

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

ADRIANA MENDES VINAGRE

Efeito anti-ulcerogênico do extrato de *Chlorella vulgaris*

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção de Título de
Mestre em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Fisiologia.

ORIENTADOR - Prof. Dr. Edgard Ferro Collares

CO-ORIENTADORA- Profa.Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito

2005

DE	BC
AMADA	
EX	
BC/	67960
	16-123-06
<input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
	11.00
	11-04-06

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

V73e	Vinagre, Adriana Mendes Efeito anti-ulcerogênico do extrato de <i>Chlorella vulgaris</i> / Adriana Mendes Vinagre. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.
	Orientador: Edgard Ferro Collares. Co-orientadora: Alba Regina Monteiro Souza Brito. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	1. Chlorella. 2. Úlcera. 3. Esvaziamento gástrico. I. Edgard Ferro Collares. II. Alba Regina Monteiro Souza Brito. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.
	(rcdet/ib)

Título em inglês: Antiulcerogenic effect of *Chlorella vulgaris* extract.

Palavras-chave em inglês: Chlorella, Ulcer, Gastric emptying.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Edgard Ferro Collares, Elfriede Marianne Bacchi, Miguel Arcanjo Áreas, Clélia Akiko Hiruma-Lima, Juvenal Ricardo Navarro Góes.

Data da defesa: 09/05/2005.

Data da Defesa: 09/05/2005.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Edgard Ferro Collares

Prof^a.Dra. Elfriede Marianne Bacchi

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

Prof^a Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima

Prof. Dr. Juvenal Ricardo Mavarro Goes

“Cheio de Deus, não temo o que virá, pois venha o que vier, nunca será maior do
que minha alma”

Fernando Pessoa

Dedico esse trabalho aos meus queridos pais

Marivaldo e Regina, aos meus irmãos

Cristiane, André, Rosana e Ranu

e ao grande amor da minha vida Miguel

por todo carinho dedicado a mim

para a realização desse trabalho

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Edgard Ferro Collares pela orientação e amizade durante todos esses anos.

À Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito pela orientação, amizade e por proporcionar uma nova visão sobre a vida e a arte.

Ao Prof. Dr. José Roberto Trigo e ao Prof. Dr. Lício Velloso pela colaboração neste trabalho.

Aos membros da banca Prof^a. Dra. Elfriede Marianne Bacchi e Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas pela colaboração nesta tese.

A meus avós queridos que começaram tudo isso, em especial minha vó Iracema, que é um exemplo de vitalidade.

A toda minha família: tios, tias, primos e primas, em especial minha tia Marisa, pelos conselhos e carinho.

Aos meus pais que me proporcionam todos os dias crescimento em todas as áreas da minha vida, meu Pai com seu exemplo de sinceridade e espiritualidade e a minha mãe pelo exemplo de luta, garra, sensibilidade e de muita fé

.

Aos meus irmãos, que eu amo tanto e desde pequena são meus companheiros de brincadeiras e choros, obrigada pela existência, sem vocês seria impossível.

A minha tia Rosana, amiga especial, que participou da minha transformação de menina para a mulher que sou, me trazendo todo amor necessário para essa mudança.

A meu anjo e alma gêmea Miguel, que faz da minha vida um lugar feliz onde todo dia realizamos vários dos nossos sonhos.

A meu irmão do Peru, Ranu, que mudou minha vida por completo, me mostrando como confiança e amor transformam uma pessoa

A minha família japonesa Mit e Kazuê, que me ajudaram muito com a amizade e exemplos.

A todos os meus amigos do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental que há dez anos me ajudam todos os dias, em especial Amanda, Sandra, Nilza, Genifer, Rosana Garcia, Thaís, Rosana Morandin, Willian, Ana, Ana Cristina.

Aos meus amigos especiais do Laboratório de Produtos Naturais que tornaram minha tese uma experiência divertida, cheia de risadas e de amizade, Anderson, Maíra, Vitor, Tati, Ana, Vinícius, Fabiana, Elis.

Às minhas duas grandes amigas Pati e Dani que fazem da minha vida uma experiência maravilhosa durante nossas conversas diárias.

À Andréia, secretária da pós graduação, pelo apoio e amizade.

Ao Sr. Luis e Sr. Jósimo pelo apoio na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Hasegawa pela doação da alga *Chlorella vulgaris* utilizada nesse trabalho.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

Figura 1. Anatomofisiologia do estômago.....	21
Figura 2. Distribuição anatômica das camadas musculares e localização das células do estômago.....	21
Figura 3. Regulação da secreção ácida pela célula parietal.....	22
Figura 4. Esquema fisiopatológico da úlcera péptica.....	25
Figura 5. Esquema de separação do extrato de <i>Chlorella vulgaris</i> em fração acetato.....	35
Figura 6. Estudo do esvaziamento gástrico de uma refeição de prova feita de extrato de <i>Chlorella vulgaris</i>	46
Figura 7. Avaliação do efeito antiulcerogênico do extrato de <i>Chlorella vulgaris</i> no modelo de indução de úlcera por piroxicam.....	48
Figura 8. Avaliação do efeito antiulcerogênico do extrato de <i>Chlorella vulgaris</i> no modelo de indução de úlcera por etanol.....	49
Figura 9. Avaliação do efeito antiulcerogênico do extrato de <i>Chlorella vulgaris</i> no modelo de indução de úlcera por etanol após 2 horas.....	50
Figura 10. Avaliação do efeito antiulcerogênico do extrato de <i>Chlorella vulgaris</i> no modelo de indução de úlcera por ácido acético.....	51
Figura 11. Avaliação da quantidade de EGF presente na lesão causada por ácido acético.....	52

Figura 12 Avaliação do efeito antiulcerogênico da fração acetato do extrato de <i>Chlorella vulgaris</i> no modelo de indução de úlcera por ácido acético.....	52
Figura 13. Estudo do ganho de peso dos animais avaliados no modelo de úlcera induzida por ácido acético.....	53
Figura 14. Estudo do ganho de peso dos animais avaliados no modelo de úlcera crônica induzida por ácido acético.....	47

TABELAS

Tabela 1. Análise dos parâmetros bioquímicos do conteúdo estomacal de camundongos submetidos a ligadura do piloro.....	47
Tabela 2. Peso dos órgãos dos animais avaliados no modelo de úlcera induzida por ácido acético.....	55
Tabela 3. Peso dos órgãos dos animais avaliados no modelo de úlcera induzida por ácido acético	56

RESUMO	xii
SUMMARY	xvi
1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	32
3. MATERIAL	33
3.1 Animais.....	34
3.2 Drogas.....	34
3.2.1 Extrato aquoso de <i>Chlorella vulgaris</i> (ECV).....	34
3.2.2 Fração acetato de ECV.....	34
3.2.3 Cimetidina.....	36
3.2.4 Anti-inflamatório não esteróide (AINEs) Piroxican.....	36
3.2.5 Lansoprazol.....	36
3.3 Delineamento experimental.....	36
4. MÉTODOS	37
4.1 Esvaziamento gástrico.....	37
4.2 Análise dos parâmetros bioquímicos do conteúdo estomacal de camundongos submetidos a ligadura do piloro.....	39
4.3 Modelo de úlcera gástrica induzida por AINEs.....	40
4.4 Modelo de úlcera gástrica induzida por etanol.....	40
4.5 Modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético.....	41
4.5.1 Quantificação de proteínas – Teste do Biureto.....	42
4.5.2 Immunoblotting.....	43
4.6 Análise estatística.....	44
5. RESULTADOS	45
5.1 Esvaziamento gástrico.....	46
5.2 Atividade antiulcerogênica.....	47

5.2.1 Análise dos parâmetros bioquímicos do conteúdo estomacal de camundongos submetidos a ligadura do piloro.....	47
5.2.2 Modelo de úlcera gástrica induzida por AINEs.....	48
5.2.3 Modelo de úlcera gástrica induzida por etanol.....	49
5.2.4 Modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético.....	50
5.2.4.1 Efeito do ECV sobre lesão ulcerativa.....	50
5.2.4.2 Quantificação de Fator de Crescimento Epidermal (EGF)...	51
5.2.4.3 Toxicidade do extrato aquoso de <i>Chlorella vulgaris</i>	53
6. DISCUSSÃO.....	57
7. CONCLUSÕES.....	66
8. BIBLIOGRAFIA.....	68

RESUMO

A úlcera péptica acomete cerca de 10% da população mundial; inseridos dentro dessa porcentagem estão milhares de brasileiros. Essa patologia é causada por um desbalanço entre os mecanismos protetores e agressores da mucosa, e é resultado da associação de diversos fatores agressores endógenos (ácido, pepsina e bile), fatores exógenos predisponentes às condições de vida (estresse, fumo, álcool, uso contínuo de drogas anti-inflamatórias não esteróides, ingestão de determinados alimentos e a presença do *Helicobacter pylori*) e a predisposição genética. Atualmente, as terapêuticas utilizadas no tratamento das lesões são: antiácidos, anticolinérgicos, antagonistas de receptores H₂ para histamina, inibidores da bomba de próton, antibióticos e mais raramente alguns procedimentos cirúrgicos. A aplicação de qualquer esquema terapêutico com emprego de uma ou mais destas drogas ou procedimento cirúrgico pode ocasionar alguns efeitos colaterais e não obrigatoriamente é eficaz. A utilização de plantas medicinais no tratamento de doenças vem se desenvolvendo na última década. Algumas plantas têm atividade antiulcerogênica. Há evidências que a alga *Chlorella vulgaris* pode modificar a resposta imune celular, tem atividade antitumoral, antimetastática e antiulcerogênica. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antiulcerogênica da alga *Chlorella vulgaris* em modelos agudos e um modelo crônico de indução de úlceras. Ratos Wistar foram utilizados para determinação do esvaziamento gástrico (EG) e modelos de úlcera induzida por etanol e ácido acético, enquanto camundongos swiss foram utilizados para os modelos de úlcera através de ligadura do piloro e piroxicam. Para avaliar o efeito sobre o esvaziamento gástrico (EG) do extrato de *Chlorella vulgaris* (ECV) foi

utilizada uma refeição de prova (RP) líquida com extrato nas concentrações de 50mg/mL e 100mg/mL do ECV. Para o estudo dos modelos agudos de ligadura do piloro, etanol e piroxicam e do modelo crônico, foram utilizadas as doses de 250, 500 e 1000mg/kg de ECV para a prevenção e o tratamento das lesões. No modelo crônico também foi utilizada a fração acetato obtida do ECV na dose de 5mg/100g e foi dosada a quantidade de fator de crescimento epidermal (EGF) produzido na região da úlcera. O estudo da toxicidade do ECV foi realizado através da medida de ganho de peso dos ratos e peso dos órgãos como rins, pulmões, fígado e coração, visto que os primeiros sinais da toxicidade dada por um extrato é a perda de peso corporal e dos órgãos. O ECV, nas concentrações empregadas, não interferiu no EG quando preparado como uma RP líquida em comparação com o veículo (água). O extrato não alterou nenhum dos parâmetros bioquímicos como pH, quantidade de H⁺ e peso do suco gástrico, no modelo de ligadura do piloro. O ECV não preveniu a formação de úlceras no modelo de piroxicam, mas evitou a formação de lesões causadas por etanol nas doses de 500 e 1000 mg/kg. Esse efeito desapareceu quando o etanol foi empregado duas horas após o pré-tratamento com ECV na dose de 1000 mg/kg. No modelo de úlcera crônica o ECV, nas doses de 500 e 1000 mg/kg, foi capaz de diminuir significativamente as lesões causadas pelo ácido acético, não alterando no entanto, a quantidade de EGF produzida na zona de cicatrização, quando comparados ao controle água. Além disso, o tratamento prolongado com o ECV na dose de 500 mg/kg alterou significativamente a evolução do ganho de peso

desses animais. Em conclusão, o ECV, como complemento alimentar, pode ser uma alternativa no tratamento da úlcera péptica gástrica.

SUMMARY

About 10% of the world's population suffer from peptic ulcer, within this percentage we find thousands of Brazilians. This pathology is caused by an unbalance between the protection and attack mechanisms of the stomach lining, and is the result of the association of various endogenous attack factors (pepsin, acid, bile), exogenous factors pertaining to life style (stress, smoking, alcohol intake, continuous use of non-steroidal anti-inflammatory drugs, ingestion of certain types of food and the presence of *Helicobacter Pylori*) and genetic predisposition. Nowadays, the therapeutic methods used for the treatment of the lesions are: Anti-acids, anti-cholinergic, antagonist H₂ receptors for histamine, proton pumps; certain surgical procedures are also applied, though much less frequently. Any therapeutic method that involves the use of one or more of the drugs and/or procedures above mentioned may cause some side effects and is not necessarily effective. The use of medicinal plants in the treatment of diseases has been developing over the past decade. Some plants have an anti-ulcer activity. There is evidence that the *Chlorella vulgaris* algae may modify cellular immune response, and there is also evidence to its anti-tumor, anti-metastasis, anti-ulcer activity. The objective of this present study was to evaluate the anti-ulcer activity of the *Chlorella vulgaris* algae acute models of ulcer induction and also in one chronic model of ulcer induction. Wistar rats were used to determine gastric emptying (GE) and in models of ulcer induced by ethanol and acetic acid, while swiss mice were used for the piloro ligation and piroxicam ulcer induction models. In order to evaluate the

effect of the *Chlorella vulgaris* extract (ECV) on gastric emptying (GE) a liquid proof meal (PM) with the extract in the concentration of 50mg/l and 100mg/l was used. In the study of the acute piloro ligature, ethanol and piroxicam models, and in the chronic model, dosages of 250, 500 and 1000mg/kg of ECV were used in the prevention and treatment of the lesions. In the chronic model the fraction of acetate obtained from the ECV in the dosage of 5mg/100g was also used, and the amount of epidermal growth factor (EGF) produced in the region of the ulcer was measured. The toxicity study of the ECV was done by measuring the weight gain of the rats and the weight of their organs i.e. kidneys, lungs, liver, and heart, once the first signs of toxicity by an extract are loss of body and organ weight. The ECV, in the concentration used, did not interfere with the GE when prepared as a liquid PM in comparison to the vehicle (water). The extract did not alter any of the biochemical parameters such as pH, amount of H⁺ and weight of the gastric juice in the piloro ligature model. The ECV did not prevent the formation of ulcer in the piroxicam model, but it prevented the formation of lesions caused by ethanol in the dosage of 500 and 1000mg/kg. This effect disappeared when ethanol was ministered two hours after the pre-treatment with ECV in the dosage of 1000mg/kg. The chronic ulcer induction model the ECV, in the dosage of 500 and 1000mg/kg, was able to significantly lessen the lesions caused by acetic acid, not altering, however, the amount of EGF produced in the scar tissue area when compared to the water control. Furthermore, the long-term treatment with ECV in the dosage of 500mg/kg significantly altered the evolution of weight gain of these animals. In

conclusion, the ECV, as a dietary complement, may be an alternative in the treatment of gastric peptic ulcer.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal (TGI) tem uma conformação adequada para obtenção de nutrientes e manutenção do bom funcionamento das células. (KUTCHAI,1996). Apresenta uma grande superfície de absorção e uma variedade de glândulas produtoras de sucos digestivos com capacidade de quebrar os nutrientes em moléculas suficientemente pequenas para, após completa digestão na superfície da mucosa, serem absorvidas pelo intestino delgado.

O estômago, um dos segmentos proximais do TGI, circundado por várias camadas de músculo liso e revestido por uma mucosa, está dividido em quatro regiões anatômicas: cárdia, fundo, corpo e antro (Figura 1). Este órgão está envolvido na digestão de proteínas e possui depressões e glândulas em toda sua extensão, sendo a superfície (Figura 2) constituída por células epiteliais secretoras de muco e os sulcos, por células parietais, principais, enterocromafins-like (ECL) e células G, produtoras de gastrina. (KUTCHAI,1996).

As células parietais, secretoras de ácido, e as células principais, de pepsinogênio, estão localizadas primariamente no fundo e no corpo, enquanto que as células de gastrina estão no antro (KUTCHAI, 1996) .O suco gástrico normal é uma mistura da secreção parietal (ácido e fator intrínseco) e secreções não parietais (muco, bicarbonato, Na⁺, K⁺ e pepsinogênio).

As células parietais (Figura 3) secretam ácido por três vias: parácrina, quando estimuladas pela histamina produzida pela ECL; endócrina, estimuladas pela gastrina produzida pelas células G do antro; e neural, estimuladas pela acetilcolina liberada nas terminações nervosas eferentes do vago e do sistema nervoso entérico. Histamina, gastrina e acetilcolina possuem seus respectivos receptores localizados na membrana basolateral das células parietais. Gastrina e acetilcolina têm receptores na membrana das células ECL e também estimulam a secreção ácida indiretamente, através da liberação de histamina. (YAO E FORTE, 2003).(Figura 3)

A secreção ácida envolve basicamente uma elevação inicial de cálcio intracelular e/ou AMPc, seguido pela ativação da cascata proteína kinase AMPc-dependente, que leva à translocação e inserção da bomba de próton (H,K-ATPase) dentro da membrana apical das células parietais (YAO E FORTE, 2003).

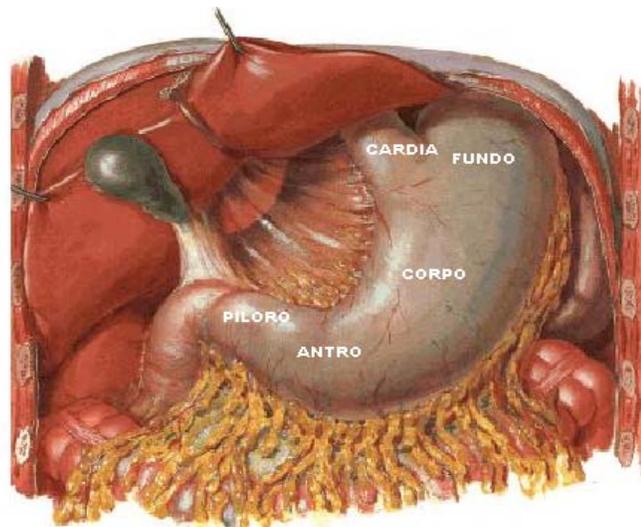


Figura 1: Anatomofisiologia do estômago

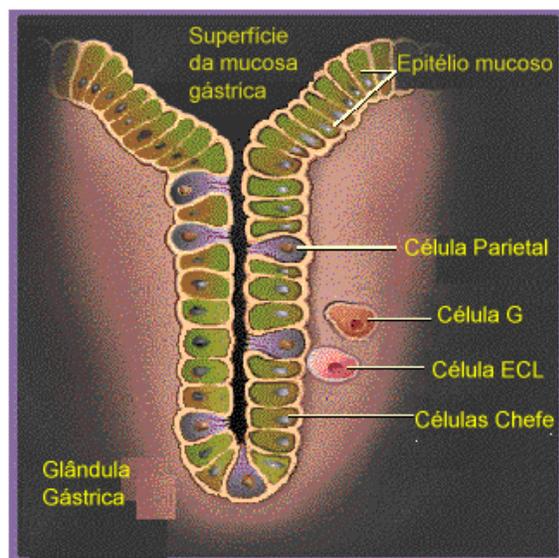


Figura 2. Distribuição anatômica das camadas musculares e localização das células do estômago

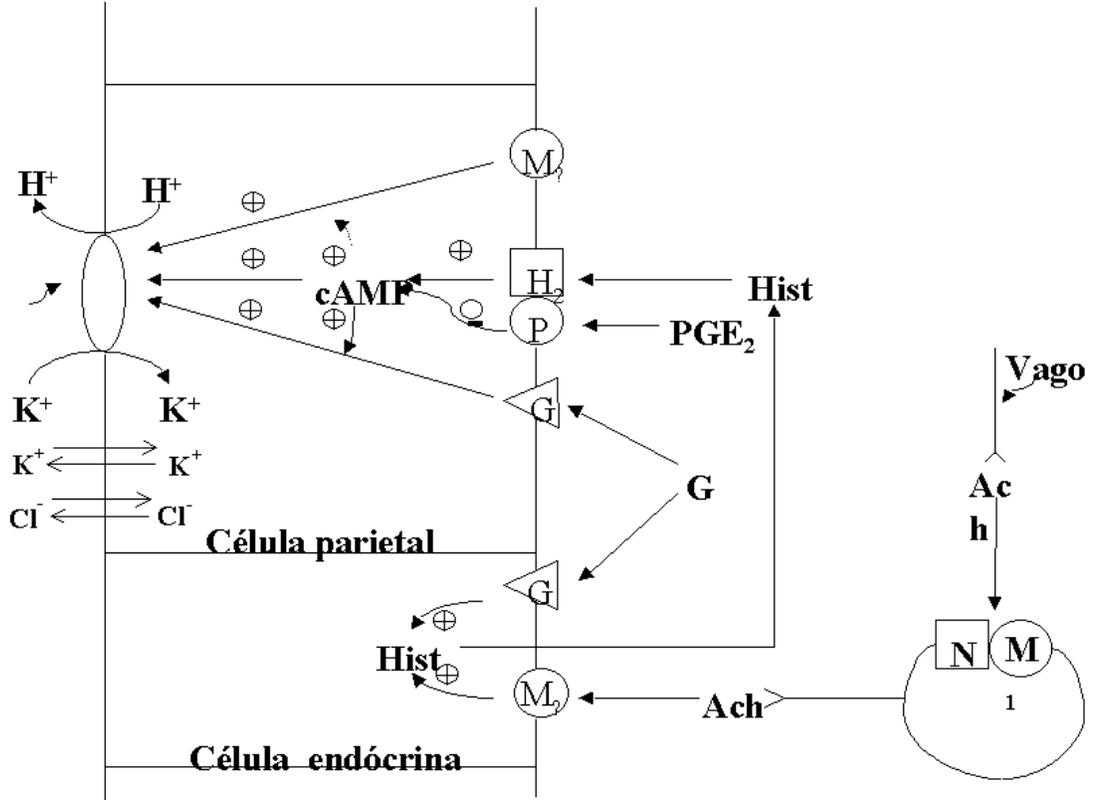


Figura 3- Esquema da secreção ácida

Adicionalmente, o estômago tem uma série de barreiras para que a sua função primordial de digestão não acabe por lesá-lo. A camada mucosa é uma das principais barreiras que isolam as células do lúmen, onde ocorrem as variações de pH, conteúdo osmótico e calórico da refeição.

Assim, na camada mucosa podem ser observados quatro níveis de proteção. O primeiro constituído pelos fatores secretados para o lúmen tais como: fosfolípidos de superfície ativa, bicarbonato, ácidos, muco, prostaglandinas e outras substâncias antibacterianas como a lactoferrina. O segundo nível de proteção é constituído pelo próprio epitélio que funciona contra a difusão passiva

de substâncias e dispõe de um sistema eficaz de reparo rápido, que envolve a produção de fatores tróficos como, por exemplo, o fator de crescimento epidermal (EGF), garantindo a integridade da mucosa. A proteção dada pela ação conjunta de aferência nervosa sensitiva e a microcirculação de mucosa e submucosa determina o terceiro nível de proteção. Desta forma, qualquer modificação do meio, incluindo a ação de agentes invasivos, é detectada pela aferência e imediatamente são desencadeadas respostas como: aumento de fluxo sanguíneo na região para facilitar a ação reparadora dos fatores de crescimento e garantir um aporte nutritivo necessário para que as células desempenhem corretamente suas funções. O quarto nível de defesa é constituído pelo sistema imunológico da mucosa, que inclui a participação das células de alerta como mastócitos e macrófagos que, por sua vez, mobilizam todo sistema imunológico celular para uma resposta inflamatória de proteção (WALLACE, 1996, ROBERT, 1979).

A mucosa não é impenetrável a diversas substâncias ingeridas ou produzidas. Deste modo, a formação de úlceras e a ocorrência de injúrias são inevitáveis. A úlcera péptica é um termo que se refere a úlceras gástricas e duodenais. Sabe-se que, atualmente, cerca de 10% da população ocidental e asiática são acometidos por úlcera péptica acarretando custos elevados para a sociedade (BERSTAD E BERSTAD, 1993).

As úlceras gástricas são mais recorrentes, em consequência do fato de a mucosa gástrica estar em contato direto com o ácido +pepsina e submetida à ação de agentes externos ingeridos. Por décadas, admitiu-se que as úlceras eram causadas apenas pelo excesso de secreção ácida. Sabe-se hoje que muitos dos pacientes que apresentam úlceras não têm alteração na secreção gástrica de ácido (WALLACE, 1996). Posteriormente, passou-se a admitir que essa patologia estaria associada à colonização do estômago por *Helicobacter pylori* (BRUTON *et al*, 1996). Contudo, foram identificadas na população pessoas saudáveis colonizadas pela bactéria, que não desenvolviam as úlceras e indivíduos acometidos pela patologia sem a presença dessa bactéria.

Deste modo, o consenso na literatura atual (Figura 4) é de que essa patologia é resultado da associação de 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 esteróides (AINEs), ingestão de determinados alimentos e presença de *Helicobacter pylori*) e predisposição genética, os quais reduziram a defesa da mucosa gástrica (HIRSCHWITZ, 1995, BRUNTON, 1996, WOLFE E SANCHS, 2000, WALLACE 2000). Por outro lado, os testes de urease para *Helicobacter pylori* são mascarados pelo uso dos inibidores de bomba de próton. Desse modo, pode ser que a maioria dos pacientes com a úlcera péptica estejam colonizados com a bactéria, visto que os inibidores são prescritos e utilizados antes dos testes para detectar a presença da bactéria (OLIVEIRA, 2003).

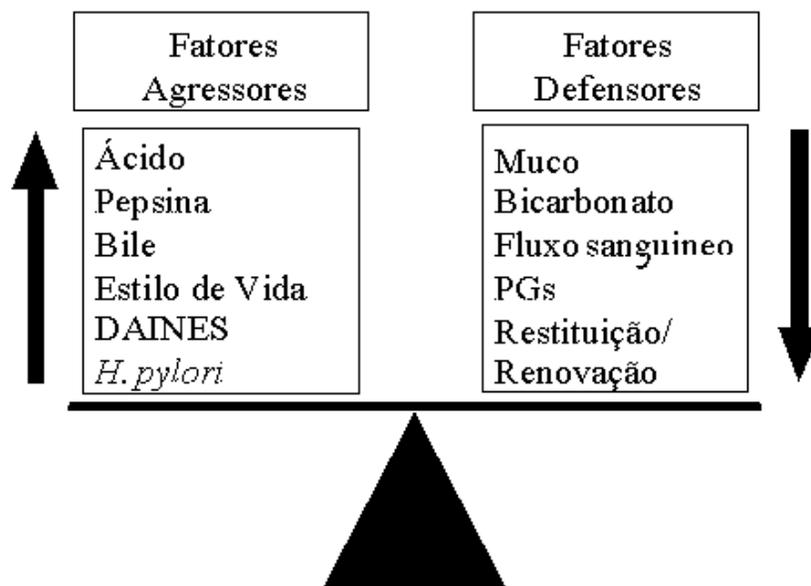


Figura 4- Esquema fisiopatológico atual da úlcera péptica

Um pequeno desequilíbrio entre os mecanismos agressores da mucosa e os mecanismos protetores poderá causar uma lesão e no Brasil são milhares de centenas de casos com alta morbidade (WALLACE E GRANGER, 1996). Sendo assim, o desenvolvimento de uma terapêutica adequada para o tratamento das úlceras pépticas tornou-se de vital importância (SOUZA-BRITO E NUNES, 1997). As drogas utilizadas atualmente não são 100% eficazes na remissão de úlceras. Entre as inúmeras drogas empregadas temos: antiácidos, anticolinérgicos,

antagonistas do receptor H-2 para histamina e inibidores de bomba de próton. Embora, sejam atualmente, raramente utilizados, alguns procedimentos cirúrgicos, como a vagotomia, ainda são indicados para alguns casos da patologia. (SOUZA-BRITO, 1997).

A cimetidina é um antagonista de receptores H2 comumente utilizado na terapêutica e age como inibidor competitivo da histamina com seu receptor, é altamente seletiva e não interage com receptores H1 (BRUTON, 1996).

O lansoprazol é um potente inibidor da bomba de próton, inibe a secreção ácida por inativação da bomba através da formação de ligações dissulfeto entre as moléculas reagentes do lansoprazol com a enzima.H,K-ATPase (BRUTON, 1996).

Os esquemas terapêuticos com estas drogas e procedimentos cirúrgicos têm algumas desvantagens pelos efeitos colaterais, reações adversas e resposta limitada em patologias crônicas.

A utilização de plantas medicinais como alternativa terapêutica cresceu muito nas últimas décadas. Estudos desenvolvidos pela Organização Mundial de Saúde demonstram que 85% da população em países em desenvolvimento fazem uso de plantas medicinais, ou seus derivados, no tratamento das patologias gastrintestinais (GRACIOSO, 2002).

Desde os primórdios da civilização as plantas têm sido um recurso acessível ao ser humano. Durante milênios, o homem empiricamente aprofundou seu conhecimento para a cura de suas enfermidades através do uso de plantas medicinais.

As indústrias farmacêuticas têm mostrado grande interesse no estudo de plantas, visando à identificação de novas estruturas moleculares com atividades biológicas (HAMBURGER E HOSTETTMAN, 1991), visto que, a natureza é um dos melhores laboratórios de moléculas com potenciais efeitos medicinais (SOUZA-BRITO, 1997).

A quantidade de evidências relacionadas com as atividades biológicas de compostos derivados de plantas aumentou durante a última década (KONSTANTOULOULOU, 1992). Porém, existem muitas espécies vegetais que são usadas sem que se saiba exatamente qual o princípio farmacológico ativo e se possuem componentes potencialmente tóxicos com riscos para a saúde pública (GAILLARD E PEPIN, 1999).

Sem o estudo adequado de plantas medicinais, tornam-se inviáveis o estabelecimento de parâmetros necessários para o estabelecimento da dose terapêutica e seu uso seguro com o mínimo de reações colaterais (GAILLARD E PEPIN, 1999; KONSTANTOULOULOU, 1992).

A experiência demonstra que o estudo de substâncias ativas retiradas dessas plantas envolve, além da indicação popular, uma equipe multidisciplinar com participação de um botânico (para identificar e classificar a espécie), de um químico (para isolar o princípio ativo) e um farmacólogo (para realizar os ensaios em modelos experimentais) (SOUZA-BRITO, 1997).

Concluídos os ensaios fitoquímicos e farmacológicos, torna-se necessária a produção de um medicamento para comercialização, necessitando, porém, de parâmetros de qualidade para fins farmacêuticos, tais como a correta descrição

botânica, testes de identidade, requisitos de pureza, ensaios químicos, determinação dos constituintes químicos majoritários, farmacologia, contra-indicações, perigos, precauções, reações adversas e posologia (WHO, 2000).

Em recentes publicações, muitas plantas medicinais têm sido evidenciadas como úteis no tratamento de distúrbios gástricos. Como exemplos temos *Syngonanthus arthrotrichus* (BATISTA, 2004) *Musa paradisiaca* L. (SOUZA-BRITO E COSTA, 1996)

Contudo, existe na flora mundial um grande número de espécies usadas na medicina popular: *Melissa officinalis*, *Mentha piperita*, *Silybum marianum* (KHAYYAL *et al.*, 2001), *Brassica oleracea*, *Maytenus aquifolium*, *Symphytum officinalis*, *Zolernia ilifolia* (ALONSO, 1998) e a alga *Chlorella vulgaris* (TANAKA *et al.*, 1998).

Os compostos obtidos de plantas medicinais com atividade anti-ulcerogênica apresentam estruturas químicas diversas e distintos mecanismos de ação. Dentre as principais classes de compostos relacionados a essa atividade têm-se os terpenos, triterpenos, flavonóides, alcalóides, glicosídeos, saponinas e polissacarídeos (LEWIS E HANSON, 1991). Estudos demonstram que esteróides como o estradiol têm efeito curativo sobre úlceras crônicas causadas por ácido acético (GUNAL, 2003).

A *Chlorella* é um gênero de microalga unicelular de água doce, com 15 espécies conhecidas, sendo a *Chlorella vulgaris* a mais extensamente estudada. Esta espécie tem uma conformação esférica, com 2 a 10 micrômetros de diâmetro, pertencente à classe *Chlorophyceae*, ordem *Chlorococcales* e família

Oocystaceae, é utilizada como suplemento alimentar em comunidades japonesas e vem sendo estudada pelas suas propriedades antitumorais, antiulcerogênicas e por estimular algumas funções do sistema imunológico celular (YASUKAWA, 1996, TANAKA, 1997, QUEIROZ *et al* , 2002). Foi demonstrado ser modificador de resposta biológica, devido a sua habilidade de acentuar a defesa imunológica inata do organismo contra vírus e bactérias de ratos normais e imunossuprimidos (TANAKA,1996, IBUSUKI, 1990, HASEGAWA, 1994, DANTAS, 1999, TANAKA, 1990). Além disso, estudos realizados em camundongos e ratos mostram que essa alga tem uma potente atividade antitumoral e antimetastática (TANAKA, 1998 E JUSTO, 2001). Justo *et al* (2001) mostraram que grande parte da atividade antitumoral se deve a sua habilidade de estimular a hematopoese

Estudos prévios têm demonstrado um aumento da expressão de genes de algumas citocinas com atividade hematopoiética como interleucina-12 (IL-12) interleucina 1 α (IL-1 α), fator de necrose tumoral (TNF- α) e fatores de crescimento de células progenitoras de granulócitos macrófagos (GM-CSF), nas células peritoniais aderidas depois da administração oral de extrato aquoso de *Chlorella vulgaris* (ECV) (DANTAS E QUEIROZ, 1999). Os macrófagos são vitais para a cicatrização de qualquer tecido e, em conjunto com os neutrófilos, agem fagocitando patógenos e os restos de tecidos e liberando alguns agentes quimiostáticos importantes como TNF- α (MUTSAERS *et al*, 1997).

Tanaka *et al* (1997) demonstraram que o extrato seco de *C. vulgaris* previne a formação de úlceras induzidas por estresse por imersão e frio em ratos, previne

as perfurações provocadas por cisteamina e não tem efeito em modelo de ligadura do piloro.

Yasukawa *et al* (1996) demonstraram que alguns esteróides isolados da fração acetato de etila do ECV foi capaz de reduzir a inflamação causada por 12-O-tetradecanoilfobol-13-acetato (TPA) e o desenvolvimento de tumor de pele, sugerindo que apresenta capacidade de interferir no processo de cicatrização.

Sendo assim, julgamos necessário um estudo detalhado sobre as propriedades antiulcerogênicas da *C. vulgaris* como primeiro passo para posterior identificação do princípio ou princípios ativos que poderiam ser utilizados no tratamento de úlceras gástricas.

Para isso, são utilizadas substâncias potencialmente ativas contra a gênese de úlceras, com a finalidade de não desconsiderar nenhum dos aspectos de sua formação e desenvolvidos modelos experimentais que mimetizam todas as condições da formação dessa patologia, para permitir avaliação da atividade farmacológica dos extratos vegetais com potencial atividade antiulcerogênica (atividade preventiva ou curativa).

Os principais modelos de úlceras utilizados para medir a capacidade de prevenção das lesões são: 1) Os modelos de úlceras agudas induzidas por ligadura do piloro, por antiinflamatórios não esteróides (AINEs) e por etanol; 2) O modelo “crônico” pela aplicação subserosa de ácido acético.

O modelo por ligadura do piloro avalia uma possível atividade sistêmica do extrato estudado, visto que o extrato vegetal é injetado por via intraduodenal. Apesar de não haver leitura de índices de lesões ulcerativas, os parâmetros

analisados conjuntamente dão pistas sobre um provável mecanismo de ação da substância estudada, como alterações de pH, concentração de H⁺ e volume do suco gástrico (SHAY, 1945). Neste modelo, as lesões ulcerosas são conseqüentes da atividade colinérgica vagal aumentada devido à distensão da mucosa. A acetilcolina atua sobre receptores das células parietais aumentando a secreção ácida, ou sobre receptores das células enterocromafin-like liberando histamina.

As úlceras induzidas por utilização de antiinflamatórios não esteróides (AINEs) ocorrem por uma inibição da via das enzimas ciclooxigenases, responsável pela síntese das prostaglandinas. As prostaglandinas têm efeito citoprotetor da mucosa por inibir a secreção ácida, aumentar a quantidade de muco e por ser uma substância vasodilatadora que garante o aporte nutritivo necessário para o bom funcionamento celular (ROBERT, 1979, WALLACE, 2000, LEWIS E HANSON, 1991).

O modelo de úlcera induzida por etanol provoca as lesões por solubilização do muco protetor e desta forma a mucosa fica indefesa à ação hidrolítica e proteolítica do ácido clorídrico e da pepsina, respectivamente. O contato com o álcool também leva ao aumento da secreção ácida e alteração da rede vascular local, por rompimento dos vasos sanguíneos que irrigam a mucosa gástrica (OATES E HAKKINEN, 1988).

O ácido acético injetado na camada subserosa do estômago causa lesões “crônicas”, deste modo o estudo de extratos vegetais nesses modelos diferem dos citados anteriormente por avaliarem a capacidade de cicatrização e cura da úlcera e não a capacidade preventiva do extrato (TAKAGI *et al*, 1969).

2-OBJETIVOS

2.1 Avaliar o efeito do extrato aquoso de *C. vulgaris* no esvaziamento gástrico de uma refeição de prova líquida marcada com fenol vermelho;

2.2 Avaliar a atividade preventiva antiulcerogênica do extrato aquoso de *C. vulgaris* (ECV) utilizando os modelos de indução de úlcera aguda por ligadura do piloro, piroxicam e etanol;

2.3 Avaliar, no modelo de úlcera induzida por ácido acético, a capacidade curativa e cicatrizante do extrato aquoso de *C. vulgaris* e de sua fração acetato;

2.4 Avaliar a produção de EGF na zona de cicatrização da úlcera induzida por ácido acético dos ratos tratados com ECV e sua fração acetato ;

2.5 Avaliar a toxicidade do ECV e de sua fração acetato através da avaliação do ganho de peso e peso dos órgãos dos animais, no modelo de úlcera por ácido acético.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL

3. 1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 200-250g, para o estudo do esvaziamento gástrico e nos modelos de úlcera gástrica induzida por etanol e ácido acético. Para os modelos de úlcera gástrica por ligadura do piloro e induzida por piroxicam foram utilizados camundongos Swiss, pesando entre 25-30g. Os animais foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da Unicamp. Foram mantidos em condições de temperatura entre 22-26 °C, ciclo de luz de 12 horas, recebendo água e ração *ad libitum*, até o momento do estudo.

3. 2 Drogas

3. 2.1 Extrato aquoso de *C. vulgaris* (ECV)

O extrato aquoso de *Chlorella vulgaris* (ECV) liofilizado foi obtido da Chlorella Industry Co. Ltd. (Tóquio). O material liofilizado contém, por 100g, 44,4g de proteínas, 39,5g de carboidratos e 15,4g de ácidos nucleotídicos.

3.2.2 Fração acetato do ECV

Os procedimentos de extração da fração acetato do ECV foram realizados em conjunto com a equipe do Prof. Dr. José Roberto Trigo no laboratório de Ecologia Química do Departamento de Zoologia da UNICAMP.

O ECV (50g) foi colocado em metanol (750ml), permanecendo durante três dias nesse solvente, a fração extraída foi filtrada e concentrada por evaporação no rotavaporador a 45°C. À fração metanólica foi adicionada água e acetado de etila na mesma proporção e foram partidas as frações aquosa e

acetato de etila no funil de separação (YAKAWA et al, 1996) Apenas a fração acetato foi utilizada nos testes farmacológicos (figura 5).

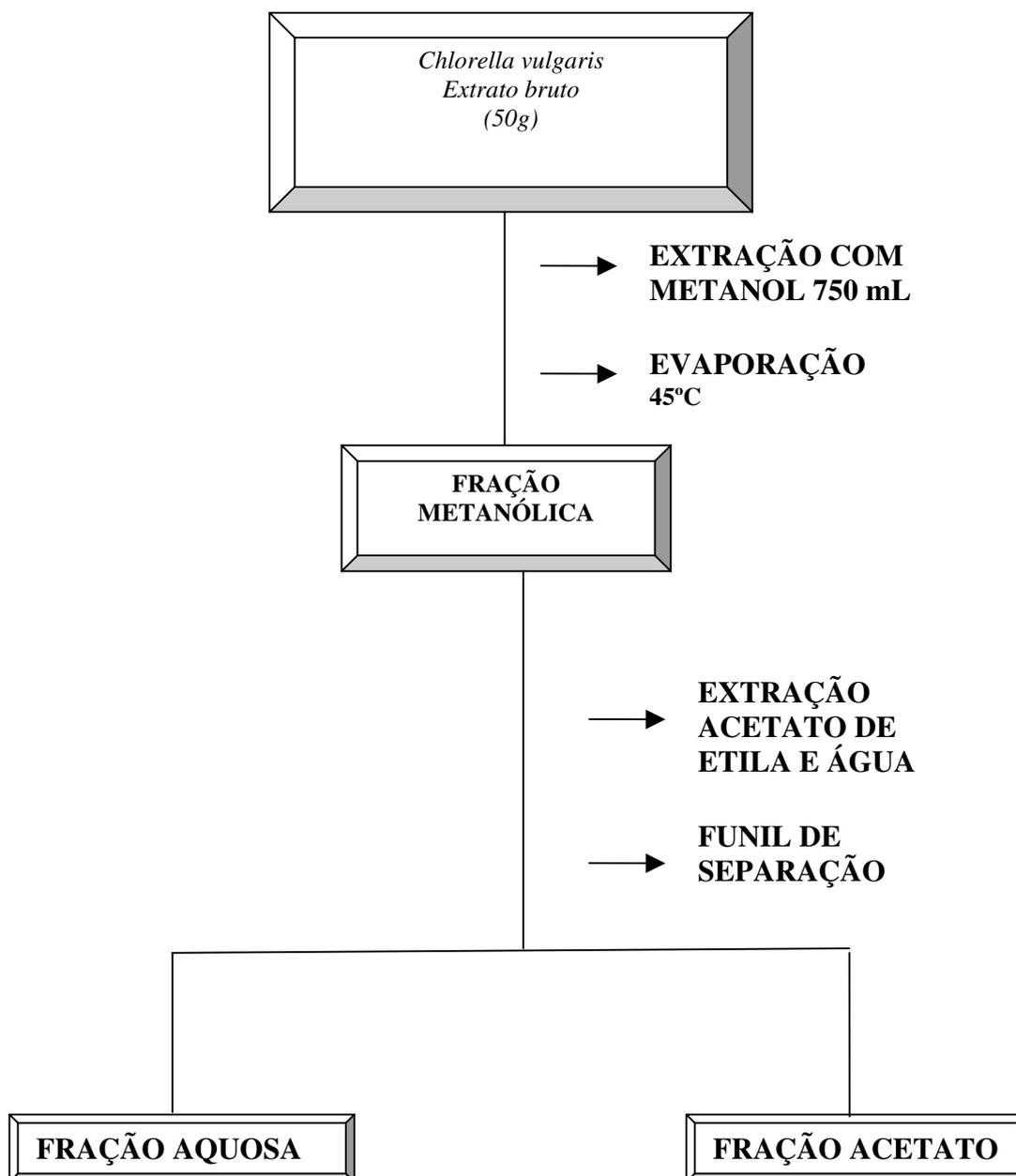


Figura 5: Esquema de separação do ECV nas frações aquosa e acetato de etila.

3. 2.3 Cimetidina

Cloridrato de Cimetidina da Kanda Indústria Brasileira, ampolas de 300mg em 2 ml

3. 2.4 Antinflamatório Não Esteróide (AINEs) - Piroxicam

Piroxicam da HEXAL, comprimido solúvel com 20 mg.

3. 2.5 Lansoprazol

Medicamento genérico da Medley S.A Indústria Farmacêutica, 30mg por cápsula.

3.3 Delineamento Experimental

1ª fase: Estudo do esvaziamento gástrico nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos após administração da refeição de prova (RP). Os animais foram divididos em dois grupos: grupo controle (A) recebendo água marcada com fenol vermelho como RP e dois grupos recebendo extrato de *C. vulgaris* nas doses de 50 (grupo Ch50) e 100 (grupo Ch100) mg/ml, dissolvidas em água marcada com fenol vermelho como RP.

Este estudo foi realizado com duas finalidades: avaliar o efeito e o tempo de permanência do extrato de *C. vulgaris* no estômago e desta forma relacionar com os resultados observados no pré tratamento com a alga nos modelos de ulcera aguda.

2ª fase: Estudo nos modelos de úlcera aguda induzida por ligadura do piloro, antiinflamatório não esteróide-piroxicam (AINEs) e etanol . Os animais foram divididos em cinco grupos: recebendo veículo água (A) como controle negativo, cimetidina (Cime) ou lansoprazol (Lanso) como controle positivo, devido a ação inibitória dessas duas drogas na secreção ácida, e extrato aquoso de *C. vulgaris* (ECV) nas doses de 250 (Ch250), 500 (Ch500) e 1000 mg/ kg (Ch1000).

3ª fase: Estudo no modelo de úlcera “crônica” induzida por ácido acético. Os animais foram divididos em cinco grupos: recebendo veículo água (A) como controle negativo, cimetidina (Cime) como controle positivo e extrato aquoso de *C. vulgaris* (ECV) nas doses de 250 (Ch250), 500 (Ch500) e 1000 mg/ kg (Ch1000). Em todos estes grupos foram feitas determinações do fator de crescimento epidermal (EGF) no homogeneizado da região da úlcera e sua área de cicatrização.

4. MÉTODOS

4.1 Esvaziamento Gástrico

Três refeições de prova (RF) foram preparadas antes do experimento, a primeira refeição controle com água destilada (grupo C) e as outras duas com extrato aquoso de *C. vulgaris* (ECV) nas concentrações de 50 e 100mg/ml, (grupos Ch50 e Ch100, respectivamente) todas marcadas com fenol vermelho (12mg/dl).

O esvaziamento gástrico foi avaliado indiretamente através da determinação da % retenção gástrica (RG) da refeição de prova utilizando técnica padronizada (BELLANGERO E COLLARES, 1998). Para isto os animais foram colocados em jejum por 24 horas divididos em três grupos C, Ch50 e Ch100, de acordo com as RF. As refeições de prova foram infundidas, no volume de 1ml/100g, através de uma seringa conectada a uma sonda de polietileno para administração orogástrica, reproduzindo as mesmas condições utilizadas na administração dos pré-tratamentos. As RG foram determinadas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos após a infusão. Após administração da refeição os animais retornaram as gaiolas onde permaneceram até 90

segundos antes dos tempos estabelecidos para determinação das RG. A seguir, individualmente, cada animal é colocado numa campânula com éter etílico por 60 segundos, transferido para uma prancha onde é fixado, o abdômen aberto por uma incisão longitudinal e o piloro clampeado exatamente no tempo estabelecido pa determinação da RG. O conteúdo gástrico é retirado, através uma sonda metálica conectada através de um cateter de polietileno a uma seringa de vidro e transferido para uma proveta. A seguir são realizadas cinco lavagens do lúmen gástrico com 2 ml de água destilada de cada vez e o lavado transferido para a mesma proveta. O volume final (resíduo gástrico) obtido é anotado. Após filtração do resíduo gástrico toma-se 2 ml e adiciona-se 5 ml de fosfato trisódico e o volume final é completado para 10 ml com água destilada. As amostras são feitas em duplicata e lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 560nm. Para o cálculo da retenção gástrica (%) aplica-se a seguinte fórmula:

$$\text{RG (\%)} = \frac{\text{volume do resíduo gástrico X absorbância do resíduo}}{\text{volume da refeição de prova X absorbância da refeição}} \times 100$$

4.2 Análise dos parâmetros bioquímicos do conteúdo gástrico de camundongos submetidos à ligadura do piloro

Os experimentos de ligadura do piloro em camundongos foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Shay *et al.* (1945) para ratos, com algumas modificações descritas a seguir.

Após 36 horas de jejum, no animal, sob anestesia por éter etílico, foi feita uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide para localização e ligadura do piloro e cárdia. Logo após foi feita administração por via intraduodenal de extrato aquoso de *C. vulgaris* (ECV) nas doses de 500 e 1000 mg/kg, cimetidina 100 mg/kg (controle positivo) e água (controle negativo), todos num volume de 10 ml/kg (MORIMOTO, 1991). Quatro horas após a cirurgia, o camundongo foi sacrificado, a incisão reaberta e, mantendo-se a ligadura da cárdia (para preservação do conteúdo gástrico) o estômago foi retirado. O conteúdo gástrico foi coletado e pesado logo em seguida. Esse conteúdo foi expresso em mg. O pH e a concentração de íons hidrogênio na secreção gástrica também foram determinados. Para tal adicionou-se água destilada ao conteúdo do estômago até completar o volume de 10 ml, e esta solução foi então centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm e o sobrenadante titulado com NaOH 0.01 N em bureta digital modelo EM-burette, utilizando fenolftaleína como indicador. A concentração do ácido foi expressa em mEq/ml/4h. O pH foi determinado em pHmêtro modelo PA 200.

4.3 Modelo de úlcera gástrica induzida por AINES

Este modelo foi realizado conforme descrito por Hayden *et al* (1978) com modificações em Puscas *et al* (1997). Após 36 horas de jejum, os grupos experimentais foram tratados 30 minutos antes da indução da lesão. Grupos de animais receberam água (controle negativo), cimetidina 100 mg/kg (controle positivo) e ECV nas doses de 250, 500 e 1000 mg/kg. Todos os tratamentos foram feitos por via oral, em dose/volume final de 10 ml/kg. A lesão gástrica foi induzida pela administração subcutânea de piroxicam (AINEs) 30 mg/kg. Após 4 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e, em seguida, os estômagos foram retirados e abertos ao longo da grande curvatura, e as lesões ulcerativas foram contadas e classificadas segundo a severidade Szelenyi e Thiemer (1978); lesões nível 1 (pontos hemorrágicos < 1 mm), nível 2 (úlcera de 1 a 3 mm de extensão) e nível 3 (úlceras profundas > 3 mm de extensão), com pequenas modificações. Para cada grupo de tratamento foi calculado um índice de lesões ulcerativas (ILU), obtido através da equação:

$$\underline{ILU = (\sum \text{lesões nível 1}) + (\sum \text{lesões nível 2} \times 2) + (\sum \text{lesões nível 3} \times 3)}$$

4.4 Modelo de úlcera gástrica induzida por etanol

Esse modelo foi realizado de acordo com Morimoto *et al* (1991). Após 24 horas de jejum, os grupos experimentais foram tratados 1 hora antes da indução da lesão. Grupos de animais receberam água (controle negativo), lansoprazol 30 mg/kg (controle positivo) e ECV nas doses 250, 500 e 1000 mg/kg. Todos os tratamentos foram feitos por via oral, em dose/volume final de

10 ml/kg. A lesão gástrica foi induzida pela administração oral de 1 ml de etanol absoluto. Após 1 hora os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, em seguida, os estômagos foram retirados e abertos ao longo da grande curvatura. Após esse procedimento, foi determinado o índice de lesões ulcerativas (ILU).

4.5 Modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético em ratos

Diferentes ensaios foram realizados utilizando as, nas doses 250, 500 e 100mg/kg de ECV e fração acetato de etila (5mg/100g) do extrato bruto conforme técnica descrita por Takagi *et al* (1969). Ratos foram anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax), 75mg/kg para exposição do estômago através de uma incisão de aproximadamente 2 cm realizada abaixo da apófise xifóide. No estômago exposto foram injetados, com auxílio de uma microseringa, 0,05 ml de uma solução de ácido acético a 30%, na camada subserosa da junção do fundo para o antro. Dois dias após a injeção do ácido, foram iniciados os tratamentos, com ECV 250, 500 e 1000 mg/kg, fração acetato de ECV na dose de 5 mg/100g, cimetidina 100 mg/kg como controle positivo, Tween 80 a 12% e água como controles negativos. Os tratamentos foram feitos via oral, uma vez ao dia durante 14 dias consecutivos.

Ao final do tratamento, os animais em jejum de 12 horas, foram sacrificados e seus estômagos removidos, abertos no sentido da maior curvatura para determinar a área da lesão ulcerativa (ALU). As úlceras foram determinadas através da medida do comprimento e da largura das lesões, observando-se os dois maiores eixos em ângulo de 90°, com auxílio de um

paquímetro digital Digimatic (Mitutoyo Corporation da Caliper Japão) sendo seu produto expresso em mm^2 , denominado área da lesão ulcerativa (ALU). A fórmula utilizada para obtenção da ALU é descrita a seguir, sendo o produto final obtido através da multiplicação do eixo maior da lesão denominado comprimento (c) pelo eixo que cruza o primeiro exatamente na metade em 90° , sendo este eixo o da largura (l) da lesão.

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

Após a determinação da área da lesão ulcerativa, a região que circunscreve a lesão foi removida e submetida à análise para quantificação do Epidermal Growth Factor (EGF).

Os órgãos vitais como coração, fígado, rins e pulmões foram pesados para avaliar uma possível ação tóxica do ECV. Os resultados foram expressos em grama (g) do órgão/100g de peso do animal.

4. 5.1.Quantificação de proteínas - Teste do Biureto

A região da úlcera e zona de cicatrização foram retiradas e homogeneizadas com 1 ml de tampão de extração de proteínas, permanecendo em fervura por 10 minutos e imediatamente colocado no gelo. Centrifugou-se o homogeneizado em 12 000 rpm a 4°C por 20 minutos. Retirou-se 20 μl de sobrenadante e misturou-se a 1 ml de biureto, a mistura permanece na temperatura ambiente por 20 minutos. Fez-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro em 540 nm. O cálculo da quantidade de

proteínas é realizado comparando-se a leitura da absorbância da amostra com a de um padrão com concentração protéica conhecida (g/l)

4.5.2 Imunoblotting para determinação do EGF

Tomou-se 400 µl do sobrenadante da extração anterior e homogeneizou-se a 100µl de Laemmli e 0,015g de Cleaveland's Reagente (DTT). Essa mistura foi utilizada para avaliação do extrato total, ou seja, separação das proteínas em SDS-PAGE, com tampão de Laemmli, acrescido de DTT 200 mM, em proporção de 5:1, mantido sempre a 4°C até o momento de submeter à fervura a 100°C durante 5 minutos, e posteriormente aplicados em gel de poliacrilamida; e para imunoprecipitação com anticorpos específicos para os antígenos a serem estudados.

Alíquotas contendo 200 µg de proteína por amostra foram aplicadas sobre gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de 1,5mm de espessura. A eletroforese foi realizada em cuba de minigel da Bio Rad (Mini-Protean), com solução tampão para eletroforese, previamente diluída. O SDS-PAGE foi submetido a 30 volts, inicialmente, até a passagem da linha demarcada pela fase de empilhamento (stacking) e 120 volts até o final do gel de resolução (resolving). A seguir, as proteínas separadas no SDS-PAGE, foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência de minigel da Bio Rad, e a solução tampão para transferência mantido em voltagem constante de 120 volts por 2 horas, sob refrigeração contínua por gelo.

As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas foram incubadas em solução bloqueadora por 2 horas, a temperatura ambiente,

para diminuir a ligação inespecífica de proteínas. A seguir, as membranas foram lavadas com solução basal por 3 sessões de 10 minutos, e incubadas com anticorpo anti- EGF (anticorpo polyclonal Santa Cruz 1343) sob agitação constante por uma noite a 4°C. Foram então lavadas novamente com solução basal por 3 sessões de 10 minutos e incubadas com anti goat durante 2 horas a temperatura ambiente. O excesso de proteína A foi lavado com solução basal e então, as membranas expostas ao filme de RX (Kodak XAR - Rochester, NY), com intensificador (Cronex Lightning Plus - DuPont, Wilmington, DE) em cassete mantido a -80°C. Após 48 horas ou mais, os filmes foram revelados na forma convencional. A intensidade das bandas foi determinada através da leitura das autoradiografias reveladas por densitometria ótica, utilizando um scanner (HP 3400) e o programa Scion Image (Scion Corporation). Os resultados são expressos em unidade arbitrária (*pixels square*)

4.6 Análise Estatística

A análise estatística para comparação das amostras foi realizada através do teste ANOVA seguido do teste de Dunnett, quando necessário. Quando indicado pelo programa de estatística INSTAT foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido quando necessário do teste de Dunn.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Esvaziamento gástrico

Não houve diferença significativa no EG, no tempo de trinta minutos, dos animais que receberam a refeição de ECV, nas doses de 500 e 100mg/kg, em relação àqueles que receberam a refeição de prova controle (água). O mesmo fenômeno pode ser observado nos tempos de 60, 90 e 120 minutos, com redução gradativa da retenções gástricas das três refeições ao longo do tempo. (Figura 6)

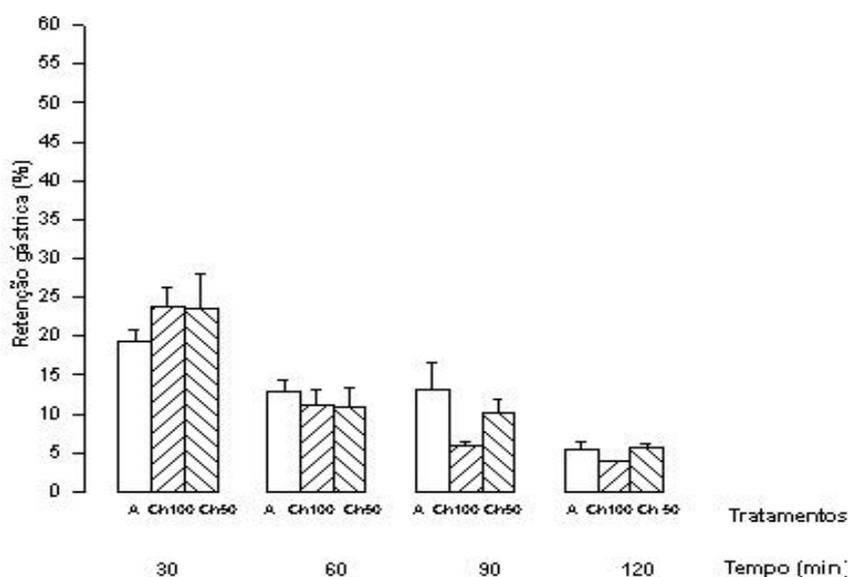


Figura 6: Retenção gástrica (%) de ratos que receberam uma refeição de prova de Água (A) e Extrato de *C. vulgaris* (ECV) na concentração de 500 e 1000 mg/kg (Ch50 e Ch100, respectivamente), marcadas com fenol vermelho, administradas 30, 60, 90 e 120 minutos antes do estudo. Os dados estão expressos em média \pm SE (erro padrão da média), N=5, teste ANOVA.

5.2 ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA

5.2 1- Análise dos parâmetros bioquímicos do conteúdo gástrico de camundongos submetidos à ligadura do piloro

Como podem ser observados na Tabela 1, os resultados demonstraram que apenas a cimetidina foi capaz de determinar mudança significativa no pH do suco gástrico ao seu controle água e ao ECV. Os outros parâmetros bioquímicos estudados (peso da secreção e concentração de [H⁺]) não foram alterados por nenhum dos tratamentos.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	pH	Peso do suco (mg)	[H ⁺] mEq/ml/4h
Água	10ml/Kg	2,28±0,48	123,0±30,4	4,2±1,5
Cimetidina	100	3,83±0,7*	56,8±22,9	3,5±0,7
ECV500	500	2,7±0,75	91,6±52,5	3,7±1,4
ECV 1000	1000	3,5±1,5	121,3±72,1	2,8±1,1

Tabela 1: Parâmetros bioquímicos do suco gástrico de camundongos submetidos a ligadura do piloro, tratados por via intraduodenal com água, cimetidina (100mg/kg) e ECV nas doses de 500 e 1000mg/kg, N=7 *p<0,05 em relação a Água, ANOVA e teste de Dunnet.

5.2.2- Modelo úlcera gástrica induzida por piroxicam

Os resultados obtidos (Figura 7) demonstraram que não houve diferenças significativas entre os índices de lesão ulcerativa (mm^2) nos animais que receberam água e extrato de *C. vulgaris* nas doses de 250, 500 e 1000 mg/kg (Ch 250, 500 e 1000 respectivamente). Apenas a cimetidina reduziu significativamente as lesões causadas por injeção subcutânea de piroxicam. Além disso, não houve diferenças significativas entre o grupo cimetidina e os animais que receberam as diferentes doses de CVE, embora nestes os índices de lesão ulcerativa tenha sido mais elevados.

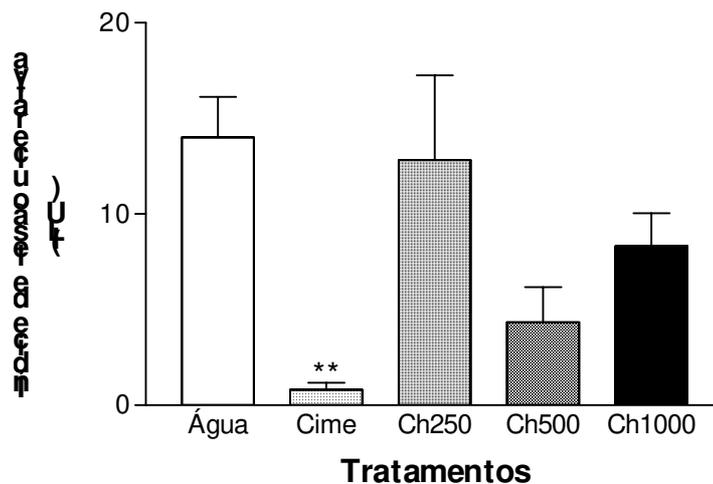


Figura 7: Índice de lesão ulcerativa (mm^2) medido em estômagos de animais em que foi induzida úlcera por piroxicam (30mg/kg). Os animais foram tratados com água, cimetidina (100mg/kg) e extrato de *C. vulgaris* nas doses de 250, 500 e 1000 mg/kg 30 minutos, após da indução da úlcera. Os resultados estão expressos em média, N=7, ** $p < 0,01$ em relação ao grupo água, teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

5.2 3-Modelo úlcera gástrica induzida por etanol

Os resultados obtidos (Figura 8) demonstraram que os pré-tratamentos com extrato de *C.vulgaris* (injetado 1 hora antes da indução da úlcera), nas doses de 500 e 1000 mg/kg e com cimetidina foram capazes de reduzir as lesões produzidas por etanol. Quando empregado na dose mais baixa de 250 mg/kg o extrato aquoso de *C.vulgaris* não impediu o aparecimento das úlceras. O grupo sham não apresentou lesão ulcerativa. Além disso, quando o etanol foi injetado 2 horas antes do tratamento com ECV (1000 mg/kg) esse efeito protetor desapareceu (Figura 9).

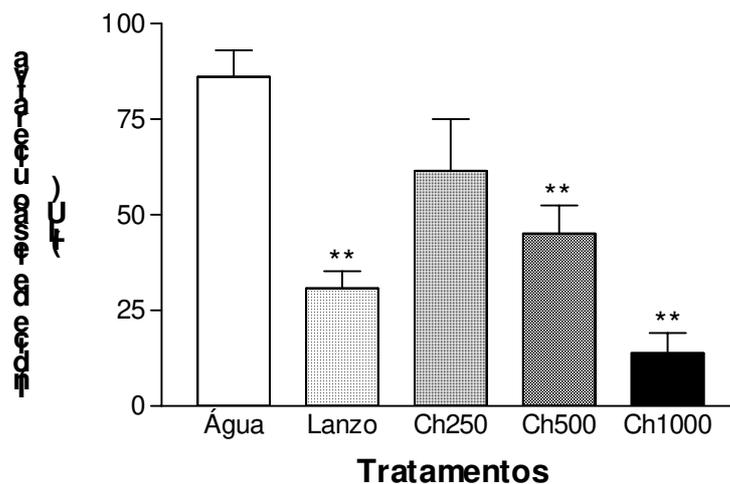


Figura 8: Índice de lesão ulcerativa (mm²) medido em estômagos de animais em que foi induzida úlcera por etanol absoluto. Os animais foram tratados com água, lanzoprasol (Lanzo) e extrato de *C. vulgaris* nas doses de 250, 500 e 1000 mg/kg (Ch250, Ch500 e Ch1000, respectivamente) 1 hora antes da indução da úlcera. Os resultados estão expressos em média, N=7, ** p< 0,01 em relação ao grupo água, teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

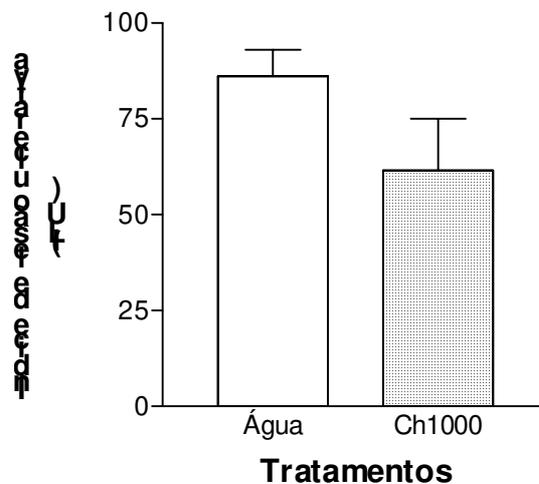


Figura 9: Índice de lesão ulcerativa (mm²) medido em estômagos de animais em que foi induzida úlcera por etanol absoluto 2 horas depois do tratamento com ECV. Os animais foram tratados com água e extrato de *C. vulgaris* nas doses de 1000 mg/kg. Os resultados estão expressos em média, N=7, teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

5.2. 4- Modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético

5.2.4.1- Efeito do ECV sobre lesão ulcerativa

O ECV nas doses de 500 e 1000 mg/kg e cimetidina foram eficazes no tratamento da úlcera induzida por ácido acético (Figura 10) diminuindo significativamente a área de lesão quando comparados os controle água. O grupo sham não apresentou lesão ulcerativa.

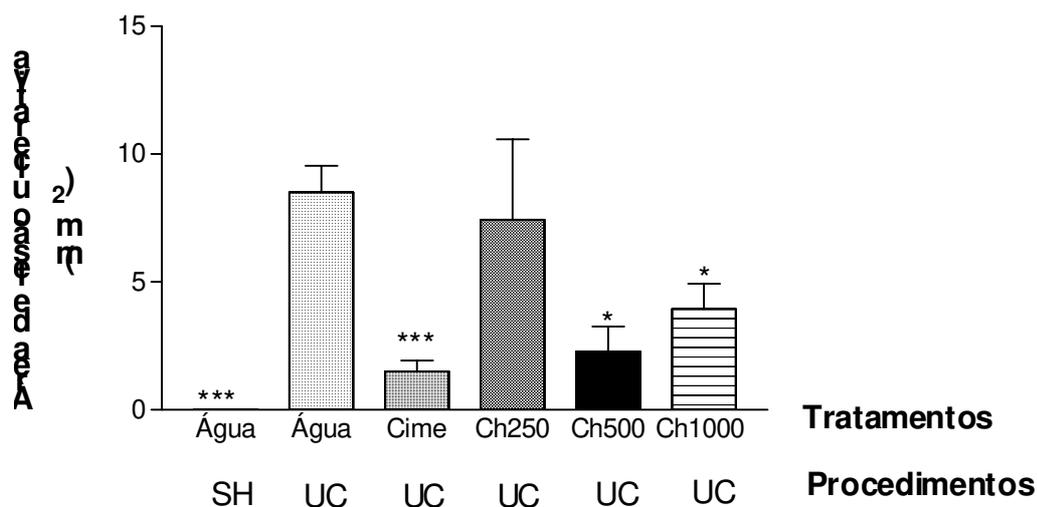


Figura 10: Área de lesão ulcerativa (mm^2) medida em estômagos de animais em que foi induzida úlcera por ácido acético. Os animais foram tratados com água, cimetidina e extrato de *C. vulgaris* nas doses de 250, 500 e 1000 mg/kg (Ch250, Ch500 e Ch1000, respectivamente) durante quinze dias após indução da úlcera. Os resultados estão expressos em média, $N=10$, *** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ em relação ao grupo água, teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

5.2.4.2 Quantificação do Fator de Crescimento Epidermal (EGF)

Conforme demonstrado na figura 11 o anticorpo anti-EGF reconheceu uma banda em 33kDa nos homogenatos do corte da área de lesão, indicando a presença do complexo GST-EGF. Os resultados obtidos demonstraram que não houve diferença significativa na presença de EGF na zona de cicatrização da úlcera, nos diferentes grupos tratados com água (628 unidades arbitárias), cimetidina (692 unidades arbitárias), ECV 1000 mg/kg (612 unidades

arbitrárias) e o grupo SHAM (617 unidades arbitrárias), com epitélio íntegro, tratado com água.



Figura11: Expressão de EGF na área de lesão ulcerativa do estômago, de animais em que foi induzida úlcera por ácido acético, tratados com água (A), cimetidina (C), extrato de *C. vulgaris* (Ch) e sham (SH), utilizando a técnica de imunoblotting.

A fração acetato na dose de 5mg/100g não reduziu as úlceras quando comparado ao grupo Tween. A cimetidina reduziu significativamente as úlceras quando comparada ao Tween. O grupo sham não apresentou lesão ulcerativa (Figura 12).

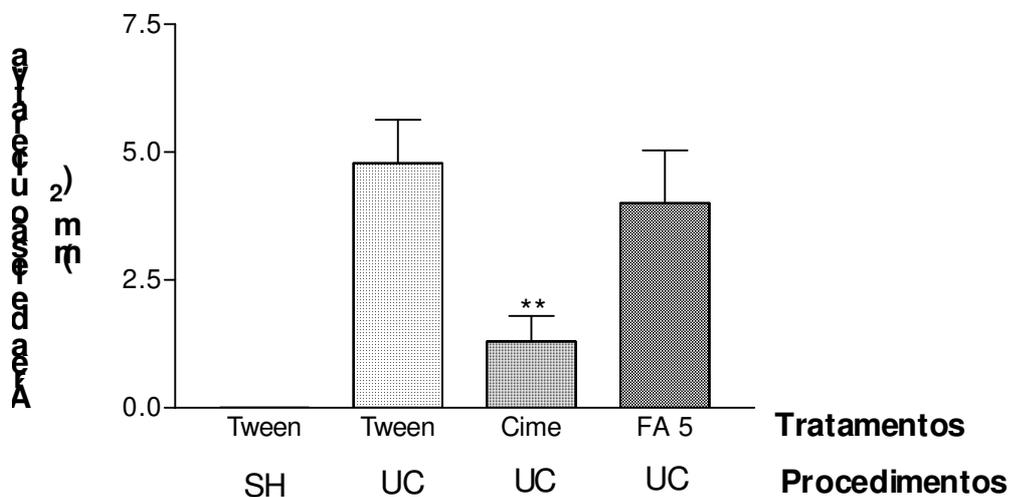


Figura 12: Área de lesão ulcerativa (mm²) medido em estômagos de animais em que foi induzida úlcera por ácido acético. Os animais foram tratados com Tween, cimetidina e fração acetato (FA5) na dose de 5 mg/kg durante quinze dias depois da indução da úlcera. Os resultados estão expressos em média. N=10, ** p < 0,05 em relação ao grupo Tween, teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

5.2.4.3 Toxicidade do extrato aquoso de *C. vulgaris*

Os dados obtidos demonstraram que não houve diferença significativa de ganho de peso (g por 100g de animal) nos ratos que receberam cimetidina e ECV nas doses de 1000 mg/kg quando comparados a seu controle água. O ganho de peso dos ratos que foram tratados com ECV (500 mg/kg) e os que tiveram um implante simulado de úlcera (sham + água) foi significativamente maior quando comparados ao grupo recebendo água. O ganho de peso dos ratos tratados com fração acetato (5mg/100g) foi significativamente menor quando comparado ao grupo sham (Figura 13). Os animais sham tratados com Tween apresentaram ganhos de peso significativamente maiores que seu controle (Figura 14).

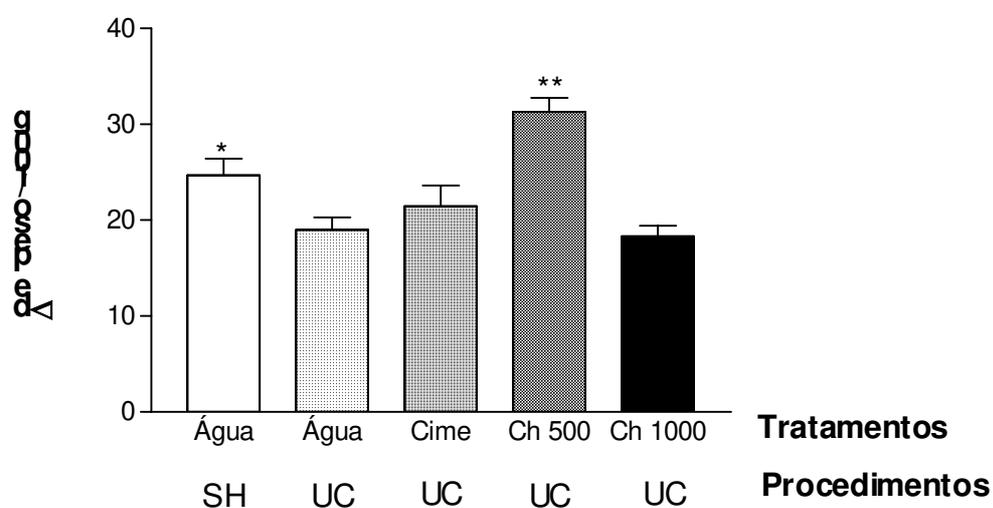


Figura 13: Incremento de peso (Δ de peso por 100g em grama) nos animais que foram tratados com água, cimetidina (Cime) e extrato aquoso de *C. vulgaris* nas doses de 500 e 1000 mg/kg (Ch500 e Ch1000, respectivamente) durante 15 dias após um implante de úlcera por ácido acético. Dados expressos em média \pm SE, N=10 * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparados ao grupo água. Teste ANOVA seguido de Dunnett.

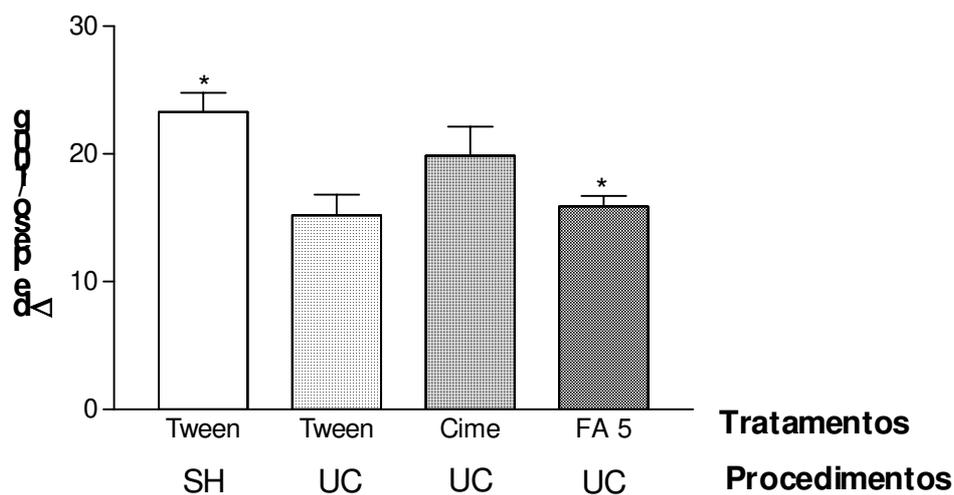


Figura 14: Incremento de peso (Δ de peso por 100g em grama) dos animais que foram tratados com Tween, cimetidina (Cime), Fração Acetato (FA5) de ECV (5mg/100g) durante 15 dias após um implante de úlcera por ácido acético. Dados expressos em média \pm SE, N=10 * $p < 0,05$ quando Sham comparado ao grupo Tween e Sham comparado ao FA5. Teste Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

Um sinal utilizado para medir o potencial tóxico do ECV e da fração acetato sobre os animais foi avaliar a repercussão da administração destes princípios potencialmente ativos, por tempo prolongado (15 dias), sobre o peso dos órgãos vitais como coração, fígado, rins e pulmões. Não foram observadas diferenças significativas do peso destes órgãos nos animais que

receberam o extrato bruto (ECV) ou tratados com a fração acetato, em relação ao grupo controle (Tabela 2 e 3).

Orgãos (g/100g)	Coração	Fígado	Rins	Pulmões
Sham + água	0,3465±0,06	3,0000±0,52	0,8505±0,15	0,5617±0,12
Água	0,3654±0,05	2,7694±0,14	0,7607±0,10	0,5106±0,11
Cimetidina	0,3559±0,05	2,8433±0,81	0,8786±0,07	0,5437±0,08
Ch 500	0,3177±0,02	2,8325±0,2	0,848±0,16	0,6461±0,16
Ch 1000	0,3701±0,05	2,8353±0,18	0,7991±0,06	0,4945±0,04

Tabela 2: Peso dos órgãos (g/100g de peso do animal) dos animais que foram tratados com extrato aquoso de *C. vulgaris* nas doses de 500 e 1000 mg/kg (Ch500 e 1000), cimetidina e água durante 15 dias depois do implante de úlcera por ácido acético. Os dados estão expressos em média ±SE, N=10 Teste de Kruskal-Wallis não mostrou significância.

Orgãos	Coração	Fígado	Rins	Pulmões
Sham + tween	0,3226±0,03	2,8585±0,1	0,8133±0,06	0,4778±0,07
Tween	0,3254±0,02	2,8481±0,17	0,7856±0,05	0,4777±0,03
Cimetidina	0,3235±0,02	3,1178±0,35	0,9190±0,19	0,6090±0,13
FA 5	0,3127±0,01	3,1212±1,0	0,7684±0,1	0,4706±0,02

Tabela 3: Peso dos órgãos (g/100g de peso do animal) dos animais que foram tratados com Fração acetato do extrato aquoso de *C.vulgaris*, cimetidina e Tween durante 15 dias depois do implante de úlcera por ácido acético. Os dados estão expressos em média ±SE, N=10 Teste de Kruskal-Wallis não mostrou significância.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Os dados do presente trabalho demonstram que não houve alteração no suco gástrico dos camundongos tratados com ECV no modelo de ligadura do piloro (Tabela 1).

A administração do extrato vegetal no modelo de ligadura do piloro foi feita via intraduodenal para que, na possibilidade de existir um princípio ativo anti-ulcerogênico, este não entrasse em contato direto com a mucosa e suco gástrico, avaliando assim seu possível efeito sistêmico.

Neste modelo, são avaliadas alterações na liberação de alguns mediadores da secreção gástrica como acetilcolina, gastrina e histamina. A distensão da mucosa causada pela obstrução do piloro aumenta a liberação de acetilcolina pelo vago, que atuará diretamente sobre as células parietais, sobre as ECL ou células G, liberando histamina e gastrina respectivamente, induzindo por sua vez a formação de lesões ulcerativas pelo estímulo da secreção do ácido clorídrico que acumula no lume do estômago (SHAY *et al.*, 1945; LEWIS E HANSON, 1991).

Tanaka *et al.* (1997) estudaram os efeitos do ECV nos fatores agressores da mucosa nos modelos de ligadura de piloro e úlcera induzida por histamina. Estes autores demonstraram que não houve nenhuma alteração de parâmetros bioquímicos como pH, quantidade de H⁺ e volume do suco gástrico nos animais tratados com ECV, quando comparados a seus controles tratados com atropina, que por ser um antagonista da acetilcolina para receptores muscarínicos, inibe a

secreção ácida. Do mesmo modo, ECV não teve efeito antiulcerogênico no modelo de úlcera por injeção de histamina. Adicionalmente, o tratamento com a cimetidina, que aumentou significativamente o pH do suco gástrico, é um potente agente antiulcerogênico por atuar como antagonista de H₂.

Estes resultados e os observados neste estudo sugerem que ECV não tem um princípio ativo que, por via sistêmica, tenham efeito protetor através da inibição da secreção ácida.

Em continuação, observou-se no presente estudo que o ECV, administrado previamente, não teve efeito sobre as úlceras provocadas por administração de piroxicam e que, nas doses de 500 e 1000 mg/kg, foi capaz de reduzir as lesões provocadas pelo etanol infundido por via gástrica uma hora após (Figuras 8 e 9). Neste último modelo não ocorreu proteção quando o etanol foi administrado duas horas após a do ECV (Figura10).

A mucosa gástrica está sujeita a contínuas mudanças em consequência de agressores endógenos e exógenos. Para enfrentar isto, possui mecanismos de defesa que a protegem dos danos teciduais e eventuais ulcerações (WHITTLE, 2003). O piroxicam, assim como a maioria dos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), atuam inibindo a síntese de prostaglandinas, diminuindo assim os mecanismos de citoproteção mediados por essas substâncias (LEWIS E HANSON, 1991; MORIMOTO *et al.*, 1991; EVANS, 1996).

Por outro lado, as mudanças vasculares na mucosa gástrica são as mais pronunciadas alterações induzidas pelo etanol absoluto. A manutenção da

vasculatura e fluxo normal são mecanismos de citoproteção (MASUDA *et al.*, 1999).

Tanaka *et al* (1997) observaram que o tratamento com ECV na dose de 500mg/kg, no modelo de úlcera induzida por estresse, e na dose de 250 mg/kg no de úlcera duodenal induzida por cisteamina, reduziu significativamente o número de lesões ulcerativas no primeiro e de perfurações no último. Além disso, o extrato de *C. vulgaris* nas doses de 500 e 1000 mg/kg reduziu as lesões ulcerativas no mesmo modelo de estresse por imersão e frio.

Essas observações sugerem que a ação antiulcerogênica do ECV, no modelo de estresse realizado por Tanaka *et al* (1997) e no modelo de etanol no nosso estudo, provavelmente ocorreu devido ao aumento de fatores protetores da mucosa. No primeiro caso, provavelmente, relacionados ao sistema imune, uma vez que o ECV é um potente modificador de resposta imune celular e aumenta a produção de IL1, um protetor natural da mucosa contra estímulos ulcerogênicos provocados pela administração de indometacina (TSUJI *et al*, 1992), com participação de macrófagos ou linfócitos T. No segundo caso, é também possível uma alteração vascular causada pela alga, não relacionada a um aumento de prostaglandinas.

Por outro lado, o estudo do esvaziamento gástrico da refeição de ECV, nas doses de 500 e 1000 mg/kg, demonstrou que no momento da injeção do etanol, cerca de 1 hora depois do pré-tratamento com ECV, o estômago ainda pode conter uma quantidade razoável deste extrato, uma condição bem diferente de quando a administração do etanol é feita 2 horas após.

É conhecido que substâncias porosas podem prevenir a formação de úlceras pépticas, por proteção da camada epitelial da mucosa gástrica e que o ECV demonstra ser uma substância muito porosa, quando observada ao microscópio eletrônico (TANAKA *et al*, 1997). Assim, é possível que o efeito protetor sobre úlcera induzida por álcool deva-se à permanência de parte da alga no estômago no momento da administração do agente agressor.

Adicionando-se a esses fatos, a hipermotilidade gástrica é um fator relevante na formação da patologia da úlcera (TAKEUCHI *et al*, 1997). Observou-se nesse trabalho que o ECV não altera a motilidade gástrica quando comparada a seu controle água.

No presente estudo, podemos observar que o ECV (doses de 500 e 1000mg/kg) reduziu significativamente a úlcera induzida por ácido acético e que a fração acetato do extrato não demonstrou ter o mesmo efeito (Figuras 11 e13). Nessa observação, a cimetidina também reduziu significativamente a úlcera induzida por ácido acético, por atuar como antagonista de H₂, diminuindo a secreção de ácido com isso, a quantidade de fatores agressores. É possível que o ECV tenha reduzido a úlcera não por diminuição de fatores agressores e sim por um aumento dos citoprotetores visto que, no modelo de ligadura do piloro não foi demonstrada nenhuma alteração dos parâmetros que indicassem diminuição de secreção do ácido.

É conhecido que, em muitos modelos de úlcera, as erosões são menores e com características histológicas diferentes da úlcera péptica crônica humana em relação a morfolopatologia e características de cura (BRZOZOWSKI, 2003). Um dos

únicos modelos de úlcera gástrica que permite avaliar o processo de cicatrização é este em que a lesão é induzida por ácido acético, introduzido por Takagi et al, 1969.

A cura da úlcera é um processo de reconstrução da arquitetura da mucosa é um processo complexo que envolve a migração e proliferação de células epiteliais e inflamatórias, a síntese e degradação de moléculas da matriz extracelular e componentes de tecido conectivo, além disso a síntese de fatores de crescimento e citocinas que juntos fazem da cicatrização um processo orquestrado. Histologicamente, a cratera da úlcera é composta de duas estruturas principais, a margem, que é a região adjacente à cratera, chamada de zona de cicatrização, e a base da úlcera denominada tecido de granulação, formado basicamente por fibroblastos, macrófagos, células linfóides e células endoteliais (TARNOWSKI *et al*, 1995).

O processo de cura da úlcera péptica é acompanhado do aumento do fluxo sanguíneo gástrico na área da úlcera e pelo aumento significativo da gastrina plasmática e citocinas pró-inflamatórias, como $TNF\alpha$ e $IL-1\beta$ (BRZOZOWSKI, 2001). Com a progressão do processo curativo da úlcera, o fluxo sanguíneo na margem da úlcera e o elevado nível de $TNF\alpha$ e $IL-1\beta$ e gastrina decaem gradualmente (BRZOZOWSKI, 2001). Durante o período inicial de cura da úlcera, ocorre uma supressão notável da acidez gástrica e expressão de grandes fatores como EGF, $TFG\alpha$ e HGF, que controlam a proliferação celular e têm uma atividade anti-secretória (KONTUREK *et al.*, 1992).

Na zona de cicatrização as glândulas gástricas dilatam e as células epiteliais que sublinham essas glândulas expressam o fator de crescimento epidermal (EGF) que é um dos principais fatores mitóticos que influenciam a proliferação das células epiteliais para reconstrução da mucosa e que aceleram a cicatrização de úlceras crônicas duodenais (KONTUREK *et al*, 1988) Vários estudos demonstram que o EGF aumenta a regeneração dos epitélios córneos, deposição de colágeno, inibição da secreção ácida, estímulo da síntese de prostaglandinas, acúmulo de gordura, proliferação das células gastrointestinais, síntese de glicogênio no fígado e regeneração do fígado(MUTSAERS *et al*, 1997, BUCKLEY *et al*, 1985, MATHERS *et al*, 1989, KITAZAWA *et al*, 1990). O EGF possui algumas moléculas homólogas como o TGF- α , que é considerado um EGF fetal (WILCOX E DERYNK, 1988) e encontrado em órgãos em desenvolvimento. Depois do nascimento, sua síntese fica restrita a poucas células, como queratinócitos e macrófagos (COFFREY *et al*, 1987).

No estudo com *immunoblotting* (Figura12) demonstrou-se que não houve diferença significativa na expressão de EGF entre os grupos estudados, indicando que o efeito antiulcerogênico de ECV, nas doses de 500 e 1000mg/kg, no modelo de úlcera crônica não está relacionado ao aumento da expressão desse fator. Desde que não foi possível demonstrar que a ação do ECV, nas doses empregadas, está ligada ao aumento da produção de EGF, o fenômeno da diminuição da úlcera poderia estar relacionado à ação da alga sobre algum outro componente do processo de cura da úlcera, tal como o tecido de granulação.

Alguns estudos demonstraram que a alga *C. vulgaris* é um potente modificador de resposta imune celular, aumentando a hematopoiese principalmente de células progenitoras de macrófagos (DANTAS E QUEIROZ, 1999, JUSTO *et al*, 2001). Os macrófagos são vitais para uma boa cicatrização de lesões e, quando são impedidos, por algum motivo, de se infiltrarem na área lesada, o processo de cura fica seriamente prejudicado. Sintetizam uma série de quimioatraentes e fatores de crescimento, como: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador beta (TGF- β_{1-3}) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), sendo esses fatores mitogênicos e quimiostáticos para células endoteliais que formam os novos vasos sanguíneos. Além disso, produzem várias citocinas que regulam a proliferação celular e estimulam a síntese e deposição de matriz. (MUTSAERS *et al*, 1997).

Há informações na literatura de que o ECV, quando administrado via oral, é capaz de aumentar significativamente a quantidade de citocinas envolvidas com a cicatrização de lesões e a proteção contra infecções oportunistas como IL-1, IL-12, TNF- α , etc. (TANAKA *et al*, 1997, MUTSAERS *et al*, 1997, QUEIROZ, HASEGUAWA, 1997). Por outro lado, IL-1 endógena protege a mucosa contra os estímulos ulcerogênicos causados pela indometacina, por diminuição das prostaglandinas e redução da maturação de linfócitos T periféricos. (TSUJI, 1992)

Sendo assim, é possível que o efeito do ECV, no modelo de úlcera “crônica”, esteja relacionado com a interferência na participação dos macrófagos no processo de cicatrização.

Por outro lado, a fração acetato não teve nenhum efeito na cicatrização da úlcera induzida por ácido acético; no entanto, estudos realizados por Yatsukawa *et al* (1996) demonstraram que esta fração é um potente redutor da inflamação causada por 12-O-tetradecanoilfobol-13-acetato (TPA). Esta fração tem em sua composição esteróides com efeitos antiinflamatórios comparados à quercetina e à hidrocortisona (Yatsukawa *et al*, 1996). Quando isolados, os esteróides presentes nessa fração mostraram um potencial antinflamatório muito maior que a fração acetato. Talvez, em estudos futuros, seja necessária a utilização dos esteróides isolados desta fração para avaliação no processo de cicatrização. Por outro lado, o processo de extração pode ter propiciado a perda dos princípios ativos que dão a característica antiulcerogênica do extrato (ECV).

Outro aspecto a ser considerado na seleção de um extrato vegetal para a cura de patologias é a sua toxicidade. A administração prolongada do ECV e de sua fração acetato no modelo de úlcera “crônica” não apresentou, no presente estudo, déficit no ganho de peso dos ratos (Figura 14 e 15), alterando apenas a evolução do ganho de peso dos animais que receberam a dose de 500 mg/kg e nenhuma alteração no peso dos órgãos vitais quando comparados aos seus respectivos controles positivo (cimetidina) e negativo (água) (Tabela 2 e 3), sugerindo uma toxicidade baixa, ou nenhum efeito tóxico, mesmo com doses altas. Adicionalmente, é conhecido que esta alga é utilizada por grupos populacionais no Oriente, há centenas de anos, sem relato de problemas de saúde relacionado com sua ingestão.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- 1- O EG da refeição de prova feita com *Chlorella* e a refeição água seguem o mesmo padrão;
- 2- O ECV não possui atividade antiulcerôgena nos modelos de ligadura do piloro e piroxicam;
- 3- O ECV possui atividade antiulcerôgena no modelo de úlcera por etanol, nas doses de 500 e 1000mg/kg;
- 4- O ECV possui atividade antiulcerôgena no modelo de úlcera por ácido acético, nas doses de 500 e 1000mg/kg;
- 5- A administração prolongada do ECV no modelo de úlcera por ácido acético não diminuiu o ganho de peso dos animais ou repercussão sobre o peso do coração, fígado, rins e pulmões.

BIBLIOGRAFIA

AZAB, A. N., KAPLANSKI, J. A reduction of tumor necrosis factor- α in paw exudate of lipopolysaccharide treated rats by nimusulide. **Life Sci**, 68: 1667-1675, 2001.

BATISTA, L.M., ALMEIDA, A.B.A., MAGRI, L.P., TOMA, W., CALVO, T.C., VILEGAS, W., SOUZA BRITO, A.R.M. Gastric antiulcer activity of *Syngonanthus arthrotrichus*. **Biol Pharm Bull**. 27: 328-332, 2004.

BELANGERO VM, COLLARES EF. Gastric emptying of liquids in rats with acute renal insufficiency. **Arq Gastroenterol**. 35 (4):278-82, 1998.

BERSTAD, K.; BERSTAD, A. Helicobacter pylori infection in peptic ulcer disease. **Scand J Gastroenterol**, 28:561-567, 1993.

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

BRZOZOWSKI, T., KONTUREK, P.C., KONTUREK, S.J. Classic NSAID and selective cyclooxygenase (COX)-1 and (COX)-2 inhibitors in healing of chronic gastric ulcers. **Microsc Res Tech**. 53: 343-353, 2001.

BRUNTON, L. L., 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, p. 663-691, 1996.

COFFEY, R.J., DERYNK, R., WILCOX, J. N., BRINGMAN, T. S., GOUSTIN, A S., MOSES, H.L. AND PITTEIKOW, M. R. Production and autoinduction of transforming growth factor- α in human keratinocytes. **Nature**, 328, 817-820, 1987.

DANTAS, D C M AND QUEIROZ, M L S. Effects of *Chlorella vulgaris* on bone marrow progenitor cells of mice infect with *Listeria monocytogenes*. **Int J Immunopharmacol**, 21:499-508, 1999.

GAILLARD, Y., PEPIN, G.J. Poisoning by plant material: review of human cases and analytical determination of main toxins by high-performance liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl** 733: 181-229, 1999.

GRACIOSO J. S., VILEGAS W., HIRUMA-LIMA C.A., SOUZA BRITO A. R. 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(4):487-491, 2002.

GUINAL, O., OKTAR, B. K., OZÇINAR, E., SUNGUR, M., ARBAK, S., YEGEN, B. Ç. Estradiol treatment ameliorates acetic acid-induced gastric and colonic injuries in rats. **Inflammation**, 27(6):351-359, 2003.

HAMBURGER, M., HOSTETTMAN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**. 30: 3864-3874, 1991.

HASEGAWA, T, KIMURA, Y, HIROMATSA, K, KOBAYASHI, Y, YAAMADA, A, MAKINO, M, OKUDA, M, SANO, T, NOMOTO, K AND YOSHIKAI, Y. Effect of hot water extract of *Chlorella vulgaris* on the cytokine expression patterns in mice with murine acquired immunodeficiency syndrome after infection with *Listeria monocytogenes*. **Immunopharmacology**, 35:273-282,1997.

HASEGAWA, T, OKUDA, M, NOMOTO, K AND YOSHIKAI, Y. Augmentation of the resistance against *Listeria monocytogenes* by oral administration of hot water extract of *Chlorella vulgaris* in mice Immunopharmacol. **Immunotoxicology**, 16:191-202, 1994.

HASEGAWA, T.; MATSUGUCHI, T.; NODA, K.; TANAKA, K.; KUMAMOTO, S.; SHOYAMA, Y.; YOSHIKAI, Y. Toll-like receptor 2 is at least partly involved in the antitumor activity of glycoprotein from *Chlorella vulgaris*. **Int Immunopharmacol**, 2:579-589, 2002.

HASEGAWA, Y.; KIMURA, Y.; HIROMATSU, K.; KOBAYASHI, N.; YAMADA, A. MAKINO, M.; OKUDA, M.; SANO, T.; NOMOTO, K.; YOSHIKAI, Y. Effect of hot water extract of *Chlorella vulgaris* on cytokine expression patterns in mice with murine acquired immunodeficiency syndrome after infection with *Listeria monocytogenes*. **Immunopharmacology**, 35(3):273-82, 1997.

HAYDEN, L. J.; THOMAS, G.; WEST, G. B. Inhibitors of gastric lesion in the rat. **J. Pharm Pharmac**, 30:244-246, 1978.

HIRSCHOWITZ, B. I.; KEELING, D.; LEWIN, M.; OKABE, S.; PARSONS, M.; SEWING, K.; WALLMARK, B.; SACHS, G. Pharmacological aspects of acid secretion. **Dig Dis Sci**, 40:2-3S-23S, 1995.

IBUSUKI, K AND MINAMISHIMA, Y. Effect of *Chlorella vulgaris* extracts on murine *cytomegalovirus* infections. **Nat Immun Cell Growth Regul**, 9:121-128, 1990.

JUSTO, G. Z.; SILVA, M. R.; QUEIROZ, M. L. S. Effects of the green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the roost hematopoietic system to intraperitoneal ehrlich ascites tumor transplantation in mice. **Immunopharmacol immunotoxicol**, 23(1):119-132, 2001.

KONSTANTOUPOULOU, I. Et al Insecticidal effects of essential oils. A study of the effects of essential oils extracted from eleven greek aromatic plants on *Drosophila auraria*. **Experientia**. 48: 616-620, 1992.

KONTUREK, P. C.; KONTUREK, S. J.; OCHMANSKI, W. Neuroendocrinology of gastric H⁺ and duodenal HCO₃⁻ secretion: the role of brain-gut axis. **Eur J Pharmacol**, 499:15-27, 2004.

KUTCHAI, H. C. Gastrointestinal System. In: **Principles of Physiology**. Ed. By R. M. Berne and M. N. Levy, Mosby-Year Book Inc., St. Louis, USA, pp. 437-498.

LEME-BRASIL, M. R.; COLLARES, E. F., VERÍSSIMO DE MELLO, S. B., GARCIA-LEME, J. Acute inflammatory responses in rats with protein-calorie malnutrition. **Agents Actions**, 10 (5): 445-450, 1980.

LEWIS, D. A.; HANSON, P. J. **Anti-ulcer drugs of plant origin In: Progress in medicinal chemistry**. VI 28. Ed. G. P. Ellis and G. B. West. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 201-231, 1991.

MATSUDA, H., PONGPIRIYADACHA, Y., MORIKAWA, T., KASHIMA, Y., NAKANO, K., YOSHIKAWA, M. Protective effects of polygodial and related compounds on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats: structural requirements and mode of action. **Bioorg Med Chem Lett**, 12: 477-482, 2002.

McCARTHY, D. M. Mechanisms of mucosal injury and healing: the role of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Scand J Gastroenterol**, 208:24-9, 1995.

MILANI, S.; CALABRO, A. Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing. **Microsc Res Tech** , 53:360-371, 2001.

MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; SUKAMOTO, T. 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. **Japan J Pharmacol**, 57:495-505, 1991.

MUTSAERS, S. E., BISHOP, J. E., MCGROUTHER, G., LAURENT, G. J. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. **Int J Biochem Cell Biol**, 29(1): 5-17, 1997.

OATES, P. J.; HAKKINEN, J.P. Studies on the mechanism of Ethanol-Induced gastric damage in rats. **Gastroenterology**, 94:10-21, 1988.

PAWLIK, T.; KONTUREK, P. C.; KONTUREK, J. W.; KONTUREK, S. J.; BRZOZOWSKI, T.; CZESNIKIEWICZ, M.; PLONKA, M.; BIELANSKI, W.; ARENY, H. Impact of *Helicobacter pylori* and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on gastric ulcerogenesis in experimental animals and in humans. **Eur J Pharmacol**, 449:1-15, 2002.

POULSEM, S. S. On the role of epidermal growth factor in the defence of the gastroduodenal mucosa. **Scand J Gastroenterol**, Suppl.128:20-3, 1987.

QUEIROZ, M. L. S.; BIANCOLETTO, C.; VALADARES, M. C.; DANTAS, D. C. M.; SANTOS, L. M. B. Effects of *Chlorella vulgaris* extract on cytokines productions in *Listeria monocytogenes* infected mice. **Immunopharmacol immunotoxicol**, 24:483-496, 2002.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J. E.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A. J. Cytoprotection by prostaglandins in Rats. **Gastroenterology**, 77:433-443, 1979.

SHAY, H.; KOMAROV, S. A.; FELS, S. S.; MERANZE, D.; GRUENSTEIN, M.; SIPLET, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. **Gastroenterology**, 5:43-61, 1945.

SILVA, R. R.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T.J.; LEÃO, M. A. Efeito de flavonóides no metabolismo do ácido araquidônico. **Medicina Ribeirão Preto**, 35:127-133, 2002.

]

SOUZA BRITO, A. R. M.; NUNES, D. S. Ethanopharmacology and sustainable development of new plant-derived drugs. **Ciência e Cultura**, 49(5-6), 402-408, 1997.

SZABO, S.; KUSSTATSCHER, G.; SAKOULAS, G.; SANDOR, Z.; VINCZE, Á.; JADUS, M. Growth factors: new 'endogenous drugs' for ulcer healing. **Scand J Gastroenterol**, 210: 15-8, 1995.

TAKAGI, K.; OKABE, S.; SAZIKI, R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and effects of several drugs on its healing. **Japan J Pharmacol**, 19:418-426, 1969.

TAKEUCHI, K.; KATO, S.; HIRATA, T.; NISHIWAKI, H. Gastric motility and mucosal ulcerogenic responses induced by prokinetic drugs in rats under prostaglandin-deficient conditions. **Dig Dis Sci**. 42(2):251-258, 1997.

TANAKA, K, KOGA ,T, KONISHI, F, NAKAMURA, M, MITISUYAMA, M AND HIMENO, K. Augmentation of host defense by the unicellular green algae, *Chlorella vulgaris*, to *Escherichia coli* infection. **Infect Immun**, 53:267-275, 1986.

TANAKA, K, TOMITA, Y, TSURUTA, M, KONISHI, F, OKUDA, M, HIMENO, K AND NOMOTO, K. Oral administration of *Chlorella vulgaris* augments concomitant antitumor immunity. **Immunopharmacol Immunotoxicol.**, 12:277-279, 1990.

TANAKA, K, YAMADA, A, NODA, K, HASEGAWA, T, OKUDA, M, SHOYAMA, Y AND NOMOTO, K. A novel glycoprotein obtained from *Chlorella vulgaris* strain CK 22 shows antimetastatic immunopotentiality. **Cancer Immunol Immunother**, 45:313-317, 1998.

TANAKA, K., YAMADA, A., NODA, K., SHOYAMA, Y., KUBO, C., NOMOTO, K. Oral administration of a unicellular green algae, *Chlorella vulgaris*, prevents stress induced ulcer. **Planta Med**, 63:465-467, 1997.

TARNAWSKI, A. S.; JONES, M. K.; The role of epidermal growth factor (EGF) and its receptor in mucosal protection, adaptation to injury, and ulcer healing: involvement of EGF-R signal transduction pathways. **J Clin Gastroenterol**, 27(1): S12-S20, 1998.

TARNAWSKI, A.; TANQUE, K.; SANTOS, M. A.; SARFEH, I. J. Cellular and molecular mechanisms of gastric ulcer healing. Is the quality of mucosal scar affected by treatment? **Scand J Gastroenterol**, 30:9-14, 1995.

TSUJI K, UEHARA A, OKUMURA T, TANIGUCHI Y, KITAMORI S, TAKASUGI Y, NAMIKI M. The gastric antisecretory action of lipopolysaccharide is blocked by indomethacin. **Eur J Pharmacol**, 210 (2):213-215, 1992.

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

WALLACE, J. L.; MCKNIGHT, W.; REUTER, B. K.; VERGNOLE, N. NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. **Gastroenterology**, 119:706-714, 2000.

WHITTLE, B.J. Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Fundam Clin Pharmacol** 17 (3): 301-313, 2003.

WOLFE, M. M.; SACHS, G. Acid suppression: optimizing therapy for gastroduodenal ulcer healing, gastroesophageal reflux disease and stress-related erosive syndrome. **Gastroenterology**, 118:s9-s31, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine**. Geneva. 71 p, 2000.

YAO, X.; FORTE, J. G. Cell Biology of acid secretion by the parietal cell. **Annu Ver Physiol** 65:103-131, 2003.

YASUKAWA, K.; AKIHISA, T.; KANNO, H.; KAMINAGA, T.; IZUMIDA, M.; SAKOH, T.; TAMURA, T.; TAKIDO, M. Inhibitory effects of sterols isolated from *Chlorella vulgaris* on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-Induced inflammation and tumor promotion in mouse skin. **Biol Pharm Bull**, 19 (4): 573-576,1996.