

,Maira Cola Miranda

**ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA DE
PLANTAS NATIVAS DO CERRADO DO
ESTADO DE SÃO PAULO - PERTENCENTES
AO GÊNERO INDIGOFERA**

Campinas

2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Maira Cola Miranda

**ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA DE
PLANTAS NATIVAS DO CERRADO DO
ESTADO DE SÃO PAULO - PERTENCENTES
AO GÊNERO INDIGOFERA**

**Tese de Doutorado apresentada ao curso de
Pós-Graduação em Farmacologia,
Departamento de Farmacologia,
Universidade Estadual de Campinas-SP**

Orientadora Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M672a Miranda, Maira Cola
Atividade antiulcerogênica de plantas nativas do cerrado do estado de São Paulo – pertencentes ao gênero *indigofera* / Maira Cola
Miranda. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Alba Regina Monteiro Souza Brito
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Indigofera. 2. Plantas Medicinais. 3. Citoproteção. 4. Gastroproteção. I. Brito, Alba Regina Monteiro Souza. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em ingles: “Antiulcerogenic activity of native plants of the São Paulo state savannah pertaining to the genre *Indigofera*”

Keywords: • Indigofera
• Medicinal Plant
• Citoprotection
• Gastroprotection

Titulação: Doutorado em Farmacologia

Banca examinadora: Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Profa. Dra. Eliana Varanda
Profa. Dra. Lourdez Campaner dos Santos
Prof. Dr. Edgard Ferro Collares
Prof. Dr. Miguel Arcanjo Áreas

Data da defesa: 27-11-2006

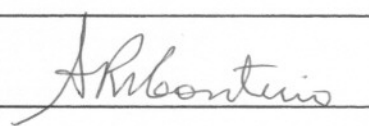
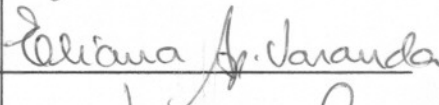
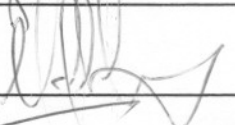
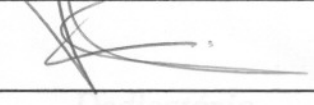


UNICAMP

Banca examinadora Tese de Doutorado

Orientador:

Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Membros:	Assinatura:
Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito	
Profa. Dra. Eliana Varanda	
Profa. Dra. Lourdez Campaner dos Santos	
Prof. Dr. Edgard Ferro Collares	
Prof. Dr. Miguel Arcanjo Áreas	
Prof. Dr. Luiz Cláudio Di Stasi	
Prof. Dr. Edson Antunes	

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

*Este trabalho é dedicado a minha mãe,
que tudo me ensinou. Exemplo
de carinho e amor materno, le amo.*

Data: 27/11/2006

Dedicatória

Esse trabalho é dedicado a minha mãe,
que tudo me ensinou. Exemplo
de carinho e amor materno, te amo.

Agradecimentos

A Deus, que sempre guiou meus passos.

Ao **meu marido**, amor da minha vida, por tudo. Pela iniciativa do meu trabalho, pelos dias maravilhosos em sua convivência, pelo seu bom humor, sorrisos, sonhos e amor. Acredito que com você ao meu lado tudo é possível, te amo.

Aos meus avós (*in memoriam*) adoráveis exemplos de amor e família. **Vovó Carmem**, que nos ensinou tudo o que precisamos para alcançar a felicidade: o amor, a sabedoria e a paciência. **Vovô João**, um querido vozão cheio de mimos, que nos ensinou a rir antes de qualquer coisa.

À minha família que tanto me apóia em minhas decisões. À minha **mãe**, pelo seu jeito de ser que me inspira e dá disposição para continuar a caminhada. Desde pequena através das suas mãos, fui alfabetizada e adquiri as bases do conhecimento. À **tia Zezé**, pelo jeito extrovertido e adorável de ser. Sua alegria e alto astral contagia a todos e nos ensina que o melhor da vida é pra ser vivido agora. Ao meu **tio Vito**, querido e amado paizão, sempre presente em todas as fases da minha vida. À **minha irmãzinha Mi**, querida parceira de vida e ideais, que cada vez vem se tornando uma amiga, a melhor.

Ao meu cunhado Osny pela sua determinação e competência profissional, muitas vezes foi e ainda é um exemplo de vitória a ser seguido para mim.

À minha tia Conce e primos Jota, Gú e Lalinha, pela amizade e carinho.

À família do meu marido, pelo exemplo e incentivo.

À minha orientadora, Profa. Dra. Alba R. M. Souza Brito pela confiança, amizade, companheirismo, compreensão e por me ensinar as bases do conhecimento científico durante esse trabalho.

Prizinha e Willians, amigos com os quais pudemos contar, obrigada pela acolhida e amizade tão solícita. Teremos vocês sempre em nossos corações.

Vitinho, meu amigo, obrigada por tudo, companheiro de todas as horas, experimentos, relatórios, projetos e momentos de descontração, obrigada por me ensinar a ter paciência e tentar fazer tudo quase perfeito. Sua amizade é um bem precioso.

Aos meus queridos amigos e colegas do grupo do laboratório de produtos naturais: Adriana, Ademir, Aninha, Ana Carolina, Anderson, Bia, Cibas, Cinzinha, Cris, Déborah, Deborinha, Demétrio, Dunder, Elis, Erikinha, Fabi, Leônia, Lú Magri, Néia, Paty, Pri, Rangel, Silene, Tatinha, Victor e Vinícius. Obrigada por tudo!

Professora e amiga Clelinha, você foi perfeita e indispensável na execução desse trabalho. Exemplo de profissional e amiga, obrigada! Admiro você por tudo o que faz pelos seus alunos e amigos, as vezes paro e penso...quantos profissionais conheci como a Clelinha?...e a resposta é nenhum! Não conheço ninguém que faz tão bem seu papel quanto você!

Professora Cláudia, sempre solícita e amiga, obrigada pelos jantares, cafés e risadas. Seus ensinamentos com as novas técnicas que aprendi em seu laboratório foram imprescindíveis para o meu trabalho.

Aos alunos do grupo do laboratório de Botucatu, Hélinho, professora Lúcia, Cebóla e Zeila, obrigada.

Ao professor Wagner Vilegas e toda sua excelente equipe.

Tadeu, obrigada pelas longas conversas sempre regadas com bom humor.

Aos professores Dra. Ana Beatriz, Dra. Elen Landucci e Dr. Edson Antunes pelas sugestões na minha qualificação.

Aos animais utilizados nos modelos experimentais.

Aos funcionários do departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia - UNICAMP.

À FAPESP, pelo apoio financeiro para minha formação científica.

Epígrafe

Mas aqueles dentre os mortais, mais animados e interessados, não no uso presente das descobertas já feitas, mas em ir mais além; que estejam preocupados, não com a vitória sobre os adversários por meio de argumentos, mas na vitória sobre a natureza, pela ação; não em emitir opiniões elegantes e prováveis, mas em conhecer a verdade de forma clara e manifesta; esses, como verdadeiros filhos da ciência, que se juntem a nós, para, deixando para trás os vestibulos das ciências, por tantos palmilhados sem resultado, penetrando em seus recônditos domínios.

Francis Bacon

Sumário

Dedicatória.....	vii
Agradecimentos.....	ix
Epígrafe.....	xiii
Sumário.....	xv
Lista de fluxogramas, figuras, ilustrações e tabelas.....	xxi
Lista de abreviaturas.....	xxix
Resumo	xxxiii
Abstract	xxxvii
I. Introdução	41
1. Considerações Gerais.....	41
1.1. Atividade Antiulcerogênica.....	41
1.2. Tratamentos Antiulcerogênicos.....	43
1.3. Secreção ácida.....	44
II. Fatores protetores da mucosa gástrica	48
2. Prostaglandina na gastroproteção.....	48
2.1. Óxido Nítrico na gastroproteção.....	49
2.2. Somatostatina.....	50
2.3. Muco e bicarbonato.....	50
2.4. Fluxo Sangüíneo da Mucosa gástrica.....	51
2.5. Atividade antioxidante.....	52
2.6. Reconstituição do epitélio gástrico.....	52
2.7. Heat shock protein (HSP).....	54
2.8. Proliferação celular.....	55
III. Flavonóides na terapêutica	56
IV. Planta Utilizada	59
V. Objetivos	61
VI. Materiais e métodos	62
6. Coleta das espécies.....	62
6.1. Preparação do extrato e das frações orgânicas.....	62
6.2. Análise cromatográfica das frações e isolamento dos constituintes ativos.....	63

6.3. Determinação da concentração de flavonóides totais.....	65
6.4. Modelos animais utilizados nos ensaios biológicos.....	66
6.5. Drogas utilizadas nos experimentos.....	66
6.6. Procedimentos experimentais.....	66
6.7. Toxicidade aguda.....	68
6.8. Citotoxicidade – Cultura de células.....	69
6.9. Indução de úlcera gástrica por etanol.....	69
6.10. Análise dos parâmetros bioquímicos na ligadura do piloro.....	70
6.11. Determinação de muco aderido à parede gástrica.....	70
6.12. Determinação da prostaglandina (PGE ₂) na citoproteção.....	71
6.13. Determinação do papel do Óxido Nítrico (ON) na citoproteção.....	71
6.14. Determinação do papel do grupamento sulfidril (SH) na citoproteção.....	71
6.15. Úlcera gástrica induzida por isquemia e reperfusão.....	72
6.16. Atividade da glutathione peroxidase.....	72
6.17. Atividade da glutathione redutase.....	72
6.18. Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	73
6.19. Úlcera gástrica induzida por ácido acético.....	73
6.20. Análise histológica.....	73
6.21. Imunohistoquímica.....	74
VII. Análise estatística.....	75
VIII. Resultados.....	76
8. Proporção de metabólitos nas frações.....	76
8.1. Substâncias isoladas da espécie <i>I. truxillensis</i> e <i>I. suffruticosa</i>	76
8.2. Toxicidade Aguda.....	79
8.3. Citotoxicidade – células V79.....	80
8.4. Indução de úlcera gástrica por etanol.....	82
8.5. Parâmetros bioquímicos do suco gástrico após ligadura do piloro.....	83
8.6. Muco gástrico aderido.....	85
8.7. Produção de prostaglandina.....	87
8.8. Óxido nítrico (ON) na citoproteção.....	89
8.9. Grupamentos sulfidril na citoproteção.....	91

8.10. Isquemia e reperfusão.....	93
8.11. Atividade antioxidante.....	95
8.12. Indução de úlcera gástrica por ácido acético.....	96
8.13. Análise histológica.....	97
IX. Discussão.....	106
X. Análise comparativa entre as frações da <i>I. truxillensis</i> e <i>I. suffruticosa</i>.....	119
XI. Conclusões parciais.....	120
11. Conclusão final.....	121
XII. Referência bibliográfica.....	122
XIII. Anexo I.....	140
XIV. Anexo II.....	161

Lista de fluxogramas, figuras, ilustrações e tabelas

Fluxograma 1	Fluxograma representativo da preparação do EMeOH a partir das partes aéreas da <i>I. truxillensis</i>	62
Fluxograma 2	Fluxograma representativo da preparação do EMeOH a partir das partes aéreas da <i>I. suffruticosa</i>	62
Fluxograma 3	Preparação das frações à partir do EMeOH de <i>I. truxillensis</i>	63
Fluxograma 4	Preparação das frações à partir do EMeOH de <i>I. suffruticosa</i>	63
Fluxograma 5	Fluxograma representativo do fracionamento do EMeOH (<i>I. truxillensis</i>).....	64
Fluxograma 6	Fluxograma representativo do fracionamento do EMeOH (<i>I. suffruticosa</i>).....	65
Figura 1	Cálculo da medida da área da lesão ulcerativa.....	68
Figura 2	Substâncias isoladas da <i>I. truxillensis</i>	76
Figura 3	Substâncias isoladas da <i>I. suffruticosa</i>	77
Figura 4	Viabilidade de células V79 após tratamento com fAq (<i>I. truxillensis</i>) por 24 h....	80
Figura 5	Viabilidade de células V79 após tratamento com fAc (<i>I. truxillensis</i>) por 24 h....	81
Figura 6	Viabilidade de células V79 após tratamento com fAc (<i>I. suffruticosa</i>) por 24 h....	81
Figura 7	Efeito da administração oral da carbenoxolona, fAq (a) e fAc (b) obtidas da <i>I. truxillensis</i> no aumento de muco gástrico aderido (Ligação do Azul de Alcian) em ratos submetidos à ligadura do piloro.....	86
Figura 8	Efeito da administração oral da carbenoxolona e fAc obtida da <i>I. suffruticosa</i> no aumento de muco gástrico aderido (Ligação do Azul de Alcian) em ratos submetidos à ligadura do piloro.....	87
Figura 9	Efeito da administração oral da fAq (a) e fAc (b) obtidas da <i>I. truxillensis</i> no aumento da produção de prostaglandina em ratos pré-tratados com indometacina	88
Figura 10	Efeito da administração oral da fAc (b) obtida da <i>I. suffruticosa</i> no aumento da síntese de prostaglandina em ratos pré-tratados com indometacina.....	89
Figura 11	Efeito da administração oral da fAq (a) e fAc (b) obtidas da <i>I. truxillensis</i> no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos pré-tratados com N ^G -nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME).....	90

Figura 12	Efeito da administração oral da fAc obtida da <i>I. suffruticosa</i> no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos pré-tratados com N ^G -nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME)	91
Figura 13	Efeito da administração oral da fAq (a) e fAc (b) obtidas da <i>I. truxillensis</i> no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos pré-tratados com N-etilmaleimida (NEM).....	92
Figura 14	Efeito da administração oral da fAc obtida da <i>I. suffruticosa</i> no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos pré-tratados com N-etilmaleimida (NEM).....	93
Figura 15	Fotomicrografia de estômago de rato (grupo sham). Corte histológico corado com hematoxilina e eosina para análise morfológica da mucosa.....	98
Figura 16	Fotomicrografias de estômago de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com as frações aquosa e acetato de <i>I. truxillensis</i> e acetato de <i>I. suffruticosa</i> . Cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina.....	99
Figura 17	Fotomicrografia de estômago de rato (grupo sham). Corte histológico corado com ácido periódico de Schiff para de secreção de glicoproteína para visualização do muco.....	100
Figura 18	Fotomicrografias de estômago de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com as frações aquosa e acetato de <i>I. truxillensis</i> e acetato de <i>I. suffruticosa</i> . Cortes histológicos corados com ácido periódico de Schiff para de secreção de glicoproteína para visualização do muco.....	101
Figura 19	Fotomicrografia de estômago de rato (grupo sham). Corte histológico submetido a imunolocalização de <i>Heat Shock Protein</i> (HSP) 70 revelado com 3'3 diaminobenzindina (DAB) e peroxidase que promove a cor marrom como resposta positiva de reação.....	102
Figura 20	Fotomicrografias de estômago de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com as frações aquosa e acetato de <i>I. truxillensis</i> e acetato de <i>I. suffruticosa</i> . Cortes histológicos submetidos a imunolocalização de <i>Heat Shock Protein</i> (HSP) 70.....	103

Figura 21	Fotomicrografia de estômago de rato (grupo sham). Corte histológico submetido a imunolocalização de <i>Proliferation cell nuclear antigen</i> (PCNA) revelado com 3'3 diaminobenzindina (DAB) e peroxidase que promove a cor marrom como resposta positiva de reação.....	104
Figura 22	Fotomicrografias de estômago de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com as frações aquosa e acetato de <i>I. truxillensis</i> e acetato de <i>I. suffruticosa</i> . Cortes histológicos submetidos a imunolocalização de <i>Proliferation cell nuclear antigen</i> (PCNA).....	105
Ilustração 1	Regulação neuro-endócrina-parácrina da secreção gástrica de ácido.....	47
Ilustração 2	Estrutura básica dos flavonóides.....	57
Ilustração 3	<i>Indigofera truxillensis</i> Kunth.....	60
Ilustração 4	<i>Indigofera suffruticosa</i> Mill.....	60
Tabela 1	Anticorpos e diluições específicas para as reações imunohistoquímicas.....	74
Tabela 2	Proporção de metabólitos nas frações (fAq e fAc) da <i>I. truxillensis</i> e <i>I. suffruticosa</i>	76
Tabela 3	Avaliação do efeito tóxico agudo pela administração via oral dos extratos metanólicos de <i>I. truxillensis</i> e <i>I. suffruticosa</i> (5000 mg.kg ⁻¹) sobre os parâmetros de peso corporal, peso de órgão e mortalidade.....	79
Tabela 4	Efeito gastroprotetor do lansoprazol e das diferentes doses de fAq e fAc (50, 100 and 200 mg.kg ⁻¹) obtidas da <i>I. truxillensis</i> no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos.....	82
Tabela 5	Efeito gastroprotetor do lansoprazol e das diferentes doses de fAq e fAc (25, 50 e 100 mg.kg ⁻¹) obtidas da <i>I. suffruticosa</i> no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos.....	83
Tabela 6	Efeito da cimetidina, fAq (100 mg.kg ⁻¹) e fAc (50 mg.kg ⁻¹) obtidas da <i>I. truxillensis</i> nos parâmetros bioquímicos do suco gástrico obtidos no modelo de ligadura do piloro via intraduodenal em ratos.....	84
Tabela 7	Efeito da cimetidina e fAc (100 mg.kg ⁻¹) obtida da <i>I. suffruticosa</i> nos parâmetros bioquímicos do suco gástrico obtidos no modelo de ligadura do piloro via intraduodenal em ratos.....	85

Tabela 8	Efeito da administração oral de rutina (200 mg.kg ⁻¹), fAq (100 mg.kg ⁻¹) e fAc (50 mg.kg ⁻¹) obtidas da <i>I. truxillensis</i> no modelo de isquemia e reperfusão em ratos.....	94
Tabela 9	Efeito da administração oral da rutina e fAc obtida da <i>I. suffruticosa</i> , em modelo de indução de úlcera gástrica por isquemia e reperfusão em ratos.....	94
Tabela 10	Mecanismos antioxidantes da atividade antiulcerogênica da fAq e fAc obtidas da <i>I. truxillensis</i> em ratos submetidos a isquemia e reperfusão.....	95
Tabela 11	Mecanismos antioxidantes na atividade antiulcerogênica da fAc obtida da <i>I. suffruticosa</i> em ratos submetidos a isquemia e reperfusão.....	96
Tabela 12	Efeito da administração oral de cimetidina, fAq e fAc obtidas da <i>I. truxillensis</i> , durante 14 dias, no modelo de indução de úlcera gástrica por ácido acético à 30% em ratos.....	96
Tabela 13	Efeito da administração oral de cimetidina e fAc obtida da <i>I. suffruticosa</i> , durante 14 dias, no modelo de indução de úlcera gástrica por ácido acético à 30% em ratos.....	97
Tabela 14	Análise comparativa entre as frações da <i>I. truxillensis</i> e <i>I. suffruticosa</i>	119

Lista de abreviaturas:

- AcOEt = Acetato de Etila
- AGP = Ácidos graxos poliinsaturados
- ALU = Área de Lesão Ulcerativa
- AMPc = Adenosina 3',5' – monofosfato cíclico
- CC = Cromatografia em coluna
- CCD = Cromatografia de camada delgada
- CHCl₃ = Clorofórmio
- COX = Isoenzima cicloxigenase
- CPG = Cromatografia de permeação em gel
- d.p. = Desvio Padrão
- DAINE = Droga Antiinflamatória Não Esteroidal
- DAG = Diacilglicerol
- DMEM = Meio Eagle Modificado por Dulbecco
- ECL = Células enterocromafins like
- EGF = Fator de crescimento epidermal
- EROs = Espécies reativas de oxigênio
- EMeOH = Extrato metanólico
- fAc = Fração acetato
- fAq = Fração aquosa
- FDA = Food and Drug Administration
- FGF = Fator de crescimento do fibroblasto
- G_i = Subunidade inibidora da proteína G
- GPx = Glutathione peroxidase
- G_q = subunidade quiescente da proteína G
- GR = Glutathione reductase
- G_s = Subunidade estimuladora da proteína G
- GSH = Glutathione na forma reduzida
- GSSG = Glutathione na forma oxidada
- H₂O₂ = Peróxido de hidrogênio
- H&E = Corante hematoxilina/eosina
- HGF = Fator de crescimento do hepatócito

- HSP = Heat shock protein
- IBAMA = Instituto brasileiro do meio ambiente e dos recursos naturais renováveis
- IL-1 α = Interleucina 1 α
- IL-1 β = Interleucina 1 β
- ILU = Índice de Lesão Ulcerativa
- IP₃ = Inositol 1,4,5 trifosfato
- I/R = Isquemia-reperfusão
- L-NAME = N^G-nitro-L-arginine methyl-ester
- MeOH = Metanol
- MPLC = Médium Pression Liquid Chromatography
- NEM = N-ethyl-maleimide
- NP/PEG = Reagente produto natural/polietileno glicol
- O₂^{•-} = Ânion superóxido
- OH[•] = Radical hidroxila
- ON = Óxido nítrico
- PAF = Fator de ativação plaquetária
- PAS = Ácido periódico de schiff
- PCNA = Proliferatin cell nuclear antigen
- PDGF = Fator de crescimento derivado de plaquetas
- PG = Prostaglandina
- PKA = Proteína quinase dependente de AMPc
- PLC = Fosfolipase C
- PVPP = Polivinilpolipirrolidona
- RMN = Ressonância magnética nuclear
- RO[•] / ROO[•] = Alcoxil / Peroxil
- SH = Compostos sulfidril
- SOD = Superóxido dismutase
- TGF β = Fator de crescimento transformador
- TGI = Tratogastrointestinal
- TNF α = Fator de necrose tumoral α
- v.o. = Via oral
- VEGF = Fator de crescimento endotelial

Resumo

O gênero *Indigofera* compreende 700 espécies herbáceas e arbustivas, figurando entre os seis maiores gêneros de Leguminosae. Em São Paulo foram descritas 9 espécies do gênero sendo que duas delas, *Indigofera truxillensis* Kunt e *Indigofera suffruticosa* Mill, são popularmente conhecidas como índigo, ocorrendo predominantemente em ambientes de Cerrado do Estado de São Paulo. A *I. truxillensis* é menos estudada do ponto de vista fitoquímico e farmacológico, sendo que a *I. suffruticosa*, possui atividade antiinflamatória, analgésica e digestiva indicadas por comunidades indígenas da América Central. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antiulcerogênica, das frações ricas em flavonóides, das espécies *Indigofera truxillensis* e *Indigofera suffruticosa* investigando os possíveis mecanismos de ação envolvidos com essa atividade. As frações aquosa (fAq) e acetato de etila (fAc) foram preparadas à partir do extrato metanólico (EMeOH) de ambas as espécies. O EMeOH das espécies foi utilizado para o ensaio de toxicidade aguda em camundongos. As frações fAq e fAc da *I. truxillensis* foram utilizadas nas doses de 50, 100 e 200 mg.kg⁻¹; já as frações fAq e fAc da *I. suffruticosa*, com um rendimento menor, foram utilizadas nas doses de 25, 50 e 100 mg.kg⁻¹, respectivamente. Ambas foram administradas pela via oral, em ratos. Para testar as frações das *Indigoferas* os modelos experimentais utilizados foram: úlcera gástrica induzida agudamente por etanol; estudo da atividade antissecretora através da ligadura do piloro; avaliação de mecanismos protetores da mucosa gástrica como a produção de muco, prostaglandina E₂ (PGE₂), envolvimento do óxido nítrico (ON) e compostos sulfidrilas (SH) na gastroproteção; avaliação da atividade antioxidante através do modelo de úlcera gástrica induzida por isquemia e reperfusão e atividade de algumas das principais enzimas envolvidas no processo como, superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR); e avaliar a atividade na cicatrização de úlcera gástrica através do modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético (subcrônico) com posterior análise histológica para produção de muco e ensaios de imunohistoquímica para Heat Shock Protein (HSP 70) e Proliferação celular (PCNA). Os extratos das espécies estudadas demonstraram ausência de toxicidade (*in vivo*). A fAq e fAc da *I. truxillensis* e fAc da *I. suffruticosa* reduziram significativamente as lesões gástricas; a fAq da *I. suffruticosa* não apresentou atividade antiulcerogênica. Não ocorreu alteração no pH do suco gástrico, indicando que as frações das

espécies estudadas não promovem atividade antissecretora. Nos mecanismos envolvendo proteção, a fAq da *I. truxillensis* protege a mucosa gástrica através do aumento de muco; envolvimento de ON e SH; aumento da atividade das enzimas SOD e GR; e expressão de HSP 70 e PCNA auxiliando no processo de cicatrização. Já a fAc da mesma espécie protege a mucosa gástrica através do aumento de muco e envolvimento de SH; aumento da atividade das enzimas SOD, GPx e GR; redução significativa na área da lesão na úlcera subcrônica. Nos mecanismos envolvendo proteção, a fAc da *I. suffruticosa* protege a mucosa gástrica através do aumento de muco; envolvimento de SH; aumento da atividade das enzimas GR; redução significativa na área da lesão na úlcera subcrônica e expressão de HSP 70 e PCNA auxiliando no processo de cicatrização. Uma triagem fitoquímica preliminar indicou a presença de flavonóides e alcalóides como um dos componentes majoritários na *I. truxillensis* e na *I. suffruticosa*. Através da análise dos resultados podemos concluir que a atividade gastroprotetora das espécies estudadas pode ser atribuída à presença de substâncias como os flavonóides, conhecidas por apresentarem atividade antiulcerogênica, antiinflamatória e antioxidante.

Abstract

The genus *Indigofera*, which includes 700 herbaceous and bush species, is one of the six largest Leguminosae genres. In São Paulo State, Brazil, nine species of this genre were already described. *Indigofera truxillensis* Kunt and *Indigofera suffruticosa* Mill, commonly known as “índigo”, are found predominately at São Paulo State’s savannah. There are just a few studies on *I. truxillensis* pharmacology and phytochemistry, whereas *I. suffruticosa* presents anti-inflammatory, analgesic and digestive proprieties, cited by many Indian communities at Central America. The objective of this work is to evaluate the antiulcerogenic activity of *I. suffruticosa* and *I. truxillensis* fractions, which are rich in flavonoids, and also to investigate the possible action mechanisms involved in this activity. The aqueous (fAq) and ethyl acetate (fAc) fractions were obtained from methanol extract (EMeOH) from both species. The EMeOH was used in the acute toxicity study in mice. The *I. truxillensis* fAq and fAc were used at doses 50, 100 and 200 mg.kg⁻¹, and the *I. suffruticosa* fAq and fAc were used at doses 25, 50 and 100 mg.kg⁻¹. Both of them were administrated p.o., in male Wistar rats. In order to test the fractions, the experimental models used were the following: a) Gastric ulcer induced by ethanol; b) Antisecretory activity study through pylorus ligation; c) Evaluation of the protective mechanisms of gastric mucosal such as mucus production, prostaglandin E₂ (PGE₂), nitric oxide evolution, and sulphydryl compounds (SH) in gastroprotection; d) Evaluation of antioxidant activity using gastric ulcer induced by ischemic and reperfusion, and some of the most important enzymes involved in the process, such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR); e) Evaluate the gastric ulcer healing activity using the model of gastric ulcer induced by acid acetic, with subsequent histological analysis to mucus production and immunohistochemistry assay to Heat Shock Protein (HSP 70) and Cell Proliferation (PCNA). The crude extracts of both species demonstrated the absence of *in vivo* toxicity. The *I. truxillensis* fAq and fAc and the *I. suffruticosa* fAc reduced significantly the gastric lesions. The *I. suffruticosa* fAq did not present any antiulcerogenic activity. The gastric juice pH did not modify, which indicates no antisecretory activity for the fractions. *I. truxillensis* (fAq) protected the gastric mucosa

through the increase of mucus; involvement of nitric oxide and SH; increase in the enzymes SOD and GR activity; expression of HSP 70 and PCNA in healing process. *I. truxillensis* (fAc) protected the gastric mucosa through the increase of mucus; involvement of SH; increase in the enzymes SOD, GPx and GR activity; significant reduction on subchronic ulcer lesion area. *I. suffruticosa* (fAc) protected the gastric mucosa through the increase of mucus; involvement of SH; increase in the enzyme GR activity; significant reduction on subchronic ulcer lesion area; expression of HSP 70 and PCNA in healing process. A preliminary phytochemistry selection and chromatographic analyses indicate the presence of flavonoids as majority compounds in *I. truxillensis*, and flavonoids and alkaloids in *I. suffruticosa*. From the analysis of the results it can be concluded that the gastroprotective activity of the studied species can be attributed to the presence of flavonoids, well known to present antiulcerogenic, anti-inflammatory and antioxidant activities.

I. Introdução

1. Considerações Gerais

A pesquisa envolvendo plantas medicinais é complexa e apresenta um caráter multidisciplinar, principalmente quando o objetivo é encontrar substâncias ativas úteis para a terapêutica. Nessas pesquisas, a experiência indica que a seleção da espécie a ser estudada deve considerar a indicação popular de uso medicinal e o trabalho conjunto de uma equipe para identificar a espécie, isolar e determinar as substâncias ativas, além de profissionais que executem ensaios farmacológicos (Souza Brito, 1996; Souza Brito e Nunes, 1997).

Este trabalho é desenvolvido de acordo com a filosofia de multidisciplinaridade. O grupo de pesquisadores é composto por profissionais com amplos conhecimentos e experiência nas áreas de etnobotânica, fitoquímica, química de síntese, farmacologia e toxicologia.

1.1. Atividade Antiulcerogênica

Ao se decidir pelo trabalho aplicado a uma classe terapêutica em particular, é necessária a análise da sua incidência de morbidade na população, considerando-se o binômio: importância em saúde pública e mercado para a substância potencialmente útil (McIntosh et al., 1991; Petersen et al., 1995). As drogas antiulcerogênicas são tão importantes do ponto de vista de utilização quanto do mercadológico.

O mercado brasileiro de fitomedicamentos atingiu, em 2001, cerca de US\$ 270 milhões correspondendo a 5.9 % do mercado brasileiro de medicamentos, maior, portanto, que a comercialização dos medicamentos genéricos que foi de R\$ 226 milhões (5% do mercado global brasileiro). Em consequência do crescimento do mercado mundial dos fitomedicamentos, as maiores indústrias farmacêuticas multinacionais (muitas delas norte-americanas), passaram a se interessar por esse mercado, até então formado predominantemente por pequenas empresas européias e asiáticas (Calixto, 2003).

As úlceras gástrica e duodenal afetam um número considerável de pessoas no mundo. Estresse, cigarro, deficiência nutricional e ingestão de antiinflamatórios não esteroidais aumentam a incidência dessas úlceras (Belaiche et al., 2002). Os gastos financeiros anuais no tratamento da úlcera péptica, só nos Estados Unidos, estão estimados em 3.4 bilhões de dólares, incluindo custos diretos e indiretos (Sandler et al., 2002). Uma vez que a úlcera

péptica é uma patologia comum espera-se que seu impacto na economia e saúde humana permanecerá importante no futuro.

A razão do surgimento das úlceras pépticas não é bem compreendida. Acredita-se existir um desbalanço no equilíbrio entre os mecanismos lesivos da mucosa - a secreção e ação do ácido e da pepsina, e os mecanismos protetores da mucosa - secreção e ação de muco e bicarbonato (Brozowski, 2003).

A úlcera, baseada em sua fisiopatologia, tem sido objeto de intensa pesquisa nas últimas décadas. Aproximadamente 10% da população mundial é vítima dessa patologia independentemente do sexo ou classe social (Berstad e Berstad, 1993). Esta doença traz custos tremendos à sociedade e torna a vida do paciente extremamente difícil, além de ser letal em muitos casos (McIntosh et al., 1991; Petersen et al., 1995).

A úlcera gástrica está associada a fatores agressores endógenos (ácido, pepsina e bile) e a fatores exógenos predisponentes relacionados a condições de vida (estresse, fumo, álcool, uso contínuo de drogas antiinflamatórias não esteroidais - DAINES), ingestão de determinados alimentos, presença da *Helicobacter pylori* e predisposição genética (Hirschowitz et al., 1995; Bruton, 1996; Wolfe e Sanchs, 2000; Wallace e Miller, 2000).

Hoje, a grande maioria das pesquisas científicas envolvendo úlceras pépticas direciona-se principalmente para o estudo de *H. pylori* ou aponta esta infecção bacteriana e as DAINES como os maiores responsáveis pela incidência desta moléstia (Watanabe e Chiba, 2002). *H. pylori* está presente em quase 50% da população mundial e as DAINES são as drogas de maior uso; porém, nem todos os indivíduos infectados pela bactéria ou que se utilizam de drogas antiinflamatórias manifestam gastrites ou desenvolvem úlceras pépticas (Go, 1997; Bauer e Marker-Hermann, 2003; Peura, 2004).

Verificou-se também que o fenômeno das migrações populacionais, o crescente aumento da participação da mulher no mercado de trabalho (Kang et al., 2006) e o estresse a ele associado interferem aumentando a incidência da úlcera (Petersen et al., 1995) e que existe uma correlação importante entre o aumento de idade e a incidência de úlcera (Yuhong et al., 2006).

1.2. Tratamentos Antiulcerogênicos

As soluções terapêuticas, durante séculos, foram sempre a de neutralizar o conteúdo gástrico de ácido clorídrico utilizando antiácidos, dieta alimentar ou cirurgia. Tal panorama só foi modificado no início dos anos 70 onde os receptores de histamina H_2 foram definidos através da utilização de antagonistas seletivos como a cimetidina e ranitidina (Black et al., 1972; Yuhong, et al., 2006). Essas drogas causaram um grande impacto mundial, o que levou Kurata (1983) a escrever um artigo na Science intitulado “What in the world is happening to ulcers?”. O artigo descreve essa modificação no panorama do tratamento de úlcera péptica, com uma diminuição expressiva no número de cirurgias.

Alguns tempo depois, foram desenvolvidas drogas citoprotetoras, como o misoprostol, um análogo da PGE_1 , e extensas revisões sobre elas têm sido feitas. A prostaglandina no estômago inibe a secreção ácida, enquanto estimula a secreção de muco e bicarbonato (Hawkey, 2000).

Outras drogas gastroprotetoras foram introduzidas como os inibidores da bomba protônica ou H^+ , K^+ ATPase, responsável pela secreção ácida gástrica. A substância padrão foi o omeprazol, que é capaz de inibir a secreção ácida por inativação da bomba através da formação de ligações dissulfeto entre as moléculas reagentes do omeprazol com a enzima (Lindberg et al., 1987; Sachs et al., 1988; Olbe et al., 2003). Na mesma época foi descrita a ação da pirenzepina, um anticolinérgico muscarínico M_1 seletivo, que também contribuiu para o tratamento da úlcera péptica nesta década (Texter e Reilly, 1982).

Assim, o tratamento das dispepsias até o final da década de 80 se limitou ao uso individual ou em associações de antiácidos, anticolinérgicos M_1 , anti-histamínicos H_2 , citoprotetores e inibidores da bomba protônica. Além disso, novos usos para velhas drogas foram encontrados; os compostos de bismuto (Baron et al., 1986; D'Souza e Dhume, 1991) e a carbenoxolona, obtida a partir de um extrato da *Glycyrriza glabra* o alcaçuz (Barrowman e Pfeiffer, 1982; Sato et al., 2004), fazem parte desse grupo.

Não há ainda uma droga que produza 100% de remissão das úlceras gastroduodenais (Alper, 1993). Existem, só no Brasil, centenas de milhares de casos envolvendo esse tipo de morbidade, o que significa um problema de saúde pública importante e nos leva a crer que estudar substâncias com potencial atividade antiulcerogênica é vital.

A terapêutica moderna, composta por medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não teria sido possível sem a contribuição dos produtos naturais, notadamente das plantas superiores, das toxinas animais e dos microrganismos (Calixto, 2003). Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais. Somente no período entre 1983-1994, das 520 novas drogas aprovadas pela agência americana de controle de medicamentos e alimentos (FDA), 220 (39%) foram desenvolvidas a partir de produtos naturais (Cragg et al., 1997; Shu, 1998).

Dados da literatura mostram que há uma grande variedade de substâncias químicas isoladas de plantas que apresentam experimentalmente atividade antiulcerogênica (Lewis e Hanson, 1991). Além disso, no Brasil estão presentes 100 mil das 250 mil espécies vegetais do planeta, distribuídas em sete biomas bem definidos. Dentre estes biomas está o Cerrado, o segundo maior bioma brasileiro em área e em número de espécies, menor apenas que a Floresta Amazônica. Segundo o IBAMA, o Cerrado brasileiro possui cerca de 56 mil espécies vegetais, a maior diversidade do mundo encontrada em savanas. Ele compreende uma extensa área do território nacional, principalmente no Brasil Central, estando também presente em estados do Sudeste, Norte e Nordeste. Em São Paulo temos alguns remanescentes desse bioma e áreas de transição para a Mata Atlântica (ecótonos) que embora fortemente agredidos, são de sensível importância ao equilíbrio do ecossistema regional.

Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade (Calixto, 2003).

1.3. Secreção ácida

O processo de secreção ácida gástrica consiste em três etapas. São elas: fase cefálica, fase gástrica e fase intestinal (Chavez et al., 1996). O cheiro, gosto, o ato de mastigar e deglutir o alimento são exemplos de estímulos que compõem a fase cefálica (Collares-Buzato e Arana, 2005); dois outros importantes estímulos compõem a fase gástrica; são elas a distensão do estômago pelo bolo alimentar e a presença de peptídeos e aminoácidos (Lloyd e Debas, 1994). A secreção ácida durante essa fase perfaz grande parte (pelo menos 50%) da secreção

total em resposta à ingestão de alimento. Finalmente, sinais provenientes do trato intestinal (fase intestinal) também estimulam a secreção ácida, contribuindo com pequena porcentagem (aproximadamente 5%) da resposta total da secreção ácida após uma refeição (Johnson, 1997).

De 1900 a 1925 foram desvendados os principais eventos envolvidos com a estimulação da secreção ácida. A gastrina, um hormônio liberado a partir do antro (Edkins, 1906), a acetilcolina liberada a partir do nervo vago e a histamina liberada das células enterocromafins (ECL), são as substâncias que essencialmente medeiam a secreção ácida pela célula oxíntica ou parietal, um dos diversos tipos de células presentes nas glândulas gástricas. 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. 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 (Hakanson et al., 1986).

Embora o potencial eletroquímico, que culmina com a secreção ácida seja conhecido os mecanismos moleculares e suas origens ainda são pouco claros. 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.

Algumas vias de sinalização intracelular têm sido identificadas como importantes contribuintes na ativação da célula parietal, incluindo proteína quinase A (PKA), proteína quinase C (PKC), calmodulina- Ca^{2+} (CaM), fosfatidil-inositol (IP3), e várias outras quinases (Yao, 2003).

A ativação do receptor da gastrina (CCK2-R) induz a ativação da fosfolipase C que induz à quebra do fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato (PIP2) levando a formação de dois segundos mensageiros, trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG). IP3 induz a liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, os quais também podem entrar no citoplasma celular por canais de íons da membrana, e DAG ativa a PKC. O cálcio e PKC desencadeiam outras ações intracelulares, propagando o sinal inicial em diferentes células alvos (Yassin et al., 1999).

O receptor de somatostatina SST_2 é acoplado a proteína G_i , que inibe a via acoplada ao G_s , e em algumas células, tais como as ECL, podem também inibir vias acopladas ao G_q . A

inibição da via de sinalização na célula ECL que depende da G_q , explica o efeito do receptor SST_2 no bloqueio da estimulação da secreção ácida pela gastrina (Athmann et al., 2000).

Experimentos *in vivo* sugerem que a gastrina e a acetilcolina estimulam a célula ECL, a liberar histamina. ECL tem um “único maquinário” para controlar a síntese e a estocagem de histamina sob diferentes condições fisiológicas. A ativação de seus receptores causa influxo de cálcio seguido por liberação da histamina estocada (Prinz et al., 2003). Há um consenso de que a histamina, a principal via estimulatória da cascata secretora de ácido gástrico, estimula receptores H_2 para ativar proteínas G_s , acopladas a adenilato ciclase, levando à produção de PKA dependente de AMPc (Yokotani et al., 1994).

A introdução de antagonista histaminérgico 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; pode-se afirmar que a liberação de histamina é o maior evento regulatório na estimulação da secreção ácida (Aihara et al., 2003)

A utilização de antagonistas seletivos e competitivos para receptores H_2 , como a cimetidina, ranitidina e lafutidina, novo antagonista de longa duração, resultou na supressão efetiva da secreção ácida em algumas doenças relacionadas à acidez. Antagonistas de receptores H_2 exercem efeitos considerados na secreção ácida gástrica mais rapidamente que inibidores da bomba de próton (Fukushima et al., 2003). 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 (Hirschowitz et al., 1995).

Devido à eficácia de antagonistas do receptor H_2 , o receptor muscarínico tem sido pouco estudado em relação à secreção ácida gástrica. O receptor muscarínico é conhecido por estar envolvido na regulação da contração do músculo liso em vários órgãos incluindo o trato gastrointestinal (Eglen et al., 2001).

Receptores muscarínicos do tecido gástrico estão acoplados ao sistema de segundo mensageiro trifosfato de inositol (IP_3) estimulatório e aumento da secreção de íons de hidrogênio (H^+), pepsinogênio e muco (Seidler et al., 1991). 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 são capazes de abolir a secreção ácida tão eficazmente quanto o antagonista H_2 (Hirschowitz et al., 1969).

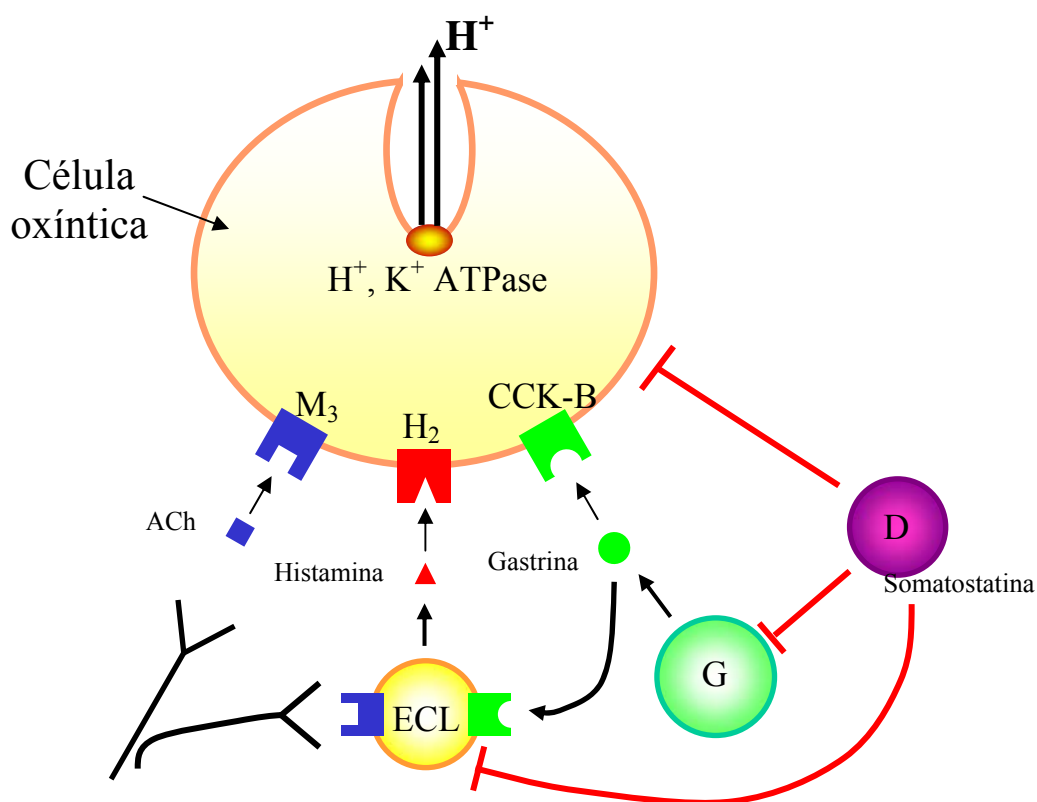


Ilustração 1: Regulação neuro-endócrina-parácrina da secreção gástrica de ácido.

ACh: Acetilcolina; ECL: Células semelhantes às enterocromafins; G: Célula G; D: Célula D; Sst: Somatostatina; (Ativação: — e inibição: —). (Adaptado de COLLARES-BUZATO e ARANA, 2005, Ed: Manole).

II. Fatores protetores da mucosa gástrica

2. Prostaglandina na gastroproteção

As prostaglandinas (PGs) estão envolvidas em uma série de processos fisiológicos no estômago, incluindo secreção de ácido, produção de muco e fluxo sanguíneo na mucosa gástrica (Robert e Ruwart, 1982).

Prostaglandinas endógenas são geradas a partir do ácido aracdônico. Três isoenzimas de ciclooxigenases (COX), COX-1 (Vane, 1994), COX-2 (Xie et al., 1991) e, recentemente, COX-3 (Chandrasekharan et al., 2002) têm sido descritas como catalisadores da conversão do ácido aracdônico para a prostaglandina endoperóxido H_2 (PGH_2), a reação chave para biossíntese das prostaglandinas, PGD_2 , PGI_2 , $PGF_{2\alpha}$ e TX_2 (Peleg et al., 2002). COX-1 é expressa, de modo constitutivo, em muitos tecidos (O'Neil e Ford-Hutchinson, 1993). Por outro lado, níveis de COX-2 são usualmente baixos ou não-detectados em condições basais (Kargman et al., 1996), mas aumentam rapidamente sobre influências de estímulos pró-inflamatórios ou mitogênicos (Kujubu et al., 1991). COX-3 é expressa no cortex cerebral de cães e em baixas quantidades em outros tecidos. Em humanos, a COX-3 também é expressa no córtex cerebral e no coração (Chandrasekharan et al., 2002). PGs modulam o fluxo sanguíneo e a secreção de muco devido a expressão da isoforma constitutiva da COX-1. Por outro lado, a PG que tem sua produção induzida durante o processo da inflamação é derivada COX-2 (Xie, 1992).

Foi estabelecido que a supressão da síntese de PG no estômago, através da inibição da COX, é o componente chave para o mecanismo básico da ulceração no TGI associado ao uso de DAINÉ (Vane, 1971).

O efeito biológico dos produtos da COX, PGs, é mediado por receptores de membranas específicos, denominados receptores EP (EP_1 , EP_2 , EP_3 e EP_4), que são acoplados a proteínas-G de membrana, ligadas a diferentes vias de transdução de sinal intracelular (Sugimoto et al., 2000). Ligantes de PGE_2 a receptores EP_1 , resultam na liberação intracelular de IP_3 e DAG, ligantes de EP_2 e EP_4 , ativam o sistema adenil-ciclase –AMPc e ligantes EP_3 inibem o esse sistema (Pawlik et al., 2002).

PG exerce sua gastroproteção, por aumentar a secreção de muco e bicarbonato, manter o fluxo sanguíneo da mucosa, e aumentar a resistência de células epiteliais contra danos causados por citotoxinas (Hawkey e Rampton, 1985).

Um dos mecanismos pelo qual a PG pode causar diminuição da resposta inflamatória e danos na mucosa é através da modulação da atividade de imunócitos na mucosa. PGE₂ é um potente supressor do fator de necrose tumoral (TNF- α) (Kunkel et al., 1986) liberado por macrófagos, além de reduzir a expressão do gene para TNF- α nas células (Kunkel et al., 1988); entretanto, Hogaboan et al (1993) demonstraram que PGE₂ inibiu de modo dose dependente a liberação de fator de agregação plaquetária (PAF), histamina e TNF- α de células na mucosa intestinal. PGs também regulam a liberação de outras citocinas como IL-1 dos macrófagos (Kunkel et al., 1986), e reduzem a liberação do leucotrieno LTB₄ dos neutrófilos (Ham, 1983).

A demonstração de que baixas concentrações de prostaglandina, do subtipo E₂, inibem a secreção ácida criou uma grande expectativa de que esses compostos possuiriam atividade antiúlcera.

2.1. Óxido Nítrico na gastroproteção

O óxido nítrico (ON) tem um importante papel na modulação da defesa da mucosa gástrica, como: regulador na secreção de muco (Brown et al., 1993), vasodilatador produzindo aumento de fluxo sanguíneo local (Wallace e Miller, 2000), inibidor da agregação de neutrófilo (Barnick et al., 1997) e auxiliar no processo de cicatrização da úlcera gástrica (Jadeski e Lala, 1999).

O óxido nítrico exerce amplo espectro de atividades biológicas *in vivo*, dependentes, em parte, da guanosina-3', 5'-monofosfato cíclica (cGMP) produzida após o ON estimular a enzima guanilato ciclase solúvel (Moncada et al., 1991). Nas células musculares lisas essa estimulação resulta em relaxamento. O ON pode atuar também diretamente em canais de potássio, dependentes de cálcio, levando a uma hiperpolarização dependente do endotélio nos vasos, resultando em vasodilatação (Bolotina et al., 1994).

As quatro vias enzimáticas produtoras de óxido nítrico são: NO-sintase neuronal, (NOS_n), endotelial (NOS_e), constitutiva (NOS_c) e induzida (NOS_i), que tem sido caracterizada no trato gastrointestinal. A NOS_i, produz grande quantidade de ON causando

danos e, portanto, a inibição específica dessa enzima é benéfica. A NOSc mantém a barreira da mucosa intacta (Kubes et al., 2000).

No TGI, a forma constitutiva é encontrada no endotélio (eNOS) e neurônio entérico (nNOS). Estímulos apropriados, tais como respostas inflamatórias, fazem com que a iNOS possa ser detectada (Kristjánsson et al, 2005).

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

2.2. Somatostatina

O principal efeito fisiológico da somatostatina no sistema digestivo é a inibição da secreção ácida gástrica. A somatostatina pode inibir o peristaltismo do estômago, intestino, vesícula biliar e proliferação de células da mucosa; reduzir o fluxo sanguíneo no TGI, absorção de água, eletrólito, glicose, aminoácido e triglicerídeo no intestino delgado, deprime secreção de ácido gástrico, pepsina, bili hepática e secreção de gastrina e outros hormônios gastrointestinais (Sun et al., 2002).

O efeito inibitório da somatostatina é preferencialmente devido ao bloqueio da liberação de histamina do que à inibição direta da célula parietal (Komasaka et al., 2002).

A ação da somatostatina em receptores SST₂, os quais estão localizados predominantes em células ECL, levam à inibição da liberação de histamina induzida por gastrina, à redução da liberação de cálcio intracelular. Esse mecanismo é provavelmente responsável pelo efeito inibitório da somatostatina na secreção ácida (Prinz et al., 1994; Komasaka et al., 2002).

2.3. Muco e bicarbonato

A mucosa gástrica produz fatores degradantes como: ácido gástrico e enzimas proteolíticas. Para manter a integridade da mucosa, um sistema de defesa efetivo é necessário. A primeira linha de defesa contra o ácido é a barreira do muco que vem sendo investigada por vários grupos de estudo (Phillipson et al., 2002).

O epitélio gástrico é recoberto por uma contínua camada de muco gástrico o qual adere na superfície da mucosa. Esse muco aderido juntamente com o bicarbonato secretado pelo epitélio, serve como uma barreira contra a autodigestão causada pelo ácido e pepsina (Allen e Flemstrom, 2005).

O muco é um importante fator protetor para a mucosa gástrica, o qual se apresenta de forma viscosa, elástica e aderente na forma de um gel transparente composto por 95% de água e 5% de glicoproteína, que recobre a superfície da mucosa gastrointestinal. O muco é capaz de agir como antioxidante e pode reduzir danos da mucosa promovidos por radicais livres (Repetto et al., 2002). O muco gástrico possui atividade antioxidante, protegendo a mucosa gástrica, devido às glicoproteínas, sendo que os açúcares são potentes seqüestradores de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Mojzis et al., 2000).

A secreção do muco gástrico é controlada por vários fatores em diferentes vias. Prostaglandinas (PGE_2) e secretina, as quais são inibidoras da secreção ácida, estimulam a secreção de muco (Tani et al., 1997). Geralmente o muco gástrico é secretado por duas ou três vias: uma delas envolveria receptor, enquanto outras duas seriam por expulsão apical e possível esfoliação. Nos receptores que medeiam a secreção de muco muitas substâncias fisiologicamente ativas, incluindo neurotransmissores, autacóides e hormônios são conhecidas como secretagogos (Fortner e Fortner, 1994).

2.4. Fluxo Sangüíneo da Mucosa gástrica

Um dos papéis do fluxo sanguíneo na mucosa é suprir de oxigênio, nutrientes e hormônios a mucosa gástrica, além de participar na regulação da saída do ácido, produção de muco, secreção de bicarbonato e remoção dos produtos incluindo a retrodifusão de íons hidrogênio; assim, o fluxo sanguíneo contribui substancialmente para a manutenção fisiológica da integridade da mucosa.

A redução do fluxo sanguíneo está envolvida na patofisiologia das lesões da mucosa gástrica causadas por stress, etanol e DAINES (Kawano et al., 2000).

A microcirculação é importante para a defesa da mucosa e é modulada pelo sistema nervoso e por mediadores inflamatórios. Difusão de ácido ou toxina na mucosa resulta em elevação crítica do fluxo sanguíneo mediada por neurônio sensorial aferente, limitando danos

e facilitando a reparação. O sangue dilui e/ou neutraliza o ácido/toxina e previne o acúmulo de altas concentrações na mucosa (Wallace et al., 2001).

2.5. Atividade antioxidante

EROs estão envolvidas em vários eventos patológicos incluindo úlceras e inflamação gastrointestinal (Yoshida et al., 1995).

EROs gerados pelo metabolismo do ácido aracdônico, macrófagos e neutrófilos, podem contribuir para danos causados na mucosa gástrica (Rosen et al., 1995). Os sequestradores de EROs são utilizados para proteger a mucosa gástrica do dano oxidativo e acelerar a cicatrização de úlceras.

EROs estão envolvidas nos mecanismos de reações inflamatórias ou atuam como segundos mensageiros para manter diversas funções celulares (Blake et al., 1995). Assim, o equilíbrio entre a formação e a remoção das EROs no organismo deve ser regulado de forma que as reações e processos metabólicos dependentes das mesmas possam ocorrer em um nível adequado para a manutenção da fisiologia das células (Halliwell e Gutteridge, 1991).

O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, inclusive podendo resultar na morte celular (Gutteridge, 1993).

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

2.6. Reconstituição do epitélio gástrico

O estômago possui várias formas de se proteger quando exposto continuamente a altas concentrações de ácido; uma das estruturas mais importantes é o epitélio gástrico. Ele é frequentemente renovado, sendo as células “velhas” 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 (Wallace e Granger, 1996).

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 (Paimela et al., 1995).

A cicatrização na mucosa na úlcera gástrica requer reconstituição da estrutura glandular epitelial (re-epitelização), restauração da lâmina própria incluindo uma rede microvascular na mucosa, nervos e células de tecidos conectivos (Milani e Calabro, 2001).

A cicatrização das úlceras é acompanhada de um aumento do fluxo sanguíneo gástrico na área da úlcera e por um significativo aumento de gastrina plasmática e citocinas pró-inflamatórias como $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$. Com o progresso da cicatrização da úlcera ocorre o declínio gradual do fluxo sanguíneo, da gastrina plasmática e das citocinas pró-inflamatórias. Foi encontrado que a hipergastrinemia, que ocorre durante o período anterior à cicatrização da úlcera, pode ser atribuída à supressão da acidez gástrica e expressão de fatores de crescimento os quais controlam a proliferação celular e também exibem atividade antissecretora (Brozowski et al., 2001).

A mucosa gástrica, situada na margem da úlcera, forma a “zona de cicatrização”; as glândulas dessa região começam a dilatar e as células de revestimento dessas glândulas sofrem diferenciação; ocorre ainda ativação do fator de crescimento epidermal (EGF) e a proliferação celular é assim ativada. Esse processo é iniciado após três dias da implantação da úlcera e é essencial para cicatrização. O maior estímulo para a divisão, migração, proliferação celular e re-epitelização da úlcera é dado por fatores de crescimento (fator de crescimento epidermal-(EGF), fator de crescimento endotelial-(VEGF), fator de crescimento do fibroblasto-(FGF), fator de crescimento do hepatócito-(HGF), fator de crescimento derivado de plaquetas-(PDGF), fator de crescimento transformador-($\text{TGF}\beta$), entre outros (Vanwijck, 2001). Esses fatores produzidos localmente ativam proliferação e migração celular epitelial via autócrina e/ou parácrina. A re-epitelização é um processo essencial porque a barreira epitelial protege continuamente a mucosa contra danos mecânicos e químicos.

Esses fatores de crescimento promovem a proliferação e migração de células epiteliais para a cratera da úlcera, levando à re-epitelização dessa cratera e maturação das glândulas. Na base da úlcera ocorre granulação de tecido sofrendo contínua remodelação. A angiogênese (formação de microvasos) facilita a remodelação do tecido por liberar oxigênio e nutrientes. Células inflamatórias são substituídas por fibroblastos e microvasos na fase final da cicatrização (Chan et al., 2001). Assim a angiogênese é importante para o reparo tanto de dano agudo da mucosa quanto crônico durante a cicatrização de úlcera gastroduodenal. VEGF e FGF são fortes fatores angiogênicos em células endoteliais vascular (Malara et al., 2005).

2.7. Heat shock protein (HSP)

Nos últimos 20 anos o estudo das doenças relacionadas à úlcera péptica, gástrica e duodenal tem aumentado significativamente devido à identificação de várias técnicas, as quais têm possibilitado o estudo mais detalhado da mucosa gástrica (Brozowski, 2003).

HSP 70 é um membro da família de HSPs encontrado em células de mamíferos (núcleo e citosol) com peso molecular de aproximadamente 70 kDa; sua produção é induzida em resposta ao estresse (Shichijo et al., 2003). O aumento da expressão de HSP 70 é demonstrado em lesões patológicas como, por exemplo, arteriosclerose (Berberian et al., 1990), estresse oxidativo (Hightower e White, 1982), doença neurodegenerativa (Hamos et al., 1991), infecção viral e doença auto-imune (Young e Elliot, 1989).

Foi proposto que HSP 70 contribui para proteção da mucosa gastrointestinal contra agentes nocivos (Tsukimi e Okabe, 2001). O aumento da expressão da HSP 70 está ainda envolvido com a aceleração na cicatrização de úlceras gástricas (Okabe e Amagase, 2005).

HSP também contribui consideravelmente para a citoproteção adaptativa na mucosa gastrointestinal, em especial a HSP 70, que atua com fatores integrais do mecanismo de defesa da mucosa gastrointestinal. A expressão de HSP 70, induzida por drogas anti-úlcera, confere proteção contra a úlcera gástrica. Entretanto, os mecanismos responsáveis por esta proteção não são conhecidos. Acredita-se que esta proteção ocorra através de um aumento do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica (Shichijo et al., 2003). O acúmulo de HSPs induzido fisiologicamente, farmacologicamente, geneticamente ou por administração direta das proteínas protege o organismo de uma série de condições patológicas, entre elas a úlcera gástrica (Tytell e Hooper, 2001). A família de proteínas HSP 70 reduz a desnaturação e

agregação induzidas por diferentes formas de estresse de proteínas intracelulares. Sugere-se que elas exerçam seu efeito citoprotetor através de proteção da mitocôndria e interferência no programa de apoptose induzido pelo estresse. A indução de úlceras é uma situação de estresse para as células. Logo, as drogas indutoras da produção de HSP 70 devem ter efeito benéfico para a prevenção e tratamento de úlceras (Rokutan, 2000).

2.8. Proliferação celular

O antígeno de proliferação celular (PCNA) é um polipeptídeo nuclear de 36kDa que tem sido amplamente estudado nas mais diversas patologias e está associado ao ciclo celular atuando como co-fator para a DNA polimerase delta (Bravo et al., 1987; Prelich et al., 1990; Nanji e Tahan, 1996). O PCNA é essencial para a síntese de DNA e, conseqüentemente, é considerado um agente intimamente associado à replicação celular; sua distribuição no ciclo celular aumenta a partir da fase G1, atingindo o pico máximo em S, diminuindo a partir da fase G2, e passando a exibir níveis tão baixos na fase M e em células quiescentes, que não é identificado por métodos imunohistoquímicos (Huang et al., 1994; Martinez-Lara et al., 1996).

O processo de cicatrização de úlcera em humanos ou em modelos experimentais é um processo complexo onde ocorre reconstituição da estrutura epitelial e do tecido conjuntivo através da proliferação, migração e diferenciação celular (Beckert et al., 2004). Após a implantação da úlcera gástrica a reconstituição da superfície do epitélio gástrico é feita através da proliferação e diferenciação celular.

III. Flavonóides na terapêutica

Flavonóides são produtos naturais amplamente distribuídos no reino vegetal e rotineiramente consumidos na dieta diária. São complexos polifenólicos derivados do metabolismo secundário das plantas e, geralmente, produzidos pela planta em situações de estresse físico, químico ou em resposta ao estresse causado por microorganismos e herbívoros. Os flavonóides oferecem proteção contra radiação ultravioleta proveniente da luz solar e estabilizam membranas celulares durante épocas de seca. Estes compostos polifenólicos são também capazes de quelar metais tóxicos e de reduzir alguns agentes oxidantes lesivos durante alterações químicas e físicas relacionadas às variações do meio (Di Carlo et al., 1999; Harbone e Willians, 2000).

Os flavonóides são pigmentos de plantas que são sintetizados a partir da fenilalanina; geralmente desenvolvem as cores admiráveis das pétalas e das flores; na maioria das vezes emitem fluorescência brilhante quando excitados por luz UV e são ubíquos em células de plantas verdes, o que leva à suposição de que eles podem participar do processo fotossintético (Mukuhata et al., 1978; Havsteen, 2002).

Do ponto de vista químico, flavonóides são derivados benzopirônicos, com baixo peso molecular, constituído de três anéis fenólicos (A, B e C), ou anéis de pirano, referidos como A, B e C (Figura 1). São classificados de acordo com sua estrutura química e agrupados levando-se em consideração o grau de saturação e os diferentes radicais que podem se associar aos anéis da estrutura (Harbone e Willians, 2000). As maiores subclasses de flavonóides incluem flavonóis, flavonas, flavononas, catequinas (ou flavonol), antocianidinas, isoflavonas, dihidroflavonas e chalconas. Muitos flavonóides ocorrem naturalmente como flavonóides glicosilados, ou seja, apresentam açúcares simples ou complexos como substituintes nos A, B e C; dentre eles destacam-se glicose, raminose, glucoramnose, galactose e arabinose. Flavonóides podem ser encontrados na forma de aglicona, ou seja, sem açúcares ligados aos A, B e C (Cook e Samman, 1996; Di Carlo et al., 1999).

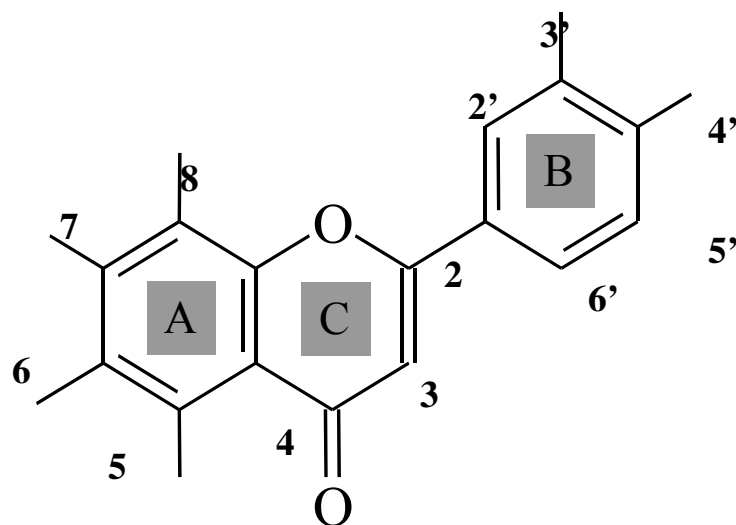


Ilustração 2: Estrutura básica dos flavonóides

As propriedades bioquímicas dos flavonóides dependem da posição das duplas ligações, glicosilações, número, espécie e disposição dos radicais nos anéis fenólicos. A maior parte dos estudos envolvendo flavonóides se concentra em suas propriedades bioquímicas e fisiológicas relacionadas ao potencial antioxidante na proteção dos sistemas biológicos durante estresse oxidativo. A proteção oferecida por estas substâncias contra o ataque oxidativo induzido por radicais livres está relacionada às diferenças em suas estruturas químicas (Van Acker et al., 1998; Di Carlo et al., 1999; Harbone e Williams, 2000).

Certos flavonóides ou compostos com propriedades semelhantes a flavonóides tem apresentado atividade antiulcerogênica e previnem lesões na mucosa gástrica produzidas por vários métodos de indução de úlcera. Entre os inúmeros flavonóides já estudados, alguns são descritos como capazes de exercer atividade antiulcerogênica; entre eles destacam-se a rutina, naringina, quercetina, kaempferol, sofaradina e luteolina (Lewis, 1992; Di Carlo et al., 1999; Harbone e Williams, 2000; Borrelli e Izzo, 2000). Estudos fitoquímicos revelaram que flavonas C-glicosilados, derivadas da luteolina e da apigenina, são os compostos majoritários no infuso das partes aéreas da *Turnera ulmifolia*; estas substâncias seriam responsáveis pela atividade antiúlcera desta espécie (Gracioso et al., 2002).

Outro mecanismo de ação dos flavonóides é produzir alteração do sistema antioxidante biológico natural em diversos pontos. Eles só são capazes de agir aumentando a atividade de enzimas antioxidantes como SOD, GPx e GR, quelando íons ferro e cobre, inibindo a reação de Fenton; catalisando o transporte de elétrons em reações de oxi-redução, e seqüestrando EROs e radicais lipídicos (Knight, 1995; Jaeschke, 1995; Di Carlo et al., 1999; Harbone e Williams, 2000).

Um flavonóide com alto poder antioxidante *in vitro*, a quercetina, também é efetivo em inibir o aparecimento das lesões ulcerativas em roedores. No entanto, para este composto foi postulado que os efeitos citoprotetores sobre a mucosa gástrica acontecem através de um complexo mecanismo envolvendo, de um lado, a estimulação da síntese de prostaglandinas citoprotetoras e aumento na produção do muco protetor, e de outro, a inibição da formação de leucotrienos nesta mucosa. As propriedades antioxidantes da quercetina foram sugeridas como auxiliar no mecanismo de inibição das lesões ulcerativas (Alarcon de La Lastra et al., 1994).

Em muitos países há várias plantas gastroprotetoras com diferentes compostos utilizados na medicina popular, devido aos seus efeitos benéficos sobre o TGI. Na China e Japão, extratos de polifenóis como o extrato de Sophoradin, rico em flavonóides, e seu derivado sintético conhecido como Solon são amplamente empregados na terapia de úlcera péptica, principalmente por inibir o metabolismo das prostaglandinas inflamatórias e leucotrienos (Kyogoku et al., 1979).

Konturek et al (1986) demonstraram que meciadanol, um flavonóide sintético, similar a catequina, indibe a histidina-descarboxilase diminuindo assim a concentração de histamina no estômago. Isso pode levar a redução das lesões na mucosa gástrica causadas por etanol absoluto.

Estudos recentes mostram que diferentes substâncias encontradas em plantas auxiliam e aceleram a cicatrização de úlceras; elas podem também possuir ação antiinflamatória por inibir a cascata neutrófilo/citocinas no TGI (Alarcon de La Lastra et al., 1995) e auxiliar na cicatrização através de aumento na expressão de vários fatores de crescimento, exibindo também atividades antioxidante (Kim et al., 2004), sequestradora de EROs (Pastrada-Bonilla et al., 2003), anti-necrótica e anti-carcinogênica (Bagchi et al., 2002).

IV. Planta Utilizada

O gênero *Indigofera*, descrito por Linnaeus (1753), compreende 700 espécies herbáceas e arbustivas, figurando entre os seis maiores gêneros de *Leguminosae* (Moreira e Azevedo - Tozzi, 1997). Bentham (1859) publicou um estudo do gênero reconhecendo 11 espécies no Brasil. Em São Paulo foram descritas 9 espécies do gênero sendo que seis delas ocorrem amplamente dispersas em todo o Estado, distribuem-se em direção ao Norte e Nordeste do país e a maioria atinge o México (Moreira e Azevedo-Tozzi, 1997). As espécies *Indigofera truxillensis* Kunt e *Indigofera suffruticosa* Mill são morfologicamente parecidas, o que gera dificuldades na identificação pela população e pelos próprios especialistas botânicos. Essas espécies, conhecidas popularmente como índigo, ocorrem predominantemente em ambientes de Cerrado do Estado de São Paulo. Por apresentarem características de fácil adaptação ambiental podem ser encontradas no Cerrado de Rubião Júnior, próximo ao Campus da Universidade Estadual Paulista (UNESP) em Botucatu, São Paulo, onde inclusive foram coletadas.

A *Indigofera truxillensis* Kunth é ainda menos estudada do ponto de vista fitoquímico e farmacológico. Ela está distribuída no Estado de São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul. Arbusto ou subarbusto ereto, ramificado, até 1,5m de altura, indumento composto por tricomas bifurcados, folha 11-17-foliolada, pecíolos presentes, folíolos opostos; legumes retos, cilíndricos, glabros ou com esparsos tricomas, com 5 a 9 sementes. O hábito arbustivo e as folhas com folíolos numerosos são as características que distinguem *I. truxillensis* das demais espécies do gênero, com exceção de *I. suffruticosa*, da qual se diferencia pela presença de frutos e por apresentar folíolos com tricomas nas duas faces (Moreira e Azevedo-Tozzi, 1997).

A *Indigofera suffruticosa* é a espécie mais amplamente distribuída do gênero, podendo ser encontrada praticamente em todo o Estado de São Paulo e está catalogada como uma planta invasora de cultivos (Aranha et al., 1982). A planta apresenta-se como arbusto ou subarbusto ereto e ramificado de até 2,5m de altura. Indumento composto por tricomas bifurcados e retos, folhas 11-19-folioladas, pecíolos presentes, folíolos opostos e legume acentuadamente curvo, cilíndrico com 3 a 7 sementes.

Essa espécie apresenta indicação terapêutica como antiespasmódico e para o tratamento de epilepsia crônica (Martinez, 1933). Comunidades indígenas da América Central também utilizavam essa espécie para tratamento de úlceras (Martinez, 1933; Standley, 1922), atividade antiinflamatória, analgésica e digestiva (Roig, 1988) e pelas medicinas oriental e africana , bem como atividade citotóxica (Neto et al., 2001). Há, no entanto, pouco conhecimento fitoquímico e farmacológico sobre a espécie, o que foi um estímulo adicional para a investigação dessa espécie.



Ilustração 3: Partes aéreas da *Indigofera truxillensis* kunth



Ilustração 4: Partes aéreas da *Indigofera suffruticosa* Mill

V. Objetivos

- 1) Analisar a atividade antiulcerogênica dos extratos e frações semipurificadas de *Indigofera truxillensis* e *Indigofera suffruticosa* em modelos experimentais de úlcera induzida por diferentes agentes em ratos;
- 2) Investigar, em modelos experimentais diversos, os mecanismos de ação envolvidos com a atividade antiulcerogênica detectada.

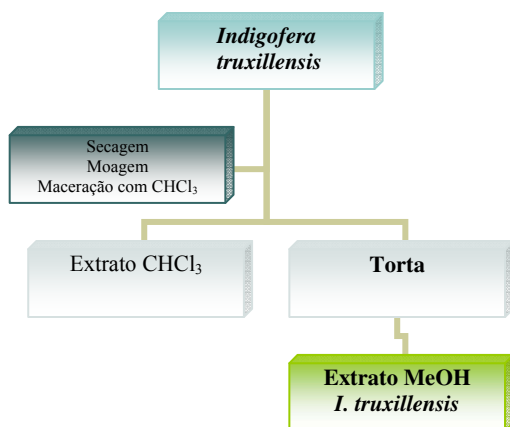
VI. Materiais e métodos

6. Coleta das espécies

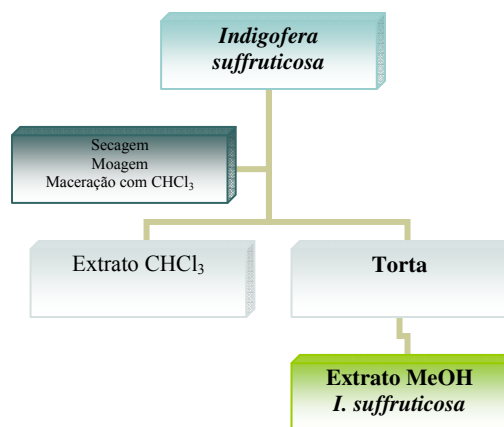
As partes aéreas da *I. truxillensis* e *I. suffruticosa* foram coletadas no Cerrado de Rubião Júnior, próximo ao Campus da Universidade Estadual Paulista (UNESP) em Botucatu, São Paulo. A identificação botânica ficou a cargo do Prof. Jorge Tamashiro do Instituto de Biologia, Departamento de Botânica da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP e as exsiccatas depositadas no Herbário da UNICAMP sob os números UEC: 131.827 (*I. truxillensis*) e UEC 129558 (*I. suffruticosa*).

6.1. Preparação do extrato e das frações orgânicas

Partes aéreas da *I. truxillensis* e *I. suffruticosa* foram secas (7 dias a 40 °C) e pulverizadas. O pó foi exaustivamente extraído com os solventes clorofórmico e metanólico (3 vezes, 72 horas para cada solvente). Os solventes foram concentrados em rotavapor fornecendo o extrato CHCl₃ (43 g, 3.0%) e extrato MeOH (110 g, 7.3%). Os ensaios foram realizados pela aluna de Doutorado Tâmara Regina Calvo no Departamento de Química, Laboratório de Química Orgânica na UNESP-Araraquara, com a orientação do Prof. Dr. Wagner Vilegas.

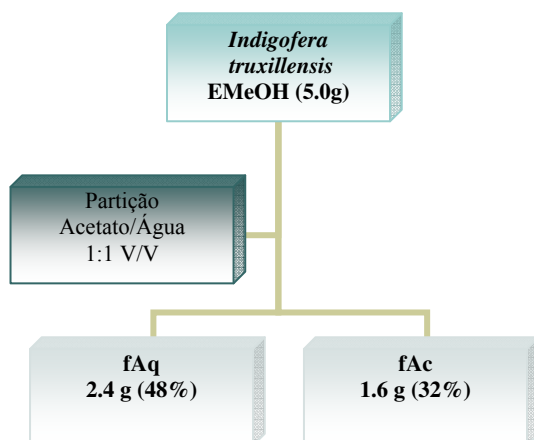


Fluxograma 1: Preparação do EMeOH a partir das partes aéreas da *I. truxillensis*.

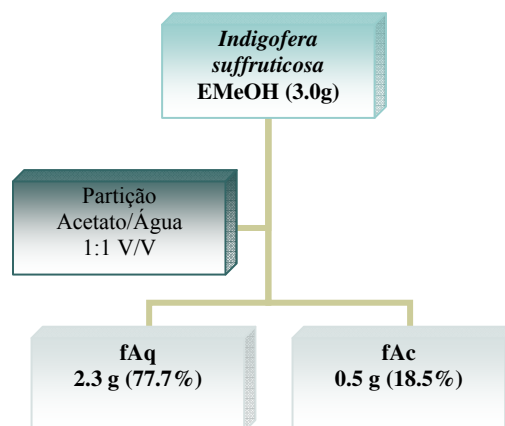


Fluxograma 2: Preparação do EMeOH a partir das partes aéreas da *I. suffruticosa*.

Uma porção (5.0 g) do extrato MeOH foi particionado com uma mistura de acetato de etila e água (1:1, v/v). O rendimento da *I. truxillensis* fração acetato de etila (fAc) e da fração aquosa (fAq) foi de (32%) e (48%), respectivamente. Para a espécie *I. suffruticosa* uma porção (3.0 g) do extrato foi particionado com uma mistura de acetato e água (1:1, v/v). O rendimento da *I. suffruticosa* fração acetato de etila (fAc) e da fração aquosa (fAq) foi de (18.5%) e (77.7%), respectivamente.



Fluxograma 3: Preparação das frações a partir do EMeOH da *I. truxillensis*.

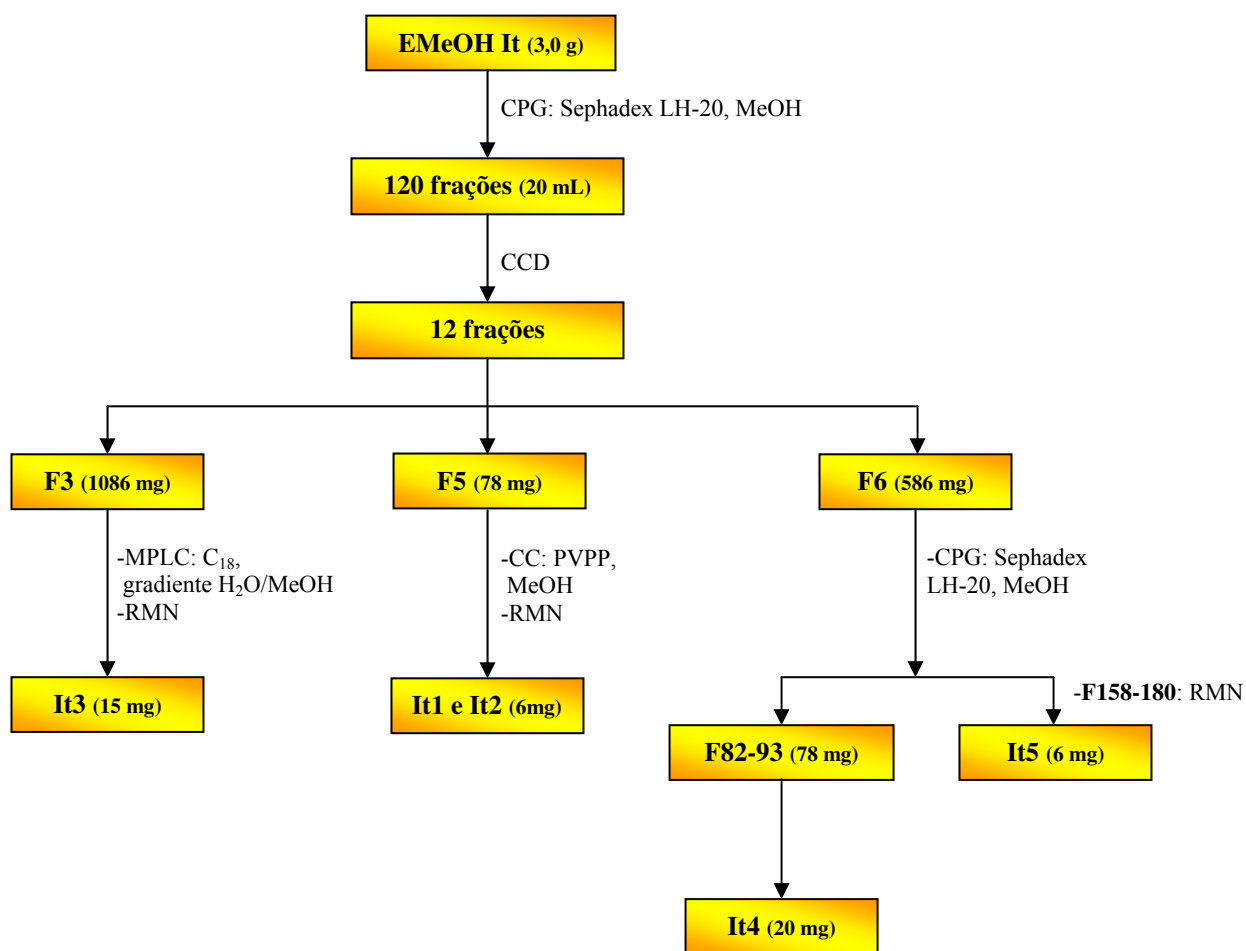


Fluxograma 4: Preparação das frações a partir do EMeOH da *I. suffruticosa*.

6.2. Análise cromatográfica das frações e isolamento dos constituintes ativos

Para a obtenção das frações ricas em flavonóides, o EMeOH de *I. truxillensis* foi fracionado por cromatografia de permeação em gel (CPG) em sephadex LH-20. Foram obtidas 120 frações (20 mL), as quais foram reunidas em 12 grupos após análises por cromatografia de camada delgada (CCD). A fração **F3** (~1,0 g) foi purificada por cromatografia líquida de média pressão (MPLC) empacotada com C18, as frações resultantes não foram avaliadas no período. Da purificação de **F5** (78 mg) por cromatografia em coluna (CC) em polivinilpolipirrolidona (PVPP) foi obtido o flavonóide **It2** (6 mg) (Fluxograma 5).

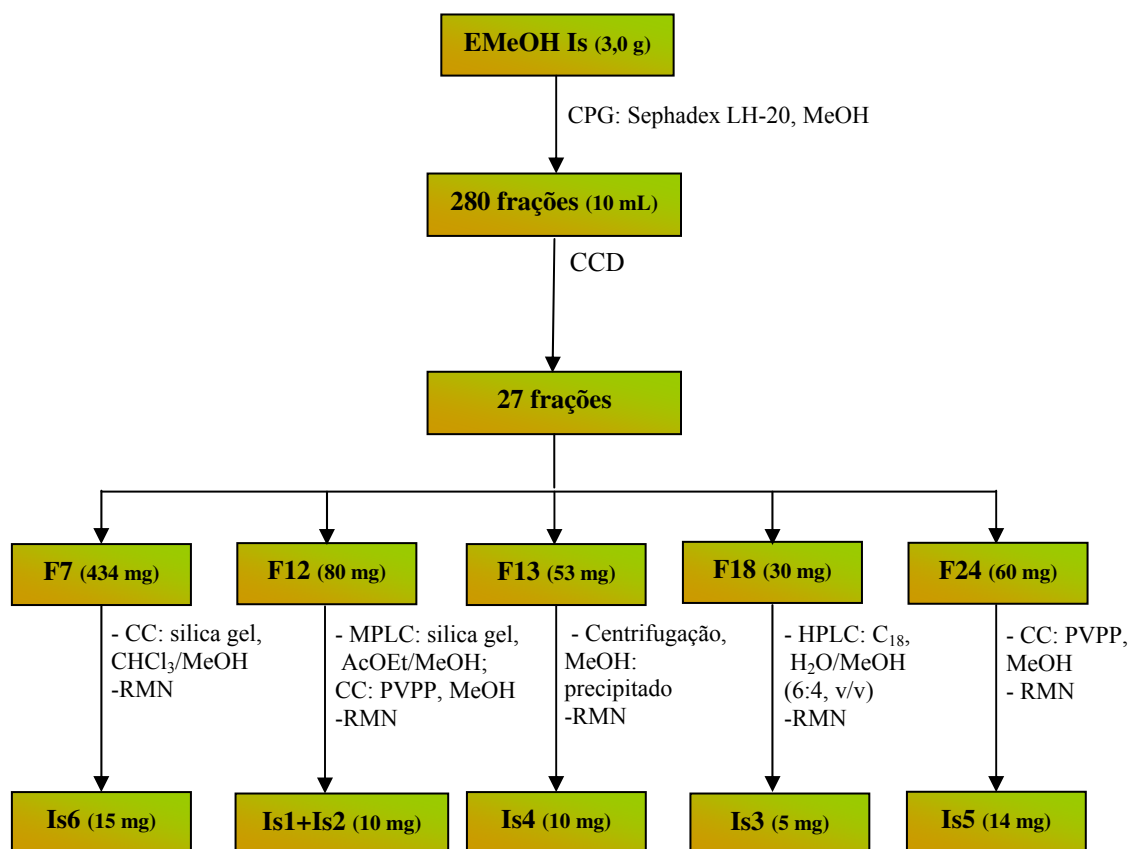
A triagem cromatográfica, utilizando reveladores específicos, da *I. truxillensis* indicou a presença de compostos fenólicos, saponinas e terpenos, sendo os flavonóides glicosilados e alcalóides os componentes majoritários. As classes de metabólitos secundários detectadas foram semelhantes no EMeOH e na porções AcOEt e água, mas com substâncias de Rf's diferentes: mais polares na porção aquosa e menos polares na porção AcOEt, segundo método de (Wagner et al., 1986).



Fluxograma 5: Fluxograma representativo do fracionamento do EMeOH (*I. truxillensis*).

Em comparação com *I. truxillensis*, *I. suffruticosa* (Fluxograma 6) apresentou maior quantidade de manchas nas placas quando reveladas com reagente de Dragendorff e Iodoplatinato, indicando que certamente possui alcalóides (estes reveladores não foram conclusivos para as análises de *I. truxillensis*). No entanto, aparentemente, as placas de *I. suffruticosa* reveladas com (NP/PEG) sugerem a presença de menor número de flavonóides do que em *I. truxillensis*.

Os ensaios por (CCD) com reveladores específicos somente fornecem indícios das classes de metabólitos existentes, sendo resultados qualitativos e preliminares.



Fluxograma 6: Fluxograma representativo do fracionamento do EMeOH (*I. suffruticosa*).

6.3. Determinação da concentração de flavonóides totais

Na fração aquosa e acetato de etila em ambas as espécies a concentração de flavonóides totais foi determinada da seguinte maneira: 0.1 ml de cada fração foi diluído em etanol a 80% (0.9 ml). Uma alíquota de 0.5 ml foi adicionada em tubos testes contendo 0.1 ml de nitrato de alumínio a 10%, 0.1 ml de acetato de potássio 1M e 4,3 ml de etanol a 80%. Após 40 min a temperatura ambiente a absorbância foi determinada por espectrofotometria a 450 nm. A concentração de flavonóides total foi calculada usando quercetina como padrão (Moreno et al., 2000).

6.4. Modelos animais utilizados nos ensaios biológicos

Para avaliação da atividade antiulcerogênica e elucidação do mecanismo de ação das amostras obtidas das espécies de *I. truxillensis* e *I. suffruticosa*, foram utilizados camundongos machos Swiss, pesando entre 25 a 35 g e ratos machos Wistar, pesando entre 180-250 g, todos provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB). Os animais foram aclimatados às condições do biotério local, por cerca de 15 dias antes dos ensaios experimentais, sob temperatura de $(23 \pm 2^{\circ}\text{C})$ e ciclos claro escuro controlados de 12 h. Os animais foram alimentados com ração Nuvital (Nuvilab) água *ad libitum* à vontade e distribuídos, ao acaso, nos diferentes grupos experimentais. Os períodos de jejum a que foram submetidos os animais estão de acordo com o preconizado para cada uma das metodologias empregadas. Os protocolos experimentais dos testes utilizados nesse trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNICAMP (Protocolo nº616-2). Todos os experimentos foram iniciados no período da manhã.

6.5. Drogas utilizadas nos experimentos

As drogas utilizadas para determinação da atividade antiulcerogênica e mecanismo de ação foram: carbenoxolona (SIGMA Chemical Co, St. Louis, USA), cimetidina (SIGMA Chemical Co, St. Louis, USA), lansoprazol (MEDLEY, Campinas, Brasil), indometacina (SIGMA Chemical Co, St. Louis, USA), N^G-nitro-L-arginine methyl-ester (L-NAME) (SIGMA Chemical Co, St. Louis, USA), N-ethyl-maleimide (NEM) (SIGMA Chemical Co, St. Louis, USA), ácido acético P.A. (CHEMCO, Campinas, Brasil) e ácido clorídrico P. A. (CHEMCO, Campinas, Brasil), cloreto de sódio P.A. (CHEMCO, Campinas, Brasil), Tween 80[®] (SYNTH, Diadema, Brasil).

Todas as drogas foram preparadas imediatamente antes do uso.

6.6. Procedimentos experimentais

No estudo de toxicidade das espécies *I. truxillensis* e *I. suffruticosa* foi utilizado o experimento de toxicidade aguda com os extratos metanólico de ambas as espécies.

Foi realizado um fracionamento das espécies *I. truxillensis* e *I. suffruticosa* com objetivo de semi-purificar as frações, o modelo escolhido para elucidar a atividade

antiulcerogênica e encontrar a dose mais efetiva foi o modelo de úlcera gástrica induzida por etanol.

Para avaliar os possíveis mecanismos de ação envolvidos na gastroproteção das espécies estudadas foram determinados: análise dos parâmetros bioquímicos (medida do pH e volume gástrico); produção de muco gástrico; produção de prostaglandina (PGE_2); envolvimento do ON e compostos sulfidril na gastroproteção; estudo de mecanismos antioxidantes como a úlcera induzida por isquemia e reperfusão, o aumento da atividade da (SOD), (GPx) e (GR); envolvimento no processo de cicatrização de úlcera através do modelo de úlcera induzida por ácido acético e expressão de proteínas envolvidas com cicatrização como (HSP 70) e (PCNA).

O extrato e as frações foram administrados em diferentes doses, por via oral, com exceção do modelo de ligadura do piloro onde a administração foi via intraduodenal.

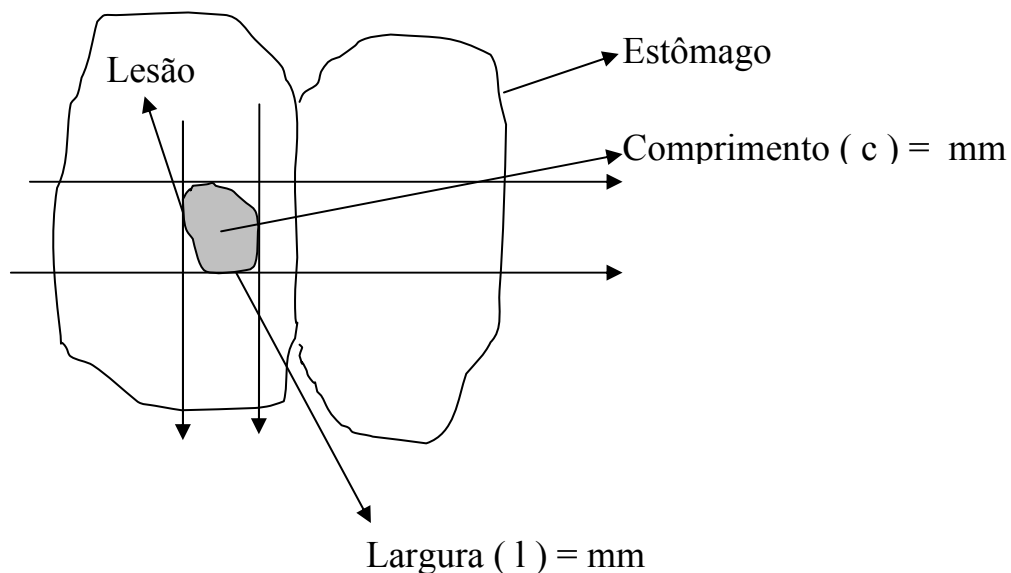
Para cada um dos modelos experimentais foram utilizados animais controles positivos (tratados com cimetidina, lansoprazol ou carbenoxolona) e controles negativos (Tween 80[®] 12% ou solução de NaCl 0,9%).

Nos experimentos de indução de úlcera gástrica, as lesões ulcerativas foram contadas e classificadas de acordo com a severidade proposta por Szelenyl e Thiemer (1978), lesão de nível 1 (pontos hemorrágicos < 1mm), nível 2 (úlceras de 2 mm de extensão), e nível 3 (úlceras profundas com 3 mm de extensão). Para cada grupo de tratamento foi calculado um índice de lesão ulcerativa (ILU), obtido através da equação:

$$ILU = \Sigma (\text{lesões de nível 1}) + (\text{lesões de nível 2x2}) + (\text{lesões de nível 3x3})$$

Nos experimentos envolvendo Isquemia e Reperfusão e Úlcera Induzida por Ácido Acético foi utilizado a medida da área da lesão ulcerativa (ALU):

Figura 1: Cálculo da medida da área da lesão ulcerativa



O efeito das frações sobre as lesões foi calculado pela fórmula:

$$\text{Área da Lesão Ulcerativa} = (c) \cdot (l) = \text{mm}^2$$

$$(\%) \text{ da taxa de cura} = \frac{(\text{ALU}) C - (\text{ALU}) T}{(\text{ALU}) C} \times 100$$

Onde: C = ALU dos animais do grupo controle e; T = ALU dos animais dos grupos tratados com as frações.

6.7. Toxicidade aguda

No experimento de toxicidade aguda foi realizado uma estimativa e preliminar das propriedades tóxicas da substância teste segundo Souza Brito (1994). Camundongos machos Swiss foram separados em grupos e tratados por via oral da seguinte forma: 1) salina 1 ml.kg⁻¹, 2) extrato metanólico - *I. truxillensis* 5000 mg.kg⁻¹, 3) extrato metanólico - *I. suffruticosa* 5000 mg.kg⁻¹. Após os tratamentos os animais foram observados durante 14 dias, no 14º dia os

animais foram sacrificados e os órgãos (coração, fígado, rins, pulmão) removidos para pesagem.

6.8. Citotoxicidade – Cultura de células V79

As células utilizadas nos experimentos foram do tipo fibroblástico, da linhagem estabelecida em cultura V79 clone M-8, oriunda do pulmão de Hamster Chinês (*Cricetulus griseus*). Os fibroblastos foram mantidos em cultura contínua em garrafas para cultura de 25 cm² (TPP, Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland) através de repiques periódicos até atingirem a densidade de confluência. O cultivo foi realizado em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Nutricell), 100 UI/mL de penicilina, e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina (Nutricell). A incubação foi realizada em estufa a 37°C sob atmosfera úmida e contendo 5% de CO₂ (Melo et al., 2000).

Nos diferentes ensaios de citotoxicidade que avaliaram a viabilidade celular, o plaqueamento foi realizado utilizando-se placas de 96 cavidades (Iwaki, Asahi Techono Glass, Co., Funabasi, Japan), plaqueando-se 3x10⁴ células/mL em cada cavidade (100 µL/cavidade) seguido de incubação a 37°C por 48 horas. Após a incubação as culturas foram expostas ao meio DMEM suplementado contendo diferentes concentrações das frações aquosa e acetato da *I. truxillensis* e acetato da *I. suffruticosa*. Após 24 horas de tratamento, as culturas foram processadas de acordo com os protocolos específicos dos testes para determinação da incorporação do vermelho neutro (2-amino-3-metil-7-dimetil-amino-cloreto de fenazina) (Borenfreund e Puerner, 1984) e redução do MTT [brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazólico)] (Denizot e Lang, 1986).

6.9. Indução de úlcera gástrica por etanol

Ratos machos Wistar foram tratados (v.o.), após 24 h de jejum, com as frações estudadas (*I. truxillensis* - fAq e fAc nas doses de 50, 100 e 200 mg.kg⁻¹ e *I. suffruticosa* – fAq e fAc nas doses de 25, 50 e 100 mg.kg⁻¹) e os controles: 30 mg.kg⁻¹ de lansoprazol (controle positivo), salina ou Tween 80[®] 12% (controle negativo), uma hora antes da indução da lesão gástrica pela administração, também por via oral, de 1 ml de etanol absoluto. Após 1 h da indução os animais foram sacrificados e os estômagos retirados. As lesões foram avaliadas e o índice de lesão ulcerativa foi calculado (Morimoto et al., 1991).

6.10. Análise dos parâmetros bioquímicos na ligadura do piloro

A metodologia utilizada foi descrita por Shay (1945) com algumas modificações. Após 24 horas de jejum os animais (ratos machos Wistar), sob anestesia (ketamina - 30 mg.kg⁻¹ /xilazina - 0,3 mg.kg⁻¹), sofreram uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide para a localização e amarradura de piloro. As administrações das frações (*I. truxillensis* - fAq 100 mg.kg⁻¹ e fAc 50 mg.kg⁻¹ e *I. suffruticosa* – fAc 100 mg.kg⁻¹) cimetidina 100 mg.kg⁻¹ (controle positivo) e salina ou Tween 80[®] 12% (controle negativo) foram realizadas logo após a amarradura, por via intraduodenal, e as incisões foram suturadas. Quatro horas após a cirurgia os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a incisão reaberta; após ligadura da cárdia (para preservação do conteúdo gástrico), o estômago foi retirado. O conteúdo gástrico foi coletado e, em seguida, foram determinados volume gástrico e pH da secreção gástrica com pHmêtro (modelo Q 400A Quimis Aparelhos Científico Ltda – Brasil).

6.11. Determinação de muco aderido à parede gástrica

Os animais (ratos machos Wistar) permaneceram em jejum por 24 horas. Foi administrado por via oral os seguintes grupos: salina ou Tween 80[®] 12%, carbenoxolona 200 mg.kg⁻¹ e frações estudadas (*I. truxillensis* - fAq 100 mg.kg⁻¹ e fAc 50 mg.kg⁻¹ e *I. suffruticosa* – fAc 100 mg.kg⁻¹). Os animais após anestesia (ketamina - 30 mg.kg⁻¹ /xilazina - 0,3 mg.kg⁻¹) sofreram uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide para a localização e amarradura do piloro por via oral. Quatro horas após a cirurgia os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a incisão reaberta, o estômago foi retirado, a porção glandular do estômago foi separada, pesada e imersa por 2 horas em 10 mL de solução de Alcian blue de acordo com a metodologia descrita por Rafatullah et al. (1990). O excesso de alcian blue foi removido lavando-se o estômago por duas vezes sucessivas com 7 mL de solução de sacarose 0,25 mol/L; a primeira por 15 minutos e a segunda por 45 minutos. O corante complexado ao muco aderido à parede gástrica foi extraído com 10 mL de cloreto de magnésio 0,5 mol/L, agitando-se intermitentemente por um minuto a cada 30 minutos durante 2 horas. A 4 mL da mistura foi adicionados 4 mL de éter etílico e, então, a solução foi submetida à agitação por 2 minutos. A emulsão obtida foi centrifugada por 10 minutos a 3600 rpm e o precipitado foi descartado. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 598 nm. A leitura foi feita

após realização de uma curva padrão com várias concentrações de alcian blue. Os resultados foram expressos em μg de Alcian blue/mL/g de tecido.

6.12. Determinação da prostaglandina (PGE_2) na citoproteção

O ensaio foi realizado pelo método de Curtis et al. (1995). Trinta minutos após tratamento (v.o.) com veículo, veículo mais indometacina (20 mg.kg^{-1} s.c.), frações (*I. truxillensis* - fAq 100 mg.kg^{-1} e fAc 50 mg.kg^{-1} e *I. suffruticosa* – fAc 100 mg.kg^{-1}) ou frações mais indometacina, os animais (ratos machos Wistar) foram sacrificados por deslocamento cervical para abertura do abdômem. Amostras do corpo do estômago dos animais foram cortadas, pesadas e suspensas em 1 ml de tampão Fosfato de sódio a 10 mM, pH 7,4. O tecido foi bem picotado com tesoura, e encubado a 37°C por 20 minutos. A prostaglandina, no tampão, foi medida através de técnica de enzima imunoensaio usando kit (RPN222- Amersham).

6.13. Determinação do papel do Óxido Nítrico (ON) na citoproteção

Ratos machos Wistar em jejum prévio de 24 horas foram divididos em grupos de acordo com os respectivos tratamentos. O grupo controle recebeu injeção subcutânea de solução salina ou Tween 80[®] 12% e os outros de L-NAME (N^G -nitro-L-arginine methyl-ester), um inibidor da NO-sintase. Após 30 min, os grupos receberam por via oral os respectivos tratamentos, salina ou Tween 80[®] 12% e as frações (*I. truxillensis* - fAq 100 mg.kg^{-1} e fAc 50 mg.kg^{-1} e *I. suffruticosa* – fAc 100 mg.kg^{-1}). Após 50 min, os animais foram tratados oralmente com etanol absoluto. Os animais foram sacrificados após 1 hora e os estômagos removidos e abertos na grande curvatura. As lesões foram avaliadas e o índice de lesão ulcerativa foi calculado (Matsuda, 1999).

6.14. Determinação do papel do grupamento sulfidril (SH) na citoproteção

Ratos machos Wistar (180-200 g) em jejum prévio de 24 horas foram divididos em grupos de acordo com os respectivos tratamentos. O grupo controle recebeu injeção subcutânea de solução salina ou Tween 80[®] 12% e os outros de NEM (N-etilmaleimida) um bloqueador de grupamento sulfidril. Após 30 min, os grupos receberam por via oral os respectivos tratamentos, salina ou Tween 80[®] 12% e as frações (*I. truxillensis* - fAq 100 mg.kg^{-1} e fAc 50 mg.kg^{-1} e *I. suffruticosa* – fAc 100 mg.kg^{-1}). Após 50 min, os animais foram tratados

oralmente com etanol absoluto. Os animais foram sacrificados após 1 hora e os estômagos removidos e abertos na grande curvatura. As lesões foram avaliadas e o índice de lesão ulcerativa foi calculado (Matsuda, 1999).

6.15. Úlcera gástrica induzida por isquemia e reperfusão

Este modelo é descrito segundo metodologia descrita por (Ueda, 1989). Os animias (ratos machos Wistar) foram tratados por via oral com as frações estudadas (*I. truxillensis* - fAq 100 mg.kg⁻¹ e fAc 50 mg.kg⁻¹ e *I. suffruticosa* – fAc 100 mg.kg⁻¹) e os controles. Trinta minutos após o tratamento os animais foram anestesiados (ketamina - 30 mg.kg⁻¹ /xilazina - 0,3 mg.kg⁻¹), por injeção intraperitoneal e submetidos à tricotomia. Em seguida foi feita uma incisão de aproximadamente 3 cm do lado esquerdo do abdômem. Após localização da artéria aorta, artéria celiaca foi isolada, a qual foi submetida a um processo de limpeza e eliminação de aderências; um “clamp” microvascular foi colocado nessa artéria por 30 minutos. Transcorridos 30 minutos da isquemia o clamp foi retirado para permitir a reperfusão da mucosa gástrica durante os 60 minutos seguintes. No final desse período, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e seus estômagos foram removidos e abertos no sentido da maior curvatura, para a determinação da área da lesão ulcerativa - ALU (mm²) utilizando-se paquímetro digital (Mitutoyo, Japão). Logo após, foi realizada uma raspagem da mucosa gástrica para a dosagem das enzimas (SOD, GPx e GR).

6.16. Atividade da Glutathione Peroxidase

A atividade da GPx foi determinada de acordo com o método de Yoshikawa et al. (1993). Ao raspado da mucosa gástrica foram adicionados 0.25 mM H₂O₂, 10 mM de Glutathione Reduzida, NADPH 4mM e 1 U de enzima glutathione redutase em PBS, pH 7,8. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 365 nm, a qual foi realizada entre 3 e 10 minutos. Os resultados foram expressos em nmol/ mim por mg de proteína.

6.17. Atividade da glutathione redutase

A atividade dessa enzima foi determinada seguindo-se espectrofotometricamente a oxidação de NADPH à 340 nm (Carlberg e Mannervik, 1985). A reação enzimática foi constituída de: 1000 mM tampão fosfato, pH 7,0, 2 mM EDTA, 1 mM GSSG e 0,1 mM de

NADPH; o consumo de NADPH foi determinado pela diminuição da absorbância à 340 nm. A atividade da enzima foi definida como nmol NADPH consumido/min/mg de proteína. O coeficiente de extinção para o NADPH é $6,22 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

6.18. Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pela inibição da redução do NBT (nitro blue tetrazolium) pelo radical superóxido gerado através do sistema hipoxantina / xantina oxidase (XO), à 37°C. A reação enzimática foi composta de: 0,1 M tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, 0,07 U de XO/ml, 100 μM hipoxantina, 600 μM NBT e 1 mg/ml de proteína da amostra (Winterbourn et al., 1975). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

6.19. Úlcera gástrica induzida por ácido acético

O experimento foi realizado conforme descrito por Takagi et al. (1969). Os animais (ratos machos Wistar) foram anestesiados (ketamina - 30 mg.kg^{-1} /xilazina - $0,3 \text{ mg.kg}^{-1}$) e foi realizada uma incisão abdominal. A parede anterior do estômago foi exposta e 50 μl de ácido acético a 30% com auxílio de uma micro seringa, foram injetados na camada submucosa da junção do fundo com o antro. Dois dias após a cirurgia foram iniciados os tratamentos por via oral, diários (duas vezes ao dia) durante 14 dias com as frações estudadas frações (*I. truxillensis* - fAq 100 mg.kg^{-1} e fAc 50 mg.kg^{-1} e *I. suffruticosa* – fAc 100 mg.kg^{-1}), cimetidina 100 mg.kg^{-1} (controle positivo) e veículo (controle negativo). Ao final do tratamento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e seus estômagos foram removidos e abertos no sentido da maior curvatura, para a determinação da área da lesão ulcerativa - ALU (mm^2) utilizando-se paquímetro digital Digimatic (Mitutoyo Corporation da Caliper, Japão) e para análise histológica.

6.20. Análise histológica

Após o experimento de úlcera gástrica induzida por ácido acético, os estômagos dos animais foram abertos no sentido da maior curvatura, a lesão foi medida em área (mm^2) e os cortes histológicos foram realizados no laboratório de histologia da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP- Botucatu) sob a orientação da Profa. Dra. Claudia Helena Pelizzon. Após cuidadosa fixação em placa de isopor com alfinetes, o material foi fixado em solução de

ALFAC (formalina, álcool 80%, ácido acético), onde ficou imerso por 24 horas a 4 °C. As peças foram desidratadas e incluídas em paraplast. Posteriormente, os blocos de paraplast foram cortados em 7 µm de espessura em micrótomo de maneira semi-seriada. As lâminas obtidas segundo esse processo foram submetidas à coloração por hematoxilina-eosina (H&E), tricrômico de Masson (Behmer et al., 1976), ácido periódico de Schiff (P.A.S.) (Vacca, 1985) para análises morfológica em microscopia de luz.

6.21. Imunohistoquímica:

Para análise imunohistoquímica foi utilizada uma lâmina representativa de cada tratamento, dos animais que sofreram úlcera induzida por ácido acético, que foi desparafinizada, re-hidratada e destinada a imunohistoquímica com método de revelação para peroxidase. O bloqueio de reação inespecífica foi feito com leite desnatado e soro normal de carneiro, posteriormente à recuperação antigênica conforme indicação da tabela 1 e as amostras foram incubadas com aos anticorpos específicos (ver tabela 1) em solução de bloqueio “overnight”. Posteriormente, as amostras foram lavadas em tampão fosfato (0.01 mol/L, pH 7.4) e incubadas em anticorpo secundário (Kit ABC Vector) e revelado com o Avidina-Biotina associado com 3-3`diaminobenzina tetrahydrochloride (DAB, Sigma), e analisadas posteriormente no microscópio LEICA DM acoplado com o software de captura de imagens Leica QWin Standard Versão 3.1.0 Abril de 2004, Reino Unido. Esse trabalho foi realizado no Setor de Histologia do Departamento de Morfologia, UNESP-Botucatu, sob a orientação da Profa. Dra. Claudia Helena Pellizzon.

Tabela 1: Anticorpos e diluições específicas para as reações de imunohistoquímica

Anticorpo	Código	Empresa	Titulação	Recuperação antigênica	Referência
PCNA	NCL-PCNA	Novo Castra	1:100	Citrato+ MW	(Kitajima et al., 1995)
HSP 70	SC-1060	Santa Cruz Biotechnology	1:100	Não necessita	(Guo et al., 2002)

Citrato+ MW= Tampão citrato 0,01 M com irradiação em forno de microondas.

PCNA – antígeno nuclear de células em proliferação, usado para determinação de células em divisão, principalmente na fase S do ciclo celular.

HSP 70 - *HEAT SHOCK PROTEIN* 70 – é uma proteína com peso molecular aproximado de 70 kDa.

VII. Análise estatística

Os resultados farmacológicos obtidos em ensaios de indução de úlcera gástrica, úlcera subcrônica e estudo do mecanismo de ação, foram expressos pela média $\pm$ desvio padrão da média. Esses dados foram submetidos a análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste a posteriori de Dunnet ou Tukey. O nível de significância permitido foi de $p < 0,05$ em todas as análises.

VIII. Resultados

8. Proporção de metabólitos nas frações

As proporções dos metabólitos nas espécies *I. truxillensis* e *I. suffruticosa* estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Proporção de metabólitos encontrados nas frações (fAq e fAc) da *I. truxillensis* e *I. suffruticosa*

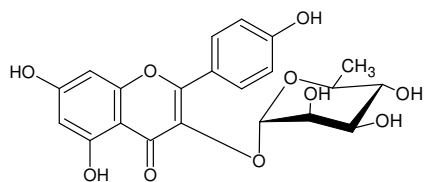
Espécies	Frações	Flavonóides	Alcalóides	Saponinas	Terpenos
<i>Indigofera truxillensis</i>	fAq	51,7%	5,3%	43%	-
	fAc	28,5%	23,8%	-	47,6%
<i>Indigofera suffruticosa</i>	fAq	50,2%	3,6%	46,2%	-
	fAc	31%	7%	-	62%

8.1. Substâncias isoladas da espécie *I. truxillensis* e *I. suffruticosa*

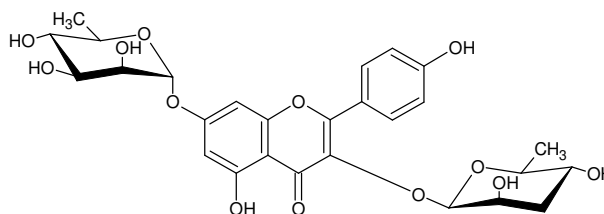
A Figura 2 apresenta as fórmulas estruturais dos metabólitos secundários isolados e identificados das partes aéreas dos extratos metanólicos das espécies de *I. truxillensis* e *I. suffruticosa*. Dos respectivos extratos foram preparadas as frações acetato de etila e aquosa que foram submetidas aos ensaios farmacológicos deste trabalho.

Figura 2: Substâncias isoladas da *I. truxillensis* (It)

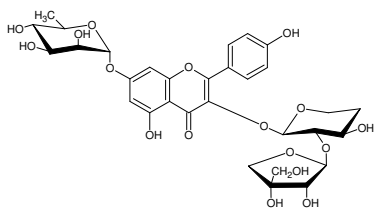
Indigofera truxillensis



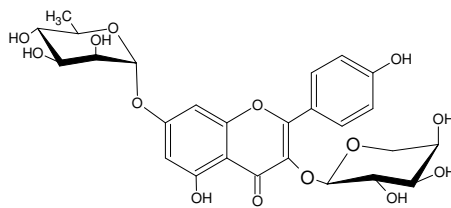
It1 - Kaempferol 3, -O-α-L-rhamnopyranosídeo.



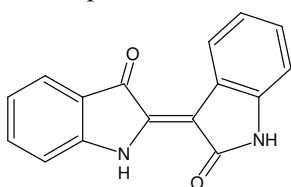
It2 - Kaempferol -3,7-di-O-α-L-rhamnopyranosídeo.



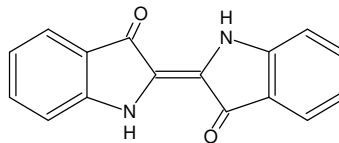
It3 - kaempferol 3-*O*-[β-D-apiofuranosil-(1→2)-α-L-arabinopiranosil-7-*O*-α-L-rhamnopyranosídeo.



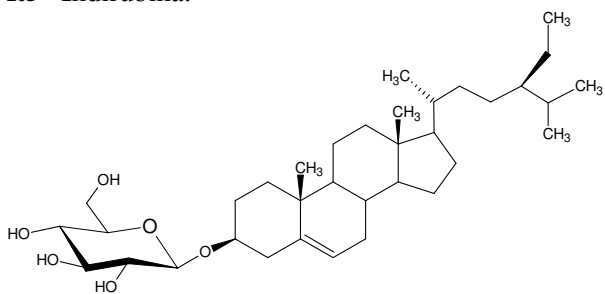
It4 - kaempferol 3-*O*-α-L-arabinopiranosil-7-*O*-α-L-rhamnopyranosídeo.



It5 - Indirubina.



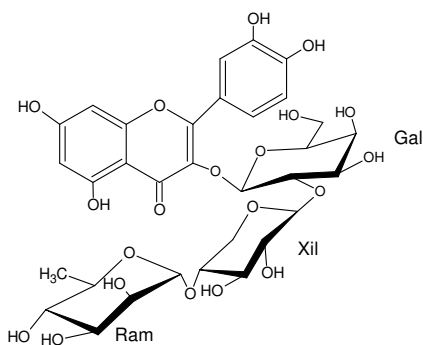
It6 - Índigo



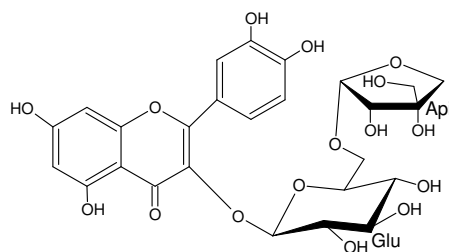
It7 - β-sitosteril 3-*O*-β-D-glucopiranosídeo.

Figura 3: Substâncias isoladas da *I. suffruticosa* (Is)

Indigofera suffruticosa

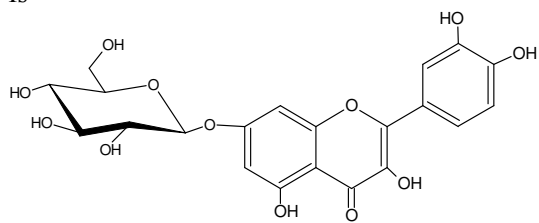


Is1 - Quercetina 3-*O*-[α-L-rhamnopyranosil-(1'''→4''')-β-D-xilopiranosil (1'''→2'')-β-D-galactopiranosídeo

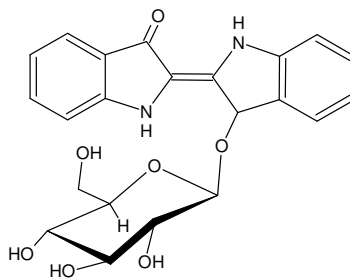


Is2 - Quercetina 3-*O*-[β-D-apiofuranosil-(1'''→6'')-β-D-glucopiranosídeo.

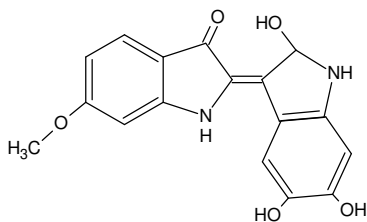
Is -



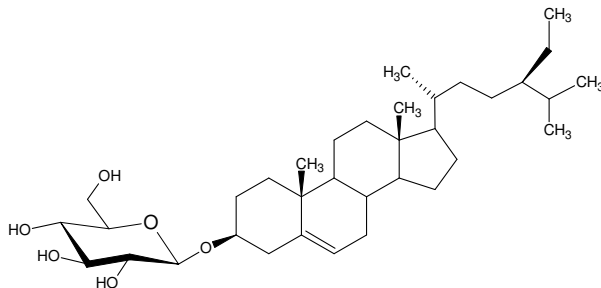
Is3 - Quercetina 7-O- β -D-glucopiranosídeo.



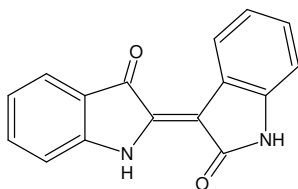
Is4 - Indigo-3-O- β -D-glucopiranosídeo.



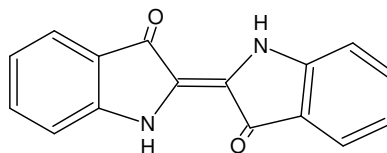
Is5 - 6'-metoxi 2, 5, 6-triidroxiisoirubina.



Is6 - β -sitosteril 3-O- β -D-glucopiranosídeo.



Is7 - Iridina



Is8 - Indigo

Calvo, 2006

Para os ensaios de atividade antiulcerogênica e mecanismo de ação, foram feitos fracionamentos dos extratos metanólicos da *I. truxillensis* e *I. suffruticosa*, em fração aquosa (fAq) e acetato (fAc), visando a obtenção de frações ricas em flavonóides, substâncias com potencial antiulcerogênico.

8.2. Toxicidade Aguda

O experimento de toxicidade aguda é uma avaliação estimativa e preliminar das propriedades tóxicas da substância teste, fornecendo informações acerca dos riscos para a saúde resultante de uma exposição de curta duração pela via escolhida, segundo Souza Brito (1994).

A partir da administração de uma única dose de 5000 mg.kg^{-1} , v.o. observamos que os extratos metanólico da *I. truxillensis* e *I. suffruticosa* não promoveram mortalidade e nem alterações nos parâmetros comportamentais, pesos corporal e dos órgãos vitais (coração, fígado, pulmão e rins) (Tabela 2), quando comparados com os respectivos controles, indicando ausência de efeitos tóxicos agudos destes extratos.

Tabela 3: Avaliação do efeito tóxico agudo pela administração via oral dos extratos metanólicos de *I. truxillensis* e *I. suffruticosa* (5000 mg.kg^{-1}) sobre os parâmetros de peso corporal, peso de órgão e mortalidade

Proporção do peso corporal e peso dos órgãos	Controle (Salina)	<i>I. truxillensis</i> 5000mg.kg⁻¹	Controle (Salina)	<i>I. suffruticosa</i> 5000mg.kg⁻¹
Corporal	45,3 ± 0,2	48,7 ± 0,4	43,0 ± 0,1	46,0 ± 0,3
Rins	0,9 ± 0,4	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,3	0,7 ± 0,5
Fígado	2,1 ± 0,3	2,4 ± 0,5	1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,2
Corção	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,19 ± 0,0	0,18 ± 0,0
Pulmão	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,0	0,22 ± 0,0	0,22 ± 0,1
Mortalidade	0/10	0/10	0/10	0/10

Os resultados são expressos pela média ± d.p. dos pesos (N=10). Teste T` Student, n.s. (não significativo).

8.3. Citotoxicidade – células V79

Os efeitos tóxicos da fração aquosa de *I. truxillensis* analisados em células V79 não são dose-dependente nos testes de redução do MTT. No teste de incorporação do vermelho neutro observou-se uma baixa citotoxicidade (Figura 4).

A inclusão das frações acetato de *I. truxillensis* e *I. suffruticosa* (Figura 5 e 6) acarretou em uma baixa citotoxicidade nas células V79 frente aos testes de redução do MTT e incorporação do vermelho neutro.

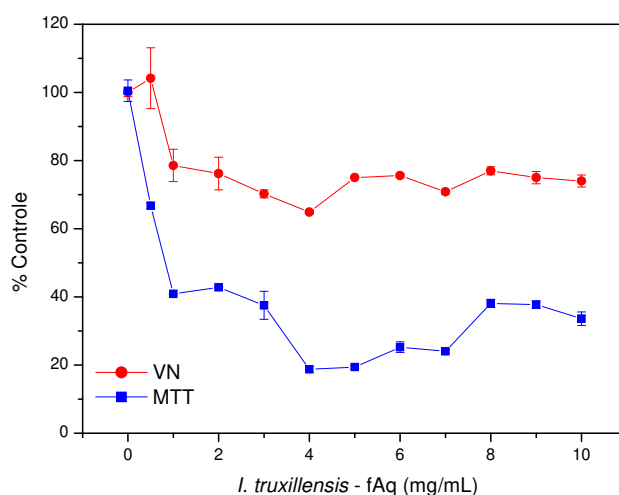


Figura 4: Viabilidade de células V79 após tratamento com fAq (*I. truxillensis*) por 24 h. Parâmetros analisados: redução do MTT (MTT) e incorporação do vermelho neutro (VN). Cada ponto representa média $\pm$ desvio padrão de dois experimentos em sextuplicata.

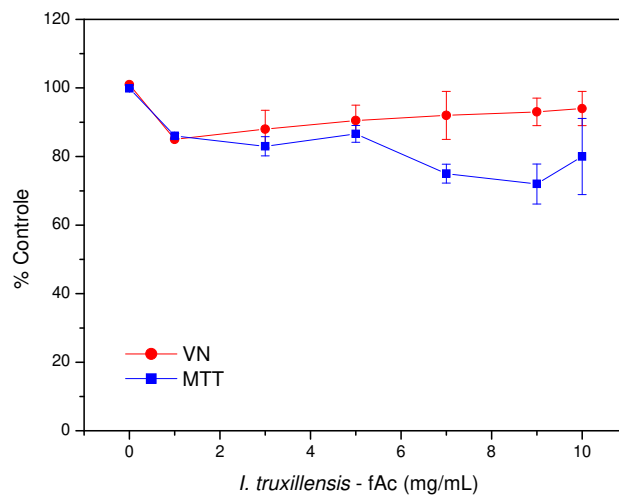


Figura 5: Viabilidade de células V79 após tratamento com fAc (*I. truxillensis*) por 24 h. Parâmetros analisados: redução do MTT (MTT) e incorporação do vermelho neutro (VN). Cada ponto representa média $\pm$ desvio padrão de dois experimentos em sextuplicata.

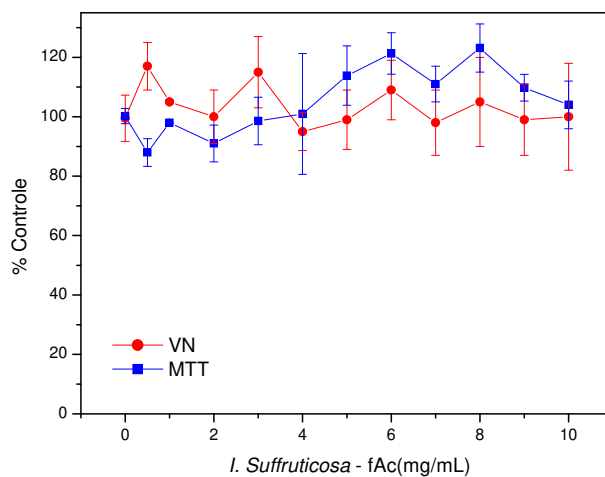


Figura 6: Viabilidade de células V79 após tratamento com fAc (*I. suffruticosa*) por 24 h. Parâmetros analisados: redução do MTT (MTT) e incorporação do vermelho neutro (VN). Cada ponto representa média $\pm$ desvio padrão de dois experimentos em sextuplicata.

8.4 Indução de úlcera gástrica por etanol

No modelo de indução de úlcera gástrica por etanol em ratos (Tabela 4), ambas as frações fAq e fAc mostraram-se efetivas em inibir a formação das lesões gástricas, sendo que para fAq a dose mais eficaz foi de 100 mg.kg⁻¹ e para fAc, 50 mg.kg⁻¹.

Tabela 4: Efeito gastroprotetor do lansoprazol e das diferentes doses de fAq e fAc (50, 100 and 200 mg.kg⁻¹) obtidas da *I. truxillensis* no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos

Tratamentos (v.o.)	N	Dose (mg.kg ⁻¹)	ILU	Inibição (%)
Salina	5	-	66,4 ± 15,7	-
Lansoprazol	5	30	19,8 ± 6,4**	70
fAq – <i>I. truxillensis</i>	5	50	43,4 ± 14,6*	35
	5	100	13,8 ± 6,3**	79
	5	200	25,4 ± 9,0**	61
	5	-	33,8 ± 13,1	-
Tween 12%	5	-	33,8 ± 13,1	-
Lansoprazol	5	30	1 ± 0,7**	97
fAc— <i>I. truxillensis</i>	5	50	6,4 ± 2,7**	81
	5	100	6,2 ± 4**	81
	5	200	6 ± 2,5**	82
	5	-	33,8 ± 13,1	-

Os resultados foram expressos em Média ± Desvio Padrão. ANOVA F_(4,20) = 18,27 para fAq e F_(4,20) = 21,18 para fAc no ILU (** p<0,01), comparado com o grupo controle, seguido do teste a posteriori de Dunnett.

No modelo de úlcera gástrica induzida por etanol, os resultados apresentados na Tabela 5 demonstram que a fAc da *I. suffruticosa* apresenta uma significativa proteção contra as lesões gástricas na dose de 100 mg.kg⁻¹, quando comparada com o controle; entretanto, a fAq não apresenta proteção em nenhuma das doses testadas. Portanto, os ensaios prosseguiram apenas com a fAc de *I. suffruticosa*.

Tabela 5: Efeito gastroprotetor do lansoprazol e das diferentes doses de fAq e fAc (25, 50 e 100 mg.kg⁻¹) obtidas da *I.suffruticosa* no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos

Tratamentos (v.o.)	N	Dose (mg.kg ⁻¹)	ILU	Inibição (%)
Salina	6	-	51,2 ± 16,8	-
Lansoprazol	5	30	9,2 ± 3,5**	82
fAq – <i>I. suffruticosa</i>	5	25	35,4 ± 8	-
	5	50	41,0 ± 2,4	-
	5	100	40,8 ± 10,5	-
Tween 12%	5	-	34,4 ± 6,3	-
Lansoprazol	5	30	8,4 ± 3,6**	75
fAc - <i>I. suffruticosa</i>	5	25	33,8 ± 4,9	-
	5	50	33,8 ± 3,5	-
	5	100	9,8 ± 3,7**	71

Os resultados foram expressos em Média ± Desvio Padrão. ANOVA $F_{(4,21)} = 12,46$ para fAq, $F_{(4,20)} = 45,57$ para fAc no ILU (** $p < 0,01$), comparado com o grupo controle, seguido do teste a posteriori de Dunnet.

8.5. Parâmetros bioquímicos do suco gástrico após ligadura do piloro

Para avaliação dos parâmetros bioquímicos do conteúdo gástrico, ratos Wistar machos foram submetidos à ligadura do piloro e posteriormente tratados com fAq e fAc obtidas da *I. truxillensis* (Tabela 6) e fAc obtida da *I. suffruticosa* (Tabela 7) nas doses mais efetivas de ambas as espécies. Os resultados obtidos nesse modelo (Tabela 6) demonstram que não foi constatada nenhuma alteração no pH. No entanto, em animais tratados com fAc, na dose de 50 mg.kg⁻¹, houve diminuição do volume gástrico.

Tabela 6: Efeito da cimetidina, fAq (100 mg.kg⁻¹) e fAc (50 mg.kg⁻¹) obtidas da *I. truxillensis* nos parâmetros bioquímicos do suco gástrico obtidos no modelo de ligadura do piloro via intraduodenal em ratos

Tratamentos	N	Dose (mg.kg ⁻¹)	pH (unidades)	Suco gástrico (mg/4h)
Salina	5	-	2,7 ± 0,16	0,5 ± 0,1
Cimetidina	5	100	3,2 ± 0,15**	0,5 ± 0,05
fAq - <i>I. truxillensis</i>	5	100	2,8 ± 0,12	0,52 ± 0,06
Tween 12%	5	-	3,2 ± 0,07	0,6 ± 0,08
Cimetidina	5	100	3,7 ± 0,19**	0,5 ± 0,1
fAc – <i>I. truxillensis</i>	5	50	3,3 ± 0,18	0,4 ± 0,06*

Os resultados foram expressos em Média ± Desvio Padrão. ANOVA $F_{(2,12)} = 22,986$ fAq e $F_{(2,12)} = 13,534$ fAc para o pH ($p > 0,05$), considerado não significativo, comparado com o grupo controle, seguido do teste a posteriori de Dunnett. ANOVA $F_{(2,12)} = 0,09357$ fAq para o volume de suco gástrico ($p > 0,05$), considerado não significativo e $F_{(2,12)} = 5,437$ fAc para o volume de suco gástrico (* $p < 0,05$) seguido do teste a posteriori de Dunnett.

Os resultados apresentados nas Tabelas 6 e 7 indicam que os tratamentos com fAc e fAq obtida da *I. truxillensis* e com a fAc obtida da *I. suffruticosa* não alteraram o pH do suco gástrico. O volume gástrico, entretanto, não foi modificado pela fAq de *I. truxillensis* e fAc de *I. suffruticosa*; já a fAc de *I. truxillensis* reduziu significativamente este parâmetro.

Tabela 7: Efeito da cimetidina e fAc (100 mg.kg⁻¹) obtida da *I. suffruticosa* nos parâmetros bioquímicos do suco gástrico obtidos no modelo de ligadura do piloro via intraduodenal em ratos

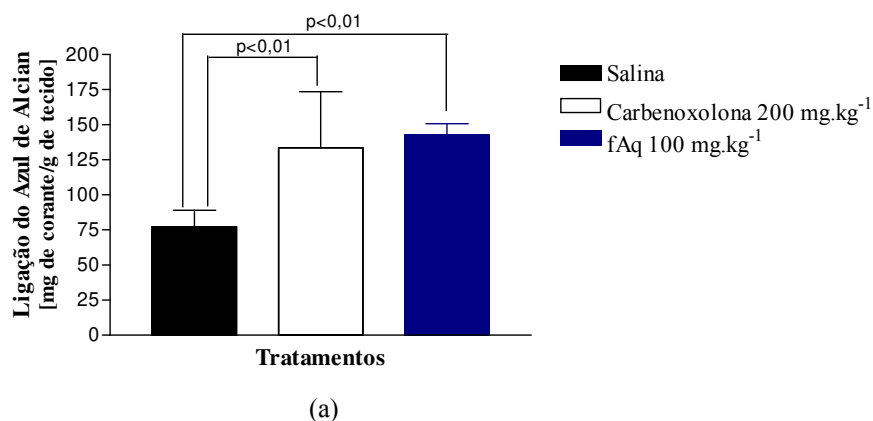
Tratamentos	N	Dose (mg.kg ⁻¹)	pH (unidades)	Suco gástrico (mg/4h)
Tween 12%	5	-	3,0 ± 0	0,8 ± 0,4
Cimetidina	5	100	4,0 ± 0**	0,8 ± 0,4
fAc – <i>I. suffruticosa</i>	5	100	3,4 ± 0,5	1,0 ± 0

Os resultados foram expressos em Média ± Desvio Padrão. ANOVA $F_{(2,12)} = 12,6$ para o pH (**p<0,01), comparado com o grupo controle, $F_{(2,12)} = 0,5$ para o volume de suco gástrico, considerado não significativo, seguido do teste a posteriori de Dunnett.

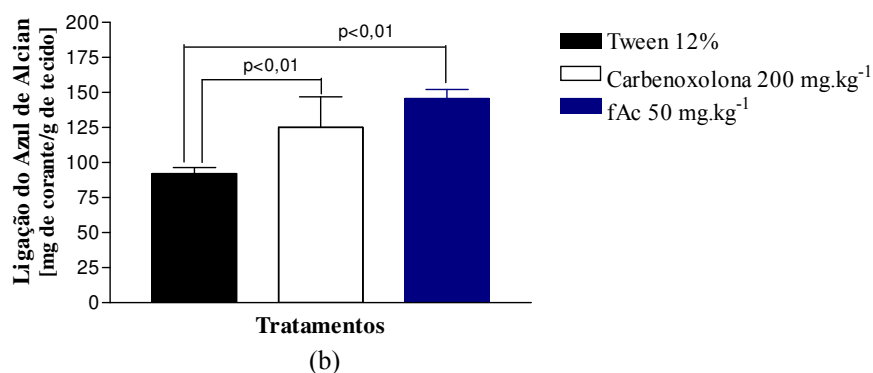
8.6. Muco gástrico aderido

Neste experimento foi avaliada a capacidade da fAq e fAc obtidas da *I. truxillensis* em aumentar o muco aderido na mucosa gástrica de ratos submetidos à ligadura de piloro. Nas Figuras 7(a) e 7(b) foi possível observar um aumento na produção de muco para todos os tratamentos realizados (carbenoxolona, fAq e fAc) quando comparados aos seus respectivos controles.

Figura 7: Efeito da administração oral da carbenoxolona, fAq (a) e fAc (b) obtidas da *I. truxillensis* no aumento de muco gástrico aderido (Ligação do Azul de Alcian) em ratos submetidos à ligadura do piloro



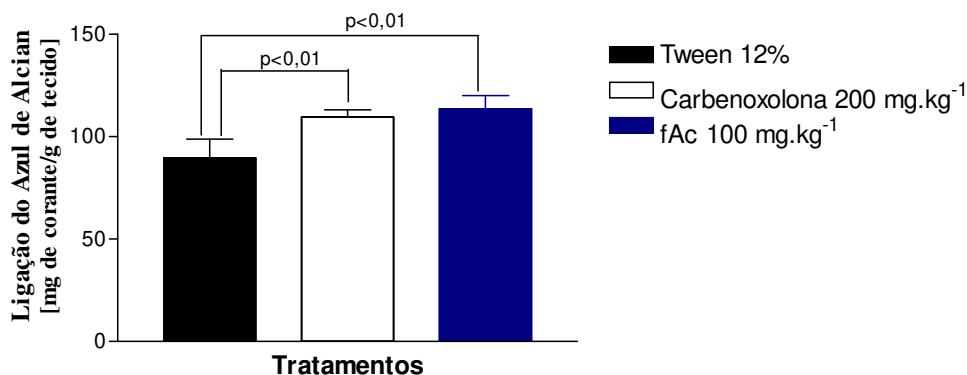
Os resultados foram expressos em Média $\pm$ Desvio Padrão (N=5). ANOVA: $F_{(2,12)} = 10,44$ para fAq ($p < 0,01$) seguido do teste a posteriori de Dunnett.



Os resultados foram expressos em Média $\pm$ Desvio Padrão (N=5). ANOVA $F_{(2,12)} = 20,31$ para fAc ($p < 0,01$) seguido do teste a posteriori de Dunnett.

O pré tratamento com carbenoxolona e fAc obtida da *I. suffruticosa* (Figura 8) aumentou significativamente a produção de muco quando comparado ao grupo controle.

Figura 8: Efeito da administração oral da carbenoxolona e fAc obtida da *I. suffruticosa* no aumento de muco gástrico aderido (Ligação do Azul de Alcian) em ratos submetidos à ligadura do piloro

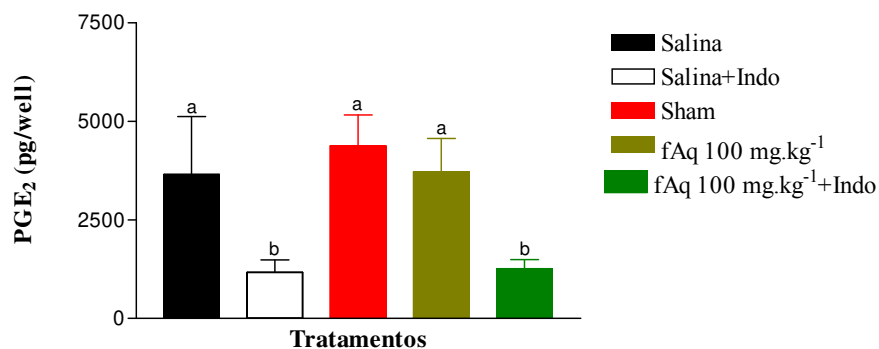


Os resultados foram expressos em Média $\pm$ Desvio Padrão (N=5). ANOVA: $F_{(2,12)} = 7,06$ para fAc ($p < 0,01$) seguido do teste a posteriori de Dunnett.

8.7. Produção de prostaglandina

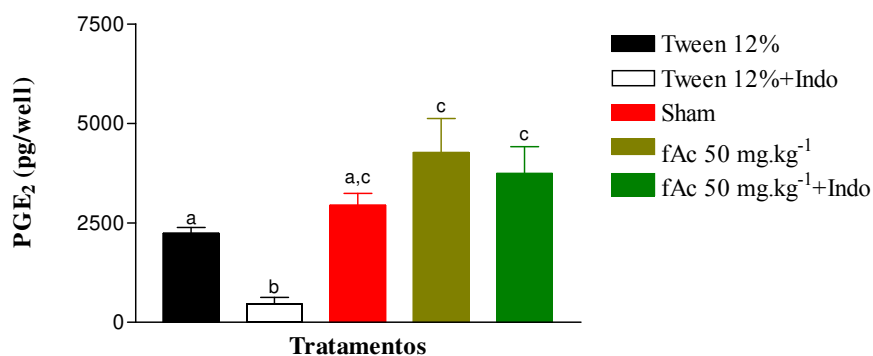
As Figuras 9 (a) e 9 (b) apresentam os experimentos realizados com um inibidor da síntese de prostaglandina, a indometacina. Ambas as frações obtidas da *I. truxillensis* não apresentaram alteração significativa na produção de PGE_2 quando comparadas com os animais sham, sendo que o pré-tratamento com a fAc, na presença do inibidor (indometacina), não reduziu a produção de PGE_2 , mantendo a concentração de PGE_2 semelhante àquela dos animais sham.

Figura 9: Efeito da administração oral da fAq (a) e fAc (b) obtidas da *I. truxillensis* no aumento da produção de prostaglandina (PGE₂) em ratos pré-tratados com indometacina (Indo)



(a)

Os resultados foram expressos em Média $\pm$ Desvio Padrão (N=5). ANOVA: $F_{(4,20)} = 15,63$ para fAq ($p < 0,0001$) seguido do teste a posteriori de Tuckey. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

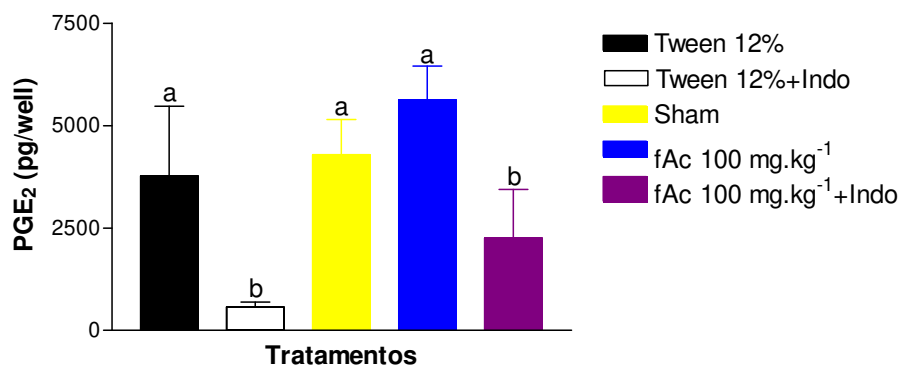


(b)

Os resultados foram expressos em Média $\pm$ Desvio Padrão (N=5). ANOVA: $F_{(4,20)} = 40,48$ para fAc ($p < 0,0001$) seguido do teste a posteriori de Tuckey. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

A Figura 10 apresenta o experimento realizado com um inibidor da síntese de prostaglandina, a indometacina. A fAc não aumentou a produção de PGE₂ quando comparada ao controle.

Figura 10: Efeito da administração oral da fAc (b) obtida da *I. suffruticosa* no aumento da síntese de prostaglandina (PGE₂) em ratos pré-tratados com indometacina (Indo)

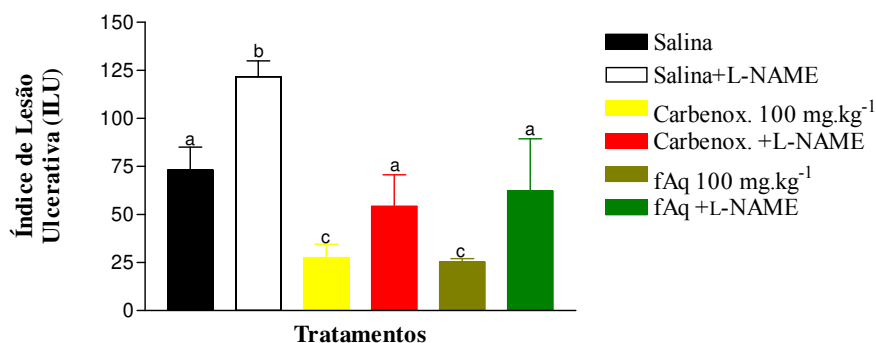


Os resultados foram expressos em Média $\pm$ Desvio Padrão (N=5). ANOVA: $F_{(4,20)} = 5,26$ para fAc ($p > 0,05$), considerado não significativo, seguido do teste a posteriori de Tuckey. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

8.8. Óxido nítrico (ON) na citoproteção

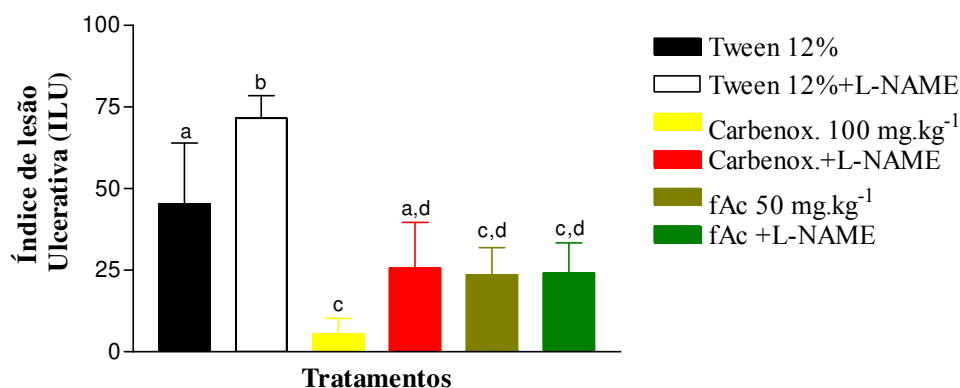
Na Figura 11 (a) foi possível observar que o pré-tratamento com a fAq obtida da *I. truxillensis* não atenuou as lesões gástricas causadas pelo etanol, sugerindo um envolvimento da fAq com o ON na proteção da mucosa; o mesmo não foi observado para a fAc (Figura 11 b).

Figura 11: Efeito da administração oral da fAq (a) e fAc (b) obtidas da *I. truxillensis* no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos pré-tratados com N^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME)



(a)

Os resultados foram expressos em Média ± Desvio Padrão (N=6). ANOVA: $F_{(5,30)} = 35,20$ para fAq ($p < 0,0001$) seguido do teste a posteriori de Tuckey. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

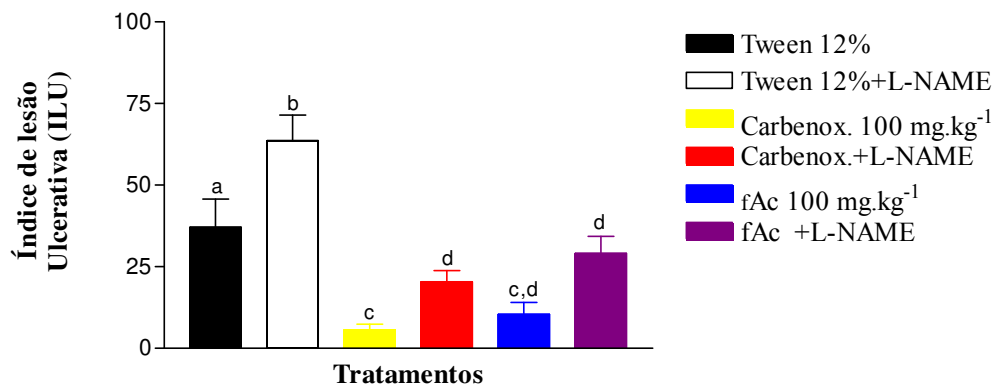


(b)

Os resultados foram expressos em Média ± Desvio Padrão (N=6). ANOVA: $F_{(5,30)} = 23,18$ para fAc ($p < 0,0001$) seguido do teste a posteriori de Tuckey. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

Houve um agravamento das lesões gástricas com o pré-tratamento com L-NAME (Figura 12); entretanto, podemos observa-se que a fAc obtida da *I. suffruticosa* continuou protegendo a mucosa gástrica contra danos causados pelo etanol, quando comparada ao controle, sugerindo que a fAc não depende dos mecanismos via ON para proteção da mucosa gástrica.

Figura 12: Efeito da administração oral da fAc obtida da *I. suffruticosa* no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos pré-tratados com N^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME)

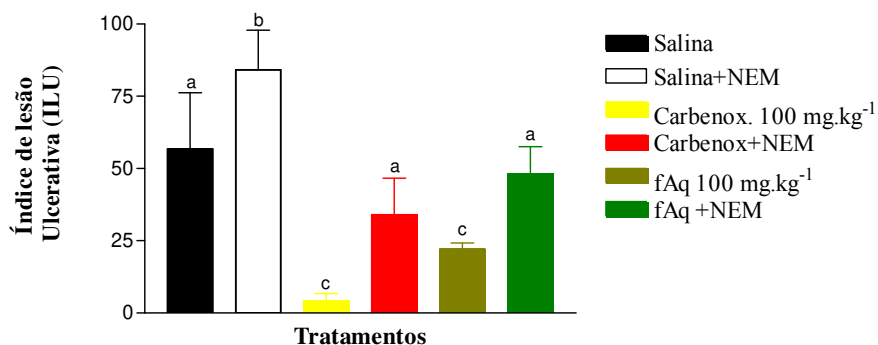


Os resultados foram expressos em Média ± Desvio Padrão (N=6). ANOVA: $F_{(5,24)} = 68,7$ para fAc ($p < 0,0001$) seguido do teste a posteriori de Tuckey. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

8.9. Grupamentos sulfidrila na citoproteção

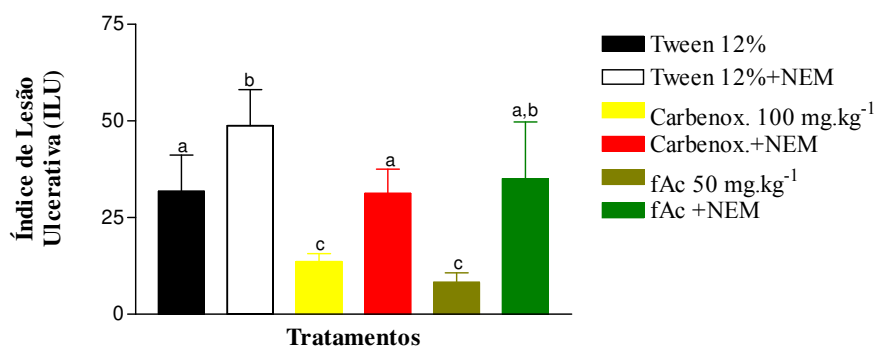
Nos experimentos utilizando o agente bloqueador de compostos sulfidrila (N-etilmaleimida), foi observado, como esperado, um aumento nas lesões ulcerativas induzidas pelo etanol. O pré-tratamento com fAq e fAc obtida da *I. truxillensis* mostrado na Figura 13 (a) e (b) não inibiu as lesões gástricas causadas pelo etanol, sugerindo um envolvimento dessas frações com os compostos sulfidrila na proteção da mucosa gástrica.

Figura 13: Efeito da administração oral da fAq (a) e fAc (b) obtidas da *I. truxillensis* no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos pré-tratados com N-etilmaleimida (NEM)



(a)

Os resultados foram expressos em Média ± Desvio Padrão (N=5). ANOVA: $F_{(5,24)} = 28,73$ para fAq ($p < 0,0001$) seguido do teste a posteriori de Tuckey. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

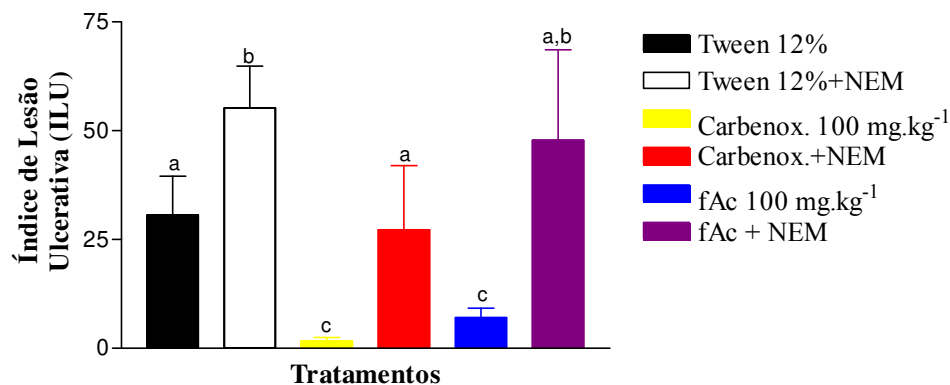


(b)

Os resultados foram expressos em Média ± Desvio Padrão (N=5). ANOVA: $F_{(5,24)} = 15,068$ para fAc ($p < 0,0001$) seguido do teste a posteriori de Tuckey. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

O aumento das lesões gástricas pela administração do bloqueador de grupamentos sulfidríla pode ser observado na Figura 14. A fAc obtida da *I. suffruticosa* não inibiu a formação dessas lesões, sugerindo que uma das vias de proteção da fAc seja dependente da presença de grupamentos sulfidríla na mucosa gástrica.

Figura 14: Efeito da administração oral da fAc obtida da *I. suffruticosa* no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos pré-tratados com N-etilmaleimida (NEM)



Os resultados foram expressos em Média ± Desvio Padrão (N=5). ANOVA: $F_{(5,24)} = 16,48$ para fAc ($p < 0,0001$) seguido do teste a posteriori de Tuckey. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

8.10. Isquemia e reperfusão

A isquemia ocasionada em diferentes grupos animais por oclusão da artéria celiaca durante 30 minutos, seguida de 60 minutos de reperfusão, produziu lesões ulcerativas na mucosa gástrica em ratos. Nos dados apresentados na Tabela 8 observa-se uma redução significativa nas lesões com o pré-tratamento de rutina e com ambas as frações obtidas da *I. truxillensis* quando comparadas aos seus respectivos controles.

Tabela 8: Efeito da administração oral de rutina (200 mg.kg⁻¹), fAq (100 mg.kg⁻¹) e fAc (50 mg.kg⁻¹) obtidas da *I. truxillensis* no modelo de isquemia e reperfusão

Tratamentos (v.o.)	Dose (mg.kg ⁻¹)	N	Área Ulcerada (mm ²)	Inibição (%)
Sham	-	5	0 ± 0**	-
Salina	-	5	1,7 ± 0,8	-
Rutina	200	5	0,3 ± 0,1**	82
fAq- <i>I. truxillensis</i>	100	5	0,3 ± 0,1**	82
Tween 12%	-	5	15,6 ± 5,3	-
Rutina	200	5	5,3 ± 3,2**	66
fAc – <i>I. truxillensis</i>	50	5	0,8 ± 0,1**	95

ANOVA F_(4,19)=17,95 para fAq e F_(4,19)=26,94 para fAc na medida da área ulcerada (mm²) no modelo de isquemia e reperfusão. Teste de Tukey **p<0,001.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 9, o pré-tratamento com rutina e fAc obtida da *I. suffruticosa* reduziu, respectivamente, em 66% e 96% a formação das lesões gástricas causadas no modelo de isquemia e reperfusão em ratos.

Tabela 9: Efeito da administração oral da rutina e fAc obtida da *I. suffruticosa*, em modelo de indução de úlcera gástrica por isquemia e reperfusão em ratos

Tratamentos (v.o.)	N	Dose (mg.kg ⁻¹)	Área ulcerada (mm ²)	Inibição (%)
Sham	4	-	0,0 ± 0,0**	-
Tween 12%	5	-	15,6 ± 5,3	-
Rutina	5	200	5,3 ± 3,0**	66
fAc – <i>I. suffruticosa</i>	5	100	0,6 ± 0,3**	96

ANOVA: F_(4,19)=27,14 para área ulcerada (mm²); com teste a posteriori de Tuckey **p<0,01.

8.11. Atividade antioxidante

Os ensaios antioxidantes realizados avaliaram a atividade das enzimas: superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR), no modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão. Foi observado na análise dos dados mostrados na Tabela 10, que o pré-tratamento com fAq obtida da *I. truxillensis* aumentou significativamente a atividade da SOD e GR, sendo que a fAc promoveu um aumento significativo na atividade da SOD, GPx e GR.

Tabela 10: Mecanismos antioxidantes da atividade antiulcerogênica da fAq e fAc obtidas da *I. truxillensis* em ratos submetidos a isquemia e reperfusão

Tratamentos (v.o.)	Dose (mg.kg ⁻¹)	SOD (U/mg de proteína)	GPx (pmol/min/mg proteína)	GR (pmol/min/mg proteína)
Sham	-	10,6 ± 1,9	36,9 ± 8,7	27,6 ± 2,8
Salina	-	3,7 ± 0,5	23,8 ± 1,5	12,8 ± 0,1
Rutina	200	19,0 ± 4,3**	19,2 ± 4,0	19,3 ± 3,2
fAq <i>I. truxillensis</i>	100	8,8 ± 0,9*	26,5 ± 3,9	109,2 ± 28,0**
Tween 12%	-	3,8 ± 0,7	13,9 ± 0,9	8,6 ± 0,5
Rutina	200	7,8 ± 1,5	16,2 ± 1,6	15,2 ± 2,4
fAc <i>I. truxillensis</i>	50	8,9 ± 1,9*	33,7 ± 5,6*	22,4 ± 3,5**

ANOVA $F_{(4,17)} = 8,52$ para SOD, $F_{(3,17)} = 17,52$ para GPx, $F_{(3,17)} = 13,37$ para GR, na fAq. $F_{(5,21)} = 4,72$ para SOD, $F_{(5,25)} = 15,09$ para GPx, $F_{(5,24)} = 11,9$ para GR, na fAc. Teste de Dunnet (**p<0,01).

Os resultados obtidos nos ensaios antioxidantes apresentados na Tabela 11 demonstram que o pré-tratamento com fAc obtida da *I. suffruticosa* produziu significativo aumento na atividade da GR.

Tabela 11: Mecanismos antioxidantes na atividade antiulcerogênica da fAc obtida da *I. suffruticosa* em ratos submetidos a isquemia e reperfusão

Tratamentos (v.o.)	Dose (mg.kg ⁻¹)	SOD (U/mg de proteína)	GPx (pmol/min/mg proteína)	GR (pmol/min/mg proteína)
Sham	-	10,6 ± 1,9	36,9 ± 8,7	27,6 ± 2,8
Tween 12%	-	3,8 ± 0,7	13,9 ± 0,9	8,6 ± 0,5
Rutina	200	7,8 ± 1,5	16,2 ± 1,6	15,2 ± 2,4
fAc <i>I. suffruticosa</i>	100	3,8 ± 0,4	13,5 ± 2,2	16,6 ± 1,1*

ANOVA F_(5,21)= 4,72 para SOD, F_(5,25)= 15,09 para GPx, F_(5,24)= 11,9 para GR. Teste de Dunnet (**p<0,01).

8.12. Indução de úlcera gástrica por ácido acético

No modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético em ratos, o tratamento durante 14 dias consecutivos com cimetidina e fAc obtida da *I. truxillensis* reduziu a área da lesão respectivamente, em 68% e 38%, como pode ser encontrado na Tabela 12. O mesmo não foi observado para a fAq.

Tabela 12: Efeito da administração oral de cimetidina, fAq e fAc obtidas da *I. truxillensis*, durante 14 dias, no modelo de indução de úlcera gástrica por ácido acético 30% em ratos

Tratamentos (v.o.)	Dose (mg.kg ⁻¹)	N	Área Ulcerada (mm ²)	Taxa de cura (%)
Sham	-	5	0 ± 0**	-
Salina	-	5	3,9 ± 0,9	-
Cimetidina	200	5	1,65 ± 0,6**	57
fAq- <i>I. truxillensis</i>	100	5	3,62 ± 0,8	-
Tween 12%	-	5	4,5 ± 0,41	-
Cimetidina	200	5	1,4 ± 0,47**	68
fAc – <i>I. truxillensis</i>	50	5	2,8 ± 1,4*	38

ANOVA F_(2,12)=11,92 para fAq e F_(2,12)=15,15 para fAc na medida da área ulcerada no modelo de ácido acético. Teste de Dunnet **p<0.01.

Os resultados apresentados na Tabela 13 demonstram que no modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético em ratos, o tratamento durante 14 dias consecutivos com cimetidina e fAc obtida da *I. suffruticosa* reduziu significativamente a área da lesão, respectivamente em 66% e 40%.

Tabela 13: Efeito da administração oral de cimetidina e fAc obtida da *I. suffruticosa*, durante 14 dias, no modelo de indução de úlcera gástrica por ácido acético 30% em ratos

Tratamentos (v.o.)	Dose (mg.kg ⁻¹)	N	Área Ulcerada (mm ²)	Taxa de cura (%)
<i>Sham</i>	-	5	0 ± 0**	-
Tween 12%	-	5	4,5 ± 0,41	-
Cimetidina	200	5	1,5 ± 0,58**	66
fAc – <i>I. suffruticosa</i>	100	5	2,7 ± 1,5*	40

ANOVA $F_{(2,12)}=11,45$ para fAc na medida da área ulcerada no modelo de ácido acético. Teste de Dunnet
**p<0,01.

8.13. Análise histológica

As próximas Figuras (15 a 22) são demonstrativas dos resultados obtidos nos estudos histológicos e imunohistoquímicos dos estômagos de ratos tratados por 14 dias com ambas as espécies, após, terem sofrido indução de úlcera por ácido acético. As legendas das figuras indicam detalhadamente o tratamento, a coloração e o objeto de cada estudo em particular, além de conter os grupos controles (sham) de cada experimento. Os resultados encontrados aparecem colocados logo após a legenda da prancha que foi opcionalmente apresentada separadamente sempre na página seguinte.

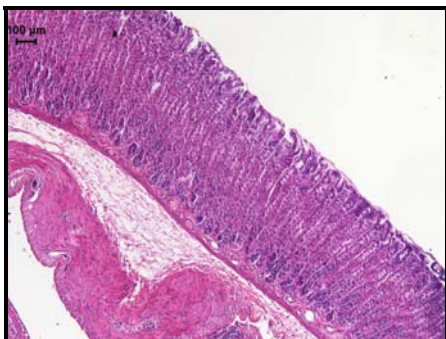


Figura 15: Fotomicrografia de estômago de rato (grupo sham). Corte histológico corado com hematoxilina e eosina para análise morfológica da mucosa.

Figura 16: Fotomicrografias de estômago de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com as frações aquosa e acetato de *I. truxillensis* e acetato de *I. suffruticosa*.

Cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina para análise morfológica da mucosa (m).

a) apresenta amostra de animais controle (salina) com as glândulas da mucosa (gl) dilatadas (seta). **b)** o grupo controle positivo (cimetidina) também apresentou glândulas da mucosa dilatadas (seta). **c)** na fAq *I. truxillensis* as glândulas da mucosa (seta) apresentam uma maior organização comparada com o grupo controle. **d, g:** no grupo controle (Tween 80[®]-12%) as glândulas da mucosa apresentam-se dilatadas (seta). **e, h:** representam o grupo controle positivo (cimetidina), no qual as glândulas da mucosa (seta) apresentam uma maior organização. **f:** o grupo *I. truxillensis* fAc possui uma maior organização nas glândulas da mucosa (seta). **i:** o grupo *I. suffruticosa* fAc apresenta glândulas com maior organização (seta). Dados apresentados na página 99.

(sm): submucosa.

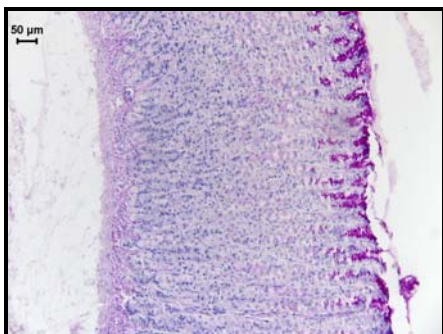


Figura 17: Fotomicrografia de estômago de rato (grupo sham). Corte histológico corado com ácido periódico de Schiff para de secreção de glicoproteína para visualização do muco.

Figura 18: Fotomicrografias de estômago de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com as frações aquosa e acetato de *I. truxillensis* e acetato de *I. suffruticosa*.

Cortes histológicos corados com ácido periódico de Schiff para de secreção de glicoproteína para visualização do muco. O muco produzido cora-se em púrpura.

a) representa o grupo controle (salina). Observa-se secreção de muco nas glândulas (seta); **b)** representa o grupo controle positivo (cimetidina), com produção de muco (seta) na porção apical das glândulas; **c)** representa o grupo *I. truxillensis* fAq com produção de muco (seta) na porção apical das glândulas. **d, g:** indicam o grupo controle (Tween 80[®]-12%), o qual apresenta secreção apical de muco (seta). **e, h:** representam o grupo controle positivo (cimetidina) com produção de muco na porção apical das glândulas (seta). **f, i:** fAc da *I. truxillensis* e da *I. suffruticosa* apresentam secreções de muco na região apical das células (seta). Dados apresentados na página 101.

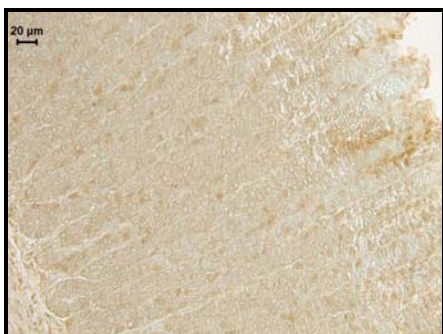


Figura 19: Fotomicrografia de estômago de rato (grupo sham). Corte histológico submetido à imunolocalização de *Heat Shock Protein* (HSP) 70 revelado com 3'3 diaminobenzindina (DAB) e peroxidase que promove a cor marrom como resposta positiva de reação.

Figura 20: Fotomicrografias de estômago de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com as frações aquosa e acetato de *I. truxillensis* e acetato de *I. suffruticosa*.

Cortes histológicos submetidos à imunolocalização de *Heat Shock Protein* (HSP) 70 revelado com 3'3 diaminobenzindina (DAB) e peroxidase que promove a cor marrom como resposta positiva de reação. Esse experimento foi realizado para a verificação da participação dessa proteína no processo de cicatrização.

a) no grupo controle negativo (salina) observa-se a presença de HSP 70 nos núcleos das células, que compõem as glândulas (seta); **b)** o grupo controle positivo (cimetidina), apresentou HSP 70 no núcleo das células (seta); **c)** o grupo *I. truxillensis* fAq apresentou HSP 70 no núcleo das células (seta). **d, g:** no grupo controle negativo (Tween 80[®]-12%) não foi observado a presença de HSP 70. **e, h:** no grupo controle positivo (cimetidina) o núcleo das células apresentam HSP 70 (seta). **f:** no grupo fAc de *I. truxillensis* não foi observada a presença de HSP 70. **i)** no grupo fAc de *I. suffruticosa* foi observada a presença de HSP 70 (seta). Dados apresentados na página 103.

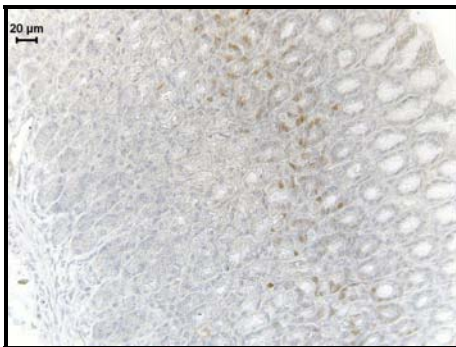


Figura 21: Fotomicrografia de estômago de rato (grupo sham). Corte histológico submetido à imunolocalização de *Proliferation cell nuclear antigen* (PCNA) revelado com 3'3 diaminobenzindina (DAB) e peroxidase que promove a cor marrom como resposta positiva de reação.

Figura 22: Fotomicrografias de estômago de ratos com úlcera induzida por ácido acético após tratamento com as frações aquosa e acetato de *I. truxillensis* e acetato de *I. suffruticosa*.

Cortes histológicos submetidos à imunolocalização de *Proliferation cell nuclear antigen* (PCNA) revelado com 3'3 diaminobenzindina (DAB) e peroxidase que promove a cor marrom como resposta positiva de reação. Esse experimento foi realizado para a verificação do processo de divisão celular.

a, d, g: nos grupos controles negativos (**a**, salina; **d, g**, Tween 80[®] 12%) foram observados a presença de PCNA na base das glândulas (seta); **b, e, h:** nos grupos controles positivos (cimetidina) foram observados PCNA na base das glândulas (seta); **c, i:** fAq da *I. truxillensis* e fAc da *I. suffruticosa*, respectivamente, apresentaram PCNA na base das glândulas (seta); **f:** no grupo fAc *I. truxillensis* não foi observada a presença de PCNA. Dados apresentados na página 105.

IX. Discussão

Os compostos obtidos de plantas com atividade antiulcerogênica apresentam estruturas químicas diversas e distintos mecanismos de ação. Dentre as principais classes de compostos relacionados à essa atividade têm-se os flavonóides, saponinas, taninos, gomas e mucilagens (Borrelli e Izzo, 2000). Os flavonóides estão presentes, em larga escala, na dieta alimentar do homem justificando o crescente interesse científico em elucidar os efeitos destas substâncias na saúde humana. Seus efeitos benéficos são descritos em diversas doenças, tais como: *diabetes melitus*, alergia, câncer, infecção viral, cefaléia, úlcera duodenal e gástrica, inflamações, cardiopatias, arteriosclerose e osteoporose (Harbone e Willians, 2000).

Alguns exemplos dos principais compostos químicos com atividade antiulcerogênica encontrados em muitas espécies de plantas são os flavonóides (quercetina e kaempferol) com atividade antiulcerogênica encontrada na *Davilla rugosa* Poiret (Guaraldo et al., 2001), a luteolina encontrada na *Syngonanthus arthotrichus* Silveira (Batista et al., 2004); com atividade antioxidante como a rutina (La Casa et al., 2000) e as antocianidinas encontradas na *Aronia melanocarpa* (Valcheva-Kuzmanova et al., 2005). A atividade antioxidante dos flavonóides é eficiente contra o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), peróxil ($ROO^{\bullet}$) e alcóxil ($RO^{\bullet}$). Essa atividade dos flavonóides está relacionada com as substituições do grupamento OH, diminuição da secreção ácida, inibição da produção de pepsinogênio e, conseqüentemente, diminuição das lesões ulcerogênicas (La Casa et al., 2000).

Na biosíntese de prostaglandinas, um fator protetor da mucosa gástrica, os flavonóides, têm efeito duplo, com baixas concentrações estimulam a síntese de PG e com altas concentrações inibem a prostaglandina sintase (PGHS). Fenóis inibem a atividade da COX-2 por competir com o ácido aracídônico no sítio de ligação (Alanko et al., 1999).

Nos ensaios fitoquímicos realizados com a *I. truxillensis* (fAq e fAc) foram detectadas várias substâncias como os flavonóides derivados do kaempferol, alcalóides, terpenos, esteróides e saponinas. Na espécie *I. suffruticosa* (fAq e fAc) foram detectados flavonóides derivados da quercetina, alcalóides, terpenos, esteróides e saponinas.

Os flavonóides derivados do kaempferol e da quercetina possuem atividade antiulcerogênica comprovada (Di Carlo et al., 1999) como os encontrados no infuso da *Maytenus aquifolium* Leaves (Vilegas et al., 1999). A quercetina possui grande capacidade de agir como *scavenger*, sequestrando EROs evitando o estresse oxidativo (Murota et al., 2004).

A quercetina é também conhecida por possuir propriedades vasoativas como promover a vasodilatação e bloqueio de agregação plaquetária (Formica e Regelson, 1995), atividade antiinflamatória (Stavric, 1994), além de prevenir a liberação de histamina pelas células gástricas (Kahraman et al., 2003).

Outras substâncias conhecidas como antiulcerogênicas são os alcalóides (Toma et al., 2004) e terpenos (Hiruma-Lima et al., 2002) que possuem atividade antiulcerogênica, tanto em modelos agudos, quanto crônicos, de indução de úlceras gástricas.

Os alcalóides bis-indólicos, conhecidos como pigmentos indigóides, foram descritos em espécies de *Indigofera aspalathoides* (Christina et al., 2003), *Indigofera tinctoria* (Steriti, 2002), *Polygonum tinctorium* (Maugard et al., 2001) e *Isatis tinctoria* (Shim et al., 1998) e constam da receita chinesa tradicional contra a leucemia chamada de Danggui Longhui Wan (mistura de *Baphicacanthus cusia*, *Polygonum tinctorium*, *Isatis indigotica*, *Indigofera suffruticosa* e *Indigofera tinctoria*) (Hoessel et al., 1999).

A indirubina é o ingrediente ativo do Danggui Longhui Wan, uma mistura de plantas que é usada na medicina tradicional chinesa para tratar doenças crônicas. Indirubina e análogos são usados no tratamento de leucemia, inibindo kinases ciclina-dependentes (Hoessel et al., 1999; Steriti, 2002).

Entre outras substâncias os estudos de meisindigo, um derivado de indirubina, indicam forte inibição da biogênese de DNA em células tumorais (Steriti, 2002). A indirubina mostrou também ação antiinflamatória pela inibição da produção do interferon-gama, uma citocina inflamatória bastante estudada (Kunikata et al., 2000).

Toxicidade é um evento complexo que apresenta um amplo espectro de efeitos, desde simples morte celular até alterações metabólicas complexas. Estudos *in vitro* fornecem importantes ferramentas para avaliar os conhecimentos sobre os efeitos citotóxicos causados por agentes químicos e para estimar esses efeitos em humanos. Os testes de citotoxicidade *in vitro* permitem a determinação da citotoxicidade basal, assim como o estabelecimento de uma faixa de concentração biologicamente ativa para um determinado agente (Eisebrand et al., 2002). Alguns testes, como por exemplo, a redução do sal de tetrazólio MTT e a incorporação do corante vermelho neutro adquiriram considerável atenção como marcadores de citotoxicidade. Esses ensaios fornecem informações sobre diferentes funções ou compartimentos celulares (Aoyama et al., 2000).

A avaliação da toxicidade das frações em células (*in vitro*) foi investigada através dos ensaios com redução do MTT e incorporação do vermelho neutro. A redução do MTT revela o correto funcionamento do sistema enzimático mitocondrial, principalmente a atividade de desidrogenases. Bernhard et al (2003) sugerem que em mitocôndrias intactas o MTT é reduzido a formazan pela enzima succinato-desidrogenase da cadeia respiratória. O teste de redução do MTT é considerado válido como medida da viabilidade celular porque mede a endocitose, um processo fundamental da maioria das células vivas. Contudo, fatores afetando a endocitose do MTT e a exocitose do formazan irão afetar a redução do MTT.

O ensaio de incorporação do vermelho neutro é baseado na capacidade de células viáveis incorporarem o vermelho neutro, um corante vital, que penetra na membrana celular por difusão passiva não-iônica e concentra-se nos lisossomos.

Nas condições utilizadas para os ensaios de citotoxicidade (*in vitro*) com MTT e vermelho neutro a perda da viabilidade celular foi praticamente ausente nas células V79 com a utilização das frações acetato da *I. truxillensis* e *I. suffruticosa* (Figuras 5 e 6). O mesmo resultado não foi observado para fração aquosa da espécie *I. truxillensis* (Figura 4), onde apresentou para o MTT uma IC_{50} = 0,99 mg/ml, entretanto, a toxicidade não foi mantida com o aumento das doses testadas.

Nos ensaios de toxicidade aguda (*in vivo*) com os extratos de *I. truxillensis* e *I. suffruticosa* não foram observadas alterações significativas nos parâmetros analisados (Tabela 3), o que demonstra baixa toxicidade de ambas as espécies nas doses testadas.

A integridade funcional da mucosa gástrica depende do equilíbrio entre fatores agressores e mecanismos protetores da mucosa gástrica e o sucesso do tratamento farmacológico de prevenir ou de curar lesões gástricas ulcerativas não depende somente do bloqueio da secreção de ácido, mas também do aumento de fatores protetores na mucosa gástrica (Dajani e Klamut, 2000). Essa habilidade de certos fatores endógenos protegerem a mucosa gástrica contra danos através de mecanismos não relacionados com inibição da secreção ácida foi primeiramente designada como “citoproteção” também mencionado rotineiramente como “gastroproteção” ou defesa da mucosa (Szabo e Goldberg, 1990; Martin e Wallace, 2006).

Os efeitos da ingestão de etanol na mucosa gástrica podem ser classificados em: 1) dano cáustico com altas concentrações de etanol (mais de 20%), que possibilitam penetrar

profundamente no plexo vascular, ocasionando estase, ruptura da parede dos vasos sanguíneos, favorecendo a hemorragia e necrose da mucosa; 2) o dano por retrodifusão de íons H^+ ocorre com baixas concentrações de álcool (8 a 20%), que podem causar esfoliação das células epiteliais da superfície, sendo mais acentuada na presença do suco gástrico, ocorrendo então o rompimento da barreira da mucosa do estômago e conseqüente retrodifusão de íons H^+ ; 3) paradoxalmente, concentrações que variam de 5 a 20% de álcool são capazes de aumentar a resistência da mucosa gástrica, ou seja, podem desencadear a citoproteção adaptativa. Irritantes moderados e parcimoniosamente utilizados estimulam a síntese de prostaglandina que, por sua vez, favorecem os processos regenerativos da mucosa (Sikiric et al., 1999).

O dano causado na mucosa gástrica, pela ingestão crônica ou aguda do etanol, pode estar associado com a geração de EROs, as quais produzem um desbalanço entre o processo oxidante e antioxidante da célula (Repetto e Llesuy, 2002). A administração do etanol pode resultar em alterações na permeabilidade da membrana com uma redução na resistência e alteração na secreção de H^+ (Vazquez-Ramirez et al., 2006). As úlceras aparecem devido a ação necrotizante do etanol na mucosa gástrica, com menor participação na secreção ácida (Lewis e Hanson, 1991; Evans, 1996).

A atividade antiulcerogênica das frações da *I. truxillensis* (fAq e fAc) e *I. suffruticosa* (fAc) foi comprovada através da proteção significativa na mucosa gástrica contra úlcera induzida por etanol em ratos. As doses eleitas como mais efetivas foram fAq 100 mg.kg⁻¹ (79%) e fAc 50 mg.kg⁻¹ (81%) obtidas da *I. truxillensis* (Tabela 4) e fAc 100 mg.kg⁻¹ (71%) obtida da *I. suffruticosa* (Tabela 5), sendo que a fAq da mesma não apresentou proteção contra as úlceras nas doses testadas. Agentes que aumentam fatores defensivos da mucosa, como prostaglandinas, protegem a mucosa gástrica contra danos induzidos pelo etanol (Morimoto et al., 1991).

Para avaliar a atividade antissecretora das frações estudadas foi realizado o estudo com o modelo de ligadura do piloro com administração via intraduodenal. A utilização desta via é importante para investigar a atividade sistêmica das frações, evitando o contato direto das substâncias testes com a mucosa gástrica dos animais. Os parâmetros avaliados foram pH e conteúdo gástrico. Nenhuma das frações apresentou alteração no pH (Tabelas 6 e 7); portanto, o mecanismo pelo qual as frações protegem a mucosa gástrica não envolve inibição da

secreção ácida gástrica. Entretanto, a fAc da *I. truxillensis* reduziu o conteúdo gástrico quando comparada ao seu respectivo controle.

A ação gastroprotetora de algumas plantas medicinais com efeito antiúlceras mas não como antisecretoras ou neutralizadoras de ácido gástrico, é desejável para o tratamento de úlcera péptica por prevenir o crescimento microbiano e a hipergastrinemia (Lamberts et al., 1993). O não envolvimento das frações estudadas com secreção ácida gástrica na proteção da mucosa nos levou a investigar os mecanismos protetores da mucosa gástrica, esses mecanismos protegem a mucosa contra inúmeros agentes agressores.

O primeiro mecanismo protetor investigado foi a produção de muco gástrico no modelo de muco gástrico aderido. O muco contribui para a defesa da mucosa por promover uma barreira física contra bactérias e age como um lubrificante reduzindo os efeitos abrasivos na mucosa, além de participar também na proteção da mucosa contra danos causados por ácidos e toxinas no lúmen (Wallace e Miller, 2000). Muitos açúcares (manitol, glicose) são potentes sequestradores de radicais livres de oxigênio, com base nisso, Cross et al. (1984) lançaram a hipótese de que o muco gástrico também é um importante sequestrador de radicais livre de oxigênio por ser rico em glicoproteínas.

De acordo com os resultados obtidos, um aumento significativo na produção de muco gástrico aderido foi observado em todas as frações testadas (Figuras 7 a,b e 8), o que possibilitou esclarecer um dos mecanismos envolvidos na gastroproteção promovida por ambas as espécies.

O próximo mecanismo protetor da mucosa gástrica investigado foi a possível interferência na produção de prostaglandina (PGE_2) promovida pelas frações estudadas.

Prostaglandinas endógenas tem um importante papel na manutenção da integridade da mucosa gástrica através da contínua secreção de HCO_3^- e produção de muco no estômago e duodeno (Brozowski et al., 2000). Além disso, as prostaglandinas estão envolvidas com a citoproteção adaptativa induzida por agentes irritantes moderados (Takeuchi et al., 2001). As PG's, em especial a PGE_2 e seus análogos, exercem ação protetora contra os danos diretos de agentes necrotizantes gástricos estando, portanto, relacionadas à citoproteção (Robert et al., 1979).

As DAINES, como a indometacina, aspirina, piroxicam e outras, induzem ulcerações na mucosa gástrica principalmente por inibição na síntese de prostaglandina e também por

atuarem em contato direto com a mucosa gástrica potencializando a capacidade de retrodifusão do íon hidrogênio, levando à diminuição da resistência da barreira gástrica e redução do fluxo sanguíneo local (Bjorkman, 1996); e causam ainda indução da adesão de neutrófilos no endotélio vascular (Wallace, 1997). DAINÉ diminuiu a síntese de muco e bicarbonato e degrada a glicoproteína que faz parte da estrutura do muco (Bagshaw et al., 1987).

De acordo com os resultados obtidos para *I. truxillensis* e *I. suffruticosa* nenhuma das frações estudadas promoveu aumento na produção de PGE₂ quando comparadas aos seus respectivos controles (sham) (Figuras 9 e 10), o que indica que os flavonóides e a mistura de outras substâncias presentes nessas frações garantem a proteção da mucosa, independentemente do aumento na produção de prostalgandina.

Como era esperado, nos animais tratados com indometacina, um bloqueador não seletivo da COX-1 e COX-2, e tratados com as frações (fAq da *I. truxillensis* e fAc da *I. suffruticosa*) houve diminuição na produção de PGE₂. Entretanto, nos grupos de animais pré-tratados com indometacina e tratados com fAc da *I. truxillensis* foram mantidos os níveis normais na produção de PGE₂. Isso pode ser parcialmente explicado pelos flavonóides presentes nessa fração (Figura 9 b).

Assim, alguns flavonóides podem aumentar a liberação de óxido nítrico (ON) (Freedman et al., 2001). Exemplo disso foi reportado para o resveratrol, um composto fenólico, que pode causar “*upregulation*” na liberação de ON (Wallerath et al., 2002). O óxido nítrico por sua vez pode promover um aumento na produção dos metabólitos da COX como a prostaglandina (Toriyabe et al., 2004). A fAc da *I. truxillensis* é rica em compostos fenólicos, provavelmente esses compostos podem modular o ON mantendo a produção da PGE₂ mesmo quando administrado o inibidor da COX (indometacina).

Ainda que alguns mediadores químicos participem da produção coordenada e efetiva da resposta na mucosa à danos, há uma influência dominante da prostaglandina e do ON nesse processo; tanto PGs quanto ON, são moduladores essenciais na defesa da mucosa. Essas substâncias influenciam cada um dos componentes de defesa da mucosa inibindo a secreção ácida, estimulando a secreção de muco e de bicarbonato e elevando o fluxo sanguíneo da mucosa, o qual promoverá tamponamento da acidez e remoção de algumas toxinas que

atravessam a mucosa, proporcionando a aceleração da cicatrização da úlcera (Wallace e Miller, 2000).

Slomiany e Slomiany (2002) demonstraram que o ON é um importante regulador da secreção de muco gástrico no estômago. Na cicatrização, o ON é um importante reparador da mucosa, provavelmente pela sua habilidade de aumentar o depósito de colágeno pelos fibroblastos além de estimular a angiogênese (Wallace e Miller, 2000).

Para avaliar o envolvimento do ON com a gastroproteção de ambas as frações foi utilizado um inibidor da óxido nítrico sintase, N^ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), um análogo da L-arginina; o mesmo é hidrolisado em L-nitroarginina que inibe a atividade da óxido nítrico sintase (Pfeiffer et al., 1996) e agrava as úlceras induzidas pelo etanol (Kawano e Tsuji, 2000).

Nos experimentos onde avaliou-se a participação do ON como mecanismo protetor da mucosa gástrica foi utilizado o L-NAME com o objetivo de reduzir os mecanismos protetores da mucosa. Foi observado uma redução significativa no efeito protetor da mucosa gástrica contra lesões induzidas pelo etanol em animais tratados com fAq obtida da *I. truxillensis* (Figura 11 a). Isso mostra que o ON está envolvido na proteção da mucosa gástrica, ou seja, o efeito da fração é dependente da liberação/produção de ON. O mesmo resultado não foi observado para fAc da *I. truxillensis* e fAc da *I. suffruticosa*; ambas as frações mantiveram a proteção, mesmo com a retirada do ON, o que indica que o ON não está diretamente envolvido na proteção da mucosa gástrica por essas frações (Figuras 11 b e 12).

O estômago está exposto constantemente a agentes agressivos da mucosa gástrica. Um dos fatores que contribui com a integridade da mucosa são os compostos sulfidríla (SH) (Abdel-Salam et al., 2001), particularmente quando EROs estão envolvidas no processo de danos ao tecido (Kimura et al., 2001).

Foi demonstrado que a indução de úlcera por etanol na mucosa gástrica está associada à redução dos níveis de SH, especialmente glutatona, reduzindo a gastroproteção (Szabo et al., 1987).

Os animais que receberam o agente bloqueador de compostos sulfidríla, NEM (N-etilmaleimida) apresentaram um aumento significativo nas úlceras gástricas causadas pelo etanol, como era esperado. Como mostram as Figuras 13 (a) e (b) e 14 o pré-tratamento com

NEM reduziu o efeito gastroprotetor de ambas as espécies; portanto, a gastroproteção dessas frações contra úlceras induzidas por etanol depende da participação de compostos sulfidríla.

O modelo de úlcera gástrica induzida por isquemia e reperfusão (I/R) é utilizado para avaliar resposta de fármacos em um processo de ulcerogênese sem utilização de agentes químicos (Cabeza et al., 2001). Estudos demonstram que a isquemia enfraquece a barreira da mucosa gástrica aumentando a difusão de ácido causando danos à mucosa (Kawai et al., 1994). Na isquemia ocorre uma redução do fluxo sanguíneo no órgão induzindo uma sequência de reações químicas que resulta em disfunção e necrose celular e o aparecimento de metabólitos tóxicos contribuindo para a morte celular (De Groot, 2005).

Após a reperfusão, as EROs são geradas, especialmente no sistema xantina-oxidase e na ativação de neutrófilos, causando peroxidação lipídica no tecido; com isso, a combinação com a secreção ácida leva a danos na mucosa gástrica (Wada et al., 1996). Esses danos à mucosa gástrica na fase da reperfusão, considerados mais severos do que durante a isquemia, inclui participação de espécies reativas de oxigênio incluindo as biomoléculas que atacam lipídios de membrana, ácidos nucleicos, enzimas e receptores, ocasionando alterações na estrutura e na atividade celular, no transporte de proteínas e outros (Cerqueira et al., 2005).

Os possíveis fatores que causam danos na I/R são: 1) o influxo de íons cálcio nas células; 2) o aumento na produção de EROs, como o $O_2^{\bullet-}$, $OH^{\bullet}$, e H_2O_2 (Schoenberg e Beger 1993).

Nos experimentos de isquemia e reperfusão (I/R), os resultados obtidos demonstram que todas as frações testadas, fAq (82%) e fAc (95%) da *I. truxillensis* (Tabela 8) e fAc (96%) da *I. suffruticosa* (Tabela 9), protegem a mucosa gástrica contra lesões gástricas causadas pela I/R. Essa proteção pode ser atribuída à presença de flavonóides nas espécies testadas, sendo que esses compostos apresentam atividade antioxidante por impedir a formação de radicais livres (La Casa et al., 2000).

EROs são continuamente produzidas durante os eventos fisiológicos normais, sendo removidas pelo mecanismo de defesa antioxidante. Em condição patológica, EROs resultam em peroxidação lipídica e dano oxidativo. O desbalanço entre EROs e defesa antioxidante, leva à modificação oxidativa na membrana celular ou nas moléculas intracelulares (El-Habit et al., 2000). A integridade da mucosa gástrica depende de uma variedade de fatores, como a manutenção da microcirculação, secreção de muco e atividade de enzimas antioxidantes, como

a SOD e GPx. Esses fatores também implicam na gastroproteção contra agentes irritantes exógenos e endógenos na mucosa gástrica (Kwiecién et al., 2004).

As membranas celulares são alvos freqüentes de EROs por serem ricas em complexos enzimáticos pertencentes às cadeias redutoras de O_2 . A composição majoritariamente de ácidos graxos poliinsaturados (AGP) nas membranas celulares propicia a formação de sítios geradores de EROs, fazendo com que ocorra lipoperoxidação (LPO) pelo fácil acesso dos EROs às insaturações dos ácidos graxos (Buege e Aust, 1989; McCord, 2000; Andreoli, 2000). Este processo degenerativo envolvendo formação e propagação de radicais lipídicos peroxil e alcóxil ($ROO^\bullet$, $RO^\bullet$), captação de O_2 e rearranjo de duplas ligações dos AGP altera a integridade e fluidez das membranas (Buege e Aust, 1989).

A primeira enzima antioxidante da mucosa gástrica é a SOD, que cataliza a desmutação do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 que é menos nocivo. O segundo passo do metabolismo da H_2O_2 depende da atividade da GPx em cooperação com a GR. A redução do H_2O_2 em água pela GPx é acompanhado pela conversão da glutatona na forma reduzida (GSH) para a forma oxidada (GSSG) (Kwiecién et al., 2002).

Vários compostos como flavonóides, taninos, cumarinas, e mais recentemente, procianidinas são potentes sequestradores de EROs, e vem sendo estudado como drogas para tratamento de doenças causadas por EROS (Czinner et al., 2001).

Com o intuito de avaliar o papel das frações frente à atividade antioxidante, o passo seguinte foi o de investigar as enzimas envolvidas nesse processo, como a SOD, GPx e GR. O tratamento com a fAc da *I. truxillensis* promoveu um aumento na atividade das três enzimas (SOD, GPx e GR) (Tabela 10). A fAq da *I. truxillensis* aumentou significativamente a SOD e GR (Tabela 10). Os resultados indicam que fAc obtida da *I. truxillensis*, foi eficaz na manutenção dessas enzimas. Por outro lado, o tratamento com fAq além de ser eficaz para a manutenção da SOD, aumentou a atividade da GR em 5.6 vezes quando comparada com a salina. A fAc da *I. suffruticosa* aumentou significativamente a atividade da GR, quando comparado ao respectivo controle (Tabela 11).

A atividade antioxidante dessas frações confirmou a proposta de Di Carlo et al. (1999), que a atividade antioxidante é um dos principais mecanismos antiulcerogênicos relacionados à presença de flavonóides em amostras vegetais.

O passo seguinte foi avaliar o potencial de cura (durante 14 dias), ou seja, o potencial das frações em acelerar o processo de cicatrização de úlceras previamente induzidas por ácido acético a 30%. A úlcera induzida por ácido acético em ratos é um dos modelos em que mais se assemelha a úlcera gástrica em humanos Takagi et al. (1969). As fases de cicatrização da úlcera obedecem a seguinte ordem: 1) de 0 a 3 dias, fase do desenvolvimento da úlcera com necrose do tecido, implantação da úlcera, infiltração inflamatória e formação da margem da úlcera; 2) de 3 a 10 dias, fase rápida de cicatrização envolvendo migração rápida de células epiteliais e contração da base da úlcera; 3) de 10 a 20 dias, fase lenta da cicatrização que compreende angiogênese, remodelação dos tecidos de granulação e completa re-epitelização da cratera da úlcera (Schmassmann, 1998).

A úlcera gástrica é resultado de um processo de necrose e isquemia da mucosa; a área do tecido necrosado não recebe mais nutriente, isso porque ocorre dano microvascular como constrição e oclusão vascular. O tecido necrosado libera leucotrieno que atrai leucócitos e macrófagos; estes últimos fagocita o tecido necrosado liberando citocinas pró-inflamatória como $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ entre outros (Tarnawski, 2005).

Histologicamente a úlcera gástrica consiste em duas estruturas: a margem da úlcera formada pela borda adjacente não necrosada e que delimita a área da lesão, e a base ou cratera da úlcera apresentando o tecido necrosado. A cicatrização da úlcera é um processo complicado o qual envolve migração e proliferação celular, re-epitelização, angiogênese e formação de escara. Todos esses processos são controlados pelos fatores de crescimento, fatores de transcrição e citocinas (Tarnawski, 2000).

O tecido de granulação é desenvolvido na base da úlcera entre 48 e 72 h após a implantação da lesão. O tecido de granulação consiste da proliferação de células do tecido conjuntivo como macrófagos, fibroblastos e proliferação de células endoteliais, formando microveias através do processo de angiogênese (Tarnawski et al., 1991a). A migração dos fibroblastos e a proliferação celular na lesão são mediadas pelos fatores de crescimento $\text{TGF}\beta$, PDGF, EGF e FGF e por citocinas principalmente $\text{TNF}\alpha$ e IL-1 (Cotran et al., 1999).

O crescimento de um tecido de granulação e a formação de uma nova rede microvascular, através da angiogênese, é estimulada por FGF, VEGF, PDGF, angioproteínas e citocinas (Tarnawski et al., 2001).

Nos resultados dos experimentos de úlcera induzida por ácido acético foi observado que nos animais tratados durante 14 dias com fAc da *I. truxillensis* e fAc da *I. suffruticosa* houve redução na área da lesão, com taxa de cura de (38%) e (40%), respectivamente (Tabela 12 e 13). O mesmo resultado não foi observado para a fAq da *I. truxillensis*. Os órgãos (coração, fígado, rins e pulmão) foram pesados e nenhuma alteração foi constatada quando comparados aos respectivos controles (dados não apresentados). Na mucosa, é possível observar grande quantidade de produto de secreção no interior das glândulas, principalmente nos animais tratados com Cimetidina e a fAq e fAc da *I. truxillensis* e fAc da *I. suffruticosa*; a técnica de PAS realizada confirmou que tal produto de secreção é muco (Figura 18). O muco recobre toda a superfície das células das glândulas tubulosas e é um fator importante no processo de cicatrização das úlceras por estar correlacionado à proteção de células contra danos causados pelo pH ácido e potencial proteolítico das secreções gástricas (Tarnawski et al., 1995; Valcheva-Kuzmanova et al., 2005). Esse resultado foi confirmado pela medida da concentração de muco aderido demonstrado nas Figuras 7 e 8.

Com o intuito de avaliar a qualidade da cicatrização promovida por essas frações foram realizados cortes histológicos corados em H&E e ensaios de imunohistoquímica para proteínas envolvidas no processo de cicatrização (Heat Shock Protein – HSP 70 e Proliferating Cell Nuclear Antigen - PCNA). A qualidade da cicatrização da mucosa gástrica é um fator importante para evitar a reincidência da úlcera gástrica; tal qualidade pode ser comprometida se, durante a cicatrização, ocorrer dilatação de glândulas, aumento do tecido conjuntivo, desorganização na rede microvascular e aumento da permeabilidade do capilar (Tarnawski et al., 1991b).

Nos animais com úlcera induzida por ácido acético, (Figura 16 em coloração H&E), foi possível observar que nos controles salina e Tween 80[®] 12%, a renovação epitelial na margem da úlcera e a formação de glândulas é feita de forma desordenada, sendo que nos animais tratados com cimetidina a renovação da mucosa gástrica é mais organizada. O tratamento com a fAq e fAc da *I. truxillensis* e fAc da *I. suffruticosa*; promoveu um alongamento das glândulas mucosas localizadas na região de regeneração. O tratamento com cimetidina do grupo Tween 80[®] 12%, demonstrado na Figura 16 (e) e (h), não se observou tal organização.

Nos animais tratados com a fAc da *I. truxillensis* a cratera da úlcera foi cicatrizada quase que completamente, sendo que a fAc da *I. truxillensis* e a fAc da *I. suffruticosa* reduziram apenas parcialmente a área da lesão.

HSPs são necessárias para vários eventos celulares como transporte de proteínas; essas proteínas são chaperonas moleculares que também protegem as células dos efeitos citotóxicos da agregação de proteína produzida por vários tipos de estresse (Craig et al., 1994). A expressão da HSPs é geralmente induzida após exposição ao choque quente, metais pesados, agentes químicos e estresse patofisiológico (Lindquist, 1986). Especialmente a HSP 70 é induzida através de estresse por imersão em água, hipertermia e drogas protetoras da mucosa gástrica, sugerindo que HSP 70 está relacionada com proteção na mucosa gástrica (Rokutan, 2000). Essa proteína tem a função de proteger os processos homeostáticos celulares de injúrias ambientais e fisiológicas através da preservação de estruturas de proteínas normais e reparo ou remoção de proteínas danificadas (Tytell e Hooper, 2001).

As HSPs estão envolvidas com o processo de cicatrização de úlcera por diferentes mecanismos, modulando ou regulando proteínas envolvidas com crescimento e diferenciação celular (Glick, 1995). Foi observado a expressão de HSP 70 na fase lenta da cicatrização de úlceras na mucosa gástrica (Tsukimi et al., 1994). Consequentemente, o aumento da expressão de HSP 70 na margem da úlcera sugere o envolvimento dessa proteína na regeneração da mucosa gástrica. HSP 70 parece ser encontrada em células em crescimento na margem da úlcera; portanto, existe uma forte relação entre a expressão de HSP 70 e proliferação celular (Zhao e Shen, 2005).

Tsukimi et al. (2001) descreveram que o nível de HSP 70 expresso na mucosa normal é pequeno; entretanto, durante a cicatrização da úlcera a HSP 70 é expressa na base dela. No tecido lesado ocorrem respostas inflamatórias onde são produzidas citocinas e o nível da inflamação e a expressão de HSP 70 na margem da úlcera diminuem conforme avança a cicatrização. Além disso, encontrou-se forte relação entre a expressão de HSP 70 e um marcador de proliferação celular como o PCNA. Baseado nisso, sugere-se que as proteínas HSP 70 são expressas nas células em proliferação e estão envolvidas na regeneração da mucosa na última fase da cicatrização.

No ensaio de imunohistoquímica para HSP 70, os resultados mostrados na Figura 20 apresentam marcação de HSP 70 nos controles, como era esperado através do processo de

cicatrização normal do tecido; nos animais tratados com fAq da *I. truxillensis* e fAc da *I. suffruticosa*, o mesmo acontece indicando que a HSP 70 está envolvida no processo de cicatrização da mucosa gástrica desses animais. Entretanto, não foi observada marcação de HSP 70 nos animais tratados com fAc da *I. truxillensis*, uma vez que não há exposição da submucosa nesse grupo, provavelmente pelo avançado estágio de cicatrização do tecido promovido por essa fração. Esses resultados confirmam os estudos feito por Tsukimi et al. (2001), onde a HSP 70 é expressada na base das úlceras gástricas em desenvolvimento.

A proliferação celular é necessária para reconstituição da mucosa gástrica. Estudos sugerem que o balanço entre proliferação e apoptose celular seja de grande importância para manter a integridade da mucosa gástrica (Reed, 2000); um desbalanço entre apoptose e proliferação celular pode resultar em perda celular, levando a formação de úlceras ou um acúmulo celular com o desenvolvimento de um câncer (Khoda et al., 1999).

Nos resultados demonstrados na Figura 22, imunohistoquímica para PCNA, houve marcação para PCNA nos animais tratados com fAq da *I. truxillensis* (embora essa fração não tenha reduzido a área da lesão), e em animais tratados com fAc da *I. suffruticosa*, indicando que houve proliferação celular no processo de cicatrização promovido por essas frações. Como era esperado, pelo processo de cicatrização normal do tecido, nos animais controle (salina, Tween 80[®] 12% e cimetidina) também ocorreu marcação para PCNA. Entretanto, na fAc da *I. truxillensis*, não foi observado marcação para PCNA, provavelmente devido ao processo avançado de cicatrização do tecido promovido por essa fração.

Os resultados obtidos com as frações estudadas da *I. truxillensis* e *I. suffruticosa* são promissores apresentando atividade antiulcerogênica nos modelos testados, através de um mecanismo de ação envolvendo aumento e modulação de fatores protetores da mucosa gástrica, atividade antioxidante e cicatrização de úlcera gástrica.

As informações da literatura justificam a continuidade do estudo de espécies de *Indigofera*, juntamente, com os nossos resultados farmacológicos e químicos.

X. Análise comparativa entre as frações da *I. truxillensis* e *I. suffruticosa*

Tabela 14: Análise comparativa entre as frações da *I. truxillensis* e *I. suffruticosa*

<i>Modelos experimentais</i>	Indigofera truxillensis		Indigofera suffruticosa
	fAq	fAc	fAc
Citotoxicidade	P	A	A
Úlcera induzida por etanol – <i>atividade antiulcerogênica</i>			
Ligadura de piloro – <i>secreção ácida</i>			
Muco aderido – <i>gastroproteção</i>			
Produção de PGE ₂ – <i>gastroproteção</i>			
Óxido nítrico – <i>gastroproteção</i>			
Compostos sulfidríla – <i>gastroproteção</i>			
Isquemia/Reperusão – <i>mecanismo antioxidante</i>			
Superóxido dismutase (SOD) – <i>mecanismo antioxidante</i>			
Glutathiona peroxidase (GPx) – <i>mecanismo antioxidante</i>			
Glutathiona redutase (GR) – <i>mecanismo antioxidante</i>			
Ácido acético – <i>cicatrização</i>			
PAS – <i>cicatrização</i>			
PCNA – <i>cicatrização</i>			
HSP 70 – <i>cicatrização</i>			

P = presente; A = ausente.

- Positivo (*mecanismo protetor relacionado à gastroproteção exercida pela fração*);

- Negativo (*mecanismo protetor não relacionado à gastroproteção exercida pela fração*);

XI. Conclusões parciais

***Indigofera truxillensis* Kunth**

- A fAq e fAc da *I. truxillensis* não apresentaram efeitos tóxicos nos ensaios de toxicidade aguda (*in vivo*);
- Nos ensaios de citotoxicidade (*in vitro*), a fAc não apresentou efeito tóxico nas células nas condições testadas; o mesmo não foi observado para fAq que apresentou toxicidade;
- Ambas as frações (fAq) e (fAc) obtidas da *I. truxillensis* protegem a mucosa gástrica contra lesões induzidas pelo modelo de etanol absoluto;
- O mecanismo protetor das frações contra lesões gástricas não envolve alteração do pH.

As frações agem por mecanismos distintos:

- Na gastroproteção da fAq os mecanismos envolvidos são o aumento na produção de muco, a presença de compostos sulfidríla, óxido nítrico e mecanismos antioxidantes com o aumento da atividade das enzimas SOD e GR;
- Houve uma indução de HPS 70 e ocorreu proliferação celular na margem e na base da úlcera, provavelmente pelo processo de cicatrização normal do tecido, sendo que a fAq não reduziu a área ulcerada na mucosa gástrica;
- Na gastroproteção da fAc os mecanismos envolvidos são o aumento de muco, presença de compostos sulfidríla e mecanismos antioxidantes com o aumento da atividade de enzimas como SOD, GPx e GR;
- O mecanismo antioxidante de ambas as frações pode ser atribuído à presença de compostos fenólicos como os flavonóides glicosilados;
- A fAc apresentou um percentual de cicatrização da úlcera (38%) gástrica induzida por ácido acético;
- Não foi observado alteração tanto na indução de HSP 70 quanto na proliferação celular, provavelmente devido ao estágio avançado da cicatrização da úlcera promovida por essa fração;
- A atividade gastroprotetora da fAc foi mais efetiva que a fAq, provavelmente pela diversidade de compostos encontrados nessa fração.

***Indigofera suffruticosa* Mill**

- A fAc da *I. suffruticosa* não apresentou efeitos tóxicos nos ensaios de toxicidade aguda (*in vivo*);
- Nos ensaios de citotoxicidade (*in vitro*), a fAc não apresentou efeito tóxico nas células nas condições testadas.
- A fração acetato (*I. suffruticosa*) protege a mucosa gástrica contra lesões induzidas pelo modelo de etanol absoluto;
- O mecanismo protetor da fração contra lesões gástricas não envolve alteração do pH;
- Na gastroproteção da fAc os mecanismos envolvidos são o aumento de muco, presença de compostos sulfidril e mecanismos antioxidantes com o aumento da atividade da enzima GR;
- A fAc apresentou um percentual de cicatrização na úlcera (40%) induzida por ácido acético;
- Houve expressão de HSP 70 e ocorreu proliferação celular na margem e base da úlcera; essa indução, provavelmente, é um dos mecanismos pelo qual a fração apresentou esse percentual de cicatrização.

11. Conclusão final

De acordo com os resultados obtidos, as frações aquosa e acetato da *Indigofera truxillensis* e acetato da *Indigofera suffruticosa* apresentam, embora diferenciados, mecanismos envolvidos com aumento ou modulação de fatores protetores, antioxidantes e mecanismo de cicatrização da mucosa gástrica. Essa diferenciação pode ser atribuída às diferentes concentrações das diversas substâncias encontradas nas frações.

XII. Referência bibliográfica

1. Abdel-Salam OM, Czimmer J, Debrececi A, Szolcsanyi J, Mozsik G. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. *J Physiol Paris*, 2001; 95(1-6): 105-27.
2. Aihara T, Nakamura E, Amagase K, Tomita K, Fujishita T, Furutani k, Okabe S. Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: past, present, and future. *Pharmacol Ther*, 2003; 98: 109-27.
3. Alanko J, Riutta A, Holm P, Mucha I, Vapatalo H, Metsa-Ketela T. Modulation of arachidonic acid metabolism by phenols: relation to their structure and antioxidant/prooxidant properties. *Free radical Biology and Medicine*, 1999; 26: 193-201.
4. Alarcon de La Lastra C, Martin MJ, Motilva V. *Pharmacology*, 1994; 48: 56-62.
5. Alarcon de La Lastra AC, Martin MJ, Motilva V, et al. Gastroprotection induced by silymarin, the hepatoprotective principle of *Silybum marianum* in ischemia-reperfusion mucosal injury: role of neutrophils. *Planta Med*, 1995; 61: 116-119.
6. Allen A, Flemstrom G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. Review. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005; 288(1):C1-19.
7. Alper J. Ulcers as an infectious disease. *Science*, 1993; 260 (9): 159-160.
8. Andreoli TE. Physiology in medicine: Free Radicals and oxidative stress. *The Amer J Med*, 2000; 108: 650-651.
9. Aoyama H, Melo PS, Granjeiro PA, Haum M, Ferreira CV. Cytotoxicity of okadaic acid and kinetic characterization of protein tyrosine phosphatase activity in V79 fibroblasts. *Pharm Pharmacol Commun*, 2000; 6: 331-334.
10. Aranha C, Bacchi O, Leitão-Filho HF. Plantas invasoras de culturas. Instituto Campineiro de Ensino Agrícola - Campinas, 1982; v.2.
11. Athmann C, Zeng N, Scott DR, Sachs G. Regulation of parietal cell calcium signaling in gastric glands. *Am J Physiol*, 2000; 279: 1048-1058.
12. Bagchi D, Ray SD, Bagchi M, Preuss HG, Stohs SJ. Mechanistic pathways of antioxidant cytoprotection by a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. *Indian J Exp Biol*, 2002; 40(6): 717-26.
13. Bagshaw PF, Munster DJ, Wilson JG. Molecular weight of gastric mucus glycoprotein is a determinant of the degree of subsequent aspirin induced chronic gastric ulceration in the rat. *Gut*, 1987; 28: 287-293.

14. Barnick PD, Chen QP, Xu YA, Thom SR. Nitric oxide inhibits neutrophil $\beta 2$ integrin function by inhibiting membrane-associated cyclic GMP synthesis. *J Cell Physiol*, 1997; 172: 12-24.
15. Baron JH, Barr J, Batten J, Sidebotham R, Spenser J. Acid, Pepsin and mucus secretion in patients with gastric and duodenal ulcer before and after colloidal bismuth subcitrate. *Gut*, 1986; 27: 486-490.
16. Barrowman JA, Pfeiffer CJ. Carbenoxolone: a critical analysis of its clinical value in peptic ulcer. In: *Drugs and Peptic Ulcer*, 1982; Vol 1. Ed. by C.J. Pfeiffer. CRC Press, Boca Raton, 123-132.
17. Batista LM, Almeida ABA, Magri LP, Toma W, Clavo TR, Vilegas W, Souza-Brito ARM. Gastric antiulcer activity of *Syngonanthus arthrotricus* Silveira, *Biol Pharm Bull*, 2004; 27:328-332.
18. Bauer H, Mark-Hermann E. Therapy with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Orthopade*, 2003; 32: 1088-1099.
19. Beckert S, Class N, Farrahi F, Coerper S. Growth hormone enhances gastric ulcer healing in rats. *Med Sci Monit*, 2004; 10: 255-258.
20. Behmer OA, Tolosa EMC, Freitas Neto AG. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. EDART, Editora da Universidade de São Paulo, 1976; 241.
21. Belaiche J, Burrete A, De Vos M, Louis E, Huybrechts M, Deltenre M. Observational surgery of NSAID-related upper gastro-intestinal adverse events in Belgium. *Acta Gastroenterology Belgium*, 2002; 65, 65-73.
22. Benthall GM. Leguminosae 1. In *Flora Brasiliensis* (C. F. von Martius, S. Endlicher & I. Urban, eds.). Frid Fleischer Monachii Lipsiae, 1859; V.15.
23. Berberian PA, Myers W, Tytell M, Challa V, Bond MG. Immunohistochemical localization of heat shock protein-70 in normal-appearing and atherosclerotic specimens of human arteries. *Am J Pathol*, 1990; 136: 71-80.
24. Bernhard D, Schwaiger W, Crazzolaro R, Tinhofer I, Kofler R, Csordas A. Enhanced MTT-reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells. *Cancer Lett*, 2003; 195: 193-199.
25. Berstad K, Berstad A. *Helicobacter pylori* infection in peptic ulcer disease. *Scand J Gastroenterol*, 1993; 28: 561-567.
26. Bjorkman DJ. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug-Induced Gastrointestinal Injury. *The Am J of Medicine*, 1996; 101: 25-32.

27. Black JW, Duncan WAM, Durant CJ, Ganellin CR, Parsons EM. Definition and antagonism of histamine H₂ receptors. *Nature*, 1972; 236: 385-390.
28. Blake D, Winyard PG. Immunopharmacology of Free Radical Species. *Academic Press*, 1995; London, 301.
29. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, 1994; 368: 850-853.
30. Borenfreund E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *J Tiss Meth*, 1984; 9: 7-9.
31. Borrelli F, Izzo AA. The plant kingdom as a Source of Anti-ulcer Remedies. *Phytotherapy Research*, 2000; 14, 581-591.
32. Bravo R, Flank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . *Nature*, 1987; 326: 515-517.
33. Brown JF, Keates AC, Hanson PJ, Whittle BJR. Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells. *Am J Physiol*, 1993; 265: 418-422.
34. Brozozowski T, Konturek PCH, Konturek SJ, et al. Involvement of cyclooxygenase (COX-2) products in acceleration of ulcer healing by gastrin and hepatocyte growth factor. *J Physiol Pharmacol*, 2000; 51: 751-773.
35. Brozozowski T, Konturek PC, Konturek SJ. Classic NSAID and selective cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 inhibitors in healing of chronic gastric ulcers. *Microsc Res Tech*, 2001; 53:343-353.
36. Brozozowski T. Experimental production of peptic ulcer, gastric damage and cancer models and their use in pathophysiological studies and pharmacological treatment - Polish achievements. *J Physiol Pharmacol*, 2003; 54: 99-126.
37. Bruton LL. Agents for control of gastric acidity and treatment of peptic ulcers. In: Goodman and Gilman's – *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Ed. By J. G. Hardman, L. E. Limbird, P. B. Molinoff, R. W. Ruddon and A. G. Gilman, 9th edition, Int. Edition, McGraw-Hill, New York, 1996; 663-691.
38. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods enzymol*, 1989; 303-310.
39. Cabeza J, Motilva V, Martín MJ, Alarcon De La Lastra C. Mechanisms involved in gastric protection of melatonin against oxidant stress by ischemia-reperfusion in rats. *Life Science*, 2001; 68: 1405-1415.
40. Calixto JB. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Cienc Cult*, 2003; 55: 37-38.

41. Calvo TR. Prospecção Químico-Farmacológica em Plantas Superiores: Alchornea (Euphorbiaceae) e Indigofera (Fabaceae). Tese de Doutorado em Química do Instituto de Química de Araraquara, Unesp (*previsão de defesa – primeiro semestre de 2007*).
42. Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*, 1985; v.113, p. 484–499.
43. Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cirurgica Brasileira*, 2005; 20: 336-343.
44. Chan FK, Sung JJ. Role of acid suppressants in prophylaxis of NSAID damage. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2001; 15: 433-45.
45. Chandrasekharan NV, Daí H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. *Proc Natl Acad Sci*, 2002; 99: 13926-13931.
46. Chavez, R. R. Gastric acid. *Rev Gastroenterol*, 1996; 16(3): 249-253.
47. Christina AJM, Jose MA, Robert SJH, Kothai R, Chidambaranatham N, Muthumani P. Effect of *Indigofera aspalathoides* against Dalton's ascitic lymphoma. *Fitoterapia*, 2003; 280-283.
48. Collares-Buzato CB, Arana S. Células: uma abordagem multidisciplinar. Células Oxíntica. In: Carvalho, H.F.; Collares-Buzato, C.B. (org). Ed: Manole, Barueri, 1ª edição, 2005; 112-125.
49. Cook NC, Samman S. Review article: Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J of Nutrition and Biochemistry*, 1996; 7: 66-76.
50. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Gastric ulceration. In Robbins Pathologic Basis of Disease. 5th Edition. RS Cotran, V Kumar, SL Robbins (eds). Philadelphia, Saunders, 1999; 773-777.
51. Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. Natural products in drug discovery and development. *J of Natural Products*, 1997; 60: 52-60.
52. Craig EA, Weissman JS, Horwich AL. Heat shock proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell. *Cell*, 1994; 12: 365-372.
53. Cross CE, Halliwell B, Allen A. Antioxidant protection: a function of tracheobronchial and gastrointestinal mucus. *Lancet*, 1984; 1: 328-330.
54. Curtis GH, Macnaughton WK, Grant GD, et al. Intraluminal pH modulates gastric prostaglandin synthesis: *Can J Physiol Pharmacol*, 1995; 73: 130-134.

55. Czinner E, Hagymasi K, Blazovics A, Kery A, Szoke E, Lemberkovics E. The *in vitro* effect of *Helichysi flos* on microsomal lipid peroxidation. *J of Ethnopharmacology*, 2001; 77: 31-35.
56. Dajani EZ, Klamut MJ. Novel therapeutic approaches to gastric and duodenal ulcers: an update. *Expert Opin Invest Drugs*, 2000; 9: 1537-1544.
57. De Groot H. Injury to visceral organs by ischemia and reperfusion. Review. Processes in pathogenetic networks. *Zentralbl Chir*, 2005; 130(3): 202-12.
58. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*, 1986; 89: 271-277.
59. Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Review article: Flavonoids old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci*, 1999; 65: 337-353.
60. D'Souza RS, Dhume VG. Gastric cytoprotection. *Indian J Physiol Pharmacol*, 1991; 2:88-98.
61. Edkins J. The chemical mechanisms of gastric secretion. *J Physiol*, 1906; 34: 133-144.
62. Eglen RM, Choppin A, Watson N. Therapeutic opportunities from muscarinic receptor research. *TINS*, 2001; 22, 409-414.
63. Eisebrand G, Pool-Zobel B, Baker V, Balls M, Blaauboer BJ, Boobis A, Carere A, Kevekordes S, Lhuguenot JC, Pieters R, Kleiner J. Methods of *in vitro* toxicology. *Food Chem Toxicol*, 2002; 40: 193-236.
64. El-Habit OH, Saada HN, Azab KS, Abdel-Rahman M, El-Malah DF. The modifying effect of β -carotene on gamma radiation-induced elevation of oxidative reactions and genotoxicity in male rats. *Mutat Res*, 2000; 466, 179-86.
65. Evans F. Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material, *The gastro-intestinal Tract*, 1996; 24-45.
66. Formica JV, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*, 1995; 33: 1061- 1080.
67. Fortner JF, Fortner GG. "Physiology of the Gastrointestinal Tract," ed. by Johnson L. R., Raven Press, New York, 1994; 1255-1283.
68. Freedman JE, Parker C, LI L, Perlman JA, Frei B, Ivanov V, Deak LR, Iafrati MD, Folts JD. Select Flavonoids and Whole Juice From Purple Grapes Inhibit Platelet Function and Enhance Nitric Oxide Release. *Circulation*, 2001; 103: 2792-2798.

69. Fukushima Y, Ishikawa T, Saitoh T, Tateishi K, Ogihara T, Fujishiro M, Shojima N, Honda M, Kushiyama A, Anai M, Sakoda H, Ono H, Onishi Y, Otsuka H, Katagiri H, Nagai R, Omata M, Asano T. Extremely early onset of ranitidine action on human histamine H2 receptors expressed in HEK293 cells. *Digestion*, 2003; 68(2-3): 145-52.
70. Garner A, Flemstrom G, Heylings JR. *Gastroenterology*, 1979; 77: 451-457.
71. Glick BS. Can HSP 70 proteins act as force-generating motors? *Cell*, 1995; 80: 11-14.
72. Go MF. What are the host factors that place an individual at risk for *Helicobacter pylori*-associated disease? *Gastroenterology*, 1997; 113: 15-20.
73. Gracioso JS, Vilegas W, Hiruma-Lima CA, Souza Brito ARM. Effects of tea from *Turnera ulmifolia* L. On mouse gastric mucosa support the Turneraceae as a new source of antiulcerogenic drugs. *Biol Pharm Bull*, 2002; 25:487-491.
74. Guaraldo L, Sertie JAA, Bacchi EM. Antiulcer cation of the hydroalcoholic extract and fractions of *Davilla rugosa* Poirlet in the rat, *J of Ethnopharmacol*, 2001; 76: 191-195.
75. Guo JS, Cho CH, Lam-Lui ES, Coi HT, Wang JY, Leung Koo MW. Antiangiogenic effect of a highly selective cyclooxygenase-2 inhibitory on gastric ulcer healing in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2002; 183: 41-45.
76. Gutteridge JMC. *Free Rad Res Comm*, 1993; 19: 141.
77. Hakanson R, Oscarson J, Sundler F. Gastrin and the trophic control of gastric mucosa. *Scand J Gastroenterol*, 1986; 118:18-30.
78. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. *Claredon Press*, Oxford, 1991; 543.
79. Ham EA, Soderman DD, Zanetti ME, Dougherty HW, Mccauley E, Kuehl FA. Inhibition by prostaglandins of leukotriene B4 release from activated neutrophils. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 1983; 80:4349-4353.
80. Hamos JE, Oblas B, Pulaski-Salo D, Welch WJ, Bole DG, Drachman DA. Expression of heat shock 70 proteins in Alzheimer's disease. *Neurology*, 1991; 41: 345-350.
81. Harbone JF, Willians CA. Review: Advances in flavonoid research since. *Phytochem*, 2000; 55:481-504.
82. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 2002; 96: 67-202.
83. Hawkey CJ. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Gastropathy. *Gastroenterology*, 2000; 119:521-535.

84. Hawkey CJ, Rampton DS. Prostaglandins and the gastrointestinal mucosa: are they important in its function, disease, or treatment? *Gastroenterology*, 1985; 89:1162-1188.
85. Hightower LE, White TP. Preferential synthesis of rat heat shock and glucose-regulated proteins in stressed cardiovascular cells. In *Heat Shock: From Bacteria to Man*. M. Schlesinger (ed). New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982; 369-377.
86. Hirschowitz BI, Sachs G. Atropine inhibition of insulin-, histamine-, and pentagastrin-stimulated gastric electrolyte and pepsin secretion in the dog. *Gastroenterology*, 1969; 56:693-702.
87. Hirschowitz BI, Keeling D, Lewin M, Okabe S, Parsons M, Sewing K, Wallmark B, Sachs G. Pharmacological aspects of acid secretion. *Dig Dis Sci*, 1995; 40: 3-23.
88. Hiruma-Lima CA, Toma W, Gracioso JS, Almeida AB, Paula ACB, Batista LM, Magri L, Soares FR, Nunes DS, Souza Brito ARM. Natural trans-crotonin: the antiulcerogenic effect of another diterpene isolated from the bark of *Croton cajucara*. *Biol Pharm Bull*, 2002; 25: 452-456.
89. Hoessel R, Leclerc S, Endicott JA, Nobel MEM, Lawrie A, Tunnah P, Leost M, Damiens E, Marie D, Marko D, Niederberger E, Tang W, Eisenbrand G, Meijer L. Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nature Cell Biology*, 1999; 1: 60-67.
90. Hogaboan CM, Bissonnette EY, Chin BC, Befus AD, Wallace JL. Prostaglandins inhibit inflammatory mediator release from rat mast cells. *Gastroenterology*, 1993; 104:122-129.
91. Holzer P. *Neuroscience*, 1988; 24: 739-768.
92. Huang WYF, et al. Histopathologic evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PC10) in oral epithelial hyperplasias and premalignant lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod*, 1994; 78: 748-754.
93. Jadeski LC, Lala PK. Nitric oxide synthase inhibition by N(G)-nitro-L-arginine methyl ester inhibits tumor-induced angiogenesis in mammary tumors. *Am J Pathol*, 1999; 155:1381-1390.
94. Jaeschke H. Mechanisms of antioxidant stress-induced acute tissue injury. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1995; 209: 104-111.
95. Johnson LR. Gastric secretion. In: Johnson, L.R. *Gastrointestinal Physiology*. Raven Press, 1997; 69-88.

96. Kahraman A, Erkasap NF, Köken T, Serteser M, Aktepe F, Erkasap S. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions *Toxicology*, 2003; 183: 133-142.
97. Kang JY, Elders A, Majeed A, Maxwell JD, Bardhan KD. Recent trends in hospital admissions and mortality rates for peptic ulcer in Scotland 1982-2002. *Aliment Pharmacol Ther*, 2006; 1:65-79.
98. Kanwar S, Wallace JL, Befus D, Kubes P. Nitric oxide synthesis inhibition increases epithelial permeability via mast cells. *Am J Physiol*, 1994; 266: 222-229.
99. Kargman J, Evans J, O'neil GP. Characterization of prostaglandin G/H synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology*, 1996; 111:445-454.
100. Kawai T, Joh T, Iwata F, Itho M. Gastric epithelial damage induced by local ischemia-reperfusion with or without exogenous acid. *Am J Physiol*, 1994; 266: 263-270.
101. Kawano S, Tsuji S. Role of mucosal blood flow: a conceptional review in gastric mucosal injury and protection. *J Gastroenterol Hepatol*, 2000; 15: D1–D6.
102. Khoda K, Tanaka K, Aiba Y, et al. Role of apoptosis induced by helicobacter pylori infection in the development of duodenal ulcer. *Gut*, 1999; 44: 456-462.
103. Kim SC, Byun SH, Yang CH, et al. Cytoprotective effects of Glycyrrhizae radix extract and its active component liquiritigenin against cadmium-induced toxicity (effects on bad translocation and cytochrome c-mediated PARP cleavage). *Toxicology*, 2004; 197: 239-251.
104. Kimura M, Goto S, Ihara Y, Wada A, Yahiro K, Niidome T, Aoyagi H, Hirayama T, Kondo T. Impairment of glutathione metabolism in human gastric epithelial cells treated with vacuolating cytotoxin from *Helicobacter pylori*. *Microb Pathol*, 2001; 31: 29- 36.
105. Kitajima T, Okuhira M, Tani K, Nakano T, Hiramatsu A, Mizuno T, Inoue K. Cell proliferation kinetics in acetic acid-induced gastric ulcer evaluated by immunohistochemical staining of proliferating cell nuclear antigen *J Clin Gastroenterol*, 1995; 17:116-120.
106. Knight JA. Diseases related to oxygen-derived free-radicals. *Ann Clin Lab Sci*, 1995; 25: 111-121.
107. Komasa M, Horie S, Watanabe K, Murayama T. Antisecretory effect of somatostatin on gastric acid via inhibition of histamine release in isolated mouse stomach. *Eur J Pharmacol*, 2002; 452: 235-43.

108. Konturek SJ, Kitler ME, Brozozowski T, Radecki T. Gastric protection by meciadanol. A new synthetic flavonoid inhibiting histidine decarboxylase. *Dig Dis Sci*, 1986; 31: 847-852.
109. Kristjánsson G, Högman M, Venge P, Hällgren. Gut mucosal granulocyte activation precedes nitric oxide production: studies in celiac patients challenged with gluten and corn. *Gut*, 2005; 54: 769-774.
110. Kubes P, McCafferty DM. Nitric oxide and intestinal inflammation. *Am J Med*, 2000; 109: 150-158.
111. Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem*, 1991; 226: 12866-12872.
112. Kunikata T, Tatefuji T, Aga H, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M. Indirubin inhibits inflammatory reactions in delayed-type hypersensitivity. *Eur J Pharmacol*, 2000; 410: 93-100.
113. Kunkel SL, Wiggins RC, Chensue SW, Larrick J. Regulation of macrophage tumor necrosis factor production by prostaglandin E2. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986; 137:404-410.
114. Kunkel SL, Spengler M, May MA, Spengler R, Larrick J, Remick D. Prostaglandin E2 regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression. *J Biol Chem*, 1988; 263:5380-5384.
115. Kurata JH. What in the world is happening to ulcers? *Gastroenterology*, 1983; 84 (6): 1623-1625.
116. Kwiecién S, Brzozowski T, Konturek S J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa damage. *Physiol Pharmacol*, 2002; 53, 39-50.
117. Kwiecién S, Brzozowski T, Konturek PC, Pawlik MW, Pawlik WW, Kwiecién N, Konturek SJ. Gastroprotection by pentoxifylline against stress-induced gastric damage. Role of lipid peroxidation, antioxidizing enzymes and proinflammatory cytokines. *J Physiol Pharmacol*, 2004; 55, 337-355.
118. Kyogoku K, Hatayama K, Yokomori S, et al. Anti-ulcer effect of isoprenyl flavonoids. II. Synthesis and anti-ulcer activity of new chalcones related to sophoradin. *Chem Pharm Bull*, 1979; 27: 2943-2952.
119. La Casa C, Villegas I, Alarcón De Lastra C, Motilva V, Calero MJM. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions, *J Ethnopharmacol*, 2000; 71: 45-53.

120. Lamberts R, Creutzfeldt W, Struber HG, Brunner G, Solcia E. Long-term omeprazole therapy in peptic ulcer disease: gastrin, endocrine cell growth, and gastritis. *Gastroenterology*, 1993; 104: 1356-70.
121. Lewis DA, Hanson PJ. (1991). Anti-ulcer drugs of plant origin. In: G.P., Ellis & G.B. West, *Progress Medicinal Chemistry*, Elsevier Science Publishers, 1991; 28: 201-231.
122. Lewis DA. Antiulcer drugs from plants. *Chemistry in Britain*, 1992; 28: 141-144.
123. Lindberg P, Brandstrom A, Wallmark B. Structure-activity relationships of omeprazole analogues and their mechanisms of action. *Trends Pharmacol. Sci*, 1987; 8: 399-402.
124. Lindquist S. The heat-shock response. *Ann Ver Biochem*, 1986; 55: 1151-1191.
125. Lloyd KCK, Debas HT. Peripheral regulation of gastric acid secretion. In: Jhonson, L.R. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, Raven Press, 1994; 1185-1226.
126. Malara B, Josko J, Tyrpien M, Malara P, Steplewska K. Dynamics of changes in vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and angiogenesis in stress-induced gastric ulceration in rats. *J Physiol Pharmacol*, 2005; 56(2):259-71.
127. Martin GR, Wallace JL. Gastrointestinal inflammation: a central component of mucosal defense and repair. *Exp Biol Med*, 2006; 231(2):130-7.
128. Martinez M. Las plantas medicinales de México. Ediciones Botas, México, 1933.
129. Martinez-Lara I, et al, Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as a marker of dysplasia in oral mucosa. *Acta Stomatol. Bel*, 1996; 93: 29-32.
130. Matsuda H, Li Y, Yoshikawa M. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydryls and prostaglandins in gastroprotection by momordin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesion in rats. *Life Sciences*, 1999; 65, 27-32.
131. Maugard T, Enaud E, Choisy P, Legoy MD. Identification of an indigo precursor from leaves of *Isatis tinctoria* (Woad). *Phytochemistry*, 2001; 58: 897-904.
132. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *The Amer J Med*, 2000; 108: 652-659.
133. McIntosh JH, Byth K, Piper DW. Causes of death amongst a population of gastric ulcer patients in New South Wales, Australia. *Scand J Gastroenterol*, 1991; 26: 806-811.
134. MccCord JM, Fridovich I. *Bio Chem*, 1969; 244: 604.

135. Melo PS, Maria SS, Vidal BC, Haun M, Durán N. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Animal*, 2000; 36: 539-543.
136. Milani S, Calabro A. Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing. Review. *Microsc Res Tech*, 2001; 53(5):360-71.
137. Mojzis J, Hegedusová R, Mirossay L. Role of mucus in ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal injury in rats. *Physiol Res*, 2000; 49: 441-446.
138. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Ver*, 1991; 43: 109-42.
139. Moreira JLA, Azevedo-Tozzi AMG. *Indigofera L. (Leguminosae, Papilionoideae)* no estado de São Paulo, Brasil. *Revista brasil Bot.*, São Paulo, 1997; 20: 97-117.
140. Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol*, 2000; 71: 109-114.
141. Morimoto Y, Oshima S, Hara H, Sukamoto T. Effects of Kb-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of tepreenone and cimetidine. *Jap J Pharmacol*, 1991; 57: 495-505.
142. Mukuhata Y, Nakabayashi S, Higashida M. Quercetin, an energy transfer inhibitor in photophosphorylation. *FEBS. Lett*, 1978; 85: 215-218.
143. Murota K, Mitsukuni Y, Ichikawa M, Tsushida T, Miyamoto S, Terao J. Quercetin-4-glucoside is more potent than quercetin-3-glucoside in protection of rats intestinal mucosa homogenates against iron-induced lipid peroxidation. *J Agric and Food Chemistry*, 2004; 52: 1907-1912.
144. Nanji AA, Tahan SR. Association between endothelial cell proliferation and pathologic changes in experimental alcoholic liver disease. *Toxicol Applied Pharmacol*, 1996; 140: 101-7.
145. Neto JDB, Oliveira CMC, et al. Hemolytic anemia caused by *Indigofera suffruticosa* (Leg. Papilionoidae). In: *Cattle Pesquisa Veter Brasil*, 2001; 21(1): 18-22.
146. O'neil GP, ForD-Hutchinson AW. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in humans tissues. *FEBS Lett*, 1993; 330:156-160.
147. Okabe S, Amagase K. An Overview of Acetic Acid Ulcer Models The History and State of the Art of Peptic Ulcer Research, *Biol Pharm Bull*, 2005; 28: 1321-1341.
148. Olbe L, Carlsson E, Lindberg P. A proton-pump inhibitor expedition: the case histories of omeprazole and esomeprazole. *Nat Rev Drug Discov*, 2003; 2:132-9.

149. Paimela H, Goddard PJ, Silen W. Present views on restitution of gastrointestinal epithelium. *Dig Dis Sci*, 1995; 40: 2495-2496.
150. Pastrada-Bonilla E, Akoh CC, Sellappan S, Krewer G. Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes. *J Agric Food Chem*, 2003; 51: 5497-5503.
151. Pawlik T, Konturek PC, Konturek JW, Konturek SJ, Brzozowski T, Czesnikiewicz M, Plonka M, Bielanski W, Areny H. *Eur J Pharmacol*, 2002; 449:1-15.
152. Peleg II, Wilcox CM. Role of eicosanoids, cyclooxygenases, and nonsteroidal antiinflammatory drugs in colorectal tumorigenesis and chemoprevention. *J Clin Gastroenterol*, 2002; 34: 117-125.
153. Petersen H, Kristensen P, Johannessen T, Kleveland PM, Dybdahl JH, Myrvold H. (1995). The natural course of peptic ulcer disease and its predictors. *Scand J Gastroenterol*, 1995; 30: 17-24.
154. Peura DA. Prevention of nosteroidal anti-inflammatory drug-associated gastrointestinal symptoms and ulcer complications. *Am J of Medicine*, 2004; 117: 63-71.
155. Pfeiffer S, Leopold E, Schimit K, Brunner F, Mayer B. Inhibition of nitric oxide synthesis by N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, N^G-nitro-L-arginine. *Br J Pharmacol*, 1996; 118: 1433-1440.
156. Phillipson M, Atuma C, Henriksnas J, Holm L. The importance of mucus layers and bicarbonate transport in preservation of gastric juxtamucosal pH. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002; 282 (2): G211-9.
157. Prelich G, Tan C, Kostura M, Mathews MB. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase- δ auxiliary protein. *Nature*, 1990; 326: 517-520.
158. Prinz C, Sachs G, Walsh JH, Coy DH, Wu SV. The somatostatin receptor subtype on rat enterochromaffin-like cells. *Gastroenterology*, 1994; 107: 1067-1074.
159. Prinz C, Zanner R, Gratzl M. Physiology of Gastric Enterochromaffin-Like Cells. *Annu Ver Physiol*, 2003; 65, 371-382.
160. Rafatullah S, Tariq M, Al-Yahya M A, Mossa J S, Ageel AM. Evaluation of Turmeric (CURCUMA LONGA) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. *J Ethonopharmacol*, 1990; 29: 25-34.
161. Reed JC. Mechanism of apoptosis. *Am J Phatol*, 2000; 157: 1221-1223.
162. Repetto MG, Llesuy SF. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz J Med Biol Res*, 2002; 35: 523-34.

163. Robert A, Nezamis JE, Lancaster C, Hanchar AJ. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. *Gastroenterology*, 1979; 77: 433-443.
164. Robert A, Ruwart M. Effect of prostaglandins on the digestive system. *In: Prostaglandins*, edited by Lee J. B., New York, Elsevier, 1982; 113-176.
165. Roig JT. Plantas Medicinales, Aromaticas o Venenosas De Cuba. Editorial *Cientifica-Tecnica*, La Havana – Cuba, 1988; 164.
166. Rokutan K. Role of that heat shock protein in gastric mucosal protection. *J. Gastroenterol Hepatol*, 2000; 15:12-19.
167. Rosen GM, Pou S, Ramos CL, Cohen MS, Britigan BE. Free radical and phagocytic cells. *FASEB J*, 1995; 9: 200-209.
168. Sachs G, Carlsson E, Londberg P, Wallmark B. Gastric H⁺, K⁺. ATPase as therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1988; 28: 269-284.
169. Sandler RS, et al. The burden of selected digestive diseases in the United States. *Gastroenterology*, 2002; 122: 1500-1511.
170. Sato S, Ikeda H, Furukawa H, Murata Y, Tomoda M. Effects of nutrient solution concentration on inorganic and glycyrrhizin contents of Glycyrrhiza glabra Linn. *Yakugaku Zasshi*, 2004; 10:705-9.
171. Schmassmann A. Mechanisms of ulcer healing and effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Excerpta medica*, 1998; 104(3A): 43S-51S.
172. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med*, 1993; 21: 1376-1386.
173. Seidler U, Pfeiffer A. Inositol phosphate formation and [Ca²⁺]_i in secretagogue-stimulated rabbit gastric mucous cells. *Am J Physiol*, 1991; 260:133-141.
174. Shay H, Komarov SA, Fels SS, Meranze D, Gruenstein M, Siplet H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterology*, 1945; 5: 43-61.
175. Shichijo K, Ihara M, Matsuu M, Ito M, Okumura Y, Sekine I. Overexpression of heat shock protein 70 in stomach of stress-induced gastric ulcer-resistant rats. *Dig Dis Sci*, 2003; 48: 340-348.

176. Shim JY, Chang YJ, Kim SU. Indigo and indirubin derivatives from indoles in *Polygonum tinctorium* tissue cultures. *Biotechnology Letters*, 1998; 20 (12): 1139-1143.
177. Shu, Y.Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. *J of Natural Products*, 1998; 61: 1053-1071.
178. Sikiric P, Seiwerth S, Deskovic S, Grabarevic Z, Marovic A, Rucman R, Petek M, Konjevoda P, Jadrijevic S, Sosa T, Perovic D, Aralica G, Turkovic B. New model of cytoprotection/adaptive cytoprotection in rats: endogenous small irritants, antiulcer agents and indomethacin. *Eur J Pharmacol*, 1999; 1;364(1):23-31.
179. Slomiany BL, Slomiany A. Nitric oxide as a modulator of gastric mucin synthesis: role of ERK and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *IUBMB Life*, 2002; 54(5):267-73.
180. Souza Brito ARM. Manual De Ensaio Toxicologicos "In Vivo". UNICAMP, Campinas/SP – Brazil, 1994; 122.
181. Souza Brito ARM. How to study the pharmacology of medicinal plants in underdeveloped countries, *Journal of Ethnopharmacology*, 1996; 54:131-138.
182. Souza Brito ARM, Nunes D.S. Ethnopharmacology and sustainable development of new plant-derived drugs. *Ciência e Cultura*, 1997; 49(5-6), 402-408.
183. Standley PC. Trees and shrubs of México. *Contr U S Natl Herb*, 1922; 23(2): 429-515.
184. Stavric B. Quercetin in our diet: from potent mutagen to probable anticarcinogen. *Clin Biochem*, 1994; 27: 245- 248.
185. Steriti R. Nutritional support for chronic myelogenous and other leukemia: a review of the scientific literature. *Alternative Medicine Review*, 2002; 7: 404-409.
186. Sugimoto Y, Narumiya S, Ichikawa A. Distribution and function of prostanoid receptors: studies on knockout mice. *Prog Lipid Res*, 2000; 39: 289–314.
187. Sun F, Song Y, Cheng W, Zhao T, Yao Y. Gastrin, somatostatin, G and D cells of gastric ulcer in rats. *World Journal of Gastroenterology*, 2002; 8(2): 375-378.
188. Szabo S, Pihan G, Dupuy D. The biochemical pharmacology of sulphhydryl compounds in gastric mucosal injury and protection. In: Szabo, S. and Mózsik, G., Editors, *New Pharmacology of Ulcer Disease*, Elsevier, New York, 1987; 424–446.
189. Szabo S, Goldberg I. Experimental pathogenesis: drugs and chemical lesions in the gastric mucosa. *Scand J Gastroenterol*, 1990; 174: 1-8.

190. Szelenyi I, Thieme K. Distention ulcer as a model for testing drugs for ulcerogenic side effects. *Arch Toxicol*, 1978; 41: 99-102.
191. Takagi K, Okabe S, Saziki R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. *J Pharmacol*, 1969; 19: 418-426.
192. Takeuchi M, Nagai S, Nakajima A, Shinya M, Tsukano C, Asada H, Yoshikawa K, Yoshimura M, Izumi T. Inhibition of lung natural killer cell activity by smoking: the role of alveolar macrophages. *Respiration*, 2001; 68(3):262-7.
193. Tani S, Okuda M, Morishige R, Tanaka T. *Biol Pharm Bull*, 1997; 20: 482-485.
194. Tarnawski A, Hollander D, Stachura J, Gergely H, Krause WJ, Sarfeh IJ. Role of angiogenesis in healing of experimental gastric ulcer. In *Mechanisms of Peptic Ulcer Healing*. F Halter, A Garner, GJ Tytgat (eds). Dordrecht/Boston/London, Kluwer, 1991a; 165-171.
195. Tarnawski A, Stachura J, Krause WJ, Douglass TG, GERGELY H. Quality of gastric ulcer healing—a new, emerging concept. *J Clin Gastroenterol*, 1991b; 13: 42-47.
196. Tarnawski A, Tanoue K, Santos AM, Sarfeh IJ. Cellular and molecular mechanisms of gastric ulcer healing. Is the quality of mucosal scar affected by treatment? *Scand J Gastroenterol*, 1995; 210: 9-14.
197. Tarnawski A. Molecular mechanism of ulcer healing. *Drug News Perspect*, 2000; 13:158-168.
198. Tarnawski A, Szabo IL, Husain SS, Soreghan B. Regeneration of gastric mucosa during ulcer healing is triggered by growth factors and signal transduction pathways. *J Physiol Paris*, 2001; 95(1-6):337-44.
199. Tarnawski AS. Cellular and Molecular Mechanisms of Gastrointestinal ulcer Healing *Dig Dis Sci*, 2005; 50: 24-33.
200. Texter EC, Reilly PA. (1982). *The efficacy and selectivity of pirenzepine*: review and commentary. *Scand J Gastroenterol*, 1982; 17(72): 237-246.
201. Toma W, Trigo JR, Paula ACB, Souza Brito ARM. Modulation of gastrin and epidermal growth factor by pyrrolizidine alkaloids obtained from *Senecio brasiliensis* in acute and chronic induced gastric ulcers. *Can J Physiol. Pharmacol*, 2004; 82: 319–325.
202. Toriyabe M, Omote K, Kawamata T, Namiki A. Contribution of interaction between nitric oxide and cyclooxygenases to the production of prostaglandins in carrageenan-induced inflammation. *Anesthesiology*, 2004; 101(4):983-90.

203. Tsukimi Y, Okabe S. Acceleration of healing of gastric ulcers induced in rats by liquid diet: importance of tissue contraction. *Jpn J Pharmacol*, 1994; 66: 405-412.
204. Tsukimi Y, Okabe S. Recent Advances in Gastrointestinal Pathophysiology: Role of Heat Shock Proteins in Mucosal Defense and Ulcer Healing. *Biol Pharm Bull*, 2001; 24: 1-9.
205. Tsukimi Y, Nakai H, Itoh S, Amagase K, Okabe S. Involvement of heat shock proteins in the healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats. *J of Physiol and Pharmacol*, 2001; 52: 391-406.
206. Tytell M, Hooper PL. Heat shock proteins: new keys to the development of cytoprotective therapies. *Expert Opin Ther Targets*, 2001; 5: 267-87.
207. Ueda S, Yoshikawa T, Takahashi S, Ichikawa H, Yasuda M, Oyamada H, Tanigawa T, Sugino S, Kondo M. Role of free radicals and lipid peroxidation in gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. *Scand J Gastroent*, 1989; 162: 55-58.
208. Ueki S, Takeuchi K, Okabe S. *Dig Dis Sci*, 1988; 33: 209-216.
209. Vacca LL. Laboratory Manual of Histochemistry. Raven Press, New York, 1985; 578.
210. Valcheva-Kuzmanova S, Marazova K, Krasnaliev I, Galunska B, Borisova P, Belcheva A. Effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice on indomethacin-induced gastric mucosal damage and oxidative stress in rats. *Exp Toxicol Pathol*, 2005; 56: 385-92.
211. Van Acker S, Van Balen GP. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Bioch Pharm*, 1998; 56: 935-943.
212. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*, 1971; 231:232-235.
213. Vane J. Towards a better aspirin. *Nature*, 1994; 367:215-216.
214. Vanwijck R. Surgical biology of wound healing. *Bull Mem Acad R Med Belg*, 2001; 56:175-184.
215. Vazquez-Ramirez R, Olguin-Martinez M, Kubli-Garfias C, Hernandez-Munoz R. Reversing gastric mucosal alterations during ethanol-induced chronic gastritis in rats by oral administration of *Opuntia ficus-indica* mucilage. *World J Gastroenterol*, 2006; 12(27):4318-24.
216. Vilegas W, Sanommiya M, Rastrelli L, Pizza C. Isolation and structure elucidation of two flavonoid glycosides from the infusion of *Maytenus aquifolium* Leaves. Evaluation of antiulcer activity of the infusion. *J Agric Food Chem*, 1999; 47:403-406.

217. Wada K, Kamisaki Y, Kitano M, Kishimoto Y, Nakamoto K, Itoh T. A new gastric ulcer model induced by ischemia-reperfusion in the rat: role of leukocytes on ulceration in rat stomach. *Life Sci*, 1996; 59: 295-301.
218. Wagner HM, Bladt S, Zgainski EM. "Plant Drug Analysis", Springer, Berlin, 1986.
219. Wallace JL, Granger DN. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. *FASEB J*, 1996; 10: 823-57.
220. Wallace JL. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastroenteropathy: The second hundred years. *Gastroenterology*, 1997; 112: 1000-1016.
221. Wallace JL, Miller MJS. Nitric Oxide in Mucosal Defense: A little Goes a long Way. *Gastroenterology*, 2000; 119: 512-520.
222. Wallace JL, Ma L. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. Review: *Exp Biol Med*. (Maywood), 2001; 226: 1003-1015.
223. Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, LI H, Witte K, Forstermann U. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 2002; 106:1652-1658.
224. Watanabe T, Chiba T. Pathogenesis of gastric and duodenal ulcer in the elderly. *Nippon Rinsho*, 2002; 60: 1515-1520.
225. Whittle BJR, Kauffman GL, Moncada S. *Nature*, 1981; 292: 472-474.
226. Whittle BJR, Lopez-Belmonte J, Moncada S. *Br J Pharmacol*, 1990; 99: 607-611.
227. Winterbourn C, Hawkins RE, Brian M, Carrell RW. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1975; 85:337-341.
228. Wolfe MM, Sachs G. Acid suppression: optimizing therapy for gastroduodenal ulcer healing, gastroesophagel reflux disease and stress-related erosive syndrome. *Gastroenterology*, 2000; 118: 9S-31S.
229. Xie W, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase in regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci*, 1991; 88: 2692-2696.
230. Xie W, Robertson DL, Simmons DL. Mitogen-inducible prostaglandin G/H synthase: a new target for nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Drug Dev Res*, 1992; 25:249-265.
231. Yao X, Forte JG. Cell Biology of Acid Secretion by the Parietal Cell. *Annu Ver Physiol*, 2003; 65: 103-131.

232. Yassin RR. Signaling pathways mediating gastrin's growth-promoting effects. *Peptides*, 1999; 20:885-98.
233. Yokotani K, Park J, DelValle J, Yamada T. Roles of adrenoceptors in isolated canine parietal cells. *Digestion*, 1994; 55:148-53.
234. Yoshida N, Yoshikawa T, Nakamura Y, Matsuyama K, Inuma S, Yagi N, Naito N, Miyasaka M, Kondo M. Role of neutrophil-mediated inflammation in aspirin-induced gastric mucosal injury. *Dig Dis Sci*, 1995; 40: 2300-2304.
235. Yoshikawa T, Minamiyama Y, Ichikawa H, Takahashi S, Naito Y, Motoharu K. Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indometacin in rats. *Gut*, 1993; 3: 732-737.
236. Young RA, Elliot TJ. Stress proteins, infection, and immune surveillance. *Cell*, 1989; 59: 5-8.
237. Yuhong Y, Ireneusz TP, Richard HH. Peptic ulcer disease today. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*, 2006; 3: 80-89.
238. Zhao ZG, Shen WL. Heat shock protein 70 antisense oligonucleotide inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cell line SGC-7901. *World J Gastroenterol*, 2005; 11(1):73-8.

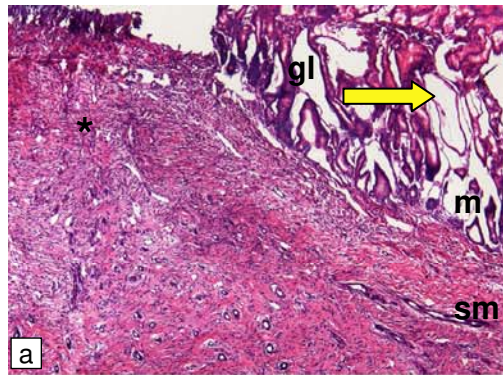
XIII. Anexo I

Artigo publicado

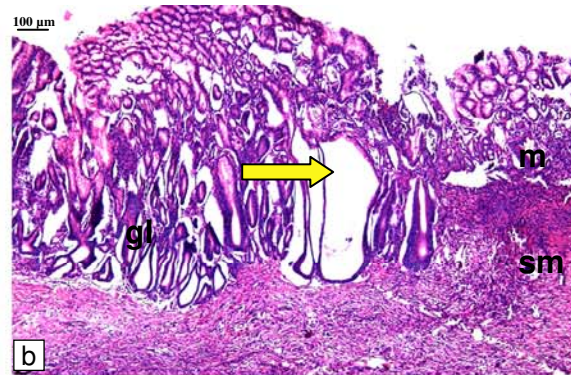
XIV. Anexo II

Artigos submetidos

Controle negativo

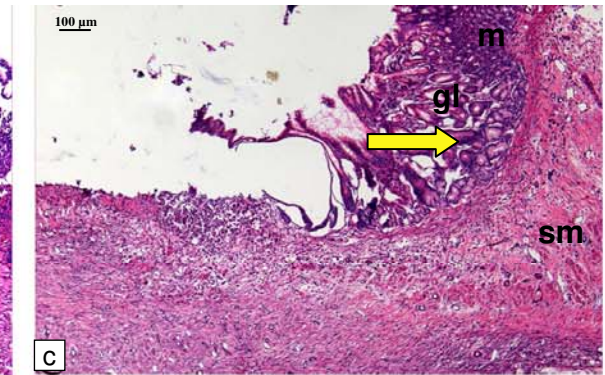


Controle positivo

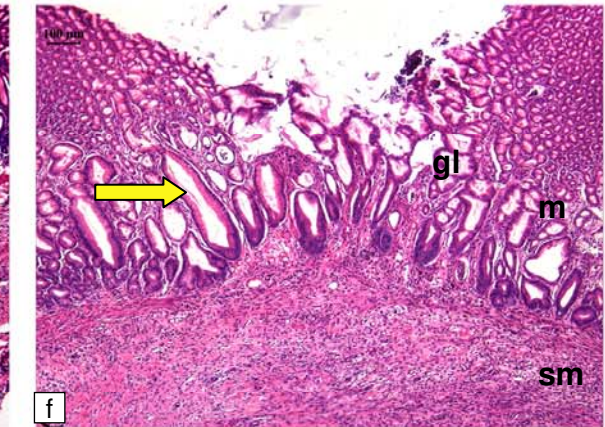


Frações das Plantas

I. truxillensis
fAq



I. truxillensis
fAc



I. sufruticosa
fAc

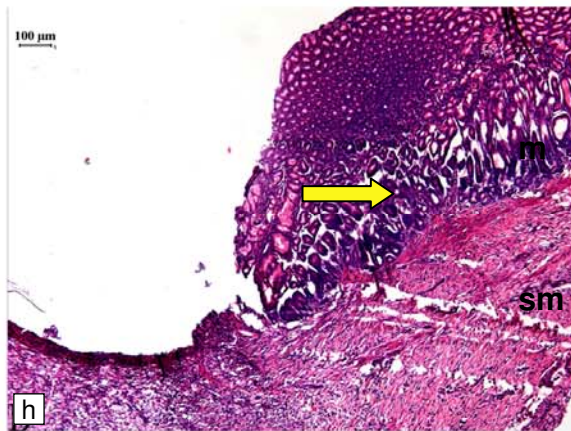
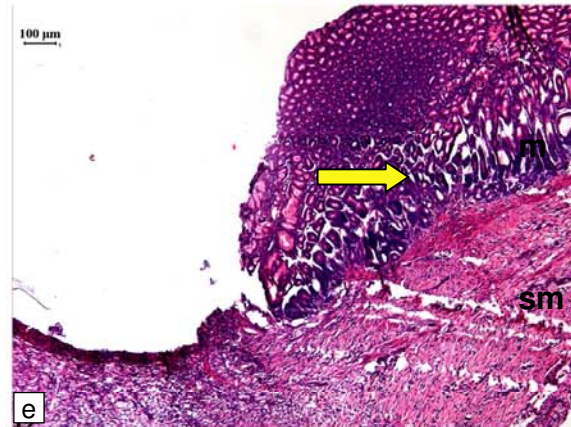
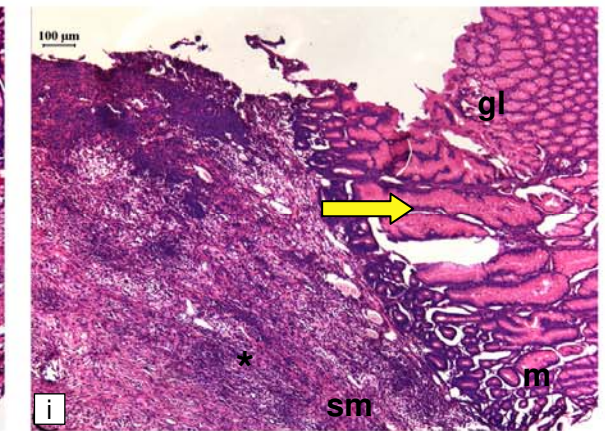
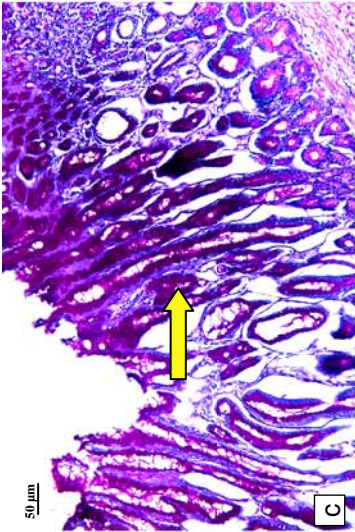


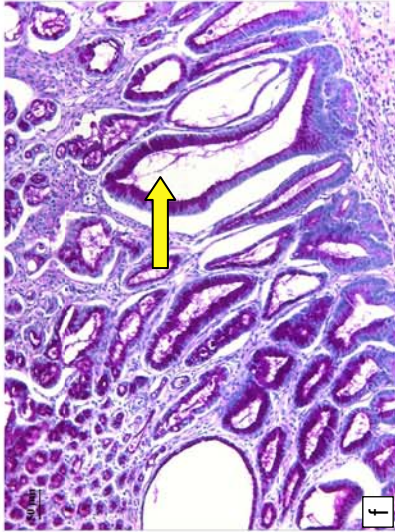
Figura 16

Frações das Plantas

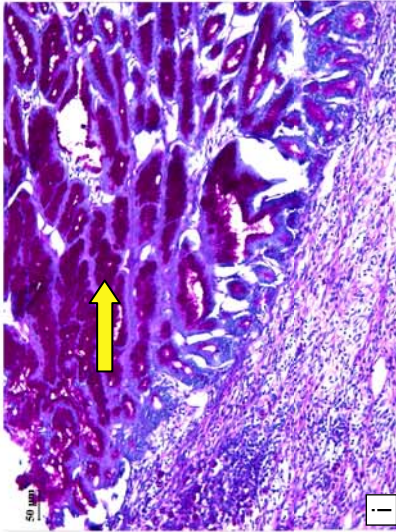
I. truxillensis
fAq



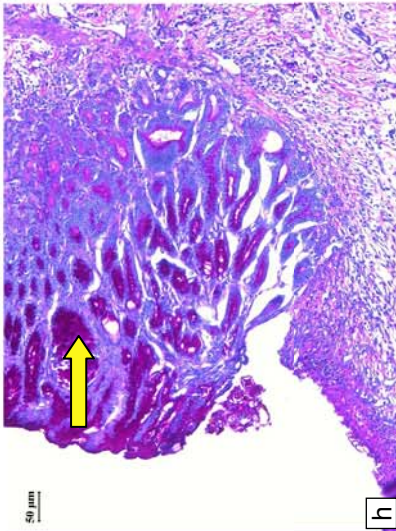
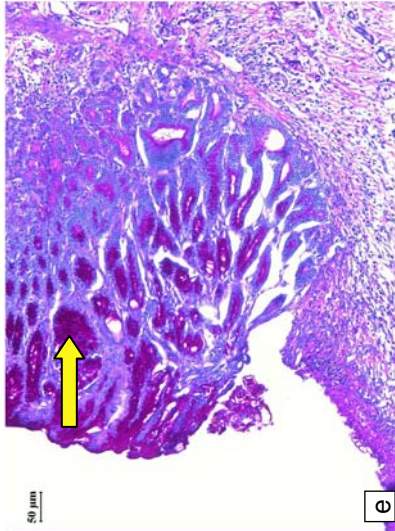
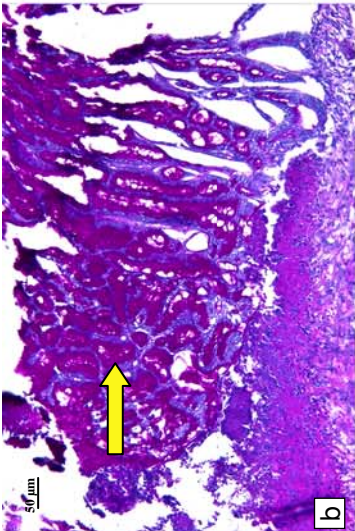
I. truxillensis
fAc



I. suffruticosa
fAc



Controle positivo



Controle negativo

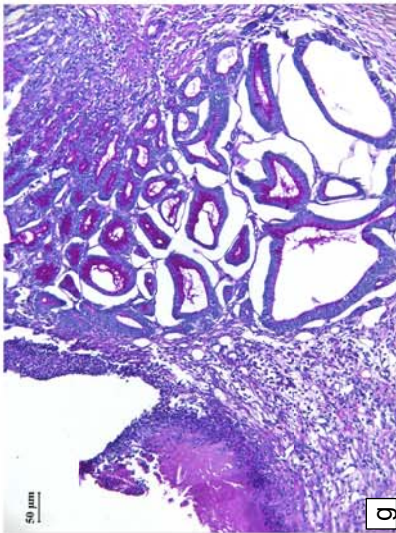
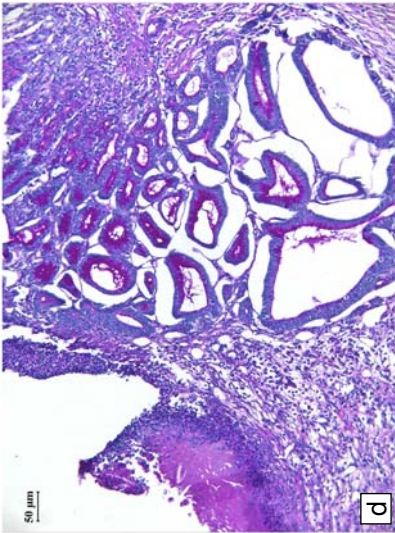
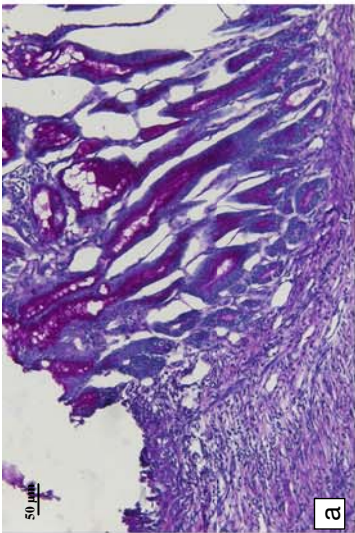


Figura 18

Frações das Plantas

Controle positivo

Controle negativo

I. truxillensis
fAq

I. truxillensis
fAc

I. suffruticosa
fAc

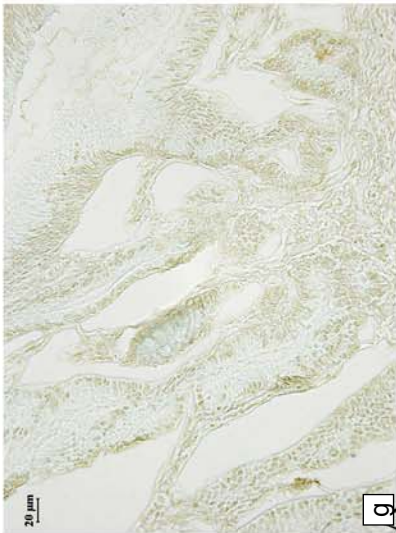
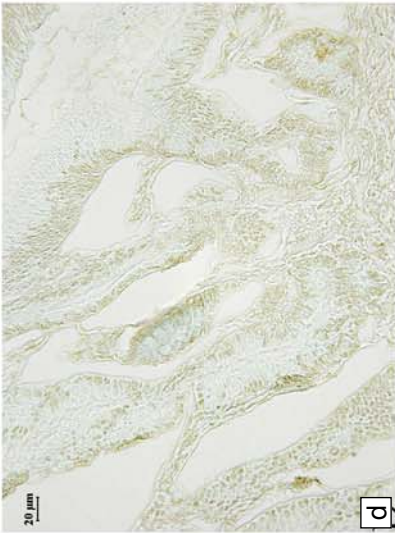
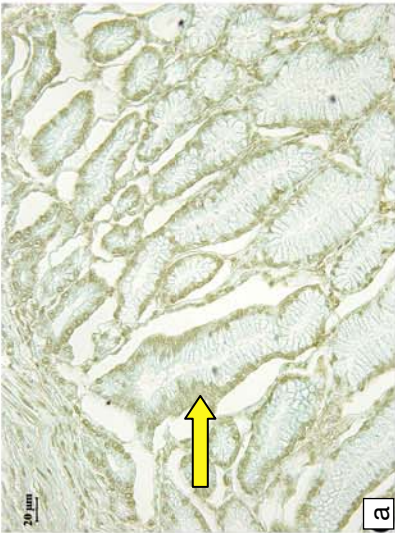
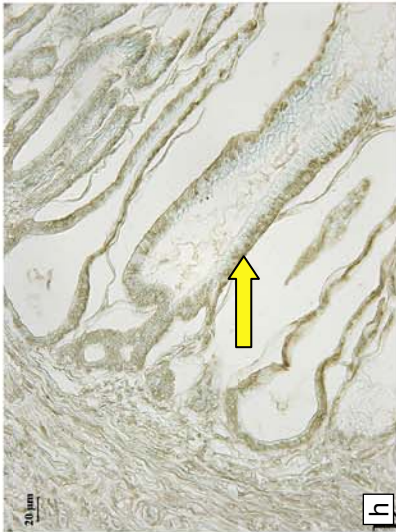
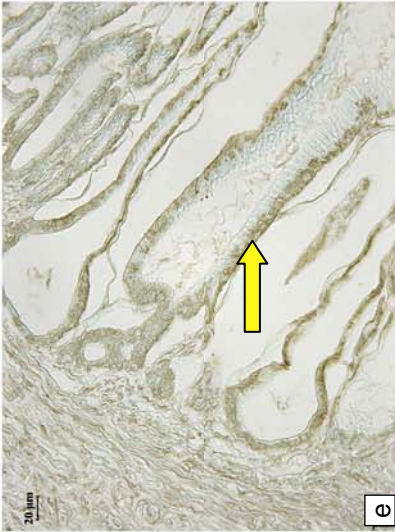
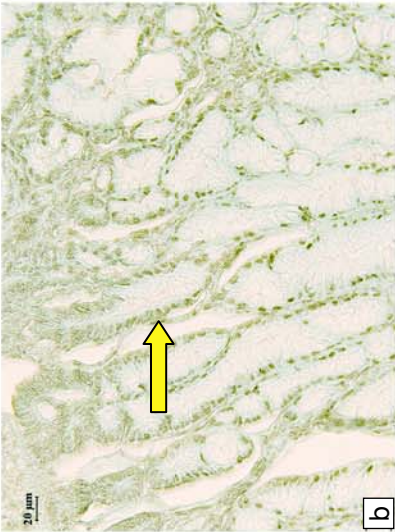
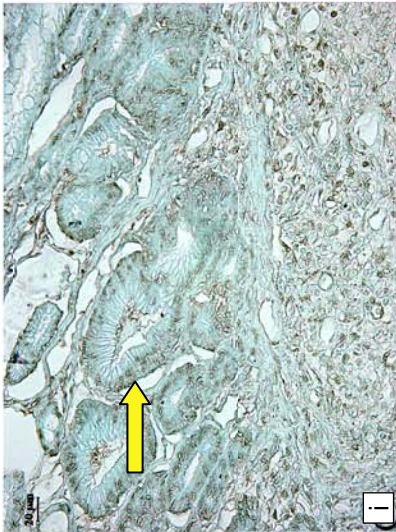
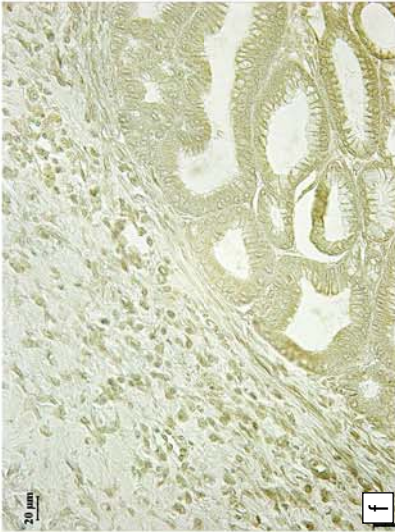
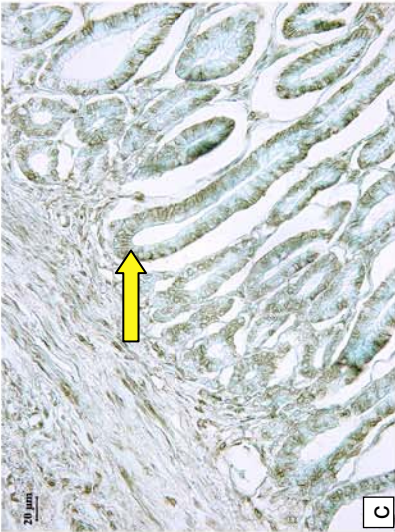


Figura 20

Frações das Plantas

Controle positivo

Controle negativo

I. truxillensis
fAq

I. truxillensis
fAc

I. suffruticosa
fAc

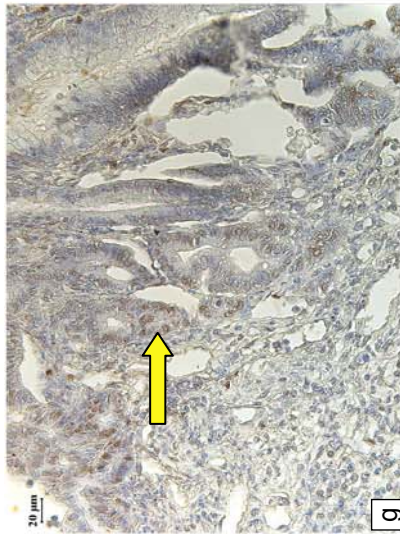
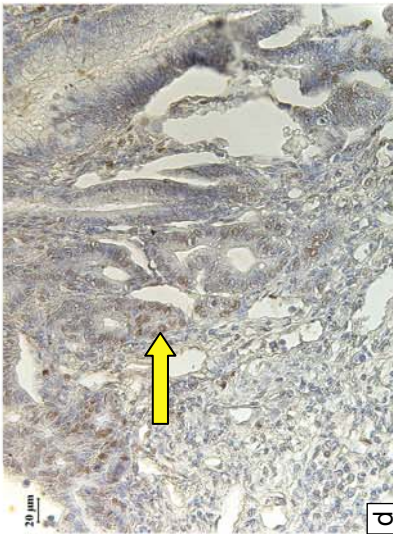
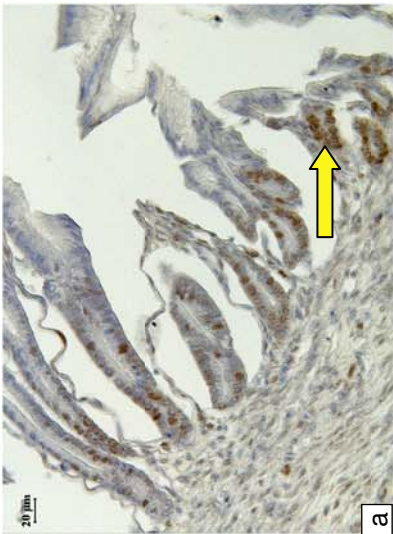
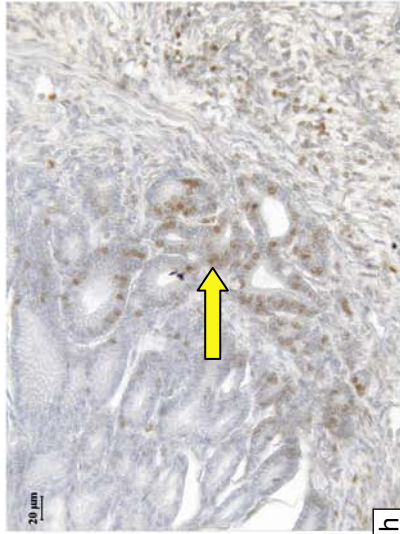
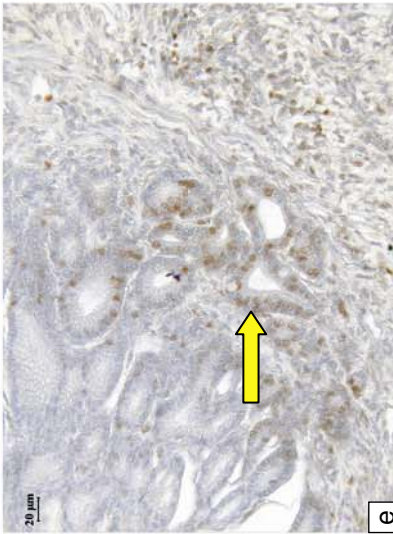
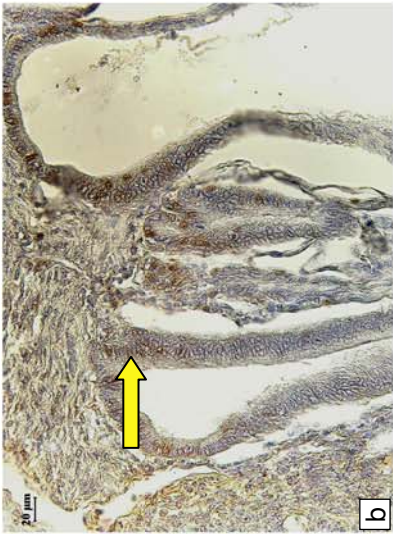
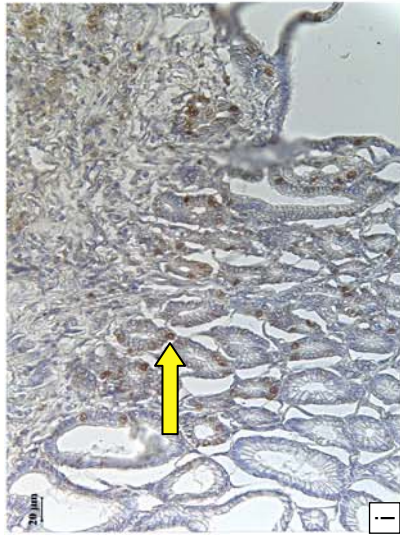
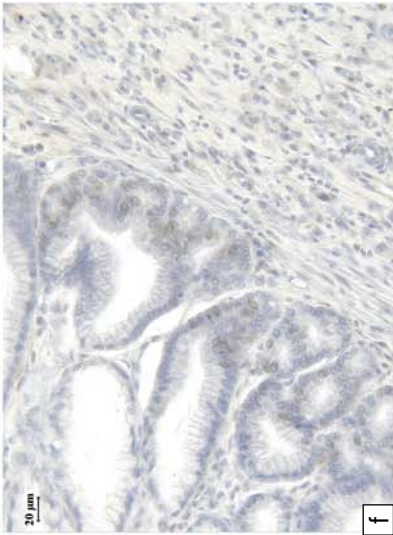
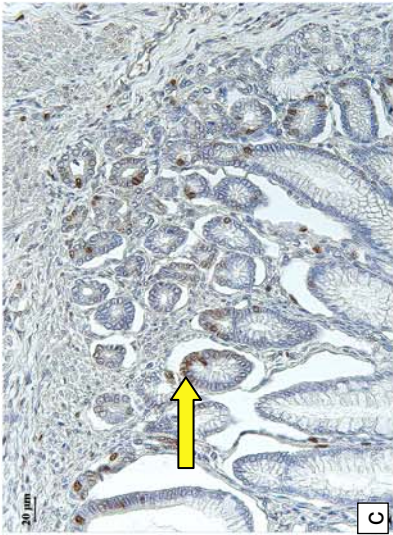


Figura 22

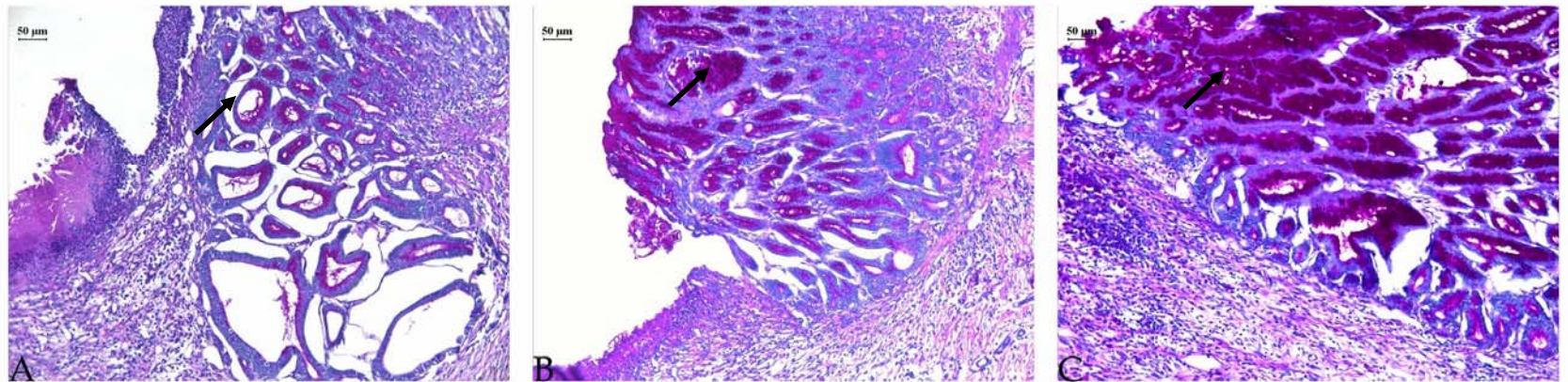


Figure 3: Histological analyses of stomach of rat (A) Tween 80 12% (10 mL/kg), (B) cimetidine (100 mg/kg) and (C) AcF of *I. suffruticosa* (100 mg/kg) and area lesion, to PAS method.

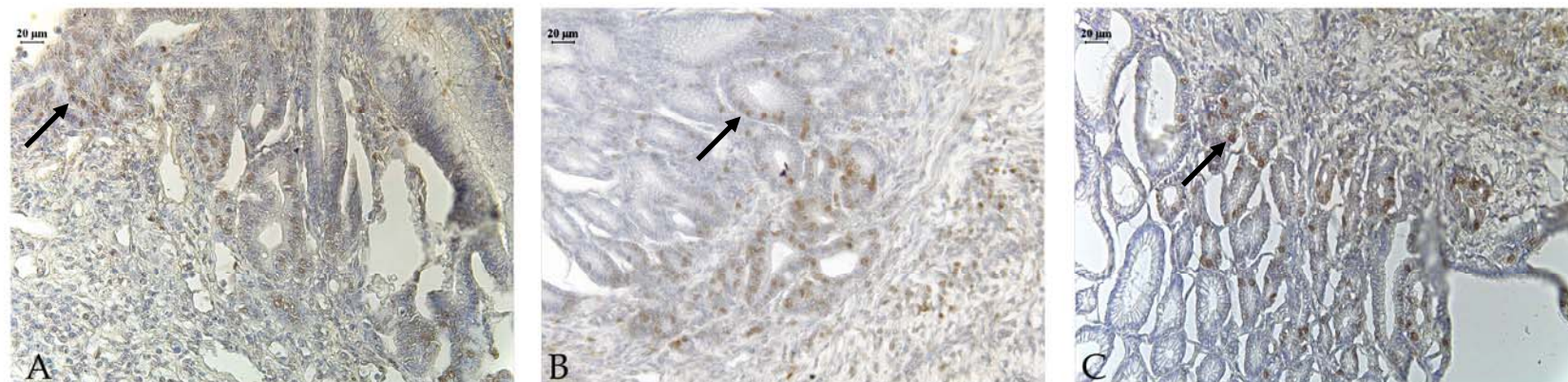


Figure 4: Histological analyses of stomach of rat (A) Tween 80 12% (10 mL/kg), (B) cimetidine (100 mg/kg) and (C) AcF of *I. suffruticosa* (100 mg/kg) and area without lesion, immunohistochemistry to PCNA immunostained with peroxidase method. The head arrow indicates the cells PCNA positive.

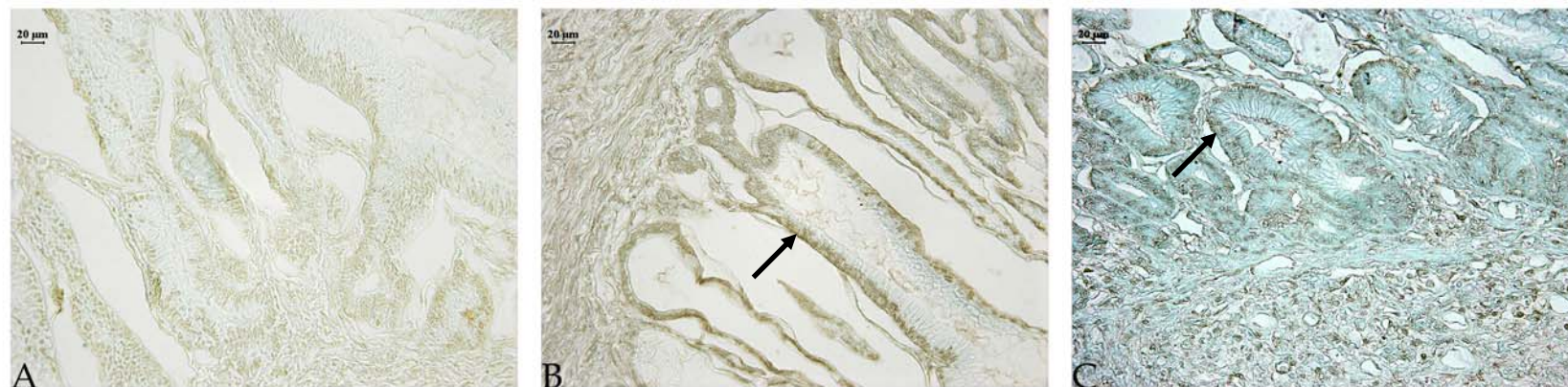


Figure 5: Histological analyses of stomach of rat (A) Tween 80 12% (10 mL/kg), (B) cimetidine (100 mg/kg) and (C) AcF of *I. suffruticosa* (100 mg/kg) and area without lesion, immunohistochemistry to HSP 70 immunostained with peroxidase method. The head arrow indicates the cells HSP 70 positive.

Journal name: BIOTA NEOTRÓPICA

Type of manuscript: Regular article

Section: Pharmacology

Data received: 12/12/2005

Revised: 08/05/2006

Accepted: 09/09/2006

Antiulcerogenic activity of *Indigofera truxillensis* Kunth

Maira Cola-Miranda^a, Victor Barbastefano^a, Clélia Akiko Hiruma-Lima^b, Tamara Regina Calvo^c,

Wagner Vilegas^c, Alba Regina Monteiro Souza Brito^{a*}.

^a Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas ([UNICAMP](#)), Campinas, SP, Brazil.

^b Departamento de Fisiologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual Paulista ([UNESP](#)), Botucatu, SP, Brazil.

^c Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista ([UNESP](#)), Araraquara, SP, Brazil.

Short title: Antiulcerogenic activity of *Indigofera truxillensis*

* Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil. Phone 55-19-3788-6192, Fax: 55-19-3788-6185.
E-mail: abrigo@unicamp.br

Abstract

The genus *Indigofera* (Fabaceae) is used in folk medicine to treat gastrointestinal pain. In this study, we investigated the antiulcerogenic properties of *Indigofera truxillensis* Kunth. Oral administration of MeOH extract did not produce any signals of acute toxicity. The antiulcerogenic activity was assessed in different models of acute gastric ulcers (100% ethanol, piroxicam 30 mg.kg⁻¹, hypothermic restraint stress and pylorus ligation) in mice and rats. The animals were treated with the drugs lansoprazole (30 mg.kg⁻¹) or cimetidine (100 mg.kg⁻¹) as positive controls depending on the performed model. In another experiment with ethanol-induced ulcers in rats, N-ethylmaleimide (NEM), a sulfhydryl group blocker, was also used. The MeOH extract, at doses of 250, 500 and 1000 mg.kg⁻¹, inhibited the gastric lesions in all experiments: a) by 62%, 69 and 32%, respectively, in piroxicam-induced lesions, b) by 43%, 71 and 98%, in ethanol-induced lesions, c) by 69%, 64 and 89%, in hypothermic-restraint stress-induced lesions, d) by 71%, 80 and 93%, in pylorus ligation lesions. Significant changes in the total gastric acid levels were also found after intraduodenal administration of the MeOH extract in the ligated pylorus model. Pre treatment with NEM reduced partially the antiulcerogenic activity of the MeOH extract in ethanol-induced gastric lesions, this results indicate an increase in the levels of non-protein sulfhydryl groups by MeOH extract in the gastric mucosa. These results indicate that the MeOH extract has antisecretory and citoprotective effects that may be related to the presence of flavonoids detected by phytochemical analysis.

Key words: Antiulcerogenic activity; Fabaceae; *Indigofera truxillensis* Kunth; Medicinal plant; Phenolic compounds.

Resumo

O gênero *Indigofera* (Fabaceae) é utilizado na medicina tradicional para distúrbios gastrintestinais. Em nosso trabalho foi investigada a propriedade antiulcerogênica da *Indigofera truxillensis* Kunth. A administração oral do extrato metanólico (MeOH) não produziu efeitos tóxicos. A atividade antiulcerogênica foi avaliada em diferentes modelos agudos de úlcera gástrica (etanol 100%, piroxicam 30 mg.kg⁻¹, estresse por retenção e frio e ligadura do piloro) em camundongos e ratos. Os animais foram tratados com lansoprazol (30 mg.kg⁻¹) ou cimetidina (100 mg.kg⁻¹), que foram utilizados como controle positivo dependendo do modelo testado. Em outro experimento com úlcera induzida por etanol em ratos, N-etilmaleimida (NEM), um bloqueador dos compostos sulfidrila, também foi utilizado. O extrato metanólico, nas doses de 250, 500 e 1000 mg.kg⁻¹, inibiu significativamente as lesões gástricas em todos os experimentos: a) 62%, 69% e 32%, respectivamente, nas lesões gástricas induzidas por piroxicam, b) 43%, 71% e 98%, nas lesões gástricas induzidas por etanol, c) 69%, 64% e 89%, nas lesões gástricas induzidas por estresse por contenção e frio, d) 71%, 80% e 93%, nas lesões gástricas induzidas por ligadura de piloro. Alterações significativas foram observadas na concentração total de ácido gástrico após a administração via intraduodenal do extrato MeOH no modelo de ligadura do piloro. Pré-tratamento com NEM reduziu parcialmente a atividade antiulcerogênica do extrato MeOH na úlcera induzida por etanol, o que sugere um aumento nos níveis de compostos sulfidrila pelo extrato MeOH na mucosa gástrica. Os resultados indicam que o extrato MeOH possui um efeito antissecretor e citoprotetor, e que tais efeitos podem estar relacionados com a presença de flavonóides detectados por análise fitoquímica no extrato MeOH.

Palavras-chave: Atividade antiulcerogênica; Fabaceae; *Indigofera truxillensis* Kunth; Plantas medicinais; Compostos fenólicos.

1. Introduction

Numerous plants and herbs are used to treat gastrointestinal disorders in traditional medicine. There has been renewed interest in identifying new antiulcer drugs from natural sources (Brito 1997). Before introduction of potent antiulcerogenic agents, i.e. H₂-receptor antagonists, proton pump inhibitors, etc. plant remedies were widely employed for the treatment of various symptoms of peptic ulcer (Gurbuz et al. 2002).

The genus *Indigofera* (Fabaceae) contains herbaceous and shrub species found in tropical and subtropical regions, mainly in Africa (Lewis 1987). *Indigofera truxillensis* Kunth, commonly known as “anileira”, was first recorded by Bentham (1859) in the state of São Paulo, Brazil. This species is typical of the “cerrado” or Brazilian savannah, and has been used to treat gastrointestinal disorders such as gastrointestinal pain (Roig 1988). This species is known to be a rich source of flavonoids, alkaloids, steroids, proteins and carbohydrates (Leite et al. 2004).

The aim of this study was to evaluate the antisecretory and cytoprotective activities of a crude methanolic extract (MEOH) of *I. truxillensis* in four models of gastric lesions in mice and rats. We also assessed the acute toxicity of the MeOH extract and its influence on the mucosal content of non-protein sulfhydryl groups.

2. Material and Methods

2.1 Animals

Male Swiss albino mice (25-35 g) and male Wistar rats (200-250 g) from the Central Animal House of the Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP) were used. The animals were housed in cages with raised floors of wire mesh to prevent coprophagy and were fed a certified Nuvilab CR-a[®] (Nuvital) diet with free access to water under standard conditions (12 h dark-12 h light, 60% humidity at 21 ± 1° C). The animals were fasted before all assays. The drugs and MeOH extract were administered orally (by gavage), subcutaneously or intraduodenally using 0.9% (w/v) NaCl (10 ml/kg) as the vehicle. All of the experiments were approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Research (protocol 616-2, CEEA/IB-UNICAMP).

2.2 Plant material and extract

The aerial parts of *I. truxillensis* were collected along the Domingos Sartori highway, at Rubião Junior, Botucatu, São Paulo, Brazil (22S 52'20'', 48O 26'37''), in June 2003, and were authenticated by Dr. Jorge Tamashiro of the Institute of Biology at UNICAMP. A voucher specimen (UEC: 131.827) was deposited in the Herbarium of the State University of Campinas.

2.2.1 Extract preparation

The aerial parts (230 g) of *I. truxillensis* were air dried (7 days at 40°C) and powdered. The powdered aerial parts were exhaustively extracted with methanol at room temperature (3 times, 72 h each), and the extract was concentrated in vacuum to yield 40 g of residue.

2.2.2 Chromatographic analyses of the MeOH extract

The chemical constituents present in the MeOH extract were screened according to the method of Wagner et al. (1996). The chromatographic analysis was done by TLC (Fluka silica gel on glass plates, 20 cm x 20 cm x 0.25 mm) developed with *n*-butanol/acetic acid/water (BAW, 4:1:1, v/v/v). Approximately 10 µL of the MeOH extract was spotted onto the TLC plate. Alkaloids were detected by spraying the plates with Dragendorff's reagent and iodoplatinate. Anthraquinones were detected using 10% potassium hydroxide solution in methanol. Flavonoids were detected by their intense fluorescence in visible or UV light when developed with a natural product/polyethylene glycol (NP/PEG) reagent. General phenolic compounds were detected after exposition of the plates to ammonia vapors and immediately observing the fluorescent spots under UV light. Saponins and triterpenes were detected with anisaldehyde-sulphuric acid reagent which produced a range of colors after heating for 5 min at 100°C. Tannins were detected with 5% ferric chloride solution in methanol and with 1% gelatin solution and iodine vapours. Standard solutions of (+)-catechin, rutin, isoquercitrin, quercetin, kaempferol, yohimbine, galic acid, tannin acid, lupeol and friedelin were prepared in methanol. The degree of glycosylation was assessed by the R_f of the spots detected in the MeOH extract compared to the available standards.

2.3 Drugs

The following drugs were used: cimetidine, lansoprazole, piroxicam and NEM (N-ethyl-maleimide) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All of the reagents were of high purity. The MeOH

extract obtained from the aerial parts of *I. truxillensis* was dissolved in a 0.9% (w/v) NaCl solution. All reagents, drugs and MeOH extract were prepared immediately before use.

2.4 Acute Toxicity

The acute toxicity of the MeOH extract was assessed in mice as described by Souza Brito (1994). A single high dose of the MeOH extract (5000 mg.kg⁻¹ body weight, *p.o.*) was administered to a group of 10 animals after a 12 h fast.

2.5 Acute gastric mucosa lesions

The gastroprotective activity of the MeOH extract was assessed at doses of 250, 500 and 1000 mg.kg⁻¹ *p.o.* in four models of experimentally-induced gastric ulcers (see below). Cimetidine or lansoprazole was used as a reference drug, depending on the experiment. All of the animals had free access to water. After each experiment, the animals were sacrificed by cervical dislocation, the stomach removed, opened along the great curvature, and fixed between two glass plates. The inner surface of the stomach was examined with a dissecting microscope (Nikon SMZ800) and the number of gastric lesions was counted. The ulcer index was calculated according to the method of Szelenyi & Thiemer (1978).

2.6 Gastric mucosal lesions induced by absolute ethanol

These experiments were done as described by Morimoto et al. (1991) Rats were fasted for 24 h and MeOH extract, lansoprazole (30 mg.kg⁻¹) or vehicle (solution 0.9% NaCl) was administered orally. One hour after treatment, the animals received an oral dose of 1 ml of absolute ethanol and were sacrificed one hour later, as described before.

2.7 Gastric secretion in pylorus ligation induced lesions

For this assay, the method of Shay et al. (1945) was used with some modifications. The mice were fasted for 36 h, but had free access to water. Immediately after pylorus ligation, the MeOH extract, cimetidine (100 mg.kg⁻¹), or vehicle solution (0.9% NaCl) was administered intraduodenally. The mice were sacrificed 4 h later, the abdomen was opened and the stomach removed. The volume of gastric juice (ml), the pH and the ulcer index were determined. The total acid content of the gastric secretion was determined by titration to pH 7.0 with 0.01 N NaOH.

2.8 Gastric lesions induced by nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs)

These experiments were done using the method of Rainsford (1987), with some modifications (Puscas 1997). Gastric ulcers were induced using piroxicam (30 mg.kg^{-1} , *s.c.*), administered to mice after a 24 h fast. The MeOH extract, cimetidine (100 mg.kg^{-1}) or vehicle (0.9% NaCl) was administered orally, 30 min before the induction of gastric ulcers. The mice were sacrificed by cervical dislocation 4 h after ulcer induction and the ulcer index was determined as described before.

2.9 Gastric lesions induced by hypothermic-restraint stress

For this model, the method of Levine (1971) was used, with some modifications. After a 36 h fast, mice received an oral dose of MeOH extract, cimetidine (100 mg.kg^{-1}) or vehicle solution (0.9% NaCl). One hour after treatment, the mice were immobilized in a restraint cage at 4°C to induce ulcers. The mice were sacrificed 4 h after hypothermic-restraint stress and the ulcer index was calculated as described before.

2.10 Contribution of mucosal non-protein sulfhydryl groups to cytoprotection

The cytoprotective effect of mucosal non-protein sulfhydryl groups was assessed by the method of Takeuchi et al. (1989). Mice were fasted for 24 h and then allocated to different treatments. The control group received a subcutaneous injection of vehicle solution (0.9% NaCl), while the others received an injection of NEM (10 mg.kg^{-1}) by the same route. Thirty minutes later, all groups received either vehicle or MeOH extract (500 mg.kg^{-1}) orally. After 1 h, all animals received an oral dose of 0.2 ml of 0.3 M HCl/60% ethanol solution. The mice were sacrificed 1 h later and the ulcer index was determined as described before.

2.11 Statistical analysis

The results were expressed as the mean $\pm$ SD. Statistical significance was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test, with the minimum level of significance set at $P < 0.05$.

3. Results and discussion

The present study was designed to assess the antiulcerogenic activity of a MeOH extract of *I. truxillensis*. The phytochemical screening indicated that the main constituents of the MeOH extract were

flavonoid glycosides. Acute administration of the MeOH extract (up to 5000 mg.kg⁻¹ *p.o.*) did not produce signs of toxicity, and no significant changes in daily body weight or organ weight occurred during the next 14 days of observation (data not shown). Thus, this result probably indicates that the plant extract has no toxic effect. Based on previous studies with plant extracts (Gonzales & Di Stasi 2002, Nwafor & Akah 2003, Antonio et al 2004), oral doses of MeOH extract (250 500 and 1000 mg.kg⁻¹) were initially administered in order to establish a general profile of the antiulcerogenic activity. The reason for use an apparently high dose of crude extract is that this is the posology traditionally employed, i.e., a glass of tea or infusion several times by day for at least a week. Dose of 1 g.kg⁻¹ of crude extract presuppose the presence of the active principle in concentration of 10% for substances like cimetidine (100 mg.kg⁻¹), 2% for those similar to omeprazol (20 mg.kg⁻¹) and of 0.1% for those like misoprostol (1 mg.kg⁻¹), taking into consideration the dosage employed in antiulcer therapeutics (Brito 1996).

Szabo et al. (1985) demonstrated the onset of vascular injury in the glandular mucosa of the rat stomach within one minute after the intragastric administration of ethanol. The pathogenesis of the vascular lesions is not known but may be partly related to a direct effect of ethanol and its metabolites on endothelial cells.

After ingestion, ethanol diffuses into the mucosa and stimulates the formation of proinflammatory mediators by resident granulocytes and/or other mucosal cells (epithelial and endothelial cells) (Kvietys et al. 1990). Acute treatment with ethanol increases oxidative stress, DNA damage, xanthine oxidase activity and malondialdehyde levels and decreases the total glutathione content in gastric mucosal cells (Marotta et al. 1999).

As shown in Table 1, the MeOH extract significantly protected, in a dose-dependent way, the gastric mucosa from ethanol-induced ulcers at all doses (250, 500 and 1000 mg.kg⁻¹, with 43%, 71 and 98% protection, respectively). Lansoprazole, substance orally used as a positive control in this experiment, at a dose of 30 mg.kg⁻¹, provided 68% protection against the gastric lesions induced by ethanol. These results indicated a promising antiulcerogenic activity of the MeOH extract and suggested that an antisecretory or cytoprotective action may be involved (Morimoto et al. 1991).

NSAIDs can damage the gastrointestinal mucosa by local injury, when surface cells are damaged and allow acid diffusion into the submucosa, and by systemic injury, when systemic inhibition of prostaglandin synthesis occurs, thereby reducing gastric mucus production, bicarbonate secretion, and mucosal blood flow (Bjorkman 1996). NSAIDs also delay the healing of peptic ulcers, interfere with the action of growth factors, decrease epithelial cell proliferation at the ulcer margin, decrease angiogenesis in the ulcer bed, and slow the maturation of granulation tissue (Schmassmann 1998).

Table 2 summarizes the results obtained with piroxicam-induced gastric lesions. The MeOH extract protected the gastric mucosa at low (250 mg.kg⁻¹, 62% reduction in the ulcer index) and intermediate (500 mg.kg⁻¹, 69% reduction) doses, suggesting a cytoprotective mechanism via an increase in mucous and/or prostaglandin synthesis. The highest dose of MeOH extract (1000 mg.kg⁻¹) did not protect against gastric lesions induced by piroxicam. This lack of effect is typical of extracts rich in flavonoids, since in high levels of flavonoids show pro-oxidant instead of antioxidant activity (Galvez et al. 1994, 2000, Sanchez de Medina et al. 1996).

Gastric mucus plays an important role in gastric defensive mechanisms by acting as a protective barrier, mainly because of its glycoprotein content. The water stored by these glycoproteins prevents hydrogen ions from reaching the cell surface (Motilva et al. 1996). Prostaglandins play an important role in modulating the integrity of the gastric mucosa in the presence of gastric acid secretion (Curtis et al. 1995). The systemic inhibition of prostaglandin synthesis reduces gastric mucus production, bicarbonate secretion, and mucosal blood flow (Wallace 1992).

Stress-induced mucosal damage is generally considered to be the result of an imbalance between aggressive and defensive mucosal factors (Miller 1987). The hypothermic restraint-stress model used here increases acid secretion and decreases the gastric mucosal pH (Murakami et al. 1985). Brozozowski et al. (2000) observed that the exposure of rats to 3.5 h of stress induced by cold and restraint produced gastric lesions, and that this effect was accompanied by a decrease in prostaglandin (PGE₂) generation and a marked fall in gastric blood flow.

As shown in Table 3, oral administration of the MeOH extract inhibited gastric lesions induced by hypothermic restraint-stress at the three doses tested: 250 mg.kg⁻¹ (69% inhibition), 500 mg.kg⁻¹ (64% inhibition), and 1000 mg.kg⁻¹ (89% inhibition). These results suggest that active compounds present in the MeOH extract may act as regulators of gastric acid secretion. This antiulcerogenic action of the MeOH extract could also be related to the recovery of the gastric mucosal integrity mediated by an increase in mucus and bicarbonate production or by restoration of the vascular integrity to maintain the local blood flow under physiological conditions.

The inhibition of acid secretion is the one of most important factors for the healing of gastric ulcers. In the pylorus ligation model, the MeOH extract significantly reduced gastric acidity [H⁺] at a dose of 500 mg.kg⁻¹, as did cimetidine (both given intraduodenally), when compared to control rats (Table 4). These results show that a possible antisecretory effect is involved in the antiulcerogenic activity of the MeOH extract. In addition, the

ulcer index decreased after treatment with the MeOH extract (500 mg.kg⁻¹ and 1000 mg.kg⁻¹), without any change in the volume of gastric secretions, as also found to cimetidine.

Szabo (1981) demonstrated a significant decrease in the mucosal levels of non-protein sulfhydryl compounds in ethanol-induced gastric damage. These non-proteic compounds are important for maintaining the integrity of the gastric mucosa. Endogenous sulfhydryl compounds mediate the protective effects of prostaglandins against gastric mucosal injury (Miller 1983). Potentiation of the mucosal injury by NEM, an SH blocker, may be explained by the enhanced microvascular permeability in the gastric mucosa and inhibition of the gastric motility commonly associated with the prevention of mucosal injury (Takeuchi et al. 1989).

As shown in Table 5, the frequency of gastric mucosal lesions to 113% in mice pretreated with saline + NEM, whereas mice pretreated with the MeOH extract + NEM showed an increase of only 77%, thus suggesting that sulfhydryl compound were partially, involved with the gastroprotective effects of this extract.

Phytochemical analysis revealed the presence of flavonoids in the MeOH extract. These compounds, which are important for the normal growth, development, and defense of plants (Cody 1986), also exert a gastroprotective action in mammals by increasing endogenous prostaglandin levels, decreasing histamine secretion, inhibiting *Helicobacter pylori*, and scavenging oxygen-derived free radicals (Park et al. 2004). This gastroprotection has been reported for various flavonoids including rutin, naringin, quercetin, kaempferol, sofaradin and luteolin (Lewis 1992, Di Carlo et al. 1999, Harborne & Williams 2000, Borrelli & Izzo 2000). Rutin reduces the levels of lipoperoxides and increases the activity of the anti oxidant enzyme GSH-Px (La Casa et al. 2000). Then the protective action of flavonoids may be assessed by the stimulation of mucus and bicarbonate secretion (Cristoni et al. 1989, Gracioso et al. 2002) and by their inhibitory effect on the proton pump of parietal cells (Beil 1995).

In conclusion, the results of this preliminary study indicated that the MeOH extract of the aerial parts of *I. truxillensis* has a gastroprotective action in several models of gastric lesions. This action is probably mediated by flavonoids. New series of experiment is in progress using a flavonoid rich fraction obtained from the MeOH extract of *I. truxillensis* as well as the isolation and identification of the flavonoids present in this fraction.

4. Acknowledgments

This work was supported by Brazilian institutions FAPESP (process n° 03/07017-4 of the grant and n° 03/03110-0 for the scholar ship) and CNPq.

5. References

1. ANTONIO, J.M., GRACIOSO, J.S., TOMA, W., LOPEZ, L.C., OLIVEIRA, F. & BRITO, A.R. 2004. Antiulcerogenic activity of ethanol extract of *Solanum variabile* (false "jurubeba"). *J. Ethnopharmacol.* 93: 83-88.
2. BEIL, W., BIRKHOLZ, C. & SEWING, K.F. 1995. Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and *Helicobacter pylori* growth. *Arzneimittelforschung.* 45: 697-700.
3. BENTHAM, G. M. 1859. Leguminosae I. In *Flora Brasiliensis* (VON MARTIUS, K. F. P., ENDLICHER, S. F. L., URBAN, I., EICHLER, A. W., and FENZL, E., eds.). Monachii; Friedr. Fleischer, 15.
4. BJORKMAN, D.J. 1996. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastrointestinal injury. *Am. J. Med.* 101: 25S-32S.
5. BORRELLI, F. & IZZO, A.A. 2000. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytother. Res.* 14: 581-591.
6. BRITO, A.R. 1996. How to study the pharmacology of medicinal plants in underdeveloped countries. *J. Ethnopharmacol.* 54: 131-138.
7. BRITO, A.R.M.S., COTA, R.H.S. & NUNES, D.S. 1997. Gastric antiulcerogenic effects of *Dalbergia monetaria* L in rats. *Phytother. Res.* 11: 314-316.
8. BRZOSOWSKI, T., KONTUREK, P.C., KONTUREK, S.J., DROZDOWICZ, D., PAJDO, R., PAWLIK, M., BRZOSOWSKA, I. & HAHN, E.G. 2000. Expression of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in adaptive cytoprotection induced by mild stress. *J. Physiol Paris* 94: 83-91.
9. CODY, V., MIDDLETON, E., and HARBORNE, J. B. 1986. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships*. New York : Alan R. Liss.
10. CRISTONI, A., MALANDRINO, S. & MAGISTRETTI, M.J. 1989. Effect of a natural flavonoid on gastric mucosal barrier. *Arzneimittelforschung.* 39: 590-592.
11. CURTIS, G.H., MACNAUGHTON, W.K., GALL, D.G. & WALLACE, J.L. 1995. Intraluminal pH modulates gastric prostaglandin synthesis. *Can. J. Physiol Pharmacol.* 73: 130-134.

12. DI CARLO, G., MASCOLO, N., IZZO, A.A. & CAPASSO, F. 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.* 65: 337-353.
13. GALVEZ, J., DE LA CRUZ, J.P., ZARZUELO, A., SANCHEZ DE, M.F., Jr., JIMENEZ, J. & SANCHEZ DE LA, C.F. 1994. Oral administration of quercitrin modifies intestinal oxidative status in rats. *Gen. Pharmacol.* 25: 1237-1243.
14. GALVEZ, J., GARRIDO, M., MERLOS, M., TORRES, M.I. & ZARZUELO, A. 2000. Intestinal anti-inflammatory activity of UR-12746, a novel 5-ASA conjugate, on acute and chronic experimental colitis in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 130: 1949-1959.
15. GONZALEZ, F.G. & DI STASI, L.C. 2002. Anti-ulcerogenic and analgesic activities of the leaves of *Wilbrandia ebracteata* in mice. *Phytomedicine.* 9: 125-134.
16. GRACIOSO, J.S., VILEGAS, W., HIRUMA-LIMA, C.A. & SOUZA BRITO, A.R. 2002. Effects of tea from *Turnera ulmifolia* L. on mouse gastric mucosa support the Turneraceae as a new source of antiulcerogenic drugs. *Biol. Pharm. Bull.* 25: 487-491.
17. GURBUZ, I., USTUN, O., YESILADA, E., SEZIK, E. & AKYUREK, N. 2002. In vivo gastroprotective effects of five Turkish folk remedies against ethanol-induced lesions. *J. Ethnopharmacol.* 83: 241-244.
18. HARBORNE, J.B. & WILLIAMS, C.A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481-504.
19. KVIETYS, P.R., TWOHIG, B., DANZELL, J. & SPECIAN, R.D. 1990. Ethanol-induced injury to the rat gastric mucosa. Role of neutrophils and xanthine oxidase-derived radicals. *Gastroenterology* 98: 909-920.
20. LA, C.C., VILLEGAS, I., ARCON DE LA, L.C., MOTILVA, V. & MARTIN CALERO, M.J. 2000. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *J. Ethnopharmacol.* 71: 45-53.
21. LEITE, S.P., DE MEDEIROS, P.L., DA SILVA, E.C., DE SOUZA MAIA, M.B., DE, M.L., V & SAUL, D.E. 2004. Embryotoxicity in vitro with extract of *Indigofera suffruticosa* leaves. *Reprod. Toxicol.* 18: 701-705.
22. LEVINE, R. J. 1971. A Method for Rapid Production of Stress Ulcers in Rats. In *Peptic Ulcer* (PFEIFFER, C. J., ed.). Munksgarrd, pp.92-97.
23. LEWIS, D.A. 1992. Antiulcer Drugs from Plants. *Chemistry in Britain* 28: 141-144.
24. LEWIS, G. P. 1987. *Legumes of Bahia* . Royal Botanic Gardens, Kew.

25. MAROTTA, F., TAJIRI, H., SAFRAN, P., FESCE, E. & IDEO, G. 1999. Ethanol-related gastric mucosal damage: evidence of a free radical-mediated mechanism and beneficial effect of oral supplementation with bionormalizer, a novel natural antioxidant. *Digestion* 60: 538-543.
26. MILLER, T.A. 1983. Protective effects of prostaglandins against gastric mucosal damage: current knowledge and proposed mechanisms. *Am. J. Physiol* 245: G601-G623.
27. MILLER, T.A. 1987. Mechanisms of stress-related mucosal damage. *Am. J. Med.* 83: 8-14.
28. 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 teprenone and cimetidine. *Jpn. J. Pharmacol.* 57: 495-505.
29. MOTILVA, V., LOPEZ, A., MARTIN, M.J., LA, C.C. & ARCON DE LA, L.C. 1996. Cytoprotective activity of cisapride on experimental gastric mucosal lesions induced by ethanol. Role of endogenous prostaglandins. *Prostaglandins* 52: 63-74.
30. MURAKAMI, M., LAM, S.K., INADA, M. & MIYAKE, T. 1985. Pathophysiology and pathogenesis of acute gastric mucosal lesions after hypothermic restraint stress in rats. *Gastroenterology* 88: 660-665.
31. NWAFOR, S.V. & AKAH, P.A. 2003. Effect of methanolic leaf extract of *Cissampelos mucronata* A. Rich against indomethacin induced ulcer in rats. *Indian J. Exp. Biol.* 41: 181-183.
32. PARK, S., HAHM, K.B., OH, T.Y., JIN, J.H. & CHOUE, R. 2004. Preventive effect of the flavonoid, wogonin, against ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *Dig. Dis. Sci.* 49: 384-394.
33. PUSCAS, I., PUSCAS, C., COLTAU, M., PASCA, R., TORRES, J., MARQUEZ, M., HERRERO, E., FILLAT, O. & ORTIZ, J.A. 1997. Comparative study of the safety and efficacy of ebrotidine versus ranitidine and placebo in the prevention of piroxicam-induced gastroduodenal lesions. *Arzneimittelforschung.* 47: 568-572.
34. RAINSFORD, K.D. 1987. Gastric ulcerogenicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs in mice with mucosa sensitized by cholinomimetic treatment. *J. Pharm. Pharmacol.* 39: 669-672.
35. ROIG, J. T. 1988. *Plantas Medicinales, Aromaticas o Venenosas De Cuba*. Editorial Cientifica-Tecnica, La Havana - Cuba. 164 pp.
36. SANCHEZ DE MEDINA, F., GALVEZ, J., ROMERO, J.A. & ZARZUELO, A. 1996. Effect of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278: 771-779.
37. SCHMASSMANN, A. 1998. Mechanisms of ulcer healing and effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am. J. Med.* 104: 43S-51S.

38. 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.
39. SOUZA BRITO, A. R. 1994. Manual De Ensaio Toxicologicos "In Vivo". UNICAMP, Campinas/SP - Brazil. 122 pp.
40. SZABO, S., TRIER, J.S. & FRANKEL, P.W. 1981. Sulfhydryl Compounds May Mediate Gastric Cytoprotection. *Science* 214: 200-202.
41. SZABO, S., TRIER, J.S., BROWN, A. & SCHNOOR, J. 1985. Early Vascular Injury and Increased Vascular-Permeability in Gastric-Mucosal Injury Caused by Ethanol in the Rat. *Gastroenterology* 88: 228-236.
42. SZELENYI, I. & THIEMER, K. 1978. Distention Ulcer As A Model for Testing of Drugs for Ulcerogenic Side-Effects. *Arch. Toxicol.* 41: 99-105.
43. TAKEUCHI, K., OKADA, M., NIIDA, H. & OKABE, S. 1989. Role of sulfhydryls in mucosal injury caused by ethanol: relation to microvascular permeability, gastric motility and cytoprotection. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 248: 836-841.
44. WAGNER, H. and BLADT, S. 1996. *Plant Drug Analysis a Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer, Berlin.
45. WALLACE, J.L. 1992. Prostaglandins, NSAIDs, and cytoprotection. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 21: 631-641.

Legends

Tabela 1. The results are expressed as the mean $\pm$ SD. ANOVA $F_{(4,26)} = 12.451$ ($p < 0.01$, $p < 0.05$) for the ulcer index. Dunnett's test: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to the control group.

Tabela 2. The results are expressed as mean $\pm$ SD. ANOVA $F_{(4,35)} = 10.966$ ($p < 0.01$, $p < 0.05$) for the ulcer index and 4.275 ($p < 0.01$) for the pH. Dunnett's test: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to the control group.

Tabela 3. The results are expressed as mean $\pm$ SD. ANOVA $F_{(4,34)} = 4.071$ ($p < 0.05$, $p < 0.01$) for the ulcer index. Dunnett's test: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to the control group.

Tabela 4. The results are expressed as mean $\pm$ SD. ANOVA $F_{(4,27)} = 5.074$ ($p < 0.01$) for pH, 1.661 for gastric volume ($p > 0.05$), 38.76 for the ulcer index ($p < 0.01$), and 9.289 for $[H^+]$ ($p < 0.05$, $p < 0.01$). Dunnett's test: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to the control group.

Tabela 5. The results are expressed as mean $\pm$ SD. ANOVA $F_{(3,28)} = 22.262$ ($p < 0.01$) for the ulcer index. Dunnett's test: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to the saline + saline group.

Table 1. Effects of lansoprazole and MeOH extract of *I. truxillensis* on gastric mucosal lesions induced by absolute ethanol in rats.

Treatment (p.o)	N	Dose (mg.kg ⁻¹)	Ulcer index	Number of rats with lesions	Inhibition (%)
Control	8	10 ml.kg ⁻¹	70.0 ± 28.0	8/8	-
Lansoprazole	8	30	22.0 ± 11.0**	7/8	68
	5	250	40.0 ± 27.0*	5/5	43
MeOH extract	5	500	20.0 ± 4.5**	4/5	71
	5	1000	1.4 ± 0.9**	2/5	98

Table 2. Effects of cimetidine and MeOH extract of *I. truxillensis* on gastric mucosal lesions induced by piroxicam (NSAID)-in mice.

Treatment (p.o)	Dose (mg.kg ⁻¹)	N	pH (unit)	Ulcer index	Number of mice with lesions	Inhibition (%)
Control	10 ml.kg ⁻¹	8	2.4 ± 0.7	10.2 ± 3.7	8/8	–
Cimetidine	100	8	3.2 ± 1.0	3.9 ± 1.9**	7/8	62
	250	8	3.6 ± 0.5**	3.9 ± 1.9**	8/8	62
MeOH extract	500	8	2.6 ± 0.7	3.2 ± 1.6**	7/8	69
	1000	8	2.0 ± 0.9	6.9 ± 2.6*	6/8	32

Table 3. Effects of cimetidine and MeOH extract of *I. truxillensis* on gastric mucosal lesions induced by stress in mice.

Treatment	N	Dose (mg.kg ⁻¹)	Ulcer index	Number of mice with lesions	Inhibition (%)
Control	8	10 ml.kg ⁻¹	13.5 ± 12.2	8/8	–
Cimetidine	8	100	5.5 ± 4.5	8/8	59
	7	250	4.3 ± 3.1*	6/7	69
MeOH extract	8	500	4.7 ± 3.6*	6/8	64
	8	1000	1.5 ± 1.1**	5/8	89

Table 4. Effects of cimetidine and MeOH extract of *I. truxillensis*, administered intraduodenally, on gastric juice parameters in pylorus ligation-induced gastric mucosal lesions in mice.

Treatments	N	Dose (mg.kg ⁻¹)	pH (unit)	Gastric Volume (ml)	[H ⁺] (mEq/ml/4h)	Ulcer Index	Inhibition (%)
Control	13	10 ml.kg ⁻¹	3.2 ± 0.7	1.2 ± 0.7	6.4 ± 2.6	4.6 ± 1.3	-
Cimetidine	5	100	5.6 ± 1.1**	1.3 ± 0.6	1.2 ± 1.1**	0 ± 0**	100
	5	250	3.6 ± 0.5	1.2 ± 0.4	3.3 ± 1.9*	1.2 ± 0.4**	73
MeOH extract	5	500	4.2 ± 1.1	1.0 ± 0.5	1.6 ± 0.8**	0.8 ± 0.4**	82
	4	1000	3.7 ± 1.5	0.5 ± 0.1	3.5 ± 0.9	0.7 ± 0.5**	84

Table 5. Effects of N-ethylmaleimide (NEM) and the MeOH extract of *I. truxillensis* (500 mg.kg⁻¹) on HCl/ethanol-induced gastric mucosal lesions in mice.

Treatments	N	Dose (mg.kg ⁻¹)	Ulcer index	Change (%)
Saline (s.c.) + Saline (p.o.)	8	10 ml.kg ⁻¹	27.6 ± 10.5	-
Saline (s.c.) + MeOH extract (p.o.)	8	500	2.9 ± 1.9**	-
NEM (s.c.) + Saline (p.o.)	8	10	59.0 ± 20.0**	+ 113%
NEM (s.c.) + MeOH extract (p.o.)	8	500	49.0 ± 19.0*	+ 77%

Journal name: Biological & Pharmaceutical Bulletin

Type of manuscript: Regular article

Section: Pharmacology

Antiulcerogenic effects of organic fractions obtained from *Indigofera truxillensis* Kunth and their mechanisms

Authors:

Maira Cola-Miranda^a, Tamara Regina Calvo^c, Victor Barbastefano^a, Anderson Luiz-Ferreira^a, Elisangela Farias-Silva^a, Clélia Akiko Hiruma-Lima^b, Wagner Vilegas^c, Alba Regina Monteiro Souza Brito^{a,*}

Affiliations:

^a*Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil;* ^b*Departamento de Fisiologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brazil;* ^c*Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, SP, Brazil.*

***Author for correspondence:** Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil. Phone: +55-19-3788-6192, Fax: +55-19-3788-6185. E-mail: abrito@unicamp.br

Abstract

An aqueous fraction (AqF) and an acetate fraction (AcF) obtained from the crude organic extract of the aerial parts of *Indigofera truxillensis* Kunth (Fabaceae) were screened for their antiulcerogenic properties in different experimental models. Preliminary phytochemical screening showed that glycoside flavonoids derived from kaempferol were the major compounds present in AqF and AcF. Pretreatment with AqF or AcF (50, 100 and 200 mg kg⁻¹) significantly inhibited the gastric mucosal damage caused by orally administered absolute ethanol. Neither AqF nor AcF showed antisecretory activity since they did not modify the biochemical parameters of gastric juice in pylorus ligated rats. Pretreatment with both fractions significantly increased ($p < 0.01$) the gastric wall mucus as also seen with carbenoxolone. Prostaglandin (PGE₂) production was not significantly increased by AcF and AqF. In addition, indomethacin has no effect on the levels of PGE₂ in the presence of AcF. Gastroprotection by AqF, but not AcF, was attenuated by pretreatment with N^G-nitro-L-arginine methyl-ester, a nitric oxide-synthase inhibitor. However, gastroprotection by AcF, and AqF, was attenuated by pretreatment with N-ethylmaleimide, a blocker of mucosal nonprotein sulfhydryl groups. These results show that AqF and AcF have significant antiulcerogenic activity that is mediated by cytoprotective mechanisms, including mucus, prostaglandin and nitric oxide production and the presence of sulfhydryl compounds.

Keywords: Antiulcerogenic activity; *Indigofera truxillensis*; gastroprotection.

1. Introduction

Flavonoids are phenolic compounds widely distributed in edible plants including leafy vegetables, fruits (strawberry or apple) and beverages (tea, red wine and beer). These compounds exert a variety of biological effects, including antiviral, antithrombotic, antiischemic, antiinflammatory, antihistaminic, antioxidant and free-radical scavenging activities^{1,2,3,4}. Gastric ulcers are produced by an imbalance between damage-inducing and protective factors in the stomach⁵. Antonio and Souza Brito⁶ demonstrated that flavonoid-containing organic extracts from plants inhibited gastric lesions induced by ethanol, indomethacin and ligation of the pylorus in rats.

Indeed plants are an attractive source of new drugs for the treatment of a variety of illnesses, including gastric ulcers⁷.

The genus *Indigofera*, one of the six largest genera of the Leguminosae, contains approximately 700 herbaceous and bushy species and occurs in the state of São Paulo and in north and northeastern Brazil, as well as in Mexico⁸. Phytochemical screening has shown that glycoside flavonoids were the major compounds present in *Indigofera truxillensis*. Other phenolic compounds, saponins, alkaloids and triterpenes, are present as minor compounds.

The aim of this study was to evaluate the antiulcerogenic activity of aqueous (AqF) and ethyl acetate (AcF) fractions, obtained from a crude methanolic extract of the aerial parts of *I. truxillensis*, and to determine the mechanisms involved. We also investigated the antisecretory and cytoprotective properties of both fractions, including the involvement of mucus secretion, prostaglandins (PGs), nitric oxide (NO) and sulfhydryl (SHs) compounds.

2. Material and Methods

2.1. Animals

Male Wistar rats (180-250 g) obtained from breeding at the State University of Campinas (CEMIB/UNICAMP) Brazil, were used. The colony rats were fed a certified Nuvelab CR-diet, with free access to tap water, and were housed with a 12 h light/dark cycle at $60 \pm 1\%$ humidity and $21.5 \pm 2^\circ\text{C}$.

The experimental protocols were approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation (CEE/UNICAMP) and were done in accordance with the Canadian Council Guidelines for Animal Care.

2.2. Drugs

Cimetidine, lansoprazole, carbenoxolone, indomethacin, N^G-nitro-L-arginine methyl-ester (L-NAME) and N-ethyl-maleimide (NEM) were all obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.3. Plant material

The aerial parts of *I. truxillensis* were collected along the Domingos Sartori highway at Rubião Junior, Botucatu, São Paulo State, Brazil, in June 2003. The plants were identified by Dr. Jorge Tamashiro of the Institute of Biology at UNICAMP and a voucher specimen (UEC: 131.827) was deposited in the Herbarium at UNICAMP.

2.4. Preparation of fractions

The aerial parts (1500 g) of *I. truxillensis* were air dried (7 d at 40°C), powdered, and then exhaustively extracted with chloroform (CHCl₃) and methanol (MeOH) successively, at room temperature (three chloroform-methanol cycles, with 72 h for each solvent). The solvents were evaporated in a vacuum to provide a CHCl₃ extract (43 g, 3.0%) and a MeOH extract (110 g, 7.3%). A portion (5.0 g) of the MeOH extract was partitioned in ethyl acetate and water (1:1, v/v) to yield 1.6 g (32%) of the AcF and 2.4 g (48%) of the AqF fractions.

2.5. Determination of the total flavonoid content

The flavonoid contents of the AcF and AqF were determined as follows: 0.1 ml of each fraction was diluted with 80% aqueous ethanol (0.9 ml) and an aliquot of 0.5 ml was added to test tubes containing 0.1 ml of 10% aluminum nitrate, 0.1 ml of 1 M aqueous potassium acetate and 4.3 ml of 80% ethanol. After 40 min at room temperature, the absorbance was determined at 415 nm. The total flavonoid content was calculated using quercetin as a standard⁹⁾.

2.6. Ethanol-induced gastric lesions

Ethanol-induced ulcers were produced in rats according to the method of Morimoto, *et al.* (1991)¹⁰⁾. Rats were randomly separated into ten groups and fasted for 24 h before the experiment. One hour after the oral administration of AqF or AcF (50, 100 and 200 mg kg⁻¹), lansoprazole (30 mg kg⁻¹), saline (10 ml kg⁻¹; for AqF) or 12% Tween 80 (10 ml kg⁻¹; for AcF), 1 ml of 99.5% ethanol was given orally to the rats. Animals were killed by cervical dislocation one hour after ethanol administration. Their stomachs were removed, opened along the greater curvature, and fixed between two glass plates. The inner surface of the stomach was examined with a dissecting microscope (Nikon SMZ800) and the number of gastric lesions was counted. The ulcer index was calculated according to the method of Szeleny and Thieme¹¹⁾.

2.7. Gastric secretion in lesions induced by pylorus ligation

For this assay, the method of Shay, *et al.* (1945)¹²⁾ was used with some modifications. Rats were fasted for 36 h and immediately after pylorus ligation, AqF (100 mg kg⁻¹), AcF (50 mg kg⁻¹), cimetidine (100 mg kg⁻¹), saline 0.9% (10 ml kg⁻¹) or 12% tween 80 (10 ml kg⁻¹) was administered intraduodenally. The rats were killed 4 h later, and their abdomens were opened and the stomachs removed. The gastric juice was collected and weighed (g) and its pH was determined using a pH meter (Quimis Aparelhos Científico Ltda, model Q400A, Brazil).

2.8. Determination of the gastric mucus content

This assay was done as described by Rafatullah, *et al.* (1990)¹³⁾ with some modifications. After a 36 h fast, rats received AqF (100 mg kg⁻¹), AcF (50 mg kg⁻¹), carbenoxolone (200 mg kg⁻¹), saline 0.9% (10 ml kg⁻¹) or 12% Tween 80 (10 ml kg⁻¹) orally. Thirty minutes after treatment, the pylorus was ligated. The animals were killed by cervical dislocation 4 h after pylorus ligation and the glandular portion of the stomachs were removed and weighed. Each segment was immediately immersed in 10

ml of 0.1% Alcian blue solution (0.16 M sucrose/0.05 M sodium acetate, pH 5.8) for 2 h, after which the excess dye was removed by two successive rinses with 10 ml of 0.25 M sucrose, first for 15 min and then for 45 min. Each stomach was then transferred into a 0.5 M magnesium chloride solution for 2 h. Four milliliters of the dye solution was then vigorously shaken with an equal volume of ether and the resulting emulsion was centrifuged at 3600 rev min⁻¹ and the absorbance of the aqueous layer was measured at 580 nm. The amount of blue dye extracted per gram of wet glandular tissue was then calculated from a standard curve of dye prepared in sucrose-acetate solution.

2.9. Quantification of prostaglandin production

Prostaglandin production was determined according to the method of Curtis, *et al.* (1995)¹⁴⁾ in rats. After an 18 h fast, control rats received 0.9% saline (10 ml kg⁻¹, s.c.) or an injection of indomethacin (30 mg kg⁻¹, s.c.), a cyclooxygenase inhibitor. Thirty minutes later, each experimental group received AqF (100 mg kg⁻¹), AcF (50 mg kg⁻¹); saline or 12% Tween 80 (10 ml kg⁻¹) orally. The rats were sacrificed 30 min after treatment and the abdomen was opened and samples of the corpus (full thickness) were excised, weighed and suspended in 1 ml of 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4. The tissue was homogenated with a Polytron® PT-10-35 (Kinematica AG-Switzerland) and incubated at 37°C in a Dubnoff water-bath (Tecnal – Brazil), for 20 min. The prostaglandin E₂ (PGE₂) content of the buffer was measured using an enzyme immunoassay kit (RPN222, Amersham).

2.10. Ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats pretreated with N^G-nitro-L-arginine methyl-ester

N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 70 mg kg⁻¹ dissolved in saline solution) or saline vehicle was injected intraperitoneally 30 min before the oral administration of AqF (100 mg kg⁻¹), AcF (50 mg kg⁻¹) or carbenoxolone (100 mg kg⁻¹)¹⁵⁾. One hour after treatment, 1 ml of 99.5% ethanol was given orally to the rats. Animals were killed by cervical dislocation one hour after ethanol administration; their stomachs were removed, opened along the greater curvature, and fixed between two glass plates for examination. The results were expressed as an ulcer index (UI) as described above.

2.11. Ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats pretreated with N-ethylmaleimide

Rats (N=5) received a subcutaneous injection of N-ethylmaleimide (10 mg kg⁻¹, dissolved in saline solution) or saline vehicle, 30 min before the oral administration of AqF (100 mg kg⁻¹), AcF (50 mg kg⁻¹) or carbenoxolone (100 mg kg⁻¹)¹⁵⁾. One hour after treatment, 1 ml of 99.5% ethanol was given orally to the rats. Animals were killed by cervical dislocation one hour after ethanol administration; their stomachs were removed, opened along the greater curvature, and fixed between two glass plates for examination. The results were expressed as an ulcer index (UI) as described above.

2.12. Statistical analysis

The results were expressed as the mean $\pm$ standard derivation. Statistical comparisons were done by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett's or Tukey's post-hoc test, with the level of significance set at $P < 0.05$.

4. Discussion

In this work, we examined the antiulcerogenic activity of an aqueous (AqF) and an ethyl acetate (AcF) fraction obtained from the aerial parts of *I. truxillensis* and the possible mechanisms involved in gastric mucosal protection. We also quantified the total flavonoid content in the aerial parts of *I. truxillensis* using quercetin as standard. Kaempferol-derived flavonoids were detected in both fractions, and have been reported as antiulcer agents in the gastrointestinal tract¹⁶⁾.

The flavonoid content was $65.0 \pm 0.7 \text{ mg g}^{-1}$ (6.5%) in AcF and $110.5 \pm 1.3 \text{ mg g}^{-1}$ (11%) in AqF of the MeOH extract from *I. truxillensis*.

The administration of absolute ethanol produces numerous gastric mucosal lesions, a decrease in gastric blood flow, the generation of reactive oxygen species and an increase in inflammatory mediators, including $\text{IL}^{-1}\beta$ and $\text{TNF}\alpha$ ¹⁷⁾.

To evaluate the antiulcerogenic effect of AqF and AcF, we initially examined the efficacy of oral doses of 50, 100 and 200 mg kg^{-1} of each fraction in gastric ulcers induced by ethanol. As shown in Table 1, AqF (100 mg kg^{-1}) and AcF (50 mg kg^{-1}) provided 79% and 81% protection, respectively, against ethanol-induced ulcers.

We next evaluated the antisecretory properties of AqF and AcF. Table 2 shows that the antiulcerogenic activity of AqF and AcF was unrelated to the mechanisms that control gastric acid secretion. In the model of pyloric ligation, pretreatment with AqF (100 mg kg^{-1}) or AcF (50 mg kg^{-1}) did not significantly modify the pH of gastric juice. However, AcF (50 mg kg^{-1}) significantly decreased the volume of gastric juice produced. The gastroprotective action of some medicinal plants plays an important role in their antiulcerogenic activity. A drug with an antiulcer effect but that does not inhibit gastric acid secretion or neutralize intraluminal acid is very desirable for the treatment of peptic ulcers, since it would prevent microbial overgrowth and excessive hypergastrinemia¹⁸⁾.

Natural flavonoids are well known for their important scavenging properties on oxygen radicals *in vivo* and *in vitro*, and their ability to affect various steps of the arachidonate cascade via action on cyclo-oxygenase or lipoxygenase¹⁹⁾. Damage to the gastric mucosa markedly increases the formation of 5-lipoxygenase products such as LTB_4 and LTC_4 ²⁰⁾. Recent studies showed that *Indigofera hetrantha* significantly inhibits lipoxygenase activity²¹⁾.

Pretreatment with flavonoids increases the production of mucus and its glycoprotein content²²⁾. Mucus contributes to mucosal defense by providing a physical barrier against bacteria and acts as a lubricant to reduce physical abrasion of the mucosa. Mucus also protects the mucosa from damage induced by acid and luminal toxins²³⁾.

Gastric cytoprotection, which consists of mucus secretion, enhanced mucus movement, and bicarbonate secretion into the gastric lumen, is highly dependent on products of the arachidonic acid pathway and on the peroxidative-antioxidative balance²⁴⁾. The gastric mucus consists of a soluble mucin present in gastric juice, insoluble (adherent) mucus that covers mucosal cells and mucus present in muciniparous cells. Adherent mucus is considered to be the main factor in gastric mucosal protection²⁵⁾.

Figure 1(a, b) shows that pretreatment with carbenoxolone (200 mg kg^{-1}), AqF (100 mg kg^{-1}) or AcF (50 mg kg^{-1}) significantly increased the amount of adherent mucus in the gastric mucus mucosa when compared to the control group. This increasing is one of the antiulcerogenic mechanisms involved with the antiulcer effects of the two fractions tested here.

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) can damage the gastroduodenal mucosa via several mechanisms, including a topical irritant effect on the epithelium, impairment of the barrier properties of the mucosa, suppression of gastric prostaglandin production, reduction of the gastric mucosal blood flow and interference with the repair of superficial injury²⁶⁾. Flavonoids stimulate the production of prostaglandins in isolated cells of the gastric mucosa²⁷⁾ and promote mucus and bicarbonate secretion, thereby enhancing mucosal blood flow and reducing the increased microvascular permeability²⁸⁾. Mojziz et al.²⁹⁾ showed that pretreatment of animals with quercetin prevented mucus degradation after ischemia/reperfusion.

Endogenous prostaglandins play an important role in maintaining mucosal integrity, by a mechanism that includes the continuous secretion of bicarbonate anions (HCO_3^-) and mucus production in the stomach and duodenum³⁰⁾. The presence of PGE_2 in the stomach, duodenum and small intestine may be related to the inhibition of gastric contraction, stimulation of duodenal alkaline secretion and the suppression of bacterial translocation³¹⁾.

As shown in Figure 2(a), AqF (100 mg kg^{-1}) did not increase PGE_2 synthesis, whereas indomethacin PGE_2 synthesis was attenuated compared to the controls. This finding indicated that PGE_2 was not involved in the gastroprotective action of AqF. Similarly AcF (50 mg kg^{-1}) did not increase PGE_2 synthesis compared to the sham. In addition, indomethacin did not effect the levels of PGE_2 in the presence of AcF.

Prostaglandins, a family of mediators, have numerous effects including cytoprotection of gastric mucosa. Cyclooxygenase, the first enzyme in the pathway of prostaglandin and other eicosanoids formation from arachidonic acid, also exists in both constitutive (cyclooxygenase-1) and cytokine/lipopolysaccharide-inducible (cyclooxygenase-2) isoforms^{32,33)}. Aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs³⁴⁾ such as indomethacin inhibit the enzymatic activity of both isoforms. It is now accepted that the constitutively expressed enzyme, cyclooxygenase-1, is involved in producing prostaglandins for cellular 'housekeeping' functions, including gastric cytoprotection; in contrast, the inducible enzyme cyclooxygenase-2, is thought to be involved in inflammation, cellular differentiation, and mitogenesis³⁵⁾. Inducible nitric oxide (NO) synthase and cyclooxygenase-2 may co-exist in some cells after exposure to lipopolysaccharide or cytokines³⁶⁾. It has been reported that NO activates the isoenzyme cyclooxygenase leading to an augmented production of cyclooxygenase metabolites³⁷⁾ such as prostaglandin. Some flavonoids can enhance NO release³⁸⁾. It has been reported that phenolic compounds such as resveratrol can upregulate NO³⁹⁾. This fraction (acetate fraction of *I. truxillensis*) is rich in phenolic compounds. These phenolic compounds present in the fraction probably modulates the NO, and this in turn increases the cyclooxygenase metabolites, justifying the increase of prostaglandin when indomethacin, a potent inhibitor of cyclooxygenase isoenzymes was administered.

Functional alterations, such as a decrease in acid secretion or an increase in mucosal blood flow, play an important role in gastric mucosal defense under adverse conditions⁴⁰⁾. NO plays a critical role in maintaining goblet cell function in the gastric mucus⁴¹⁾. The protective effect of exogenously administered L-arginine against stress-induced gastric mucosal lesions in rats is partly attributable to the NO-mediated inhibition of neutrophil infiltration into the gastric mucosa⁴²⁾. The release of NO causes

vasodilatation of submucosal arterioles that increases the mucosal blood flow. This increase in blood flow allows the buffering of acid that has entered the lamina propria and helps to dilute and remove any toxins that have crossed the epithelium²³⁾. NO is also an important regulator of mucus secretion in the stomach and is involved in gastric defense mechanisms⁴³⁾.

As shown in Figure 3(a, b), N^G-nitro-L-arginine methyl-ester (L-NAME), an NO synthase inhibitor, significantly reduced the gastroprotective activity of AqF (100 mg kg⁻¹), but did not have any effects on that of AcF (50 mg kg⁻¹). This result indicates that NO is involved with the antiulcerogenic action of AqF but not of fAc.

Non-protein sulfhydryl (SH) compounds limit the production of oxygen-derived free radicals and are involved in cellular protection⁴⁴⁾. Ethanol-induced damage to the gastric mucosa is associated with a significant decrease in the levels of SH-compounds, especially glutathione (GSH), in experimental animals⁴⁵⁾. Sulfhydryl groups (-SH) have a broad range of roles in the cell, and the redox status of cysteine residues can affect the structure and function of numerous enzymes, receptors and transcription factors⁴⁶⁾. Sulfhydryl compounds have been implicated in the maintenance of gastric integrity, particularly when reactive oxygen species are involved in the pathophysiology of tissue damage⁴⁷⁾.

Ethanol-induced gastric damage has also been associated with the depletion of endogenous SHs⁴⁸⁾. Figure 4(b) shows that N-ethylmaleimide (NEM) an SH blocker, significantly attenuated the gastroprotective effect of AcF (50 mg kg⁻¹) and AqF (100 mg kg⁻¹), which indicated that part of the protective action was mediated by endogenous SHs.

5. Conclusion

AqF and AcF obtained from *I. truxillensis* showed antiulcerogenic activity. NO, SHs and mucus formation are involved in the gastroprotection induced by AqF, whereas mucus and SHs are involved in the gastroprotective effects of AcF.

The identification of the active flavonoids in AqF and AcF should contribute to our understanding of the mechanisms involved in the antiulcerogenic properties of these fractions.

Acknowledgment

This work was supported by the Brazilian institutions FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa Científica e Tecnológica).

References

- 1) Formica J. V., Regelson W., *Food Chem Toxicol.*, **33**, 1061-1080, (1995).
- 2) Erden I. M., Kahraman A., *Toxicology.*, **154**, 21-29, (2000).
- 3) Erden I. M., Kahraman A., Koken T., *Clin Exp Dermatol.*, **26**, 536-539, (2001).
- 4) Robak J., Gryglewski R. J., *Pol J Pharmacol.*, **48**, 555-564, (1996).
- 5) Brzozowski T., *J Physiol Pharmacol.*, **54**, 99-126, (2003).
- 6) Antonio M. A., Souza Brito A. R., *J Ethnopharmacol.*, **61**, 215-228, (1998).
- 7) Gonzales E., Iglesias I., Carretero E., Villar A., *J Ethnopharmacol.*, **70**, 329-333, (2000).

- 8) Moreira J. L. A., Azevedo-Tozzi A. M. G., *Revista Brasileira de Botânica.*, **20**, 97-117, (1997).
- 9) Moreno M. I., Isla M. I., Sampietro A. R., Vattuone M. A., *J Ethnopharmacol.*, **71**, 109-114, (2000).
- 10) Morimoto Y., Shimohara K., Oshima S., Sukamoto T., *Jpn J Pharmacol.*, **57**, 495-505, (1991).
- 11) Szelenyi I., Thiemer K., *Archives of Toxicology.*, **41**, 99-105, (1978).
- 12) Shay H., Komarov S. A., Fels S. S., Meranze D., Gruenstein M., Siplet H., *Gastroenterology.*, **5**, 43-61, (1945).
- 13) Rafatullah S., Tariq M., Al-Yahya M. A., Mossa J. S., Ageel A. M., *J Ethnopharmacol.*, **29**, 25-34, (1990).
- 14) Curtis G. H., MacNaughton W. K., Gall D. G., Wallace J. L., *Can J Physiol Pharmacol.*, **73**, 130-134, (1995).
- 15) Matsuda H., Li Y., Yoshikawa M., *Life Sci.*, **65**, 27-32, (1999).
- 16) Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A. A., Capasso F., *Life Sci.*, **65**, 337-353, (1999).
- 17) Kwiecien S., Brzozowski T., Konturek S. J., *J Physiol Pharmacol.*, **53**, 39-50, (2002).
- 18) Lamberts R., Creutzfeldt W., Struber H. G., Brunner G., Solcia E., *Gastroenterology.*, **104**, 1356-1370, (1993).
- 19) Abad M. J., Bermejo P., Villar A., *Gen Pharmacol.*, **26**, :815-819, (1995).
- 20) Boughton-Smith N. K., Whittle B. J., *Br J Pharmacol.*, **95**, 155-162, (1988).
- 21) Aziz U. R., Malik A., Riaz N., Ahmad H., Nawaz S. A., Choudhary M. I., *Chem Pharm Bull.*, **53**, 263-266, (2005).
- 22) Alarcon de la Lastra C., Lopez A., Motilva V., *Planta Med.*, **59**, 497-501, (1993).
- 23) Wallace J. L., Miller M. J., *Gastroenterology.*, **119**, 512-520, (2000).
- 24) Lutnicki K., Szpringer E., Czerny K., Ledwozyw A., *Folia Morphol.*, **60**, 47-56, (2001).
- 25) Azzumi Y., Ichikawa T., Ishihara K., Hotta K., *Clin Chim Acta.*, **221**, 219-225, (1993).
- 26) Wallace J. L., *Best Pract Res Clin Gastroenterol.*, **14**, 147-159, (2000).
- 27) Beil W., Birkholz C., Sewing K. F., *Arzneimittelforschung.*, **45**, 697-700, (1995).
- 28) Ito S., Lacy E. R., Rutten M. J., Critchlow J., Silen W., *Scand J Gastroenterol.*, **101**, 87-95, (1984).
- 29) Mojzis J., Hviscova K., Germanova D., Bukovicova D., Mirossay L., *Physiol Res.*, **50**, 501-506, (2001).
- 30) Brzozowski T., Konturek P. C., Konturek S. J., Pajdo R., Schuppan D., Drozdowicz D., *et al. J Physiol Pharmacol.*, **51**, 751-773, (2000).
- 31) Takeuchi K., Kato S., Tanaka A., *Nippon Yakurigaku Zasshi.*, **117**, 274-282, (2001).
- 32) Fu J., Masferrer J. L., Siebert K., Raz A., Needleman P., *J Biol Chem.*, **265**, 16737-16740, (1990).
- 33) Xie W., Chipman J. G., Robertson D. L., Erikson R. L., Simmons D. L., *Proc Natl Acad Sci USA.*, **88**, 2692-2696, (1991).
- 34) Meade E. A., Smith W. L., Dewitt D. L., *J Biol Chem.*, **268**, 6610-6614, (1993).
- 35) DeWitt D. L., *Biochim Biophys Acta.*, **1083**, 121-134, (1991).
- 36) Corbett J. A., Kwon G., Turk J., McDaniel M. L., *Biochemistry.*, **32**, 13767-13770, (1993).
- 37) Salvemini D., Manning P. T., Zweifel B. S., Seibert K., Connor J., Currie M. G., Needleman P., Masferrer J. L., *J Clin Invest.*, **96**, 301-308, (1995).
- 38) Freedman J. E., Parker C., Li L., Perlman J. A., Frei B., Ivanov V., Deak L. R., Iafrafi M. D., Folts J. D., *Circulation.*, **103**, 2792-2798, (2001).

- 39) Wallerath T., Deckert G., Ternes T., Anderson H., Li H., Witte K., Forstermann U., *Circulation.*, **106**, 1652-1658, (2002).
- 40) Takeeda M., Hayashi Y., Yamato M., Murakami M., Takeuchi K., *J Physiol Pharmacol.*, **55**, 193-205, (2004).
- 41) Qui B. S., Mei Q. B., Liu L., Tchou-Wong K. M., *World J Gastroenterol.*, **10**, 594-597, (2004).
- 42) Ohta Y., Nishida K., *Pharmacol Res.*, **43**, 535-541, (2001).
- 43) Brown J. F., Keates A. C., Hanson P. J., Whittle B. J., *Am J Physiol.*, **265**, 418-422, (1993).
- 44) Konturek P. K., Brzozowski T., Konturek S. J., Dembinski A., *Gastroenterology.*, **99**, 1607-1615, (1990).
- 45) Szabo S., Pihan G., Dupuy D., New pharmacology of ulcer disease : experimental and new therapeutic approaches. In: Szabo S, Mózsik G, eds. NY: Elsevier; 424-446, (1987).
- 46) Grant C. M., *Mol Microbiol.*, **39**, 533-541, (2001).
- 47) Kimura M., Goto S., Ihara Y., Wada A., Yahiro K., Niidome T., *et al. Microb Pathog.*, **31**, 29-36, (2001).
- 48) Szabo S., Trier J. S., Frankel P. W., *Science.*, **214**, 200-202, (1981).

Figure legends

Figure 1: Effects of oral carbenoxolone (Carbenox, 200 mg kg⁻¹), AqF (100 mg kg⁻¹) (a) and AcF (50 mg kg⁻¹) (b) obtained from *I. truxillensis* on the production of adherent gastric mucus (measured as the amount of bound alcian blue) in pylorus-ligated rats. The results are the mean $\pm$ SD of the five rats per group. ANOVA $F_{(2,12)}=10.44$ for AqF and $F_{(2,12)}=20.31$ for AcF followed by Dunnet's test ($p<0.01$).

Figure 2: Effects of the oral administration of AqF (100 mg kg⁻¹) (a) and AcF (50 mg kg⁻¹) (b) obtained from *I. truxillensis* and subcutaneous indomethacin (Indo, 30 mg kg⁻¹) on gastric prostaglandin E₂ production. The results are the mean $\pm$ SD of the five rats per group. ANOVA $F_{(4,20)}=15.63$ for AqF and $F_{(4,20)}=40.48$ for AcF. Different letters indicate significant differences ($p<0,05$ in all cases; Tukey's test).

Figure 3: The ulcer index for gastric ulcers induced by ethanol in rats pretreated with L-NAME (70 mg kg⁻¹) alone or together with carbenoxolone (Carbenox, 100 mg kg⁻¹), AqF (100 mg kg⁻¹) (a) or AcF (50 mg kg⁻¹) (b) obtained from *I. truxillensis*. The results are the mean $\pm$ SD of six rats per group. ANOVA $F_{(5,30)}=35.20$ for AqF and $F_{(5,30)}=23.18$ for AcF. Different letters indicate significant differences ($p<0,05$ in all cases; Tukey's test).

Figure 4: The ulcer index for gastric ulcers induced by ethanol in rats pretreated with NEM (10 mg kg⁻¹) alone or together with carbenoxolone (Carbenox, 100 mg kg⁻¹), AqF (100 mg kg⁻¹) (a) or AcF (50 mg kg⁻¹) (b) obtained from *I. truxillensis*. The results are the mean $\pm$ SD of five rats per group. ANOVA $F_{(5,24)}=26.76$ for AqF and $F_{(5,24)}=15.06$ for AcF. Different letters indicate significant differences ($p<0,05$ in all cases; Tukey's test).

Table 1: Effects of lansoprazole (30 mg kg⁻¹) and of AqF and AcF (50, 100 and 200 mg kg⁻¹) obtained from *I. truxillensis* on ethanol-induced gastric mucosal ulcers in rats.

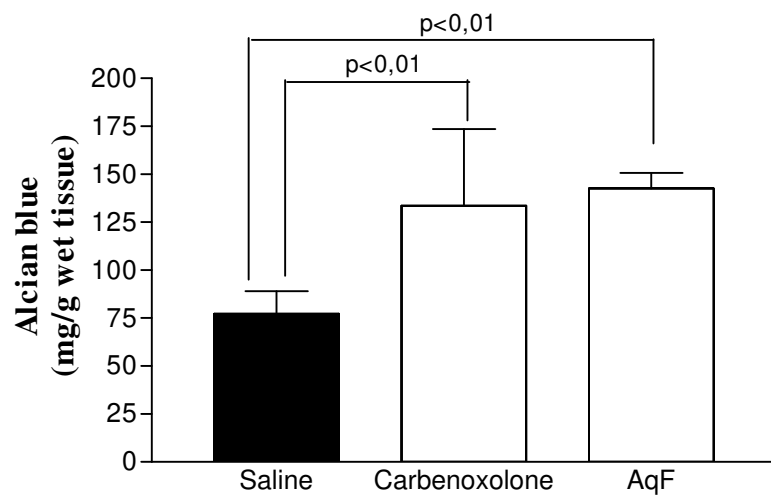
Treatments	Dose	Ulcer Index	Inhibition
(p.o.)	(mg.kg ⁻¹)		(%)
Saline	10 ml.kg ⁻¹	66.4 ± 15.7	-
Lansoprazole	30	17.4 ± 10**	73
AqF - <i>I. truxillensis</i>	50	35. ± 17**	46
	100	13.8 ± 6.3**	79
	200	17.2 ± 13.1**	74
12% Tween	10 ml.kg ⁻¹	33.8 ± 13.1	-
Lansoprazole	30	1 ± 0.7**	97
AcF - <i>I. truxillensis</i>	50	6.4 ± 2.7**	81
	100	6.2 ± 4**	81
	200	6 ± 2.5**	82

The results are the mean ± SD of five rats per group. ANOVA $F_{(4,20)} = 13,41$ for AqF and $F_{(4,20)} = 21,18$ for AcF for ulcer index in the ethanol model. ** $p < 0,01$ compared to the corresponding control (saline or 12% tween) (Dunnet's test).

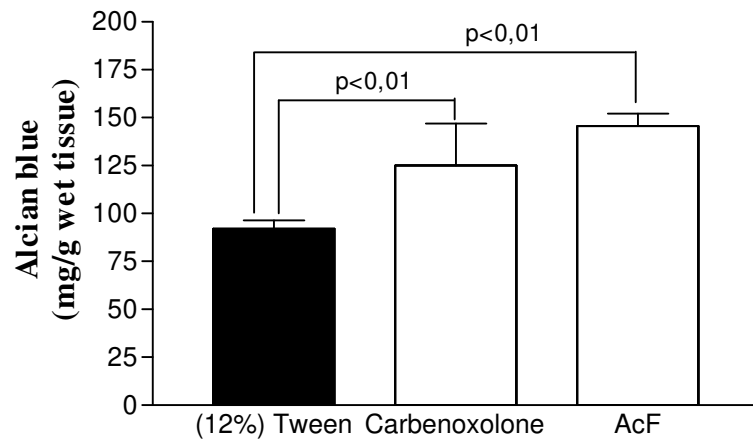
Table 2: Effects of intraduodenal cimetidine, AqF (50 mg kg⁻¹) and AcF (100 mg kg⁻¹) obtained from *I. truxillensis* on the biochemical parameters of gastric juice in pylorus-ligated rats.

Treatments	Dose (mg.kg ⁻¹)	pH (units)	Gastric juice (mg/4 h)
Saline	10 ml.kg ⁻¹	2.7 ± 0.16	0.5 ± 0.1
Cimetidine	100	3.2 ± 0.15**	0.5 ± 0.05
AqF - <i>I. truxillensis</i>	100	2.8 ± 0.12	0.52 ± 0.06
12% Tween	10 ml.kg ⁻¹	3.2 ± 0.07	0.6 ± 0.08
Cimetidine	100	3.7 ± 0.19**	0.5 ± 0.1
AcF - <i>I. truxillensis</i>	50	3.3 ± 0.18	0.4 ± 0.06*

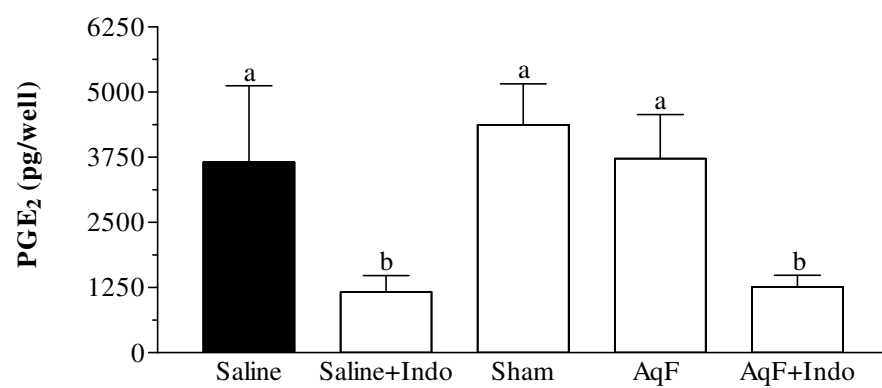
The results are the mean ± SD of five rats per group. ANOVA $F_{(2,12)} = 22.98$ for AqF and $F_{(2,12)} = 13.53$ for AcF (pH), and $F_{(2,12)} = 0.09$ AqF for $F_{(2,12)} = 5.43$ for AcF (gastric juice). *p<0.05 and **p<0,01 compared to the corresponding control (saline or 12% tween) (Dunnet's test).



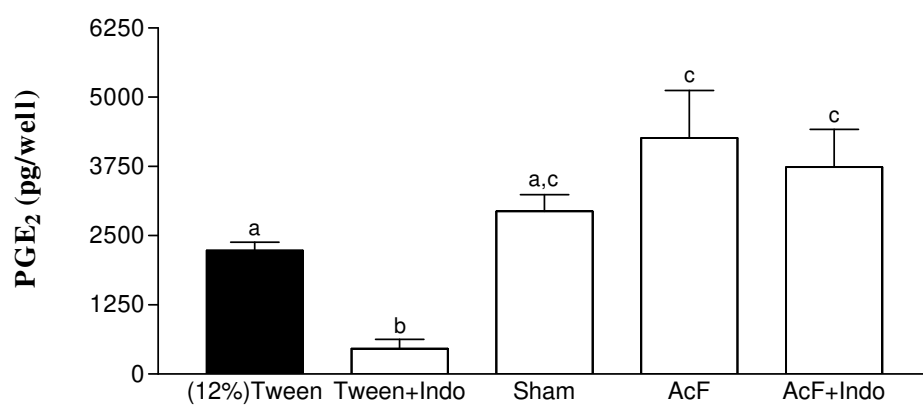
(a)



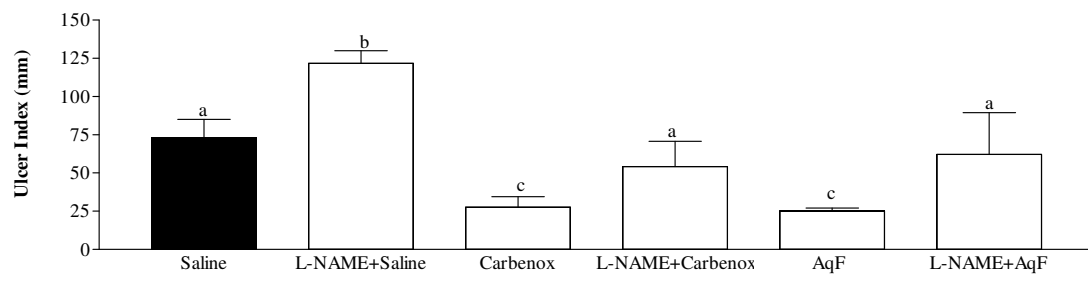
(b)



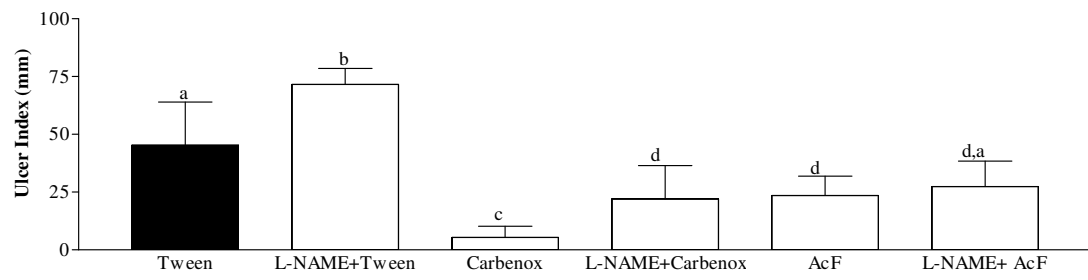
(a)



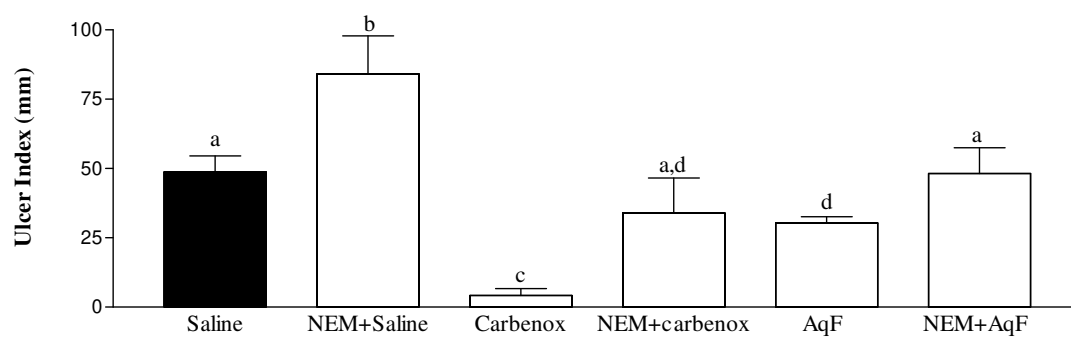
(b)



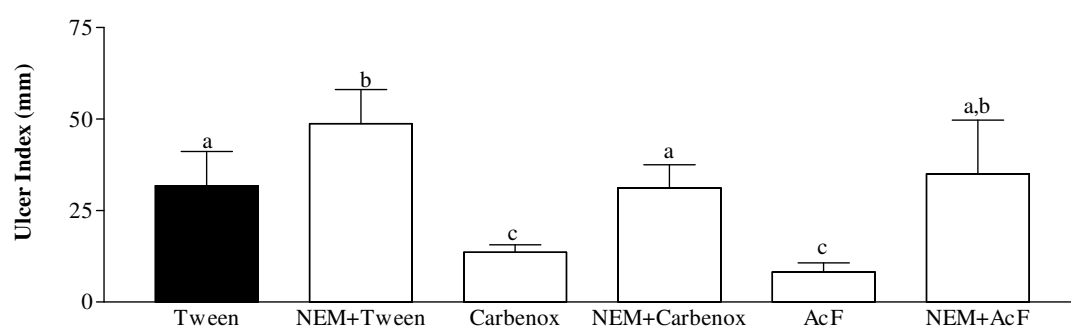
(a)



(b)



(a)



(b)

Journal name: Canadian Journal of Physiology and Pharmacology

Type of manuscript: Regular article

Section: Pharmacology

Antiulcerogenic effects and action mechanism of organic fraction obtained from *Indigofera suffruticosa* Mill

Authors:

Maira Cola-Miranda^a, Tamara Regina Calvo^c, Victor Barbastefano^a, Anderson Luiz-Ferreira^a, Elisangela Farias-Silva^a, Claudia Helena Pellizon^b, Clélia Akiko Hiruma-Lima^b, Wagner Vilegas^c, Alba Regina Monteiro Souza Brito^{a,*}

Affiliations:

^a*Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil;* ^b*Departamento de Fisiologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brazil;* ^c*Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, SP, Brazil.*

***Author for correspondence:** Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil. Phone: +55-19-3788-6192, Fax: +55-19-3788-6185. E-mail: abrito@unicamp.br

Abstract

An acetate fraction (AcF), obtained from the crude organic extract of the aerial parts of *Indigofera suffruticosa* Mill (Fabaceae) were screened for their antiulcerogenic properties in different experimental models. Preliminary phytochemical screening showed that glycoside flavonoids derived from quercetina and alkaloids were the major compounds present in AcF. Pretreatment with AcF (25, 50 and 100 mg kg⁻¹, p.o.) significantly inhibited the gastric mucosal damage caused by oral administered absolute ethanol. AcF not showed antisecretory activity since they did not modify the biochemical parameters of gastric juice in pylorus ligated rats. Pretreatment with AcF significantly increased (p<0.01) the gastric wall mucus as also seen with carbenoxolone, and this results was validate in PAS tecnic. The gastroprotection by AcF, was attenuated by pretreatment with N-ethylmaleimide, a blocker of mucosal nonprotein sulfhydryl groups. In acid-acetic-induced ulcer model, a single daily oral dose of AcF (100 mg.kg⁻¹, p.o.) for 14 consecutive days accelerated ulcer healing. Immunohistochemistry analysis showed induction of proliferating cell (PCNA) and heat shock protein (HSP 70). These results show that AcF have significant antiulcerogenic activity through cytoprotective mechanisms: (1) including mucus production; (2) the presence of sulfhydryl compounds, (3) induction of cell proliferating and (4) induction of cellular cytoprotective protein such as HSP70.

Keywords: Antiulcerogenic activity; *Indigofera truxillensis*; gastroprotection.

Introduction

The genus *Indigofera*, one of the six largest genera of the Leguminosae, contains approximately 700 herbaceous and bushy species and occurs in the state of São Paulo and in north and northeastern Brazil, as well as in Mexico (Moreira and Azevedo-Tozzi, 1997). Phytochemical screening has shown that glycoside flavonoids derived from quercetina and alkaloids present in *Indigofera suffruticosa*.

The quercetina also is known by possessing vasoativas properties as to promote the vasodilatação and blockade of plaquetária aggregation (Formica and Regelson, 1995), antiinflammatory activity (Stavric, 1994) beyond preventing the release of histamina for the gastric cells (Kahraman et al., 2003).

The alkaloids demonstrated an antiulcerogenic activity in acute and chronic induced gastric ulcers on rats (Toma et al, 2004).

Pretreatment with different substances could effectively prevent gastric mucosa from the development of erosions and ulcerations. This action, called gastro- or cyto-protection is not related to the inhibition of gastric acid secretion and known to account for gastroprotection by various irritants and ulcerogens (Cho and Wang, 2002).

Drug treatment of peptic ulcers is targeted at either counteracting aggressive factors (acid plus pepsin, active oxidants, PAF, leukotrienes, endothelins, bile or exogenous factors including NSAIDs) or stimulating the mucosal defences (mucus, bicarbonate, normal blood flow, prostaglandins, nitric oxide) (Tepperman and Jacobson, 1994).

Recent studies found that different substances from plant sources, not only afford gastroprotection but also accelerate ulcer healing. They may also possess anti-inflammatory action by suppressing the neutrophil/cytokine cascade in gastrointestinal tract (GIT) (Alarcon de la Lastra et al., 1995), promoting tissue repair though expression of various growth factors (Kim et al., 2004), exhibiting antioxidant activity (Kim et al., 2004), scavenging reactive oxygen species (ROS) (Pastrada-Bonilla et al., 2003).

The reconstitution of the surface epithelium is achieved by the proliferation of undifferentiated epithelial precursors that migrate from the ulcer margin onto the granulation tissue and cover the ulcer bed. Previous studies have suggested that the balance between cell apoptosis and cell proliferation (Reed, 2000) and induced of Heat shock

protein (HSP70) (Tsukimi et al, 2001) is of great importance for maintaining gastric mucosa integrity and protection

This paper describe the protective effects of AcF of *I. suffruticosa* against ethanol-induced gastric ulcer in rats. In addition, we discuss the gastroprotective activity and action mechanism, including the involvement of mucus production, sulfhydryl compound (SHs), which play important roles in gastric defense mechanisms, and healing of ulcer gastric with immunohistochemistry for PCNA and HSP70.

Material and Methods

Animals

Male Wistar rats (180-250 g) obtained from the breeding of the State University of Campinas (CEMIB/UNICAMP) Brazil, were used. The colony rats were fed a certified Nuvilab CR-diet, with free access to tap water, and were housed on a 12 h light/dark cycle at $60 \pm 1\%$ humidity and $21.5 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

The experimental protocols were approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation (CEEa/UNICAMP) and were done in accordance with the Canadian Council Guide lines for Animal Care.

Drugs

Cimetidine, lansoprazole, carbenoxolone, indomethacin, and N-ethyl-maleimide (NEM) were all obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All drugs and reagents were prepared immediately before use.

Plant material

The aerial parts of *I. suffruticosa* were collected along the Domingos Sartori highway at Rubião Junior, Botucatu, São Paulo State, Brazil, in June 2003. The plants were identified by Dr. Jorge Tamashiro of the Institute of Biology at UNICAMP and a voucher specimen (UEC: 131.827) was deposited in the Herbarium at UNICAMP.

Preparation of fractions

The aerial parts (1500 g) of *I. suffruticosa* were air dried (7 d at 40°C), powdered, and then exhaustively extracted with chloroform (CHCl₃) and methanol (MeOH) successively, at room temperature (three chloroform-methanol cycles, with 72 h for each solvent). The solvents were evaporated in vacuum to provide a CHCl₃ extract and a MeOH extract. A portion (3.0 g) of the MeOH extract was partitioned in ethyl acetate and water (1:1, v/v) to yield 2.3 g (77.7%) of the AcF and 0.5 g (18.5%) of the AqF fractions.

Determination of the total flavonoid content

The flavonoid content of the AcF was determined as follows: 0.1 ml of each fraction was diluted with 80% aqueous ethanol (0.9 ml) and an aliquot of 0.5 ml was added to test tubes containing 0.1 ml of 10% aluminum nitrate, 0.1 ml of 1 M aqueous potassium acetate and 4.3 ml of 80% ethanol. After 40 min at room temperature, the absorbance was determined at 415 nm. The total flavonoid content was calculated using quercetin as a standard (Moreno et al., 2000).

Ethanol-induced gastric lesions

Ethanol-induced ulcers were produced in rats according to the method of Morimoto et al. (1991). Rats were randomly separated into ten groups and fasted for 24 h before the experiment. One hour after the oral administration of AcF from *I. suffruticosa* (25, 50, and 100 mg kg⁻¹), lansoprazole (30 mg kg⁻¹), 12% Tween 80 (10 ml kg⁻¹), 1 ml of 99.5% ethanol was given orally to the rats. Animals were killed by cervical dislocation one hour after ethanol administration. Their stomachs were removed, opened along the greater curvature, and fixed between two glass plates. The inner surface of the stomach was examined with a dissecting microscope (Nikon SMZ800) and the number of gastric lesions was counted. The ulcer index was calculated according to the method of Szelenyi and Thieme.

Gastric secretion in lesions induced by pylorus ligation

For this assay, the method of Shay et al. (1945) was used with some modifications. Rats were fasted for 36 h and immediately after pylorus ligation, AcF from *I. suffruticosa* (100

mg kg⁻¹), cimetidine (100 mg kg⁻¹), 12% tween 80 (10 ml kg⁻¹) was administered intraduodenally. The rats were killed 4 h later, and their abdomens were opened and the stomachs removed. The gastric juice was collected and weighed (g) and its pH were determined using a pH meter (Quimis Aparelhos Científico Ltda, model Q400A, Brazil).

Determination of the gastric mucus content

This assay was done as described by Rafatullah et al. (1990) with some modifications. After a 36 h fast, rats received AcF from *I. suffruticosa* (100 mg kg⁻¹), carbenoxolone (200 mg kg⁻¹), 12% Tween 80 (10 ml kg⁻¹) orally. Thirty minutes after treatment, the pylorus was ligated. The animals were killed by cervical dislocation 4 h after pylorus ligation and the glandular portion of the stomachs were removed and weighed. Each segment was immediately immersed in 10 ml of 0.1% Alcian blue solution (0.16 M sucrose/0.05 M sodium acetate, pH 5.8) for 2 h, after which the excess dye was removed by two successive rinses with 10 ml of 0.25 M sucrose, first for 15 min and then for 45 min. Each stomach was then transferred to 0.5 M magnesium chloride solution for 2 h. Four milliliters of the dye solution was then vigorously shaken with an equal volume of ether and the resulting emulsion was centrifuged at 3600 rev min⁻¹ and the absorbance of the aqueous layer was measured at 580 nm. The amount of blue dye extracted per gram of wet glandular tissue was then calculated from a standard curve of dye prepared in sucrose-acetate solution.

Ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats pretreated with N-ethylmaleimide

Rats (N=5) received a subcutaneous injection of N-ethylmaleimide (10 mg kg⁻¹, dissolved in saline solution) or saline vehicle, 30 min before the oral administration of AcF from *I. suffruticosa* (100 mg kg⁻¹) or carbenoxolone (100 mg kg⁻¹) (Matsuda et al., 1999). One hour after treatment, 1 ml of 99.5% ethanol was given orally to the rats. Animals were killed by cervical dislocation one hour after ethanol administration, their stomachs were removed, opened along the greater curvature, and fixed between two glass plates for examination. The results were expressed as an ulcer index (UI) as described above.

Healing in acetic-induced gastric lesion

The experiment were done according to the method described by Takagi et al. (1969) with some modifications Okabe and Amagase (2005). Three groups of male Wistar rats fasted for 24 h were used in this experiment (n=5). Under anesthesia, a laparotomy was done in all animals through a midline epigastric incision. After exposing the stomach, 0,05 ml (v/v) of a 30% acid acetic solution was injected into the subserosal layer in the glandular part of the anterior wall. The stomach was bathed with saline (20°C) to avoid adherence to the external surface of the ulcerated region. The abdomen was then closed and all the animals were fed normally. We selected the lower effective dose of AcF (100 mg.kg⁻¹) of *I. suffruticosa*; cimetidine (100 mg.kg⁻¹) or vehicle (10 mL/kg) for the determination of the healing effects by the subacute treatment. All treatments were done orally once a day during 14 consecutive days beginning one day after surgery.

One day after the last drug administration, the rats were killed and the stomachs were removed. The gastric lesions were evaluated by examining the inner gastric surface with a dissecting magnifying glass. The macroscopic ulcer area (mm²) and curative ratio (%) were subsequently determined as described by Takagi et al. (1969).

Histology methods

The stomach of the rats submitted by different treatment of gastric ulcers in the acid acetic model with different treatments were pushed off and opened by the large curves and the lesion was localized. The lesion was sectioned, and fixed in ALFAC solution (alcohol, chloroform and acetic acid) for 24 h in 4°C. Then the samples were routine processed for embedding in paraplast, and cut into 7 µm thick section. Hematoxylin and eosin and PAS (Behmer et al, 1976, Vacca, 1995). The samples were analysed with a Leica microscope associated with Leica Qwin Software (Leica-England).

Immunohistochemistry

The representative slides was deparaffinized, rehydrated and immunostained with the peroxidase anti-peroxidase method. For Heat Shock Protein (HSP 70) and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) high temperature antigen unmasking technique in 0.01 M citrate buffer pH 6.0 in microwave oven, for two times at 5 min. Blocking of nonspecific reaction was performed with 1% normal goat serum and 3% not-fat milk. After each

reaction was performed with normal goat serum prior to incubation with the specific antiserum (Table 1) (GUO ET AL., 2002; KITAJIMA ET AL., 1995). After rising in phosphate buffered saline (0.01 mol/L PBS pH 7.4), the sections were incubated in secondary antiserum. They were then washed in PBS and incubated in ABC (avidine and biotine complex) reagents (ABC kit-Vector) and incubate in peroxidase reaction (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) containing 0.01% H₂O₂ in PBS buffer. After immunostained, the sections were lightly counterstained with Mayer's hematoxylin. The slides were observed under Leica light microscope.

Table 1: Antiserum used in this study

Antiserum	Code	Source	Dilution
HSP70	SC-1060	Santa Cruz Biotechnology	1:100
PCNA	NCL-PCNA	Novo Castra	1:100

Statistical analysis

The results were expressed as the mean $\pm$ standard derivation. Statistical comparisons were done by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett's or Tukey's post-hoc test, with the level of significance set at $P < 0.05$.

Results and discussion

The present study was designed to assess the antiulcerogenic activity and action mechanisms of an AcF of *I. suffruticosa*. The phytochemical screening indicated that the main constituents of the AcF were flavonoid glycosides derived from quercetina and alkaloids.

Flavonoids have antiinflammatory activity (Harborne and Williams, 2000) and protect the gastric mucosa against a variety of ulcerogenic agents in different mammalian species. As a result, many studies have examined the antiulcerogenic activities of plants containing flavonoids using either naturally derived or synthetic compounds (Di Carlo, 1999). Several mechanisms have been proposed to explain the gastroprotective effect of flavonoids; these include increase of mucosal prostaglandin content (Alcaraz and Hoult, 1985), decrease of

histamine secretion from mast cells by inhibition of histidine decarboxylase (Bronner and Landry, 1985) and inhibition of *Helicobacter pylori* growth (Beil et al., 1995). Damage to the gastric mucosa markedly increases the formation of 5-lipoxygenase products such as LTB₄ and LTC₄ (Boughton-Smith and Whittle, 1988). Recent studies showed that *Indigofera hetrantha* significantly inhibits lipoxygenase activity (Aziz et al, 2005). In addition, flavonoids have been found to be free radical scavengers (Baumann *et al.*, 1980; Salvayre *et al.*, 1982); free radicals play an important role in ulcerative and erosive lesions of the gastrointestinal tract.

Others chemistry compounds present antiulcerogenic activity such as the pyrrolizidine alkaloids. This substances demonstrated an antiulcerogenic activity in acute and chronic induced gastric ulcers on rats and mice and showed an increase of expression of epidermal growth factor (EGF) in the healing of the gastric ulcers lesions after chronic treatment (Toma, 2004).

Studies focusing on the pathogenesis of ethanol-induced gastric mucosal injury suggest that initial event is disruption of the vascular endothelium resulting in increased vascular permeability, edema formation, and epithelial lifting (Kvietys et al., 1990).

The damage caused in the gastric mucosa by ethanol chronic or acute ingestion, can be associated with the generation of reactive species of oxygen which produces one desbalance between the oxidant and antioxidant process of the cell (Repetto and Llesuy, 2002).

The oral doses (25, 50 and 100 mg.kg⁻¹) were initially used to establish a general profile of the antiulcerogenic activity of the AcF (Tale 2). The dose of 100 mg.kg⁻¹ of AcF demonstrated 71% protection against gastric ulcer induced by ethanol absolute when compared with respective control.

It is well known that ethanol-induced gastric lesions are not inhibited by anti-secretory agents like cimetidine, but are inhibited by agents which enhance mucosal defensive factors, such as misoprostol (Robert et al., 1979). The gastroprotetive effect observed in our ethanol-induced ulcer model indicates that AcF enhanced the cytoprotective mechanisms of the gastric mucosa.

We next, evaluated the antisecretory properties of AcF. Table 3, shows that the antiulcerogenic activity of AcF was unrelated to the mechanisms that control gastric acid

secretion. In the model of pyloric ligation, pretreatment with AcF (100 mg kg⁻¹) did not significantly modify the pH of gastric juice.

Still looking for a possible mechanism for the increase in the gastric mucosa protective factors, we investigated the effect of AcF on mucus production and involvement of sulphhydryl compounds.

Mucus contributes to mucosal defense by providing a physical barrier against bacteria and acts as a lubricant to reduce physical abrasion of the mucosa. Mucus also protects the mucosa from damage induced by acid and luminal toxins (Wallace and Miller, 2000).

Figure 1, shows that pretreatment with carbenoxolone (200 mg kg⁻¹), and AcF (100 mg kg⁻¹) significantly increased the amount of adherent mucus in the gastric mucosa when compared to the control group. This increasing is one of the antiulcerogenic mechanisms involved with the antiulcer effects of the fraction tested here.

Sulphydryl groups (-SH) have a broad range of roles in the cell, and the redox status of cysteine residues can affect the structure and function of numerous enzymes, receptors and transcription factors (Grant, 2001). Sulphydryl compounds have been implicated in the maintenance of gastric integrity, particular when reactive oxygen species are involved in the pathophysiology of tissue damage (Kimura et al., 2001). Endogenous sulphydryl radicals and other antioxidant mechanisms appear to play significant roles in counteracting gastric injury associated with *Helicobacter pylori* infection (Jung et al., 2001)

Ethanol-induced gastric damage has also been associated with the depletion of endogenous SHs (Szabo et al., 1981). Figure 2, shows that N-ethylmaleimide (NEM) an SH blocker, significant attenuated the gastroprotective effect of AcF (100 mg kg⁻¹), which suggested that part of the protective action was mediated by endogenous SHs.

Finally, we investigated the healing process of gastric ulcer induced by acid-acetic 30% in rats and the involvement of proliferating cellular (PCNA) and Heat shock protein (HSP70). The ulcer produced by the injection of acetic acid into the rat stomach wall was assumed to be similar to the human chronic ulcer, since it is difficult to be treated and it takes a long time to be healed (Takagi et al. 1969).

Studies demonstrated that reepithelialized mucosa of grossly “healed” experimental gastric ulcers has prominent histologic and ultrastructural abnormalities (Tarnawski et al., 1991a) reduced height, marked dilation of gastric glands, increased connective tissue, a

disorganized microvascular network and increased capillary permeability. These prominent abnormalities may interfere with mucosal defense and cause ulcer recurrence when ulcerogenic factors are present (Tarnawski, 2005). In intention to evaluate the healing of the gastric ulcer promoted by the AcF histological analysis in the stomachs of the animals with acid acetic-induced gastric ulcer.

The ulcer results from the tissue necrosis triggered by mucosal ischemia, free radical formation and cessation of nutrient delivery, all caused by vascular and microvascular injury such as thrombi, constriction or other occlusions (Baatar et al., 2002). Histologically, an ulcer consists of two major structures; a distinct ulcer margin formed by the adjacent non-necrotic mucosa-the epithelial component, and the granulation tissue at the ulcer base-the connective tissue component, mucosal of the ulcer margins forms a characteristics “healing zone” (Tarnawski, 2000).

The reconstitution of surface epithelium (re-epithelialization) is achieved by proliferation of undifferentiated epithelial precursors that migrate from the ulcer margin onto the granulation tissue and cover the ulcer bed. The regeneration of gastric glands is the result of proliferation and migration of epithelial cells that penetrate into the granulation tissue from the base of the ulcer margin and differentiate into glandular tubules. In addition to the epithelial structures, new vessels are generated in order to ensure an adequate supply of oxygen and nutrients to the healing mucosa, and connective tissue cells, including myofibroblast and smooth muscle cells, are recruited into the healing issue to reorganize the subepithelial layers (Miyake et al., 1980).

In our experiments, the oral administration of cimetidine or AcF (100 mg.kg^{-1}) for 14 consecutive days accelerated the healing of gastric ulcers (40%) in rats (Table 3). The increased gastric mucus production using AcF was verified via an increase in PAS-positive mucus (Figure 3) and it is an indicative of a gastroprotection a number of factors appear to influence ulcer healing; but mucus and bicarbonate secretion may be important in the ulcer healing process. Since the mucus/bicarbonate layer protects newly formed cells from acid peptic injury (Tarnawski et al., 2001).

Ulcer healing is a complex process, which involves cell migration, proliferation, re-epithelialization, angiogenesis, and matrix deposition, all ultimately leading to scar formation (Tarnawski et al., 1991; Vanwijck, 2001).

Apoptosis together with proliferation is crucial in the complex reparative machinery that an active organism develops to counteract damage to restore the homeostatic state as quickly as possible (Sa´nchez-Fidalgo et al., 2004).

PCNA is a highly conserved 36 KDa nuclear polypeptide identified as the auxiliary protein of DNA polymerase delta (Prelich et al., 1987; Nanji and Tahan, 1996). PCNA is expressed throughout the cell cycle and its concentration is increased further in the S-phase of the cell cycle (Celis and Celis, 1985).

In the morphologic analysis of the submitted slides with PCNA (Figure 4), in all groups were observed cell proliferation, in AcF there are cell proliferation in base of mucosa glands in lesion region. Cell proliferating also denotes that AcF induces the expression of the growth factor in the gastric mucosa, thus leading to the gastric ulcer healing activity.

HSPs may contribute to mucosal protection and ulcer healing by regulating the activity of enzymes such as cyclooxygenase (COX) and nitric oxide synthase (NOS) (Rokutan, 2000a; Tsukimi and Okabe, 2001), as well as by increasing mucosal blood flow (Shichijo et al., 2003). Expression of HSPs is generally induced following exposure to heat shock, heavy metals, chemical agents, glucose starvation, and pathophysiological stresses in a wide range of living organisms (Lindquist S, 1986). In the digestive tract, it is known that major HSPs are induced by various treatments. Especially, it was reported that HSP70 is induced by water-immersion stress, hiperthermia and gastric mucosal protecting drugs, suggesting that HSP70 is related to gastric mucosal protection (Rokutan K. 2000b).

Although we did not determine the histological localization, HSP70 appears to be expressed in growing cells in the ulcer margin. Indeed, a strong relationship has been reported between the expression of HSP70 and a marker for cell proliferation, such as proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as observed in human breast cancer biopsy samples. Based on these findings, it was suggested that HSP70 expressed in the proliferating cells and it was involved in the mucosal regeneration in the phase of ulcer healing. (Tsukimi et al., 2001).

In regards to HSP70, the level expressed in normal mucosa was quite low (Tsukimi et al., 2001). In the immunohistochemistry assay to HSP70 (Figure 5) were observed expression of HSP70 in cimetidine control and AcF, suggesting that large amount of HSP70 in the ulcer margin might be, necessary for mucosal regeneration.

Conclusion

In conclusion, the promising results found with the AcF obtained from *I. suffruticosa* inhibited the gastric mucosal lesions induced by ethanol in rats. SHs and mucus formation are involved in the gastroprotection by AcF. In addition, the expression of proliferating cell and HSP70 contribute to accelerate the process of healing of the gastric ulcer promoted by the AcF.

In view of our results, more precise investigation of their function could provide insight into the mechanism of gastric cytoprotection and the role of active flavonoids and alkaloids presents in AcF.

Acknowledgment

This work was supported by the Brazilian institutions FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa Científica e Tecnológica).

Figure legends

Figure 1: Effects of the oral carbenoxolone (Carbenox, 200 mg kg⁻¹) and AcF (100 mg kg⁻¹) of *I. suffruticosa* on the production of adherent gastric mucus (measured as the amount of bound alcian blue) in pylorus-ligated rats. The results are the mean $\pm$ SD. ANOVA $F_{(2,12)}=7,06$ for AcF followed by Dunnet's test ($p<0.01$).

Figure 2: The ulcer index for gastric ulcers induced by ethanol in rats pretreated with NEM (10 mg kg⁻¹) alone or together with carbenoxolone (Carbenox, 100 mg kg⁻¹) and AcF (100 mg kg⁻¹) of *I. suffruticosa*. The results are the mean $\pm$ SD. ANOVA $F_{(5,24)}=16.48$ for AcF. Different letters indicate significant differences ($p<0.0001$). Tukey's test.

Figure 3: Acetic-acid-induced gastric ulcer on day 14 after ulcer induction. Histological analyses of stomach of rat (A) Tween 80 12% (10 mL/kg), (B) cimetidine (100 mg/kg) and (C) AcF of *I. suffruticosa* (100 mg/kg) and area lesion, to PAS method.

Figure 4: Acetic-acid-induced gastric ulcer on day 14 after ulcer induction. Immunohistochemical staining of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the margin ulcer of animals treated with vehicle (a), cimetidine (b) and AcF (c).

Figure 5: Acetic-acid-induced gastric ulcer on day 14 after ulcer induction. Immunohistochemical staining of Heat Shock Protein 70 (HSP70) in the margin ulcer of animals treated with vehicle (a), cimetidine (b) and AcF (c).

Table 2: Effects of lansoprazole and different doses (25, 50 and 100 mg kg⁻¹) of AcF of *I. suffruticosa* on ethanol-induced gastric mucosal ulcers in rats

Treatments (p.o.)	Dose (mg kg ⁻¹)	Ulcer Index	Inhibition (%)
12% Tween	10 ml kg ⁻¹	34.4 ± 6.3	-
Lansoprazole	30	8.4 ± 3.6**	75
	25	33.8 ± 4.9	1,7
AcF - <i>I. suffruticosa</i>	50	33.8 ± 3.5	1,7
	100	9.8 ± 3.7**	71

The results are the mean ± SD of five rats per group. ANOVA $F_{(4,20)} = 45.57$ for AcF for ulcer index in the ethanol model. ** $p < 0.01$ compared to the corresponding control (12% Tween) (Dunnett's test).

Table 3: Effects of intraduodenal administration of cimetidine and AcF of *I. suffruticosa* on the biochemical parameters of gastric juice in pylorus-ligated rats

Treatments	Dose (mg kg ⁻¹)	pH (units)	Gastric juice (mg)
12% Tween	10 ml kg ⁻¹	3 ± 0	0,8 ± 0,4
Cimetidine	100	4 ± 0**	0,8 ± 0,4
AcF - <i>I. suffruticosa</i>	100	3,4 ± 0,5	1 ± 0

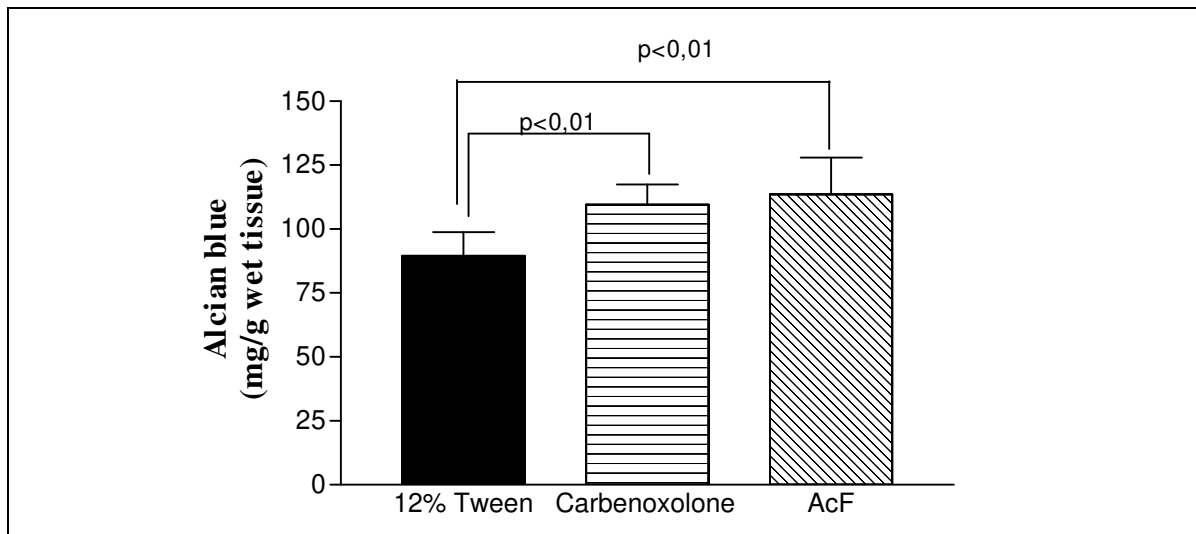
The results are the mean ± SD of five rats per group. ANOVA $F_{(2,12)} = 12.6$ for pH, and $F_{(2,12)} = 0.5$ for gastric juice. No significance (Dunnett's test).

Table 4. Effect of AcF of *I. suffruticosa* on healing of ulcers produced by the injection of a 30% acetic acid solution into the stomachs of rats. The ulceration was scored on the 15th day after surgery

Treatments (p.o.)	Dose (mg.kg ⁻¹)	N	Lesion area (mm ²)	Curative ratio (%)
12% Tween	10 ml.kg ⁻¹	5	4,5 ± 0,41	-
Cimetidine	100	5	1,5 ± 0,58**	66
AcF – <i>I.suffruticosa</i>	100	5	2,7 ± 1,5*	40

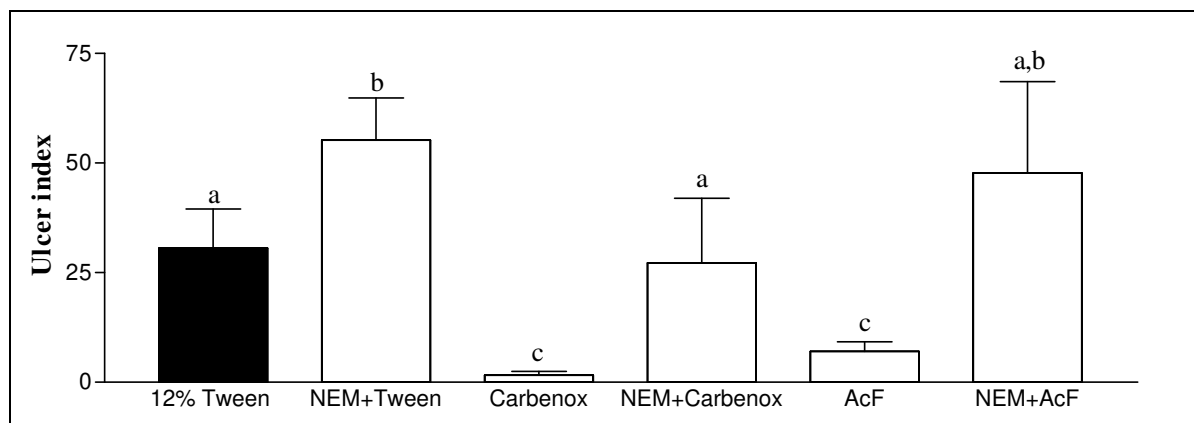
The results are the mean ± SD of five rats per group. ANOVA $F_{(2,12)} = 11.45$ for lesion area compared to tween (control) group. **P<0.01 and *P<0.05 (Dunnett's test).

Figure 1



ANOVA $F_{(2,12)}=7,06$ for AcF followed by Dunnet's test ($p<0.01$).

Figure 2



ANOVA $F_{(5,24)}=16.48$ for AcF. Different letters indicate significant differences ($p<0.0001$).

Tukey's test.

References

Grant CM. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Mol Microbiol.* 2001;39:533-41.

Kimura M, Goto S, Ihara Y, Wada A, Yahiro K, Niidome T et al. Impairment of glutathione metabolism in human gastric epithelial cells treated with vacuolating cytotoxin from *Helicobacter pylori*. *Microb Pathog.* 2001;31:29-36.

Szabo S, Trier JS, Frankel PW. Sulfhydryl Compounds May Mediate Gastric cytoprotection. *Science.* 1981;214:200-202.

Baatar D, Kawanaka H, Szabo IL, Pai R, Jones MK, Kitano S, Tarnawski AS: Esophageal ulceration activates genes encoding keratinocyte growth factor and its receptor in rats: a key to esophageal ulcer healing? *Gastroenterology* 122:458–468, 2002

Tarnawski A, Stachura J, Krause WJ, Douglass TG, Gergely H: Quality of gastric ulcer healing—a new, emerging concept. *J Clin Gastroenterol* 13(1):S42–S47, 1991

Vanwijck R: Surgical biology of wound healing. *Bull Mem Acad R Med Belg* 56(3–4):175–184, 2001

Tarnawski A: Molecular mechanism of ulcer healing. *Drug News Perspect* 13:158–168, 2000

Moreira JLA, Azevedo-Tozzi AMG. *Revista Brasileira de Botânica.* 1997;20:97-117.

Tsukimi, Y. and Okabe, S. (2001). Recent advances in gastrointestinal pathophysiology: role of heat shock proteins in mucosal defense and ulcer healing. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24, 1–9.

Shichijo, K., Ihara, M., Matsuu, M., Ito, M., Okumura, Y. and Sekine, I. (2003). Overexpression of heat shock protein 70 in stomach of stress-induced gastric ulcerresistant rats. *Digestive Diseases and Sciences*, 48, 340–348.

Rokutan, K. (2000a). Gastric mucosal protection and cell proliferation—role of heat shock proteins in gastric mucosal protection. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 15, 12–19.

Formica, J.V., Regelson, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* 33: 1061- 1080, 1995.

Tsukimi, Y., Nakai, H., Itoh, S., Amagase, K., Okabe, S. Involvement of heat shock proteins in the healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats. *J Physiology and Pharmacology*, 2001, 52: 391-406.

Kvietys, P.R., Twohig, B., Danzell, J., Specian, R.D. Ethanol-induced injury to the rat gastric mucosa – role of neutrophils and xanthine oxidase-derived radicals. *Gastroenterology*. 98: 909-920, 1990.

Lindquist S. The heat-shock response. *Ann Ver Biochem* 1986; 55: 1151-1191.

Vacca, L.L. *Laboratory Manual of Histochemistry*. Raven Press, New York, p. 578 (1985).

Behmer, O.A., Tolosa, E.M.C., Freitas Neto, A.G. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. EDART, Editora da Universidade de São Paulo, 241 (1976).

Prelich G., Tan, C., Kostura, M., Mathews, M.B. *Nature*, 326, 517-520 (1987).

Nanji, A.A., Tahan, S.R. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 140, 101-107 (1996).

Rokutan K. Role of heat shock proteins in gastric mucosal protection. *J. Gastroenterol Hepatol* (2000b); 15: 12-19.

Boughton-Smith NK, Whittle BJ. Failure of the inhibition of rat gastric mucosal 5-lipoxygenase by novel acetohydroxamic acids to prevent ethanol-induced damage. *Br J Pharmacol*. 1988;95:155-62.

Miyake T, Suzaki T, Oishi M. 1980. Correlation of gastric ulcer healing features by endoscopy, stereoscopic microscopy, and histology, and a reclassification of the epithelial regenerative process. *Dig Dis Sci* 25:8–14.

Repetto, M.G., & Llesuy, S.F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35: 523-34, 2002.

Moreno, M. I. N., Isla, M. I., Sampietro, A. R., Vattuone, M. A. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J. Ethnopharmacol.*; 71: 109-114 (2000).

Baumann J, Wurm G, Bruchhausen F. 1980. Prostaglandin synthetase inhibition by flavonoids and phenylic compounds in relation to their oxygen-scavenging properties. *Arch Pharm Weinheim* 313: 330.

Salvayre R, Braquet P, Perruchot L, Douste-Blazy L. 1982. Comparison of the scavenger effect of bilberry anthocyanosides with various flavonoids. *Flavonoids Bioflavonoids* 11: 437±442.

Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A. A., Capasso F., *Life Sci.*, **65**, 337—353 (1999).

Aziz UR, Malik A, Riaz N, Ahmad H, Nawaz SA, Choudhary MI. Lipoxygenase inhibiting constituents from *Indigofera hetrantha*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2005;53:263-66.

Stavric, B. Quercetin in our diet: from potent mutagen to probable anticarcinogen. *Clin. Biochem.* 27: 245- 248, 1994.

Tarnawski, A., Hollander, D., Stachura, J., Gergely, H., Krause, W.J., Sarfeh, I.J. Role of angiogenesis in healing of experimental gastric ulcer. In Mechanisms of Peptic Ulcer Healing. F Halter, A Garner, G N Tytgat (eds). Dordrecht/Boston/London, Kluwer, 165-171 (1991a).

Celis, J.E., Celis, A. *Embo. J.*, 4, 1187-1192 (1985).

Jung, H.K., Lee, K.E., Chu, S.H., Yi, S.Y., 2001. Reactive oxygen species activity, mucosal lipoperoxidation and glutathione in *Helicobacter pylori*- infected gastric mucosa. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 1336–1340.

Robert, A., Nezamis, J.E., Lanaster, C., Hanchar, A.L., 1979. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric erosions produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. *Gastroenterology*, 77: 433-443.

Matsuda H., Li Y., Yoshikawa M., *Life Sci.*, **65**, 27-32, (1999).

Alcaraz MJ, Hoult JR. 1985. Actions of flavonoids and the novel anti-inflammatory flavone, hypolaetin-8-glucoside, on prostaglandin biosynthesis and inactivation. *Biochem Pharmacol* 34: 2477±2482.

Bronner C, Landry Y. 1985. Kinetics of the inhibitory effect of flavonoids on histamine secretion from mast cells. *Agents Actions* 16: 147±151.

Beil W, Birkholz C, Sewing KF. 1995. Effects of flavonoids on parietal cell acid-secretion, gastric mucosal prostaglandin production and *Helicobacter pylori* growth. *Arzneim Forsch* 45: 697±700.

Tepperman BL, Jacobson ED. 1994. Circulatory factors in gastric mucosal defense and repair. In Physiology of the Gastrointestinal Tract, Johnson LR (ed.). Raven Press: New York; 1331±1352.

Harborne J. B., Williams C. A., *Phytochemistry*, **55**, 481—504 (2000).

Toma, W., Trigo, J.R., Bensuaski de Paula, A.C., Souza Brito, A.R.M., 2004. Modulation of gastrin and epidermal growth factor by pyrrolizidine alkaloids obtained from *Senecio brasiliensis* in acute and chronic induced gastric ulcers. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 82, 319–325.

Susana Sa´nchez-Fidalgoa, Ine´s Martı´n-Lacaveb, Matilde Illanesb, Virginia Motilva. Angiogenesis, cell proliferation and apoptosis in gastric ulcer healing. Effect of a selective cox-2 inhibitor. *European Journal of Pharmacology* 505 (2004) 187– 194

Reed, J.C., 2000. Mechanism of apoptosis. *Am. J. Pathol.* 157, 1221– 1223.

Guo, J.S., Cho, C.H., Lam-Lui, E.S., Coi, H.T., Wang, J.Y., Leung Koo, M.W. Antiangiogenic effect of a highly selective cyclooxygenase-2 inhibitory on gastric ulcer healing in rats. *Toxicol. Appl. Phamacol.* 183: 41-45 (2002).

Kitajima, T., Okuhira, M., Tani, K., Nakano, T., Hiramatsu, A., Mizuno, T., Inoue, K. Cell proliferation kinetics in acetic acid-induced gastric ulcer evaluated by immunohistochemical staining of proliferating cell nuclear antigen *J. Clin. Gastroenterol.* 17:116-120 (1995).

Okabe, S., Amagase, K. 2005. Na overview of acetic acid ulcer models-the history and state of the art of peptic ulcer research. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* Aug; 28(8) 1321-1341.

Takagi, K.; Okabe, S. and Saziki, R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. *J. Pharmac.* 19: 418-426 (1969).

Kahraman, A., Erkasap, N.F., Ko'ken, T., Serteser, M., Aktepe, F., Erkasap, S. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions *Toxicology*. 183: 133-142 (2003).

Szelenyi I., Thiemer K., *Archives of Toxicology*., **41**, 99-105, (1978).

Shay H., Komarov S. A., Fels S. S., Meranze D., Gruenstein M., Siplet H., *Gastroenterology*., **5**, 43-61, (1945).

Rafatullah S., Tariq M., Al-Yahya M. A., Mossa J. S., Ageel A. M., *J Ethnopharmacol.*, **29**, 25-34, (1990).

Morimoto Y., Shimohara K., Oshima S., Sukamoto T., *Jpn J Pharmacol.*, **57**, 495-505, (1991).

Cho C.-H., Wang J.-Y., eds. Gastrointestinal mucosal repair and experimental therapeutics. *Frontiers of Gastrointestinal Res*, Basel. Karger, 2002, 25, p 251.

Alarcon de la Lastra AC, Martin MJ, MotilvaV, et al. Gastroprotection induced by silymarin, the hepatoprotective principle of *Silybum marianum* in ischemia-reperfusion mucosal injury: role of neutrophils. *Planta Med* 1995; 61 (20): 116-119.

Kim SC, Byun SH, Yang CH, et al. Cytoprotective effects of Glycyrrhizae radix extract and its active component liquiritigenin against cadmium-induced toxicity (effects on bad translocation and cytochrome c-mediated PARP cleavage). *Toxicology* 2004; 197(3):p. 239-251.

Pastrada-Bonilla E, Akoh CC, Sellappan S, Krewer G. Phenolic content and antioxidant

capacity of muscadine grapes. *J Agric Food Chem* 2003; 51(18): 5497-5503.

Tarnawski, A. Cellular and Molecular Mechanisms of Gastrointestinal Ulcer Healing. *Digestive Diseases and Sciences*, 50: S24–S33, 2005.

Wallace JL, Miller MJ. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. *Gastroenterology*. 2000;119:512-20.

Tarnawski, A., Szabo, I.L., Husain, S.S., and Soreghan, B. Regeneration of gastric mucosa during ulcer healing is triggered by growth factors and signal transduction pathways. *Journal Physiology Paris*, 95, 337-344 (2001).