeitos terapêutico e tóxico de um composto é um importante parâmetro para a avaliação de um agente farmacológico. A cultura de células tem sido utilizada para avaliar a citotoxicidade (Ekwall et al., 1988) e a toxicidade nos órgãos alvos, além de poder trazer informações sobre a dose letal *in vivo* (Shivastava et al., 1991).

A citotoxicidade da DHC (Rodriguez & Haun, 1999; Souza Brito et al., 1998) e da 4SRC foi avaliada em diferentes culturas de células utilizando, primeiramente, fibroblastos da linhagem V79 de pulmão de hamster chinês e hepatócitos de ratos machos Wistar. As células V79 foram usadas porque essa linhagem é bem caracterizada e, por isso, comumente empregada em estudos de mutagenicidade e de toxicidade (Cinge et al., 1991). Para assegurar a viabilidade dos ensaios, foi utilizada uma escala de concentrações da droga teste – condição usual para o início do estudo de toxicidade de um composto desconhecido (Cingi et al., 1991). Os efeitos citotóxicos da DHC e 4SRC foram verificados através dos ensaios: redução de MTT, conteúdo de DNA e incorporação do vermelho neutro em células V79 e hepatócitos.

A DHC demonstrou efeito citotóxico similar entre os ensaios de NRU ($IC_{50} = 253 \mu M$) e MTT ($IC_{50} = 360 \mu M$) em fibroblastos V79 (Rodriguez & Haun, 1999). Esses resultados estão de acordo com os dados obtidos por Souza Brito et al (1998) na análise do conteúdo de DNA ($IC_{50} = 240 \mu M$), utilizando as mesmas células. A 4SRC apresentou toxicidade similar no ensaio de DNA ($IC_{50} = 200 \mu M$); entretanto, a toxicidade da 4SRC foi menor que a da DHC, quando o método da redução de MTT foi empregado na avaliação ($IC_{50} > 500 \mu M$) e NRU ($IC_{50} = 500 \mu M$).

Na cultura de hepatócitos (4 h) de ratos, os dados de citotoxicidade obtidos com a 4SRC mostraram similaridade de valores de IC_{50} entre os testes de redução do MTT ($IC_{50} = 10-500 \mu M$) e DNA ($IC_{50} = 10-500 \mu M$); entretanto, a IC_{50} observada no ensaio de NRU foi de $120 \mu M$, ou seja, uma toxicidade duas vezes maior que aquela observada em células V79. Variações de IC_{50} ocorrem em cultura primária de hepatócitos de mamíferos, devido à perda gradual do conteúdo de citocromo P450 sem declínio drástico inicial dos níveis de enzima da fase II. A citotoxicidade encontrada para DHC nas mesmas células esteve numa faixa similar para os testes de NRU ($IC_{50} = 400 \mu M$) e conteúdo de DNA ($IC_{50} = 300 \mu M$), quando comparado ao teste de MTT ($IC_{50} = 8 \mu M$). Embora a DHC e a 4SRC tenham apresentado, no teste de NRU, uma baixa toxicidade relativa em hepatócitos de ratos, uma alta toxicidade foi observada para o ensaio de MTT. Os dados sugerem, que tanto a DHC como a 4SRC,

sejam metabolizadas por hepatócitos gerando um ou mais produtos tóxicos com uma ação seletiva sobre a desidrogenase mitocondrial.

Foi demonstrado, em hepatócitos, a reação da desidrogenase com alguns metabólitos gerados durante a bioativação de acetaminofeno, mediada pelo citocromo P450, formando aductos covalentes diminuindo a atividade da desidrogenase (Punford et al., 1997). A formação desses aductos pode ser também proveniente da reação da desidrogenase com os metabólitos gerados da bioativação do citocromo P450 de outros compostos (Lekehal et al., 1996), podendo levar a perda da função mitocondrial (Hammond et al., 1996).

Além disso, a cultura de hepatócitos, com diferentes idades após isolamento, tem sido utilizada para determinar a participação do citocromo P450 no efeito tóxico de novas drogas (Fry et al., 1995; Hammond & Fry, 1996). Para os ensaios envolvendo citocromo P450 na bioativação da DHC (Rodriguez & Haun, 1999) e 4SRC, cultura de hepatócitos foram tratadas com diferentes doses por 20 h como descrito por Hammond & Fry (1996). Nesses experimentos uma perda da citotoxicidade foi observada, quando hepatócitos mais “velhos” foram empregados. Baseando-se nesses resultados foi possível supor que, tanto a DHC, quanto a 4SRC, são bioativadas pelo sistema microsomal do citocromo P450 gerando metabólitos menos tóxicos (dados não mostrados). Nesse sentido, para investigar se os metabólitos da DHC (Rodriguez & Haun, 1999) e da 4SRC poderiam ser potencialmente mais ou menos tóxicos para outro tipo celular, foi utilizado um sistema de co-cultura de hepatócitos e fibroblastos V79. A técnica de co-cultura é uma ferramenta útil na contribuição do estudo da toxicidade induzida por produtos da bioativação hepática em células alvo (Seibert et al., 1996; Walun et al., 1996). O tratamento de hepatócitos com 4SRC mostrou ser tão tóxico, nos testes de DNA e NRU, quanto aquele onde as células foram tratadas diretamente com a crotonina; estes resultados indicaram que a toxicidade da 4SRC e de seu(s) metabólito(s) é bastante similar. No entanto, quando a citotoxicidade da DHC (Rodriguez & Haun, 1999) e 4SRC foram avaliadas no teste de MTT, observou-se um leve efeito de ambas em estimular a habilidade de reduzir o MTT em células V79. Esse dado pode ser apresentado uma vez que o metabolismo hepático dos xenobióticos pode gerar ânion superóxido e radicais livres, capazes de reduzir compostos como o MTT (Andrews et al., 1997).

Crotonina semi-sintética ou 4SRC e lansoprazol (controle positivo) tiveram suas atividades citoprotetoras preventivas sobre a mucosa gástrica avaliada. O efeito destas substâncias foi analisado no modelo de lesões induzidas pela associação de dois agentes lesivos, etanol/HCl, em camundongos; o

etanol induz a formação de úlcera gástrica e a presença de HCl apenas acelera e agrava esse processo (Sun et al., 1991).

As doses de 50, 100 e 200 mg/kg de 4SRC mostraram significantes efeitos preventivos e dose-dependentes, sendo a prevenção da formação da úlcera, em altas doses, superior a 60%; a inibição destas mesmas lesões pelo lansoprazol foi igual àquela obtida para as maiores doses de crotonina. Ao avaliar as respostas obtidas numa curva dose-efeito de DHC, neste mesmo modelo de lesão gástrica, observou-se que a 4SRC comportou-se do mesmo modo que a DHC, ou seja, o Índice de Lesão Ulcerativa (ILU) foi significativamente menor nos grupos tratados com 100 e 200 mg/kg de DHC, quando comparado aos valores de ILU obtidos para os animais controle (Souza Brito et al., 1998).

Em seguida, os efeitos da 4SRC foram avaliados frente à lesões induzidas por administração de etanol absoluto, v.o., em ratos; o etanol comporta-se como agente ulcerogênico severo por causar necrose do tecido (Morimoto et al., 1991). Os resultados demonstraram que, tanto a crotonina (100 mg/kg), quanto a DHC na mesma dose (Souza Brito et al., 1998), foram capazes de promover uma eficaz atividade antiulcerogênica preventiva neste modelo.

O etanol tem a função de estimular as secreções salivar e do suco gástrico: a) de forma reflexa, através da excitação das terminações sensitivas na mucosa bucal e gástrica, e b) por meio de uma ação direta no estômago, provavelmente envolvendo liberação de gastrina e histamina (Goodman, 1996). Assim, foi possível propor para ambas, DHC e 4SRC, um efeito antiulcerogênico mediado por ações inibitórias sobre as secreções gástricas diminuindo/impedindo a liberação e/ou neutralizando-as.

A ação citoprotetora de algumas drogas antiúlcera é mediada por ação de prostaglandinas endógenas, as quais apresentam um importante papel na integridade e proteção da mucosa contra vários agentes agressivos (Miller, 1983). Prostaglandinas, especialmente PGE₂ e seus análogos, inibem as injúrias na mucosa gástrica induzidas por diversos agentes lesivos; essa ação protetora de PG's contra o dano direto de agentes necróticos gástricos não está aparentemente relacionada às suas propriedades antissecretoras sendo, por isso, associada à citoproteção (Robert et al., 1983).

O tratamento com indometacina - inibidor não-seletivo da ciclooxigenase (COX) - tem sido postulado como indutor de injúrias gástricas (Nosál'ova et al., 1994), através de múltiplos mecanismos: a) supressão da produção de prostaglandina, a qual representa o maior fator de patogenia em lesões gástricas; b) hipercontração gástrica; c) desintegração vascular; d) peroxidação de lipídios; e f) superprodução de leucotrieno (Takeuchi et al., 1991). O efeito do contato direto da indometacina potencializa a capacidade de difusão do íon hidrogênio e, dessa maneira, diminui a resistência da barreira

gástrica (Katsuyama, 1986); além disso, a utilização de indometacina pode levar à uma redução no fluxo local de sangue (Dajani & Agraval, 1995).

Estudos prévios (Souza Brito et al., 1998) indicaram que a DHC aumenta os fatores de defesa da mucosa gástrica, tais como aumento na produção de prostaglandina e, por esta razão, a crotonina foi avaliada no modelo de úlceras induzidas por indometacina/betanecol. Neste ensaio, verificou-se que a indometacina produziu pequenas erosões por toda a porção glandular do estômago do camundongo utilizado como controle. Os pré-tratamentos com cimetidina (dose de 100 mg/kg -controle positivo) e com 4SRC (doses de 100 e 200 mg/kg), todas administradas por via oral, inibiram significativamente a formação de úlceras gástricas induzidas por esse agente; entretanto, a inibição produzida pela dose de 50 mg/kg não foi estatisticamente significativa. Verificou-se ainda que, ao contrário da cimetidina, a DHC administrada nas mesmas doses e via em ratos, não foi capaz de promover redução significativa das lesões na mucosa gástrica induzidas por indometacina; este resultado apontou para uma possível inibição dos efeitos citoprotetores da DHC pelo antiinflamatório empregado, a indometacina (Souza Brito et al., 1998).

Assim sendo, uma primeira diferença entre as ações antiulcerogênicas da 4SRC e da DHC havia sido detectada. A proteção significativa produzida pela crotonina nesse modelo indicou a possibilidade do envolvimento desta substância com estimulação da síntese e/ou liberação de prostaglandina, não impedida ou revertida pela indometacina, como no caso da DHC, comprovando estudos que relacionaram o aumento de certas prostaglandinas endógenas com a resistência da mucosa gástrica contra agentes ulcerogênicos (Wallace & Granger, 1996).

A úlcera induzida pelo estresse por imobilização frio tem sido utilizada experimentalmente para verificar atividade antiulcerogênica (Murakami et al., 1985). Alterações gástricas como distúrbios de secreção, de microcirculação da mucosa (Kitagawa et al., 1979) e motilidade anormal (Watanabe, 1966) tem sido considerados os mecanismos patogênicos responsáveis pelas lesões da mucosa gástrica induzidas por estresse e depleção do muco (Koo et al., 1986).

As úlceras induzidas por estresse são provavelmente mediadas pela liberação de histamina com aumento da secreção ácida e redução da produção de muco (Siddhartha et al., 1991). A prevenção parcial ou completa dessas úlceras pode ser obtida por vagotomia e, desse modo, a estimulação vagal tem sido sugerida como o principal fator da ulceração induzida por esse modelo (Brodie & Hanson, 1960). Adicionalmente à vagotomia, a inibição da úlcera é bem descrita através da utilização de inibidores dos autacóides, de agentes antipépticos e anticolinérgicos (Siddhartha et al., 1991).

Em animais submetidos a estresse por imobilização e frio foram verificadas lesões hemorrágicas em todo o segmento glandular do estômago com evidências de sangramento intraluminal. O pré-tratamento com crotonina semi-sintética nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, produziu inibição dose-dependente nas severas lesões gástricas induzidas pelo estresse. Entretanto, a inibição produzida por 50 mg/kg não foi estatisticamente significativa, enquanto que aquelas produzidas pela crotonina nas doses de 100 e 200 mg/kg não diferiram estatisticamente entre si. Nesse mesmo modelo, a DHC e a cimetidina, ambas administradas na dose de 100 mg/kg, protegeram significativamente a mucosa gástrica das úlceras induzidas por estresse produzido por contenção e frio em ratos (Souza Brito et al., 1998). Os resultados indicaram que tanto a crotonina, quanto a DHC, atuam como agentes gastroprotetores eficazes, não havendo neste ensaio, diferenças quanto aos efeitos obtidos para ambas as substâncias.

Devido à proteção obtida, tanto pela 4SRC quanto pela DHC, no ensaio de estresse e devido à relação dos resultados obtidos no modelo envolvendo distúrbios na secreção gástrica, ambos discutidos acima, o passo seguinte consistiu na caracterização dos efeitos antisecretor e protetor da mucosa que poderiam estar sendo promovidos pela crotonina.

Para tanto, foram investigados os efeitos da 4SRC sobre: pH, volume do suco gástrico, concentração ácida total e muco da parede gástrica. Primeiramente, os efeitos da 4SRC sobre os parâmetros bioquímicos (pH, volume e concentração de ácido total gástrico) foram avaliados pelo método de ligadura do piloro em camundongos. Os animais foram tratados com crotonina semi-sintética (50, 100 e 200 mg/kg) e cimetidina (100 mg/kg) por via intraduodenal. A crotonina manteve inalterados todos os parâmetros observados; a cimetidina, como esperado, provocou uma redução marcante da concentração de ácido total e uma elevação significativa do pH.

Quando estes resultados foram comparados aos estudos prévios realizados com a DHC no mesmo modelo, observou-se que a DHC e a cimetidina, administradas por via intraduodenal em camundongos, provocaram uma redução marcante na concentração total de ácidos do suco gástrico; embora um aumento do volume gástrico total tenha sido observado após o tratamento com ambas as drogas, apenas aquele obtido com a cimetidina foi estatisticamente significativo; estes resultados demonstraram que o efeito gastroprotetor da DHC se dava independentemente de uma ação local da substância (Hiruma-Lima et al., 1999).

Nova diferença entre as ações de DHC e 4SRC havia sido evidenciada; os resultados atuais sugeriam que o mecanismo da 4SRC não estariam relacionados a interferência com parâmetros da secreção ácida gástrica.

A etapa seguinte de avaliação dos efeitos protetores da crotonina ou 4SRC, sobre a mucosa, foi estudar possíveis alterações na produção do muco citoprotetor. Segundo Whittle (1987) e Motilva (1996), dentre os prováveis mecanismos envolvidos com a citoproteção promovida pela prostaglandina, os quais conferem aumento da defesa da mucosa, incluem-se estimulação de bicarbonato e muco, manutenção do fluxo sanguíneo e inibições da liberação dos mediadores inflamatórios de mastócitos e da produção de radicais livres.

Em estudos de avaliação da quantidade de muco produzida pela parede do estômago de camundongos tanto a crotonina, quanto a DHC (Souza Brito et al., 1998), não foram capazes de aumentar a produção e/ou liberação de muco. Portanto, foi levantada a hipótese de que os efeitos citoprotetores da DHC e da 4SRC sobre as úlceras induzidas por etanol e estresse não seriam exercidos por um aumento da síntese e/ou por retenção de muco.

É conhecido que, no estômago, as PG's estimulam a secreção de muco e bicarbonato (Takeuchi et al., 1997), além de inibir a secreção de ácido.

Ao analisar o efeito da 4SRC (100 mg/kg) sobre a síntese de prostaglandina no estômago não foi verificada alteração dos níveis de PGE₂, quando comparado aos níveis do grupo controle (Tween), ao contrário da DHC que apresentou uma atividade citoprotetora evidenciada pelo aumento na produção de PGE₂ (Hiruma-Lima et al., 1999). O pré-tratamento desses animais com indometacina, inibidor da enzima ciclooxygenase, inibiu significativamente a produção de PGE₂. Os resultados sugeriram, então, que a crotonina semi-sintética possui um efeito gástrico preventivo, mas que o mesmo só não pode ser atribuído a um efeito estimulatório direto na produção de PGE₂, diferente das ações antiulcerogênicas da DHC, que apresentam além de um efeito antissecretório, uma atividade citoprotetora.

Esta nova diferença de mecanismo de ação entre a DHC e 4SRC conduziu os experimentos à etapa seguinte da investigação, na qual seriam estudados os efeitos da crotonina sobre os receptores dos secretagogos gástricos.

Na mucosa gástrica, a fonte de histamina é normalmente proveniente das células ECL ou *enterocromaffin-like* (Rangachari et al., 1992). A gastrina e acetilcolina estimulam a liberação de histamina a partir dessas células (Prinz et al., 1993). Assim, o papel desempenhado pela histamina, como potente estimulante fisiológico da secreção gástrica, está perfeitamente justificado. Por outro lado, a farmacologia do receptor H₂ da histamina tem sido amplamente explorada no sentido de aumentar a eficácia dos tratamentos de úlceras gástricas através da síntese de novos antagonistas seletivos (Bado et al., 1995).

A capacidade da 4SRC (nas concentrações de 3, 10 ou 30 μM) em antagonizar os receptores histaminérgicos foi estudada, em átrio direito isolado de cobaio, através de inibição do efeito cronotrópico produzido pela histamina, quando os receptores β adrenérgicos encontram-se bloqueados por propranolol. Os resultados obtidos demonstraram que a crotonina (3 μM) produz um deslocamento para a direita da curva concentração-resposta à histamina, acompanhado de redução da resposta máxima, sugerindo que esse composto possa atuar como antagonista não competitivo do receptor H_2 ; além disso, a combinação do deslocamento à direita com a depressão do efeito máximo pode ser explicado pela diminuição do processo de transferência do estímulo intracelular promovido pelo antagonista.

A DHC, estudada nas mesmas concentrações (3, 10 ou 30 μM), também apresentou nessas duas últimas concentrações, diminuição significativa na resposta máxima da preparação, observando-se ainda, com a maior dose, diminuição da frequência atrial inicial. Todas as concentrações de DHC diminuíram significativamente os valores de pD_2 para histamina. As curvas concentração-resposta à histamina, obtidas na presença da DHC, demonstraram que existe algum tipo de antagonismo não-competitivo entre a DHC e os receptores H_2 em átrio direito de cobaio (Hiruma-Lima et al., 1999).

Dada a concordância entre as ações da DHC e 4SRC, restava então estudar os efeitos da 4SRC sobre os receptores muscarínicos tal como havia sido feito para a DHC.

Um dos principais estimulantes da secreção ácida produzida pelas células parietal é a acetilcolina, a qual interage com receptores muscarínicos do subtipo M_3 (Bado et al., 1995). Os agentes colinérgicos, em contraposição à gastrina, aumentam ao máximo a secreção ácida estimulada por histamina em células isoladas de estômago de rato (Kleveland et al., 1987).

Para estudar os efeitos da crotonina sobre os receptores muscarínicos foram retiradas “tiras” do fundo do estômago de rato, local onde se localiza uma grande parte das células oxínticas. Os efeitos da 4SRC foram analisados sobre as contrações induzidas por doses cumulativas de carbachol, um agonista muscarínico. Após a obtenção da curva controle ao carbachol, obtida na ausência do veículo ou da crotonina, a preparação foi incubada com crotonina semi-sintética (3, 10 or 30 μM) e a curva do agonista foi então repetida.

Foi possível verificar que a 4SRC ou crotonina semi-sintética produziu deslocamentos, concentração-dependentes e paralelos, à direita da curva concentração-resposta ao carbachol, sem alteração na resposta máxima; este efeito é comum aos antagonistas que se ligam competitiva e

reversivelmente ao receptor, comprovando a teoria de Stephenson (1956), a qual propõe que os antagonistas competitivos clássicos possuem eficácia agonística zero.

No caso da DHC, a concentração de 30 μ M produziu um deslocamento à direita da curva ao agonista e uma diminuição significativa da resposta máxima, o que confere à DHC uma ação antagonista não-competitiva sobre o receptor muscarínico (Hiruma-Lima et al., 1999).

Os estudos funcionais sobre os receptores farmacológicos, revelaram que existe o mesmo padrão de interação para DHC e receptores histamínicos e muscarínicos, contrapondo-se ao padrão apresentado pela 4SRC, o qual interage do mesmo modo que a DHC com o receptor histaminérgico; em relação ao receptor muscarínico, entretanto, as duas substâncias apresentam comportamentos distintos. Enquanto a DHC antagoniza não competitivamente os receptores muscarínicos gástricos, a crotonina comporta-se como um antagonismo competitivo de eficácia intrínseca zero, sobre esses receptores. Embora a natureza destes antagonismos não tenha sido completamente elucidada seria possível atribuir tanto à 4SRC, quanto à DHC, um importante efeito antissecretor, o qual poderia, ainda que parcialmente, explicar suas ações antiulcerogênicas.

E estudos realizados por Lin et al (1997) indicaram que a expressão dos subtipos de receptores muscarínicos diferem entre os tecidos; no caso do músculo liso gastrointestinal ocorre uma predominância dos receptores M_1 e M_3 , os quais se manifestam através de diferentes mecanismos de sinalização intracelular.

Devido à resposta promovida pela crotonina semi-sintética, foi possível sugerir que este composto atue como antagonista de receptor muscarínico, provavelmente do subtipo M_3 , pois confirmam os estudos realizados por Berstein (Berstein et al., 1990) que descrevem a indução da contração do músculo liso do intestino delgado e a secreção de glândulas exócrinas ativadas pelo subtipo M_3 de receptor muscarínico.

Pesquisas com cultura primária de células G, do antro de estômago de coelho, comprovaram que ocorre liberação de gastrina através da utilização de agonistas de receptores de acetilcolina (Weigert et al., 1994). A utilização de atropina, que tem alta afinidade por receptor muscarínico (M_3) glandular, inibe completamente a liberação de gastrina induzida por carbacol, um análogo estável da acetilcolina. Esse perfil farmacológico sugere que a estimulação muscarínica de gastrina é mediada via receptor muscarínico M_3 . Portanto, a 4SRC, além de interagir com receptores muscarínicos presentes nas células parietais, poderia estar interagindo com receptor M_3 das células G, o que ocasionaria interrupção ou

obstrução de uma das principais vias de estímulo da secreção ácida. O mesmo não ocorreria com a DHC.

Outro subtipo de receptor muscarínico amplamente estudado é o subtipo M_1 . Shamburek e colaboradores (1993) afirmam que os receptores M_1 estão localizados predominantemente nos neurônios pós-ganglionares intramurais; eles teriam a função de mediar os efeitos das transmissões ganglionares através da liberação de substâncias estimulatórias, tais como acetilcolina. Resultados de estudos com pirenzepina confirmam o envolvimento de receptores pré-sinápticos M_1 na modulação positiva da liberação basal da acetilcolina (Ren et al., 1994).

Por essa razão, foi possível sugerir que o bloqueio de receptores muscarínicos M_1 pela crotonina semi-sintética, poderia interromper a liberação de acetilcolina a partir dos neurônios colinérgicos. Outra hipótese sobre a ação da 4SRC em relação ao subtipo M_1 provém de pesquisas realizadas por Mertz-Nielsen et al (1995), que observaram o significativo aumento da produção de PGE_2 em humanos, através do bloqueio de receptores mescarínicos M_1 com pirenzepina. Estes resultados levam à sugestão de uma possível ação gastroprotetora da 4SRC promovida por antagonismo competitivo sobre os receptores muscarínicos.

Dentre os diversos mecanismos de proteção da mucosa gástrica evidencia-se a importância da densa rede de capilares na superfície do epitélio do estômago, a qual é responsável por promover a estocagem de nutrientes e oxigênio para o epitélio; remover, diluir e neutralizar as substâncias tóxicas que possivelmente difundam da mucosa para o lumen é um outro papel atribuído ao fluxo sanguíneo na mucosa. Quando o epitélio está danificado, a microcirculação se deve ainda a criação, sobre o local da injúria, de um microambiente que é favorável ao reparo (Wallace et al., 1996).

O fluxo de sangue da mucosa pode ser modulado por algumas substâncias endógenas. Dentre as mais importantes está o peptídeo relacionado ao gene calcitonina (CGRP), prostaglandinas e óxido nítrico. CGRP e NO têm a função fundamental de modular um componente essencial de defesa da mucosa, a resposta hiperêmica à irritação luminal.

Quando a mucosa é exposta a um irritante, ou quando ocorre retorno de ácido, um rápido aumento do fluxo sanguíneo da mucosa pode ser detectado. A difusão de ácido para dentro da mucosa ativa os neurônios aferentes sensoriais. Os neurônios sensoriais aferentes liberam CGRP nos arredores das arteríolas da submucosa (Li et al., 1992) que, por sua vez, estimula a produção endotelial do óxido nítrico, o qual relaxa as células musculares lisas vasculares adjacentes através da estimulação da guanilato ciclase (GMPc) solúvel (Lippe et al., 1992). A vasodilatação resultante gera uma marcante

elevação do fluxo sanguíneo da mucosa e, desse modo, aumenta a liberação de bicarbonato para o epitélio no sentido de neutralizar o ácido. Interferência com algum aspecto dessa via pode ocasionar uma hiperemia reativa (Holzer, 1991).

Por essa razão, foi testado o papel da crotonina semi-sintética (100 mg/kg) sobre a ação do óxido nítrico. Foi possível observar que a crotonina não apresentou diferença significativa em relação ao controle no modelo estudado.

Os resultados indicaram que a crotonina semi-sintética está relacionada ao óxido nítrico endógeno, o qual está envolvido com a resposta secretória ácida induzida por liberação de histamina a partir de células que contenham histamina (Hasebe et al., 1998). Alguns estudos têm mostrado que o NO exógeno inibe a secreção ácida gástrica mediada neuronalmente em ratos (Barrachina et al., 1994), bem como a resposta secretória ácida da histamina em células parietais isoladas de ratos (Brown et al., 1993; Kim et al., 1996). Isso demonstra que o NO endógeno pode contribuir para a gastroproteção por pentagastrina contra danos da mucosa gástrica induzida por etanol (Stroff et al., 1994), além disso, apesar de não diretamente, o NO endógeno está envolvido na secreção ácida gástrica estimulada por pentagastrina e na vasodilatação da mucosa (Pique et al., 1992).

Uma outra hipótese é que a crotonina semi-sintética ative fatores de crescimento, bFGF ou TGF- β , possibilitando uma restituição epitelial rápida e eficaz na área danificada. Entretanto, esta hipótese necessita ser ainda investigada.

Os estudos com a crotonina semi-sintética quando comparados aos realizados com a DHC, demonstram que:

- A 4SRC apresentou DL_{50} semelhante a DHC, e uma citotoxicidade, de seu metabólito, relativamente mais baixa em comparação a DHC;
- A crotonina semi-sintética, assim como a DHC, demonstrou possuir ação antiulcerogênica nos modelos de úlcera gástrica induzidos por etanol, etanol/HCl, estresse por imobilização e frio, ligadura de piloro; entretanto, no modelo de indometacina/betanecol, apenas a crotonina ou 4SRC apresentou efeito significativo;
- O mecanismo antiulcerogênico, responsável pela ação da crotonina semi-sintética, é provavelmente decorrente de antagonismo não competitivo sobre os receptores H_2 da histamina, do mesmo modo que a DHC, e de um antagonismo competitivo aos receptores M_3 colinérgicos, ambos existentes na membrana da célula parietal. Além de estar relacionado a presença do óxido nítrico na mucosa gástrica. A 4SRC mostrou-se inefetiva em: aumentar a produção e/ou liberação de muco e prostaglandina e em inibir/estimular a geração de óxido nítrico.

Assim, a crotonina semi-sintética ou 4SRC possui atividade antiulcerogênica por mecanismos distintos daqueles encontrados para a DHC que, além da ação antissecretora não competitiva (em parte comum à 4SRC), apresenta adicionalmente, atividade citoprotetora, uma vez que aumenta os níveis de prostaglandina.

Estudos adicionais são necessários para: a) prosseguir na investigação de mecanismos de ação ainda não explorados, b) tentar elucidar a qual parte da molécula de 4SRC ou DHC as diferenças de efeito farmacológico e toxicidade estão relacionadas.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Almeida, A.B.A.; Melo, P.S.; Gracioso, J.S.; Nunes, D.S.; Haun, M.; Souza Brito, A.R.M. (2001) Antiulcerogenic and cytotoxic activity of semi-synthetic crotonin of *Croton cajucara* Benth. (submitted Toxicon).
- Almeida, A.B.A.; Miotto, A.M.; Hiruma-Lima, C.A.; Gracioso, J.S.; Batista, L.M.; Toma, W.; Paula, A.C.B.; Nunes, D.S.; Spadari-Bratfisch, R.C.; Souza Brito, A.R.M. (2001) Mechanism of antiulcerogenic activity of semi-synthetic crotonin obtained from *Croton cajucara* Benth (submitted).
- Andrews, M.J.; Garle, M.J.; Clothier, R.H. (1997). Toxicol. In vitro 4, 9-16.
- Ariyoshi, I.; Toshiharu, A.; Sugimura, F.; Abe, M.; Mafsu, Y.; Honda, T. (1986). Nihon Univ. J. Med. 28, 69-74.
- Bado, A.; Hervatin, F.; Lewin, M.J.M. (1991) Pharmacological evidence for histamine H₃ receptor in control of gastric acid secretion in cats. Am.J.Physiol. 260, G631-G635.
- Bado, A.; Laigneau, J.P.; Moizo, L.; Cherifi, Y.; Lewin, M.J.M. (1995) H₃-Receptor activation inhibits cholinergic stimulation of acid secretion in isolated rabbit fundic glands. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 275: 1099-1103.
- Bahari, H.M.M.; Ross, I.N.; Turnberg, L.A. (1982) Demonstration of a pH gradient across the mucus layer on the surface of human gastric mucosa in vitro. Gut 23: 513-516.
- Barnard, J.A.; Beauchamp, R.D.; Russel, W.E.; Dubois, R.N.; Coffey, R.J.Jr. (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their relevance to gastrointestinal pathophysiology. Gastroenterol. 108, 564-580.
- Barranchina, D.; Calatayud, S.; Espulgues, J.; Whittle, B.J.R.; Mocada, S.; Espulgues, J.V. (1994). Nitric oxide donors preferentially inhibit neurally mediated rat gastric acid secretion. Eur. J. Pharmacol. 262, 181-183.
- Baron, T.H.; Longman, M.T.S.; Wastell, C. (1980). In: Bonchier, I.A.D. (Ed.), Recent Advances in Gastroenterology. Churchill Livingstone, London, 523-559.
- Beauchamp, R.D.; Barnard, J.A.; Mccutchen, C.M.; Cherner, J.A.; Coffey, R.J.Jr. (1989) Localization of transforming growth factor α and its receptor in gastric mucosal cells. J.Clin.Invest. 84, 1017-1023.
- Bennett, H.S. (1967) The microscopical investigations of biological materials with polarized light. In: McGlun's Jones, R. ed. Handbook of microscopical technique. 3 ed. Hafner Publishing Co., New York, p. 591-677.
- Berqvist, E.M.; Waller, M.; hammer, L.; Obrink, K.J. (1980) Histamine as a secretory mediator in isolated gastric glands. In: Hydrogen Ion Transport in Epithelia. Amsterdam Elsevier, 429-437.
- Berridge, M.J. (1993) Inositol triphosphate and calcium signalling. Nature, 361: 315-325.

- Berstein, G.; Haga, T. (1990). Molecular aspects of muscarinic receptors. In: Current Aspects of Neurosciences. Vol. 1, NMOsborne (eds). New York. Macmillan Press, 245-84.
- Bhaskar, K.R.; Garik, P.; Turner, B.S.; Bradley, J.D.; Bansil, R.; Stanley, H.E.; LaMont, J.T. (1992) Viscous fingering of HCl through gastric mucin. 360: 458-461.
- Bianchi Porro, G.; Parente, F. (1990) Duodenal ulcer resistant to H₂ blockers: Na emerging therapeutic problem. Scand. J.Gastroenterol. 23, 159-165.
- Bianchi, V.; Fortunat, E. (1990). Toxicol. In Vitro 4, 9-16.
- Black, J. (1993) Reflections on the analytical pharmacology of histamine H₂-receptor antagonists. Gastroenterol. 105, 963-968.
- Black, J.W.; Duncan, W.A.M.; Durant, C.J.; Ganellin, C.R.; Parsons, E.M. (1972) Definition and antagonism of histamine H₂-receptors. Nature, 236: 385-387.
- Blanck, J.W.; Gerskowitch, V.P.; Leff, P.; Shankley, N.P. (1986) Br.J.Pharmacol. 89: 547-555.
- Borefreund, E.; Puerner, J.A. (1984) A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR90). Journal of Tissue Culture Methodology 9, 7-9.
- Brodie, D.A.; Hanson, H.M. (1960). A study of the factors involved in the production of gastric ulcers by the restraint technic. Gastroenterology 38, 353-360.
- Brown, J.F.; Hanson, P.J.; Whittle, B.J.R. (1993). The nitric oxide donor S-nitroso-N-acetylpenicillamine, inhibits secretory activity in rat isolated parietal cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 195, 1354-1359.
- Brown, J.F.; Tepperman, B.L.; Hanson, P.L.; Whittle, B.J.R. (1994) Lipopolysaccharide induces Ca²⁺-independent nitric oxide synthase activity in rat gastric mucosal cells. Eur. J.Pharmacol. 292: 111-114.
- Catto-Smith, A.G.; Patrick, M.K.; Scott, R.B.; Davison, J.S.; Gall, D.G. (1989) Gastric response to mucosal IgE-mediated reactions. Am.J.Physiol. 257, G704-708.
- Chen, C.M.; Chang, A.; Buhl, T.; Tanner, M.; Soll, A.H. (1994) Apical acidification induces paracellular injury in canine gastric mucosal monolayers. Am.J.Physiol. 267: G1012-1020.
- Chen, M.C.; Amirian, M.; Toomey, M.; Sanders, M.; Soll, A.H. (1988) Prostanoid inhibition of canine parietal cells: mediation by inhibiting GTP-binding protein of adenylate cyclase. Gastroenterology 77, 433-443.
- Chew, C.S. (1983) Inhibitory action of somatostatin on isolated gastric glands and parietal cells. Am.J.Physiol. 245, C371-380.
- Chew, C.S. (1985) Parietal cell protein kinases: selective activation of the type I AMP_c-dependent protein kinase by histamine J.Biol.Chem. 260, 7540-7550.

- Chew, C.S.; Brown, M.R. (1986) Release of intracellular Ca^{2+} and elevation of inositol trisphosphate by secretagogues in parietal and chief cells isolated from rabbit gastric mucosa. *Biochim.Biophys. Acta* 888: 116-125
- Chew, C.S.; Nakamura, K.; Petropolous, A.C. (1994) Multiple actions of epidermal growth factor and TGF α on rabbit gastric parietal cell function. *Am.J.Physiol.* 267, G818-826.
- Cingi, M.R.; De Angelis, I.; Fortunati, E.; Reggiani, D.; Bianchi, V.; Tiozzo, R.; Zucco, F. (1991). Choice and Standardization of test protocols in cytotoxicology – a multicenter approach. *Toxicol. In Vitro* 5, 119-125.
- Coleman, R.A.; Smith, W.L.; Narumiya, S. (1994) International union of pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtype. *Pharmacol. Ver.* 46, 205-229.
- Corne, S.J.; Morrissey, S.M. and Woods, R.J. (1974). A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. *J. Physiol. Lond.*, 242, 116-117.
- Cortelazzo, A.L. (1992) Starch detection and dosage in *Canavalia ensiformis* and *Canavalia gladiata* cotyledons during the plant let development. *Ver. Bras. Bot.*, 15: 1557-162.
- Curtis, G.H.; MacNaughton, W.K.; Gall, D.G.; Wallace, J. (1995) Intraluminal pH modulates gastric prostaglandin synthesis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 73: 130-134.
- Dajani, E.Z.; Agrawal, N.M. (1995) Prevention and treatment of ulcers induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: an update. *Journal of Physiology and Pharmacology* 46, 3-16.
- Denizot, F.; Lang, R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Meth.*, 89: 271-277.
- Dial, E.W.; Thompson, W.J.; Rosenfeld, G.C. (1981). Isolated parietal cells: histamine response and pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 219: 585-90.
- Ding, M.; Kinoshita, Y.; Kishi, K.; Nakata, H.; Hassan, S.; Kawanami, C.; Sugimoto, Y.; Katsuyama, M.; Negishi, M.; Narumiya, S.; Ichikawa, A.; Chiba, T. (1997) Prostaglandins 53: 199-216.
- Edkins, J.S. (1906) On the chemical mechanism of gastric secretion. *J.Physiol.* 34: 133-144.
- Ekwall, B.; Ekwall, K. (1988). Comments on the use of diverse cell systems in toxicity testing. *ATLA* 15, 193-200.
- El-Omar, E.M.; Penman, L.D.; Ardill, J.E.S.; Chittajallu, R.S.; Howie, C.; Mccoll, K.E.L. (1995) *Helicobacter pylori* infection and abnormalities of acid secretion in patients with duodenal ulcer disease. *Gastroenterology* 109: 681-691.

- Gannon, B.; Browning, B.; Browning, J.; O'Brien, P.; Rogers, P. (1984) Mucosal microvascular architecture of the fundus and body of human stomach. *Gastroenterology* 86: 866-875.
- Gerber, J.G.; Payne, N.A. (1988) Endogenous adenosine modulates gastric acid secretion to histamine in canine parietal cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 244, 190-4.
- Goddaard, P.J.; Hills, B.A.; Lichtenberger, L.M. (1987) Does aspirin damage canine gastric mucosa reducing its surface hydrophobicity? *Am. J. Physiol.* 252, 421-430.
- Goel, R.K.; Banerje, R.S.; Acharya, S.B. (1990). *J. Ethnopharmacol.* 29, 95-103.
- Goldenring, J.R.; Asher, V.A.; Barreuther, M.F.; Lewis, J.J.; Lohmann, S.M.; Walter, U.; Modlin, I.M. (1992) Dephosphorylation of AMP_c -dependent protein kinase regulatory subunit in stimulated parietal cells. *Am.J.Physiol.* 262, G763-773.
- Grisham, M.B.; Von Ritter, C.; Smith, B.F.; LaMont, J.T.; Granger, D.N. (1987) Interaction between oxygen radicals and gastric mucin. *Am.J.Physiol.* 253: G93-96.
- Guguen-Guillouzo, C.; Guillouzo, A. (1986). Isolated and cultured hepatocytes, (A. Guillouzo and C. Guguen-Guillouzo, eds.) pp. 1-12, Les Editions INSERM and Libbey Eurotext, Paris.
- Hakanson, R.; Boettcher, G.; Ekblad, F.; Panula, P.; Simonsson, M.; Dohlsten, M.; Hallberg, T.; Sundler, F. (1986) Histamine in endocrine cells in the stomach. *Histochemistry* 86, 5-17.
- Hasebe, K.; Horie, S.; Yano, S.; Watanabe, K. (1998). Inhibitory effect of N^w-nitro-L-arginine on gastric secretion induced by secretagogues and vagal stimulation in the isolated stomach. *European Journal of Pharmacology* 350, 229-236.
- Haun, M.; Pereira, M.F.; Hoffmann, M.E.; Joyas, A.; Campos V.; Filardi, L.D.; De Castro, S.L.; Durán, N. (1992). *Biol. Res.* 25, 21-25.
- Hayden, L.J.; Thomas, G.; West, G.B. (1978). Inhibitors of gastric lesions in the rat. *Journla Pharmacy Pharmacology* 30, 244-246.
- Hills, B.A.; Butler, B.D.; Lichtenberger, L.M. (1983) Gastric mucosal barrier, hydrophobic lining to the lumen of the stomach. *Am.J.Physiol.* 244: 561-568.
- Hirschowitz, B.I.; Keeling, D.; Lewin, M.; Okabe, S.; Parsons; Sewing, K.; Wallmark, B.; Sachs, G. (1995) Pharmacological aspects of acid secretion. *Digestive Diseases and Sciences*, 40: 3S-23S.
- Hirschowitz, B.I.; Sachs, G. (1969) Atropine inhibition of insulin, histamine and pentagastrin stimulated gastric electrolyte and pepsin secretion in the dog. *Gastroenterology* 56, 693-702.
- Hiruma-Lima, C.A.; Spadari-Bratfisch, R.C.; Nunes, D.S.; Grassi-Kassisse, D.M.; Souza Brito, A.R.M. (1999) Antiulcerogenic mechanisms of dehydrocrotonin obtained from *Croton cajucara*. *Planta Medica*, 65: 325-330.

- Holm, L.; Angren, J.; Persson, A.E.G. (1992) Stimulation of acid secretion increases the gastric gland luminal pressure in the rat. *Gastroenterology* 103: 1797-1803.
- Holzer, P. (1991) Sensory nerves and neuropeptides in gastroenterology. From basic science to clinical perspectives. *Adv.Exp.Med.Biol.* 298: 3-16.
- Howden, C.W.; Jones, D.B.; Peace, K.E. (1988) *Dig. Dis. Sci.* 33: 619-24.
- Kajimura, M.; Reuben, M.A.; Sachs, G. (1992) The muscarinic receptor gene expressed in rabbit parietal cells is the M₃ subtype. *Gastroenterology*, 103: 870-875.
- Kao, Y.C.; Lichtenberger, L.M. (1993) Effect of 16,16-dimethyl prostaglandin E₂ on lipidic organelles of rat gastric surface mucous cells. *Gastroenterology* 104: 103-113.
- Karnorsky, M.J. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 27: 137A.
- Katsuyama, Y.; Yano, S.; Watanabe, K. (1986). Reduction of rat gastric transmucosal potential difference by indomethacin partly associated with its acid secretory activity. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 53, 253-256.
- Kilbinger, H.; Nafziger, M. (1986). Two Types of neuronal muscarine receptors modulating acetylcholine release from guinea-pig myenteric plexus. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 328: 304-9.
- Kitagawa, H.; Fujiwara, M.; Osumi, Y. (1979). Effect of water immersion stress on gastric secretion and mucosal blood flow in rats. *Gastroenterology* 77, 298-302.
- Kim, H.; Kim, K.H. (1996) Effects of a nitric oxide donor and nitric oxide synthase inhibitors on acid secretion of isolated rabbit gastric glands. *Pharmacology* 53, 331-339.
- Kleveland, P.M.; Waldum, H.L.; Larsson, H. (1987). Gastric acid secretion in the totally isolated, vascularly perfused rats stomach. *Scand. J. Gastroenterol.* 22: 705-13.
- Koo, M.W.L.; Ogle, C.W.; Cho, C.H. (1986) Effect of verapamil, carbenoxolone and *N*-acetylcysteine on gastric wall mucus and ulceration in stressed rats. *Pharmacology* 32, 326-334.
- Kopin, A.S.; Lee, Y.M.; McBride, E.W.; Miller, L.J.; Lu, M.; Lin, H.Y. ; Kolakowski, L.F.; Beinborn, M.E. (1992) Expression cloning and characterisation of the canine parietal cell gastrin receptor. *Proc. Natl. Acad.Sci.* 89, 3605-3609.
- Korolkiewicz, R.; Sliwinski, W.; Rekowski, P.; Halama-Borowiec, A.; Mucha, P.; Szczurowicz, A.; Korolkiewicz, K.Z. (1997) Galanin, galantinde ND galanin (1-14)-[α -aminobutyric acid]-scylorhinin-1: structure dependent effects on the rat isolated gastic fundus. *Pharmacol. Res.*, 35: 7-16.

- Krielaart, M.J.; Veenstra, D.M.J.; Van Buuren, K.J.H. (1990) Mechanism of action of H₂-receptors of spontaneously beating guinea-pig atrium. *Agents Actions*, 31: 23-34.
- Kubo, I.; Asaka, Y.; Shibata, K. (1991). Insect growth inhibitory nor-diterpenes, cyclo-dehydrocrotonin and trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara*. *Phytochemistry* 30: 2545-2546.
- Lam, S.K. (1991). Pathogenesis and pathophysiology of duodenal ulcer. *Journal Clin. Gastroenterology* 13, 447-72.
- Levine, R.J. (1971). A method for rapid production of stress ulcer in rats. In: Pfeiffer, C.J. (ed.) *Peptic Ulcer*. Munksgaard, Copenhagen, pp. 92-97.
- Lewis, D.A. and Hanson, P.J. (1991). Anti-Ulcer drugs of plant origin. In: *Progress in medicinal chemistry*. 28: 201-231.
- Lewis, J.J.; Goldenring, J.R.; Asher, V.A.; Modlin, I.M. (1990) Effects of epidermal growth factor on signal transduction in rabbit parietal cells. *Am.J.Physiol.* 258, G476-483.
- Li, D.S.; Raybould, H.E.; Quintero, E.; Guth, P.H. (1992) Calcitonin gene-related peptide mediates the gastric hyperemic response to acid back-diffusion. *Gastroenterology* 102: 1124-1128.
- Lichtenberger, L.M.; Wang, Z.; Romero, J.J.; Ulloa, C.; Perez, J.C.; Giraud, M.N.; Barreto, J.C. (1995) Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) associate with zwitterionic phospholipids, insight into the mechanism and reversal of NSAID-induced gastrointestinal injury. *Nature Med.* 1: 154-158.
- Lin, S.; Kajimura, M.; Takeuchi, K.; Kodaira, M.; Hanai, H.; Kaneko, E. (1997). Expression of muscarinic receptor subtypes in rat gastric muscle – Effect of M₃ selective antagonist on gastric motility and emptying. *Digestive Diseases and Sciences*, 42: 907-14.
- Lippe, I.T.; Holzer, P. (1992) Participation of endothelium-derived nitric oxide but not prostacyclin in the gastric mucosal hyperaemia due to acid back-diffusion. *Br.J.Pharmacol.* 105: 708-714.
- Loewi, O.H. (1921) Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Plügers Arch.* 189: 239-242.
- Loveland, B.E.; Johns, T.G.; Mackay, I.R.; Vaillant, F.; Wang, Z.X.; Hertzog, P. (1992). *Biochem. Int.* 27, 501-510.
- McGuigan, J.E. (1991). Peptic ulcer and gastritis. In: Wilson, J.D., Braun Wald, E., Isselbacher, K.J., Petersdorf, R.G., Martin, J.B., Fauci, A.S., Root, R.K. (Eds.), *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 12th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 1229-1243.

- Mertz-Nielsen, A.; Hillingso, J.; Eskerod, O.; Bukhave, K.; Raskmadsen, J. (1995). Muscarinic M₁ receptor inhibition reduces gastroduodenal bicarbonate secretion and promotes gastric prostaglandin E₂ synthesis in healthy volunteers. *Gut*, 36: 528-33.
- Mertz-Nielsen, A.; Munck, L.K.; Bukhave, K.; Rask-Madsen, J. (1989). Muscarinic M₁ – receptors regulate gastric mucosal prostaglandin E₂ formation. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 1: 57-62.
- Miller, M.J.S.; Grisham, M.B. (1995) Nitric Oxide as a mediator of inflammation? You had better believe it. *Med.Inflammation*. In Press
- Miller, T.A. (1983). *American Journal of Physiology* 245, 610-623.
- Mizui, T.; Doteuchi, M. (1983) Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesion in rats. *Jpr J. Pharmacol.* 33, 939-945.
- Morimoto, Y.; Shimohara, K.; Oshima, S.; Sukamoto, T. (1991) Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of tepreone and cimetidine. *Japan Journal Pharmacology* 57, 495-505.
- Morris, G.P.; Harding, R.K.; Wallace, J.L. (1984) A functional model for extracellular gastric mucus in the rat. *Virchows Arch. [Cell Pathol.]* 46: 239-251.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55-63.
- Motilva, V.; López, A.; Martín, M.J.; LaCasa, C.; Alacón de la Lastra, C. (1996) Cytoprotective activity of cisapride on experimental gastric mucosal lesions induced by ethanol. Role of endogenous Prostaglandins. *Prostaglandins* 52, 63-74.
- Negulescu, P.; Machen, T.E. (1988) Intracellular Ca²⁺ regulation during secretagogue stimulation of the parietal cell. *Am.J.Physiol* 254: C130-C140.
- Negulescu, P.A.; Reenstra, W.W.; Machen, T.E. (1989) Intracellular Ca requirements for stimulus-secretion coupling in parietal cell. *Am.J.Physiol.* 256C C241-251.
- Nosál'ová, V.; Navarová, J. (1994). Indomethacin induced changes in mucosal lysosomal enzyme activity: Effect of H₂ antagonists. *Agents and Actions* 41, C95-C96.
- Nwokolo, C.U. Smith, J.T.; Gavey, C.; Sawyerr, A.; Pounder, R.E. (1990) Tolerance during 29 days of conventional dosing with cimetidine, nizatidine, famotidine or ranitine. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 4 (suppl 1): 29-45.
- Oishi, K.; Ishibashi, T.; Nakamura, S.; Mita, M.; Uchida, M.K. (1999). Protein kinase C promotes spontaneous relaxation of streptolysin-o-permeabilized smooth muscle cells from the guinea-pig stomach. *Life Sciences* 64: 1975-87.

- Paimela, H.; Goddard, P.J.; Carter, K.; Khalee, R.; McNeil, P.L.; Ito, S.; Silen, W. (1993) Restitution of frog gastric mucosa in vitro: effect of basic fibroblast growth factor. *Gastroenterology* 104: 1337-1345.
- Pal, S.; Nagchaudhury, J. (1991). *J. Ethnopharmacol.* 33, 97-102.
- Park, J.; Chiba, T.; Yamada, T. (1987) Mechanisms for direct inhibition of canine gastric parietal cells by somatostatin. *J.Biol.Chem.* 262, 14190-14196.
- Peralta, E.G.; Ashkenazi, A.; Winslow, J.W.; ramachandran, J.; Capon, D.J. (1988) Differential regulation of PI hydrolysis and adenylate cyclase by muscarinic receptor subtypes. *Nature* 334, 437-439.
- Pfeiffer, A.; Kromer, W.; Friemann, J.; Ruge, M.; Herawi, M.; Schatzl, M.; Schwegler, U.; May, B.; Schatz, H. (1995) Muscarinic receptors in gastric mucosa are increased in peptic ulcer disease. *Gut*, 36: 813-818.
- Pfeiffer, A.; Rochlitz, H.; Noelke, B.; Tacke, R.; Moser, U.; Mutschler, E. (1990) Muscarinic receptor mediating acid secretion are of M₃ type. *Gastroenterology*, 98: 218-22.
- Piper, D.W.; Stiel, D. (1986). *Med. Prog.* 2, 7-10.
- Pique, J.M.; Espulgues, J.V.; Whittle, B.J.R. (1992). Endogenous nitric oxide as a mediator of gastric mucosal vasodilatation during acid secretion. *Gastroenterology* 102, 168-174.
- Popielski, L. (1920) β -Imidazolyaethylamin und die Organextrakte: β -Imidazolyaethylamin als machtiger Erreger der Magendrusen. *Pflugers Arch.* 178: 214-236.
- Prinz, C.; Kajimura, M.; Scott, D.; Mercier, F.; Helander, H.F.; Sachs, G. (1993) Histamine secretion from enterochromaffin like cells. *Gastroenterology* 105, 449-461.
- Prinz, C.; Neumayer, N.; Mahr, S.; Classen, M.; Schepp, W. (1997) *Gastroenterology*, 12: 364-375.
- Rainsford, K.D.; Whitehouse, M.W. (1980) Biochemical gastroprotection from acute ulceration induced by aspirin and related drugs. *Biochem. Pharmacol.* 29, 1281-1289.
- Rangachari, P.K. (1992) Histamine: Mercurial messenger in the gut. *Am. J. Physiol.*, 262: G1-G13.
- Reisine, T. (1995) Somatostatin receptors. *Am.J.Physiol.* 269, G813-820.
- Ren, J.; Harty, R.F. (1994). Presynaptic muscarinic receptors modulate acetylcholine release from rat antral mucosal/submucosal nerves. *Digestive Diseases and Sciences*, 39: 1099-1106.
- Ren, J.; Young, R.L.; Lassiter, D.C.; Harty, R.F. (1993) Calcitonin gene-related peptide mediates capsaicin-induced neuroendocrine responses in rat antrum. *Gastroenterology* 104: 485-491.
- Renzi, D.; Valtonila, M.; Foster, R. (1993). The evaluation of a mult-endpoint cytotoxicity assay system. *Atla* 21, 89-96.
- Repetto, G.; Sanz, P. (1993). *ATLA* 21, 501-507.

- Robert, A.; Nezamis, J.E.; Lancaster, C.; Davis, J.P.; Field, S.D. (1983). Mild irritants prevent gastric necrosis through 'adaptive cytoprotection' mediated by prostaglandins. *American Journal of Physiology* 245, G113-G121.
- Rodriguez, J.A.; Haun, M. (1999) Subchronic toxicity of *trans*-dehydrocrotonin, na anti-ulcerogenic compound. *Planta Medica* 65: 1-5.
- Salvemini, D.; Misko, T.P.; Masferrer, J.L.; Seibert, K.; Currie, M.G.; Needleman, P. (1993) Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 90: 7240-7244.
- Sanders, M.J.; Ayalon, A.; Roll, M.; Soll, A.H. (1985) The apical surface of canine chief cell monolayers resists H^+ back-diffusion. *Nature* 313: 51-54.
- Sandvik, A.K.; Waldum, H.L. (1988) *Scand. J. Gastroenterol.* 23: 696-700.
- Schepp, W.; Heim, H.K.; Ruoff, H.J. (1983) Comparison of the effect of PGE_2 and somatostatin on histamine stimulated ^{14}C aminopyrine uptake and AMP_c formation in isolated gastric mucosal cells. *Agents Actions* 13, 200-206.
- Schubert, M.L.; Harrington, L.; Makhlouf, G.M. (1993) Reciprocal paracrine pathways link histamine and somatostatin secretion in the fundus of rat stomach. *Gastroenterology*, 104: A188.
- Seibert, H.; Balls, M.; Fentem, J.; Bianchi, V.; Clothier, R.H. (1996). Acute toxicity testing *in vitro* and the classification and labelling of chemicals. *Atla-alternative laboratory animal* 24, 499-510.
- Seidler, U.; Beinborn, M.; Sewing, K.F. (1989) Inhibition of acid formation in rabbit parietal cells by prostaglandins is mediated by the prostaglandin E_2 receptor. *Gastroenterol.* 96, 314-20.
- Shamburek, R.D.; Schubert, M.L. (1993) Pharmacology of gastric acid inhibition. *Baillieres Cli. Gastroenterol.*, 7: 23-54.
- Shay, H.; Komarov, S.A.; Fels, S.S.; Meranze, D.; Gruenstein, M. and Siplet, H. (1945). A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterology* 5: 43-61.
- Shrivastava, R.; John, G.W.; Rispat, G.; Chevalier, A.; Massingham, R. (1991). Can the *in vivo* maximum tolerated dose be predicted using *in vitro* techniques – a working hypothesis. *ATLA* 19, 393-402.
- Siddhartha, P.; Nag Chaudhuri, A.K. (1991). Studies on the anti-ulcer activity of a *Bryophyllum pinnatum* leaf extract in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology* 33, 97-102.
- Soll, A.H.; Kurata, J.; Mcguigan, J.E. (1994). Ulcers, Nonsteroidal antiinflammatory drugs, and related matters. *Gastroenterology* 96: 561-8.

- Souza Brito, A.R.M.; Rodriguez, J.A.; Hiruma-Lima, C.A.; Haun, M.; Nunes, D.S. (1998) Antiulcerogenic activity of *trans*-dehydrocrotonin from *Croton cajucara*. *Planta Medica*, 64: 126-129.
- Souza-Formigoni, M.L.O.; Oliveira, M.G.M.; Monteiro, M.G.; Silveira-Filho, N.G.; Braz, S.; Carlini, E.A. (1991) *Journal of Ethnopharmacology* 34: 21-27.
- Stephenson, R.P. (1956) A modification of receptor theory. *Br. J. Pharmacol.*, 11: 379-393.
- Stroff, T.; Lambrecht, N.; Peskar, B.M. (1994). Nitric oxide as mediator of the gastroprotection by cholecystokinin-8 and pentagastrin. *Eur. J. Pharmacol.* 260, R1-R2.
- Sugimoto, Y.; Morimoto, K.; Katsuyama, M.; Tsuboi, K.; Kishi, K.; Kinoshita, Y.; Negishi, M.; Chiba, T.; Narumiya, S.; Ichikawa, A. (1997) Cellular localization of RNAm for the prostaglandin E receptor subtypes in the mouse gastrointestinal tract. *Am.J.Physiol.* (in press).
- Takeuchi, K.; Ueshima, K.; Hironaka, Y.; Fujioka, Y.; Matsumoto, J.; Okabe, S. (1991). Oxygen free radicals and lipid peroxidation in the pathogenesis of gastric mucosal lesions induced by indomethacin in rats. *Digestion* 49, 175-184.
- Takeuchi, K.; Yagi, K.; Kato, S.; Uakawa, H. (1997) *Gastroenterology* 113: 1553-1559.
- Tanaka, K. (1989) High resolution scanning electron microscopy of the cell. *Biol. Cell*, 65: 89-98.
- Tarnawski, A.; Halter, F.; Schmassmann, A.; Vatier, J.; Carner, A. (1992). Experimental models for the assessment of antacid action on gastrointestinal mucosa and ulcer healing. *European Journal Gastroenterology Hepatology* 4, 966-76.
- Tarnawski, A.; Stachura, J.; Krause, W.J.; Douglass, T.G.; Gergely, H. (1991). Quality of gastric ulcer healing - anew emerging concept. *Journal Clin. Gastroenterology* 13:S42-7.
- Tarnawski, A.; Tanoue, K.; Santos, A.M.; Sarfeh, I.J. (1995). Cellular and molecular mechanisms of gastric ulcer healing. Is the quality of mucosal sacr affected by treatment? *Scand. Journal Gastroenterology* 30, suppl. 210: 9-14.
- Tepperman, B.L.; Soper, B.D. (1994) Nitric oxide synthase induction and cytoprotection of rat gastric mucosa injury by ethanol. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 72:1308-1312.
- Van der Berg (1993) *Plantas medicinais da Amazônia – Contribuição ao seu conhecimento sistemático*, Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, p. 223.
- Vane, J.R. (1957) A sensitive method for the assay of 5-hydroxy-tryptamine. *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, 12: 344-349.
- Vane, J.R.; Botting, R.M. (1995). New insights into the mode of action of antiinflammatory drugs. *Inflammation Res.* 44, 1-10.
- Vuyyuru, L.; Schubert, M.L. (1997) Histamine, acting via H₃ Receptors, inhibits somatostatin and stimulates acid secretion in isolated mouse stomach. *Gastroenterology*, 113: 1545-1552.

- Wallace, J.L. (1989) Gastric resistance to acid: is the "mucus-bicarbonate barrier" functionally redundant? *Am. J. Physiol.* *f*; 47256, G31-g38.
- Wallace, J.L.; Arfors, K.E.; McKnight, G.W. (1991) A monoclonal antibody against the CD18 leukocyte adhesion molecule prevents indomethacin-induced gastric damage in the rabbit. *Gastroenterology* 100: 878-883.
- Wallace, J.L.; Granger, N. (1996). The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense *FASEB J.* 10, 731-740.
- Wallace, J.L.; Reuter, B.; Cicala, C.; McKnight, W.; Grisham, M.B.; Cirino, G. (1994) Novel nonsteroidal anti-inflammatory drug derivatives with markedly reduced ulcerogenic properties in the rat. *Gastroenterology* 107: 173-179.
- Walsh, J.H.; Peterson, W.L. (1995) The treatment of *Helicobacter pylori* infection in the management of peptic ulcer disease. *New Engl. J. Med.* 333: 984-991.
- Wang, L.; Gantz, I.; DelValle, J. (1996) Histamine H₂ receptor activates adenylate cyclase and PLC via separate GTP-dependent pathways. *Am. J. Physiol.* 271, G613-620.
- Watanabe, K. (1966). Some pharmacological factors involved in formation and prevention of stress ulcers in rats. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 14, 101-107.
- Weigert, N.; Schaffer, K.; Wegner, U.; Schusdziarra, V.; Classen, M.; Schepp, W. (1994). Functional characterization of muscarinic receptor stimulating gastrin release from rabbit antral G-cells in primary culture. *European Journal of Pharmacology*, 264: 337-344.
- Whittle, B.J.R.; Lopez-Belmonte, J.; Moncada, S. (1990) Regulation of gastric mucosal integrity by endogenous nitric oxide: interactions with prostanoids and sensory neuropeptides in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 99: 607-611.
- Whittle, B.J.R.; Vane, J.R. (1987) Prostanoids as regulators of gastrointestinal function. In: L.R. Johnson, L.R. (Ed.). *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 2nd ed., Raven Press, New York, pp. 143-180.
- Wilkes, J.M.; Kajimura, M.; Scott, D.R.; Hersey, S.J.; Sachs, G. (1991) Muscarinic responses of gastric parietal cells. *J. Memb. Biol.* 122: 97-101.
- Yesilada, E.; Gurbuz, I.; Ergum, E. (1997). Effects of *Cistus laurifolius* L. flowers on gastric and duodenal lesions. *J. Ethnopharmacol.* 55, 201-211.
- Yokotani, K.; Park, J.; DelValle, J.; Yamada, T. (1994) Roles of adrenoceptors in isolated canine parietal cells. *Digestion* 55(3), 148-53.