



JAIME ANTONIO RODRIGUEZ CARVAJAL

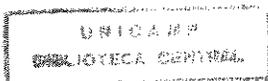
**Desidrocrotonina: Atividade Antiulcerogênica, Toxicidade e Metabolização *in vivo* e *in vitro***

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(s) candidato(s) Jaime Antonio Rodriguez Carvajal e aprovada pela Comissão Julgadora  
05/03/98 *marcela*

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área Bioquímica.

Orientadora  
Profa. Dra. Nora Marcela Haun Quirós

Campinas, 1998



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	77000000
V.	Ex.
TOMADA	60/34.263
PRNO.	395/98
0	<input type="checkbox"/>
0	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	16/06/98
N.º CPD	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

CM-00112646-4

R618d

Rodriguez Carvajal, Jaime Antonio.

Desidrocrotonina : atividade antiulcerogênica, toxicidade e metabolização *in vivo* e *in vitro* / Jaime Antonio Rodriguez Carvajal – Campinas, SP : [s.n.], 1998.

Orientador: Nora Marcela Haun Quiros.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

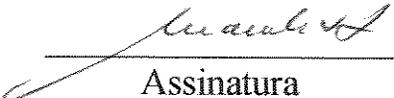
1. Citotoxicidade. 2. Toxicidade. 3. Antiulcerosos.  
4. Celulas – Cultura e meios de cultura. I. Haun Quiros, Nora Marcela. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 05 de Março de 1998

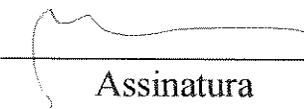
BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

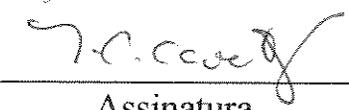
Profa. Dra. Nora Marcela Haun Q.

  
Assinatura

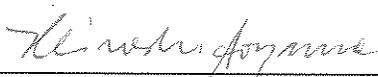
Profa. Dra. Nilce Corrêa M.

  
Assinatura

Profa. Dra. Tereza S. Cavalcanti

  
Assinatura

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

  
Assinatura

Prof. Dr. Nelson Durán C.

  
Assinatura

SUPLENTES:

Profa. Dra. Alba Souza Brito

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profa. Dra. Lucia Pereira da Silva

\_\_\_\_\_  
Assinatura

A minha mulher Ana Luisa

A minhas queridas filhas Carla e Carolina

agradeço e dedico este trabalho

A meus pais

Jaime e Mercedes

## **Agradecimentos**

À Universidad de Talca pela ajuda e apoio constantes.

À CAPES pelo auxílio econômico.

À Profa. Dra. Marcela Haun, pela orientação e amizade permanentes.

À Profa. Dra. Alba Souza Brito, pela atenção e amizade.

Ao Prof. Dr. Nelson Durán, pela ajuda e cordialidade.

Aos colegas do Laboratório de Cultura Celular, pelas ajudas recebidas.

A todos os professores, funcionários e colegas do Departamento de Bioquímica/IB UNICAMP, pela boa acolhida.

A Angelina e Antônio e a Darcy e Isabel, pela lição de vida.

## Resumo

Foi estudada a atividade antiulcerogênica, a toxicidade aguda e subcrônica e a citotoxicidade da *trans*-desidrocrotonina (DHC) um diterpeno isolado da árvore *Croton cajucara* Benth. As propriedades antiulcerogênicas da DHC foram estudadas em quatro modelos de úlcera gástrica induzida em rato. A administração oral de DHC 100 mg/Kg mostrou um significativo efeito antiulcerogênico nos modelos de úlcera induzida por estresse hipotérmico, etanol e ligadura do piloro. Não foram observados efeitos significativos sobre as lesões gástricas induzidas pela indometacina nem modificações em alguns parâmetros gástricos como conteúdo de muco, taxa de secreção gástrica, pH e conteúdo de ácido depois do tratamento com DHC. Os efeitos toxicológicos agudos da DHC foram avaliados em camundongos. Os valores das LD<sub>50</sub> foram 876,0 mg/Kg e 47,2 mg/Kg para as administrações oral e intraperitoneal respectivamente.

No experimento de toxicidade subcrônica ratos machos e fêmeas Wistar foram tratados oralmente durante 35 dias com doses de DHC 25, 50 e 100 mg/Kg. Ao término do tratamento foi observado aumento significativo, do peso dos fígados, dose-dependente nos ratos de ambos os sexos e redução significativa do nível plasmático da fosfatase alcalina e do colesterol além do aumento da enzima gama glutamil transpeptidase na dose alta (100 mg/Kg) em ratos fêmeas. A administração subcrônica de DHC também induziu alterações histopatológicas do fígado notadas como tumefação turva, degeneração microvacuolar e alterações nucleares. Apesar da boa atividade antiulcerogênica observada, nossos resultados sugerem que o uso da DHC por longos períodos pode induzir dano hepático.

Culturas semiconfluêntes de células V79 foram tratadas com DHC com doses de 80 - 400 µM em quadruplicata, durante 24 h. Foram realizados os ensaios de incorporação do vermelho neutro, redução do MTT e conteúdo de DNA. Também foi avaliado o efeito do tempo de exposição à droga e a capacidade de recuperação das células depois do tratamento com DHC. Como esperado para efeitos de citotoxicidade basal, nossos resultados mostraram uma citotoxicidade leve e semelhante para os três

alvos celulares estudados, com valores de  $IC_{50}$  variando entre 230 - 360  $\mu M$ . A citotoxicidade observada foi dependente da dose e do tempo de exposição à droga. Foi observada uma reduzida capacidade de recuperação das células após tratamento com a DHC. Em outro experimento culturas primárias de hepatócitos de ratos machos Wistar adultos foram incubados durante 20 h com meio sem soro, contendo várias diluições de DHC. A citotoxicidade da DHC foi avaliada sobre três alvos celulares independentes: redução do MTT, incorporação do vermelho neutro e conteúdo de DNA. Também foi determinada a capacidade de reduzir MTT de hepatócitos com diferentes idades pós-isolamento (4, 24 e 48 h). Uma toxicidade elevada ( $IC_{50}$  5  $\mu M$ ) foi observada para o teste do MTT. Para a incorporação do vermelho neutro e o conteúdo de DNA a toxicidade da DHC foi menor ( $IC_{50}$  300 - 400  $\mu M$ ) e semelhante à observada nos experimentos com células V79. Estes resultados sugerem um efeito tóxico específico da DHC sobre os hepatócitos. A observação de uma citotoxicidade marcadamente dependente da idade da cultura sugere que a biotransformação hepática da DHC pelo citocromo P-450 pode gerar metabólitos mais tóxicos.

## Abstract

The major diterpene isolated from *Croton cajucara* Benth *trans*-Dehydrocrotonin (DHC), was assayed for antiulcerogenic activity, acute and subchronic toxicity and cytotoxicity. The antiulcerogenic properties of DHC were studied on four induced gastric ulcer models in rat. The oral dose of 100 mg/Kg DHC showed a significant antiulcerogenic effect on hypothermic restraint stress, ethanol and pylorus ligation induced ulcers. No significant changes were found after DHC treatment on indomethacin-induced gastric lesions or on some gastric parameters such as wall mucus, secretion rate, pH and total acid content. Acute toxicological effects of DHC were assessed in mice. The LD<sub>50</sub> values were 876.0 mg/Kg and 47.2 mg/Kg for oral and intraperitoneal administrations, respectively.

In the subchronic toxicity experiment rats were orally treated for 35 days at doses of 25, 50 and 100 mg/Kg. At the end of treatment a significant dose-dependent increase in liver weight was observed in both male and female rats. Whereas in female rats a significant reduction in plasma alkaline phosphatase and cholesterol levels and an increase of gamma glutamyl transpeptidase was found only at high doses (100 mg/Kg). The subchronic administration of DHC also induced histopathological alterations of the liver, noted by turbid tumefaction, microvacuolate degeneration and nuclear alterations. Despite the good anti-ulcerogenic activity observed, our results suggest that the long term use of DHC may induce liver damage.

V79 cells were plated and 48 h after grown period were incubated with DHC at doses of 80 - 400  $\mu$ M in quadruplicate, during 24 h. Assays of neutral red uptake, MTT reduction and DNA content were performed. In another experiments, the effect of drug exposition time and the cell recovery capability after DHC treatment were assayed. As expected for basal cytotoxicity effects our results showed a slight and similar cytotoxicity for the three studied cellular endpoints with an IC<sub>50</sub> ranging between 230 - 360  $\mu$ M. The cytotoxicity had a dose and exposition time dependent effect. A reduced cell recovery capability after drug treatment was found. Hepatocytes from adult male Wistar rats were incubated for 20 h with serum free medium

containing various dilutions of DHC. Three independent endpoints, MTT reduction, neutral red uptake and DNA content were measured for relative toxicity assessment. We also determine the capability of primary cultured rat hepatocytes with 4, 24 and 48 h old to reduce MTT. A very high toxicity ( $IC_{50}$  5  $\mu$ M) was afforded by MTT test, nevertheless for DNA content and neutral red uptake was only slight ( $IC_{50}$  300 - 400  $\mu$ M) and similar that found in V79 cytotoxicity experiments. A marked age culture dependent decrease of DHC cytotoxicity was observed suggesting a P-450 mediated DHC biotransformation leading to more toxic metabolites.

# Índice

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 A SECREÇÃO ÁCIDA GÁSTRICA.....	2
1.2 MECANISMOS DE PROTEÇÃO DA MUCOSA GÁSTRICA.....	6
1.2.1 <i>Muco Gástrico</i> .....	7
1.2.2 <i>Secreção de Bicarbonato Gástrico</i> .....	8
1.2.3 <i>Fluxo Sanguíneo na Mucosa Gástrica</i> .....	10
1.2.4 <i>Proliferação e Reconstrução do Epitélio da Mucosa Gástrica</i> .....	11
1.3 A ETIOLOGIA DA ÚLCERA GÁSTRICA.....	12
1.4 TERAPÊUTICA DA ÚLCERA GÁSTRICA.....	14
1.4.1 <i>Antiácidos</i> .....	14
1.4.2 <i>Antagonistas Muscarínicos</i> .....	14
1.4.3 <i>Antagonistas dos Receptores <math>H_2</math></i> .....	15
1.4.4 <i>Citoprotetores</i> .....	15
1.4.5 <i>Inibidores da <math>H^+ -K^+ -ATPase</math></i> .....	16
1.4.6 <i>Outros Agentes Antiulcerogênicos</i> .....	16
1.5 PLANTAS MEDICINAIS COM AÇÃO ANTIULCEROGÊNICA.....	17
1.6 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA.....	19
1.7 JUSTIFICATIVA PARA AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE ATRAVÉS DE ENSAIOS COM CÉLULAS EM CULTURA.....	21
1.8 MODELOS CELULARES PARA ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE.....	25
1.9 OS TESTES DE CITOTOXICIDADE.....	27
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
2.1 GERAL.....	32
2.2 ESPECÍFICOS.....	32
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
3.1 OBTENÇÃO DA <i>TRANS-DESIDROCROTONINA (DHC)</i> .....	33
3.1.1 <i>Isolamento e Purificação da DHC</i> .....	33
3.1.2 <i>Caracterização Química da DHC</i> .....	34

3.2 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIÚLCEROGÊNICA DA DHC EM MODELOS DE ÚLCERA EXPERIMENTAL .....	35
3.2.1 Úlcera Gástrica Induzida por Indometacina .....	35
3.2.2 Úlcera por Ligadura do Píloro .....	36
3.2.3 Úlcera Induzida por Estresse Hipotérmico.....	37
3.2.4 Úlcera Induzida por Etanol .....	39
3.3 ESTUDOS DA TOXICIDADE DA DHC <i>IN VIVO</i> .....	40
3.3.1 Toxicidade Aguda Intraperitoneal .....	40
3.3.2 Toxicidade Aguda Oral.....	40
3.3.3 Toxicidade Subcrônica Oral .....	41
3.4 ESTUDO DA CITOTOXICIDADE DA DHC .....	44
3.4.1 Cultura de Células V79.....	44
3.4.1.1 Conteúdo de DNA.....	45
3.4.1.2 Incorporação do hidrocloreto de [3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina] (Vermelho Neutro).....	46
3.4.1.3 Redução do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (MTT).....	47
3.4.1.4 Efeito do Tempo de Exposição à DHC sobre a Viabilidade das Células V79 .....	48
3.4.1.5 Recuperação das Células V79 após Tratamento com DHC.....	48
3.4.1.6 Citotoxicidade da Cimetidina.....	49
3.4.2 Cultura Primária de Hepatócitos.....	49
3.4.2.1 Ensaio de Citotoxicidade em Cultura Primária de Hepatócitos .....	51
3.4.2.1.1 Redução do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (MTT).....	52
3.4.2.1.2 Incorporação do hidrocloreto de [3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina] (Vermelho Neutro).....	52
3.4.2.1.3 Conteúdo de DNA.....	53
3.4.2.1.4 Efeito da Idade da Cultura de Hepatócitos sobre a Citotoxicidade da DHC .....	53
3.4.2.1.5 Capacidade de Recuperação dos Hepatócitos após Tratamento com DHC .....	54

3.4.3 <i>Co-Cultura de Hepatócitos e Células V79</i> .....	55
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	56
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA DHC .....	57
4.2 ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA DA DHC .....	58
4.3 TOXICIDADE AGUDA ORAL E INTRAPERITONEAL .....	63
4.4 TOXICIDADE ORAL SUBCRÔNICA (35 DIAS) .....	64
4.5 CITOTOXICIDADE EM CULTURAS DE CÉLULAS V79 .....	85
4.6 CITOTOXICIDADE EM CULTURAS PRIMÁRIAS DE HEPATÓCITOS .....	92
4.7 CITOTOXICIDADE EM CO-CULTURA DE HEPATÓCITOS E CÉLULAS V79 .....	98
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>103</b>
<b>6. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>105</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>106</b>
<b>8. ANEXO Nº 1</b> .....	<b>133</b>
<b>9. PARTICIPAÇÕES CIENTÍFICAS</b> .....	<b>137</b>
9.1 CONGRESSOS.....	137
9.1.1 <i>Congressos Nacionais</i> .....	137
9.1.2 <i>Congressos Internacionais</i> .....	137
9.2 ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	138

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Anatomia do estômago.	2
<b>Figura 2.</b> Mecanismo da inibição da $H^+$ , $K^+$ -ATPase pelo omeprazol.	5
<b>Figura 3.</b> Estrutura química da <i>trans</i> -desidrocrotonina.	18
<b>Figura 4.</b> Etapas na aprovação de um novo medicamento pela FDA nos Estados Unidos	22
<b>Figura 5.</b> Estrutura química do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (MTT)	29
<b>Figura 6.</b> Estrutura química do corante hidrocloreto de [3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina] (Vermelho Neutro).	29
<b>Figura 7 .</b> Efeito antiulcerogênico da DHC sobre as úlceras gástricas induzidas por indometacina, ligadura do piloro, etanol e estresse hipotérmico em rato.	59
<b>Figura 8.</b> Evolução do peso corporal em ratos fêmeas Wistar durante o tratamento oral de 35 dias com DHC.	65
<b>Figura 9.</b> Evolução do peso corporal em ratos machos Wistar durante o tratamento oral de 35 dias com DHC.	65
<b>Figura 10.</b> Evolução do consumo de água em ratos fêmeas Wistar durante o tratamento oral de 35 dias com DHC.	66
<b>Figura 11.</b> Evolução do consumo de água em ratos machos Wistar durante o tratamento oral de 35 dias com DHC.	66
<b>Figura 12.</b> Evolução do consumo de ração em ratos fêmeas Wistar durante o tratamento oral de 35 dias com DHC.	67
<b>Figura 13.</b> Evolução do consumo de ração em ratos machos Wistar durante	

o tratamento oral de 35 dias com DHC.	67
<b>Figura 14.</b> Evolução da eliminação de fezes em ratos fêmeas Wistar durante o tratamento oral de 35 dias com DHC.	68
<b>Figura 15.</b> Evolução da eliminação de fezes em ratos machos Wistar durante o tratamento oral de 35 dias com DHC.	68
<b>Figura 16.</b> Pesos dos órgãos vitais em ratos fêmeas Wistar após tratamento oral de 35 dias com DHC.	70
<b>Figura 17.</b> Pesos dos órgãos vitais em ratos machos Wistar após tratamento oral de 35 dias com DHC.	70
<b>Figura 18.</b> Parâmetros bioquímicos avaliados no soro de ratos fêmeas Wistar após tratamento oral de 35 dias com DHC.	72
<b>Figura 19.</b> Parâmetros bioquímicos avaliados no soro de ratos machos Wistar após tratamento oral de 35 dias com DHC.	72
<b>Figura 20.</b> Atividade da enzima fosfatase alcalina, aspartato amino-transferase, alanina amino-transferase e $\gamma$ -glutamil transpeptidase, no soro de ratos fêmeas Wistar, após tratamento oral de 35 dias com DHC.	73
<b>Figura 21.</b> Atividade da enzima fosfatase alcalina, aspartato amino-transferase, alanina amino-transferase e $\gamma$ -glutamil transferase, no soro de ratos machos Wistar, após tratamento oral de 35 dias com DHC.	74
<b>Figura 22.</b> Concentração de lipídios no soro de ratos fêmeas Wistar após tratamento oral de 35 dias com DHC na dose de 100 mg/Kg.	74
<b>Figura 23.</b> Concentração de lipídios no soro de ratos machos Wistar após tratamento oral de 35 dias com DHC na dose de 100 mg/Kg.	75
<b>Figura 24.</b> Contagem diferencial de glóbulos brancos em ratos fêmeas	

Wistar após tratamento oral de 35 com DHC.	76
<b>Figura 25.</b> Contagem diferencial de glóbulos brancos em ratos machos Wistar após tratamento oral de 35 com DHC.	77
<b>Figura 26.</b> Citotoxicidade do metanol sobre culturas de células V79 após tratamento de 24 horas, avaliada pelo conteúdo de DNA.	85
<b>Figura 27.</b> Viabilidade celular de culturas de células V79 após tratamento de 24 horas com DHC, avaliada pelo conteúdo de DNA, pela incorporação de Vermelho Neutro (VN) e pela redução do MTT.	86
<b>Figura 28.</b> Viabilidade celular de culturas de células V79 após tratamento de 24 horas com cimetidina, avaliada pelo conteúdo de DNA.	90
<b>Figura 29.</b> Efeito do tempo de exposição à DHC sobre culturas de células V79 avaliada pelo conteúdo de DNA.	91
<b>Figura 30.</b> Recuperação de culturas de células V79 após tratamento com DHC durante 24 horas avaliada pelo conteúdo de DNA.	91
<b>Figura 31.</b> Viabilidade celular de culturas primárias de hepatócitos de rato após tratamento de 20 horas com DHC, avaliada pelo conteúdo de DNA e pela incorporação de Vermelho Neutro (VN).	93
<b>Figura 32.</b> Viabilidade celular de culturas primárias de hepatócitos de rato após tratamento de 20 horas com DHC, avaliada pela redução do MTT.	94
<b>Figura 33.</b> Viabilidade celular de culturas primárias de hepatócitos de rato, com diferentes idades de preparação, após tratamento de 20 horas com DHC 8 $\mu$ M, avaliada pela redução do MTT.	96
<b>Figura 34.</b> Capacidade de recuperação de culturas de hepatócitos 24 horas após tratamento de 20 horas com DHC, avaliada pela redução do MTT.	97

<b>Figura 35.</b> Capacidade de recuperação de culturas de hepatócitos 24 horas após tratamento de 20 horas com DHC, avaliada pelo conteúdo de DNA.	98
<b>Figura 36.</b> Viabilidade celular de culturas de células V79 após tratamento de 24 horas com o meio proveniente do tratamento de culturas de hepatócitos que por sua vez foram tratados com DHC durante 20 horas, avaliada pelo conteúdo de DNA, pela incorporação de Vermelho Neutro (VN) e pela redução do MTT.	100
 <b>ANEXO N° 1</b>	
<b>Figura 1a.</b> Estrutura química da <i>trans</i> -desidrocrotonina.	133
<b>Figura 2a.</b> Espectro de ressonância magnética nuclear de prótons da DHC	135
<b>Figura 3a.</b> Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono da DHC	136

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Efeitos da DHC e carbenoxolona no conteúdo gástrico de muco em ratos submetidos a estresse hipotérmico.	61
<b>Tabela 2.</b> Efeitos da DHC e cimetidina na secreção gástrica, volume gástrico, pH e conteúdo ácido total no modelo de úlcera gástrica induzida por ligadura do piloro em ratos.	62
<b>Tabela 3.</b> Peso corporal em ratos Wistar depois de tratamento oral de 35 dias com DHC.	64
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros hematológicos de ratos fêmeas Wistar após tratamento oral de 35 dias com DHC.	76
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros hematológicos de ratos machos Wistar após tratamento oral de 35 dias com DHC.	77
<b>Tabela 6.</b> Características da urina de ratos fêmeas Wistar após tratamento oral de 35 dias com DHC.	78
<b>Tabela 7.</b> Características da urina de ratos machos Wistar após tratamento oral de 35 dias com DHC.	79
<b>Tabela 8.</b> Efeitos histopatológicos nos fígados de ratos Wistar após tratamento oral de 35 dias com DHC.	80
<b>ANEXO N.º 1</b>	
<b>Tabela 1a.</b> Dados Espectroscópicos UV/Vis, IV e ponto de fusão da DHC.	133
<b>Tabela 2a.</b> <sup>1</sup> H RMN e <sup>14</sup> C RMN da DHC após purificação, comparada com os dados de Kubo e colaboradores (1991).	134

## Abreviaturas

<b>AsAT</b>	Aspartato aminotransferase
<b>ALAT</b>	Alanina aminotransferase
<b>ATV</b>	Associação de tripsina e versene
<b>DHC</b>	<i>trans</i> -Desidrocrotonina
<b>DMEM</b>	Meio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
<b>ECVAM</b>	Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos (European Center of the Validation of Alternative Methods)
<b>FDA</b>	Administração de drogas e alimentos (Food and Drug Administration)
<b>FRAME</b>	Fundo para a Substituição de Animais em Experimentos Médicos (Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments)
<b>G-GT</b>	Gama glutamil transpeptidase
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória a 50 % em relação ao controle nos ensaios de citotoxicidade
<b>LD<sub>50</sub></b>	Dose letal para o 50 % dos animais
<b>MEIC</b>	Multicentro de Avaliação de Citotoxicidade <i>In Vitro</i> (Multicentre Evaluation of <i>In Vitro</i> Cytotoxicity)
<b>MTT</b>	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]
<b>NDA</b>	Requerimento para droga nova (New Drug Application)
<b>PBS</b>	Solução salina tamponada com fosfato (Phosphate Buffered Saline)
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>VN</b>	Hidrocloreto de [3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina] (Vermelho Neutro)

## 1. Introdução

No estômago dos animais ocorrem fenômenos de motilidade, secreção e digestão enzimática necessários para a manutenção da funcionalidade do aparelho digestivo. A existência destas capacidades, deve-se a características estruturais e ação coordenada de diversos elementos de regulação intrínseca e extrínseca (Johnson, 1997a; Weisbrodt, 1997).

O estômago pode ser dividido em quatro regiões anátomo-funcionais: cárdia, fundo, corpo e antro que são revestidas por uma mucosa (Figura 1). A mucosa gástrica é constituída principalmente por depressões e glândulas. As depressões encontram-se revestidas pelas células epiteliais superficiais, enquanto que as glândulas são formadas por células mucosas (produtoras de muco), parietais (produtoras de ácido clorídrico e fator intrínseco), principais (produtoras de pepsinogênio) e, apenas na região antropilórica, estão presentes células endócrinas, encarregadas da produção de gastrina. As células parietais e principais encontram-se primariamente no fundo e no corpo gástrico (Forte, 1986).

O chamado “suco gástrico”, é composto de uma mistura das secreções parietais (ácido clorídrico e fator intrínseco) e não parietais (muco, bicarbonato, sódio, potássio e pepsinogênio) (Johnson, 1997b).

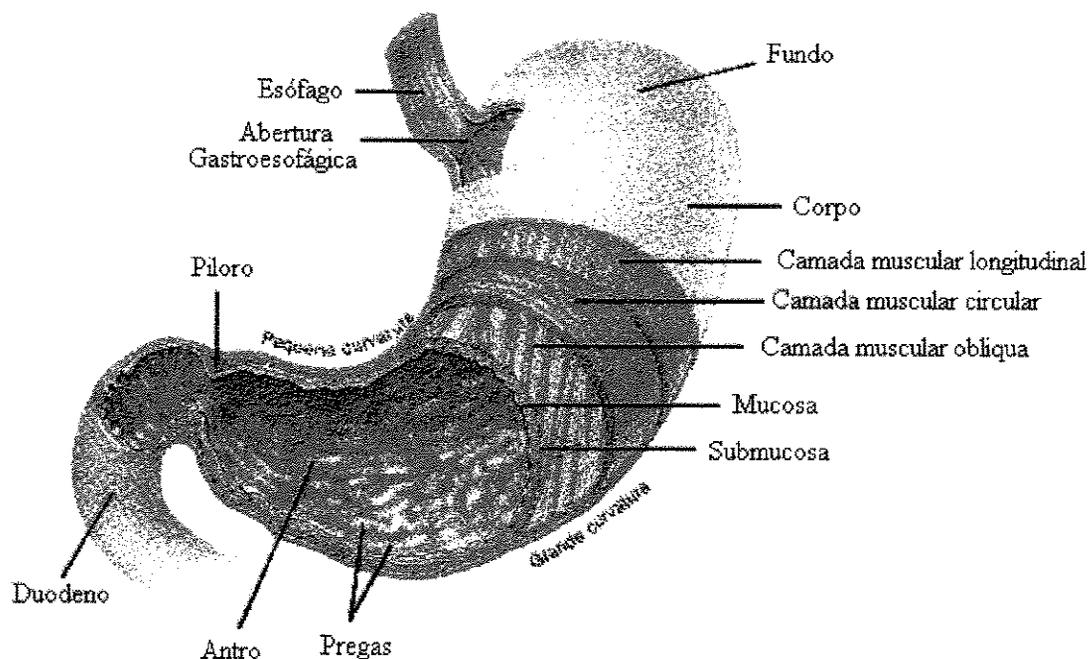


Figura 1. Anatomia do Estômago.

## 1.1 A Secreção Ácida Gástrica

A produção e secreção de ácido no estômago possui grande importância, pois permite a destruição de microrganismos presentes nos alimentos e, ativa a pepsina, enzima encarregada de iniciar a digestão das proteínas.

Os mecanismos que levam à secreção ácida pelas células parietais envolvem o AMPc como mediador intracelular da secreção estimulada pela histamina, enquanto que a elevação da concentração de cálcio citosólico, como consequência da síntese de inositol trifosfato, facilitaria àquela estimulada pela acetilcolina e gastrina. A

etapa final da secreção dos íons  $H^+$ , envolve a participação de uma  $H^+-K^+$ -ATPase (bomba de prótons) localizada na superfície luminal das células parietais (Lind et al., 1983).

Três substâncias químicas endógenas possuem capacidade de estimular a secreção de ácido clorídrico no estômago: acetilcolina, histamina e gastrina.

A acetilcolina é secretada por neurônios eferentes vagais (estimulados pelo olfato, visão, paladar ou mastigação) e neurônios locais da parede gástrica (estimulados por distensão do estômago). A acetilcolina liga-se a receptores muscarínicos  $M_3$ , localizados na membrana das células parietais que estimulam a síntese intracelular de inositol trifosfato o que provoca a elevação do conteúdo citosólico de cálcio e a estimulação da secreção ácida (Sachs et al., 1988; Hersey e Sachs, 1995; Johnson, 1997b).

A histamina está contida em células semelhantes aos mastócitos, existentes na lâmina própria do estômago, em íntimo contato com as células parietais e nas células ECL (enterochromaffin-like cells). Quando liberada, esta substância liga-se a receptores  $H_2$  presentes na superfície das células parietais, ativando o sistema enzimático que leva à formação de AMPc intracelular e a conseqüente estimulação da secreção de ácido clorídrico (Sachs et al., 1988).

A gastrina é um hormônio peptídico, secretado por células endócrinas localizadas na mucosa da região antropilórica do estômago, em resposta à presença de proteínas provenientes dos alimentos no lume gástrico. Além disso, a estimulação

vagal, alcalinização do antro e os íons  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  e  $\text{Al}^{+3}$  são também estímulos para a secreção de gastrina. Este hormônio liga-se a receptores de colecistocinina (CCK-B) presentes na membrana da célula parietal, ativando o sistema enzimático que leva à formação intracelular de inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ), o que promove a elevação do conteúdo de cálcio na célula parietal, estimulando a secreção de ácido clorídrico. (Sachs et al., 1988; Hersey e Sachs, 1995; Dockray et al., 1996; Johnson, 1997b).

Embora as células parietais possuam receptores para acetilcolina e gastrina, o maior efeito estimulatório da secreção ácida induzida por estas substâncias ocorre através da ativação das células ECL. Estas células possuem receptores para acetilcolina e gastrina que quando estimulados provocam a liberação de histamina, que por sua vez irá estimular a secreção de ácido nas células parietais (Hersey e Sachs, 1995; Johnson, 1997b). Isso poderia explicar os efeitos inibitórios dos anti-histamínicos  $\text{H}_2$  sobre a secreção ácida basal ou estimulada pela acetilcolina ou gastrina.

A capacidade de secretar  $\text{H}^+$  da mucosa gástrica, deve-se à presença de uma proteína carregadora chamada  $\text{H}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$  localizada na membrana luminal das células parietais e que promove a troca de  $\text{H}^+$  por  $\text{K}^+$  (Demarest, 1990). Esta proteína é uma enzima que possui um alto grau de homologia de seqüência com as  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^+-\text{ATPases}$ , em comparação a outras ATPases transportadoras de prótons obtidas de mitocôndrias e lisossomas. A  $\text{H}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$  do estômago tem massa molecular de 114 kd e atravessa a membrana em 7 regiões (Rabon e Reuben, 1990). Estudos eletrofisiológicos concluíram que o carregador troca  $\text{H}^+$  por  $\text{K}^+$  com estequiometria

1:1. Outros estudos permitiram inferir que a cada molécula de ATP consumida 2 protons são secretados ao lume gástrico (Rabon e Reuben, 1990).

A  $H^+K^+$ -ATPase gástrica está contida em vesículas membranosas dentro das células parietais. Quando ocorre estimulação da secreção ácida, as vesículas se fundem com a membrana luminal aumentando a capacidade de transporte de íons  $H^+$  (Sachs et al., 1988).

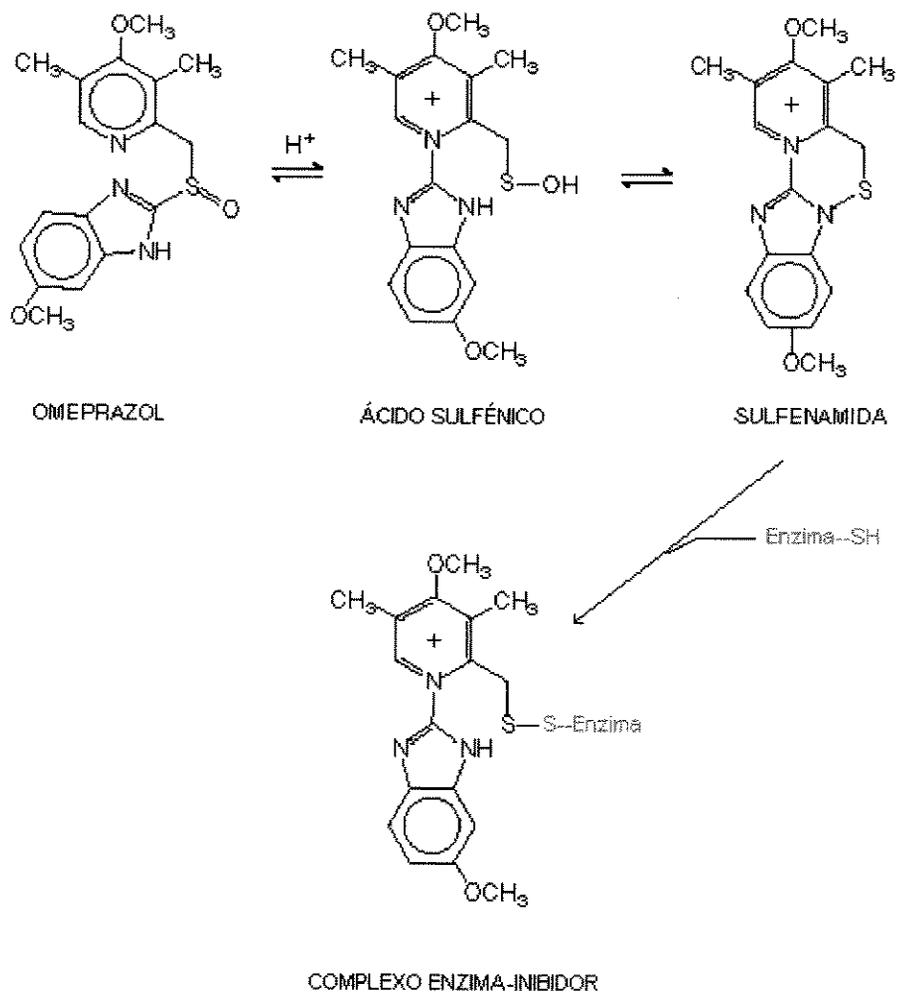


Figura 2 Mecanismo da inibição da  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase pelo omeprazol (Brunton, 1996).

Existem diversos compostos que possuem capacidade de inibir a bomba protônica gástrica. O vanadato inibe a  $H^+K^+$ -ATPase gástrica e em geral todas as ATPases que têm estrutura de fosfoenzima durante a reação de transporte. Os benzimidazóis substituídos representam outro grupo de inibidores da  $H^+K^+$ -ATPase. O omeprazol é o composto da família dos benzimidazóis mais representativo, do ponto de vista da terapêutica. Este composto precisa de um pH ácido para reagir com a  $H^+K^+$ -ATPase, formando pontes dissulfeto o que leva à inativação da bomba (Brunton, 1996) (Figura 2).

As aminas protonáveis constituem outro grupo de inibidores da enzima. Neste grupo, o composto SCH 28080 tem demonstrado possuir capacidade inibitória competitiva na bomba protônica gástrica (Rabon e Reuben, 1990).

## 1.2 Mecanismos de Proteção da Mucosa Gástrica

A mucosa do estômago encontra-se permanentemente exposta à ação do ácido clorídrico e pepsina, sem chegar a ser danificada. Parece evidente, que a mucosa gástrica tem que possuir mecanismos fisiológicos eficientes, que permitam a defesa contra estes agressores endógenos. A capacidade auto-protetora da mucosa do estômago, resulta da combinação de fatores pré-epiteliais (fluxo sangüíneo, secreção de muco e bicarbonato) com fatores epiteliais (rápida regeneração e reparo do epitélio mucoso) (Lewis e Hanson, 1991).

Nos últimos anos o estudo dos fatores envolvidos na proteção da mucosa gástrica tem sido estimulado devido a sua relação com a etiologia da úlcera

gástrica, uma das doenças mais comuns dos países desenvolvidos. No início do presente século já tinha sido reconhecida a importância da secreção ácida gástrica no aparecimento de ulcerações no estômago. Com o decorrer do tempo, novas pesquisas deixam claramente estabelecido que, além da secreção ácida, existem outros elementos que poderiam provocar o aparecimento da úlcera gástrica.

### 1.2.1 Muco Gástrico

O muco gástrico encontra-se distribuído em 3 setores: a) no muco pré-secretado, localizado dentro de vesículas intracelulares das células epiteliais, b) na camada contínua de gel mucoso aderido firmemente à superfície epitelial e c) no muco luminal móbil, altamente solúvel, misturado com o conteúdo luminal.

A camada de gel aderida à mucosa, constitui uma barreira física que mantém separada a superfície apical das células dos componentes do suco gástrico, dissolvidos no lume do estômago. A espessura da camada do gel mucoso aderida à mucosa gástrica foi estimada em valores médios de 180  $\mu\text{m}$  no homem, 70 - 80  $\mu\text{m}$  em ratos e 90  $\mu\text{m}$  em cobaias. O gel mucoso está formado, principalmente, por glicoproteínas do tipo mucina (50 mg/mL) e outras proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, a maioria provenientes da descamação de células epiteliais desprendidas e de bactérias. Estes componentes proporcionam ao muco a viscosidade e capacidade de formar e manter estrutura de gel (Bell et al. 1985).

As mucinas gastrointestinais são glicoproteínas de alta massa molecular ( $\sim 10 \times 10^6$  Da), que possuem um conteúdo de carboidratos superior a 80 %. Estas

proteínas apresentam carga elétrica negativa, devido à presença de ácido siálico e sulfato nas cadeias de açúcar. A unidade estrutural das mucinas está composta de um corpo central protéico com regiões glicosiladas e não glicosiladas. As regiões glicosiladas são resistentes a enzimas proteolíticas, enquanto que as regiões não glicosiladas formam pontes dissulfeto com outras moléculas de mucina, originando grandes agregados poliméricos com capacidade formadora de gel. É baixa a velocidade de degradação do gel mucoso gastroduodenal por agentes endógenos, como a pepsina, devido a uma penetração lenta no gel do agente mucolítico (Allen et al., 1993).

### **1.2.2 Secreção de Bicarbonato Gástrico**

A mucosa gástrica em todas as espécies estudadas possui a capacidade de secretar bicarbonato em um processo dependente do metabolismo energético. Assim, a secreção de bicarbonato é estimulada por fatores fisiológicos como a presença de ácido ou alimento no lume gástrico, enquanto que é inibida por ativação simpática no estresse.

A acidificação do lume gástrico é um poderoso estímulo para a secreção de bicarbonato. Esta estimulação de secreção deve-se à produção local de prostaglandinas, principalmente  $PGE_2$ , pela mucosa do estômago. A estimulação da secreção gástrica alcalina pode ser suprimida, no homem, por vagotomia proximal seletiva ou administração de antagonistas muscarínicos, como brometo de benzilônio e atropina. A resposta aos antagonistas muscarínicos não muda na presença da indometacina um inibidor da síntese de prostaglandinas, o que permite supor que a

ação colinérgica estimulante da secreção de bicarbonato gástrico seja independente das prostaglandinas (Aly et al., 1985).

Foi também observado que antagonistas adrenérgicos seletivos  $\alpha_2$ , como a clonidina, inibem a secreção basal de bicarbonato no estômago de ratos e gatos, enquanto drogas seletivas  $\beta$ -adrenérgicas não mudam essa secreção. Todas as observações feitas no estudo da regulação nervosa da secreção de bicarbonato, permitem supor que o sistema simpático inibe a secreção basal por ativação de receptores  $\alpha_2$ , enquanto a ativação parassimpática, por via vagal, estimula a secreção alcalina no estômago (Allen et al., 1993).

Diversas drogas e hormônios possuem a capacidade de modular a velocidade da secreção de bicarbonato no estômago. As principais substâncias estimulantes da secreção são: prostaglandinas E, agonistas muscarínicos, polipeptídeo pancreático, compostos que contêm alumínio na estrutura e íons alumínio administrados diretamente no lume gástrico (Crampton et al., 1988; Shorrock et al., 1990). Por outro lado, os principais inibidores da secreção gástrica de bicarbonato são: antagonistas muscarínicos, agonistas  $\alpha_2$  adrenérgicos, inibidores da ciclo oxigenase e acetazolamida (Allen et al., 1993).

A secreção de bicarbonato no estômago alcaliniza o gel mucoso constituindo a primeira linha de defesa contra a ação do ácido clorídrico luminal. A secreção de bicarbonato neutraliza a acidez do conteúdo gástrico dentro da matriz do gel mucoso aderido às células epiteliais, estabelecendo-se um gradiente de pH desde um valor ácido no lume ( $\leq$  pH 2), até um valor próximo à neutralidade na interface

muco-epitelial. A existência destes gradientes de pH têm sido demonstrada tanto *in vitro* quanto *in vivo*, na mucosa gástrica de diversas espécies como coelhos, anfíbios, ratos, cães e homem (Allen et al., 1993). Quando a mucosa sofre qualquer dano, o fluido intersticial, incluindo o bicarbonato, difunde-se através da mucosa alcalinizando a fibrina, o que estimula os processos de reparo celular (Allen et al., 1993).

### 1.2.3 Fluxo Sanguíneo na Mucosa Gástrica

Quando a mucosa gástrica é exposta a uma acidez elevada, pode-se observar um aumento do fluxo sanguíneo na mucosa sem variação do pH no tecido intramucosal. Tem sido proposto que esta resposta vasodilatadora é mediada por nervos sensitivos intramucosais. Sob condições de isquemia, pequenas sobrecargas ácidas podem induzir o aparecimento de úlceras gástricas. A isquemia da mucosa gástrica contribui para a ulceração gástrica produzida por diversas formas de estresse: rotacional, de retenção, queimadura, choque séptico e imersão na água. Além disso, a isquemia seguida de reperfusão promove o aparecimento de radicais livres que induzem a formação de lesões ulcerosas mesmo na ausência do ácido clorídrico no lume gástrico (Allen et al., 1993).

Muitas vezes o aparecimento da úlcera na mucosa gástrica não é devida a alterações na secreção de ácido ou de pepsina, mas sim pela incapacidade da mucosa dispor da sobrecarga intramucosal de  $H^+$ . O fluxo sanguíneo protege a mucosa retirando os  $H^+$  intramucosais e, provavelmente, aumentando a oferta de bicarbonato (Lewis e Hanson, 1991; Johnson, 1997b). A quantidade de oxigênio e nutrientes metabólicos são também de grande importância para a prevenção da úlcera (Hersey e

Sachs, 1995), como também o são as prostaglandinas que agem como citoprotetores por aumento do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica em repouso e sob diversas condições ulcerogênicas (Lewis e Hanson, 1991).

#### **1.2.4 Proliferação e Reconstrução do Epitélio da Mucosa Gástrica**

A proliferação e a reconstrução são os dois processos encarregados de manter a barreira celular epitelial no estômago (Lewis e Hanson, 1991). A proliferação celular da mucosa gástrica ocorre na região do istmo das glândulas do estômago. A maioria das células novas migram até a superfície da mucosa, enquanto que as restantes penetram nas glândulas para substituição das células parietais e principais. Devido a este fato, a reepitelização superficial da mucosa gástrica é rápida, enquanto que a reepitelização glandular pode levar meses. A vida média dessas células epiteliais superficiais é de 1 - 2 dias (Allen et al., 1993).

O fator mais importante que estimula a proliferação celular na mucosa gástrica é o peptídeo EGF conhecido como fator de crescimento epidérmico (Epidermal Growth Factor). O EGF é secretado pelas glândulas salivares e de Brunner no interior do lume digestivo. Este peptídeo possui uma poderosa atividade mitogênica que atua não apenas nas células epiteliais gástricas mas numa ampla variedade de outras células. Além da mitogênese, o EGF ajuda no reparo da mucosa produzindo uma rápida inibição da secreção ácida o que irá reduzir a extensão do dano (Allen et al., 1993).

O processo de reconstrução depende da migração das células pela lâmina basal do epitélio permitindo uma rápida restauração do epitélio (minutos ou horas), após um trauma leve, por exemplo, durante a digestão (Lacy, 1987).

### 1.3 A Etiologia da Úlcera Gástrica

As úlceras gástricas e duodenais são doenças crônicas que afetam de 8 a 10 % da população dos países industrializados (Pezard, 1995), e são definidas como defeitos da mucosa gastrointestinal que penetram na muscular da mucosa (Richardson, 1993).

Originalmente acreditava-se que todas as úlceras do trato gastrointestinal alto eram causadas pela ação agressiva do ácido clorídrico e da pepsina sobre a mucosa. Assim, tornaram-se conhecidas como “úlceras pépticas”. Embora a maioria dos pacientes com úlceras benignas secretem ácido e pepsina, estas não são as únicas causas das úlceras. As úlceras provavelmente resultam de vários diferentes mecanismos (Richardson, 1993). Atualmente sabe-se que a úlcera péptica gástrica ocorre como conseqüência do desequilíbrio entre os fatores agressivos da mucosa do estômago (ácido clorídrico, pepsina, infecção por *Helicobacter pylori*) e os fatores de defesa da mucosa (secreção de muco, bicarbonato e prostaglandinas) (Brunton, 1996; Johnson, 1997).

As úlceras pépticas geralmente ocorrem no estômago, no piloro ou no bulbo duodenal, mas também podem desenvolver-se no esôfago e no duodeno pós-bulbar (Richardson, 1993). As úlceras de tipo I ocorrem principalmente no estômago e

não se encontram associadas com hipersecreção de ácido clorídrico, sugerindo o envolvimento de alterações dos fatores de defesa da mucosa. As úlceras de tipo II ocorrem no antro distal (região pré-pilórica) e no duodeno, e estão associadas com hipersecreção de ácido clorídrico e alteração do mecanismo que inibe a secreção de gastrina quando o conteúdo gástrico é acidificado (Brunton, 1996).

De acordo com Richardson (1993) os fatores que podem induzir ou facilitar o aparecimento da úlcera péptica são: 1) Predisposição genética, 2) Anormalidades na secreção de ácido e pepsina, 3) Refluxo de bile e suco pancreático, 4) Anormalidades da defesa da mucosa, 5) Estresse emocional, 6) Retardo do esvaziamento gástrico e 7) Fatores exógenos como: tabagismo, uso de antiinflamatórios não-esteroidais e terapia adrenocorticosteróide, presença de agentes infecciosos (citomegalovirus, *Candida albicans* e *Helicobacter pylori*) e uso de bebidas contendo álcool ou cafeína.

A bactéria *Helicobacter pylori*, um bacilo gram negativo que possui a capacidade de colonizar o muco produzido pela mucosa gástrica, tem recebido atenção especial como um contribuinte putativo para o aparecimento de úlcera péptica, linfoma gástrico e adenocarcinoma (Blaser e Parsonnet 1994, NIH, 1994; Pezard, 1995).

Foi observado que 70 a 90 % dos pacientes com úlcera gástrica ou duodenal se encontram infestados pela *H. pylori* e que o tratamento combinado utilizando antibióticos (amoxicilina e claritromicina) e um antissecretor (omeprazol) produz a erradicação do microorganismo em 90 % dos casos (NIH, 1994; Pezard, 1995; Brunton, 1996). Contudo, a infecção com *H. pylori* é comum entre pessoas

sadias o que leva a pensar que a bactéria sozinha não é suficiente para induzir o aparecimento das úlceras (Pezard, 1995; Brunton, 1996).

## **1.4 Terapêutica da Úlcera Gástrica**

O tratamento farmacológico da úlcera gástrica, está baseado no uso de substâncias que inibem a secreção ácida no estômago ou que promovam o estímulo dos mecanismos protetores da mucosa gástrica, como por exemplo, o aumento do fluxo sanguíneo e a secreção de muco e bicarbonato.

### **1.4.1 Antiácidos**

Estas substâncias são compostos básicos que neutralizam o ácido clorídrico no lume gástrico. Entre os antiácidos utilizados dispomos dos ânions básicos (carbonato, bicarbonato, citrato, fosfato e trisilicato), além dos hidróxidos de cátions metálicos (alumínio e magnésio). Já foi demonstrado que o alumínio pode estimular a secreção de muco, reforçando a barreira mucosa (Caspary, 1982).

### **1.4.2 Antagonistas Muscarínicos**

Além dos efeitos sobre a secreção da gastrina, a estimulação vagal produz aumento da secreção de histamina e ácido clorídrico, efeitos que podem ser bloqueados por antagonistas nicotínicos ou muscarínicos  $M_1$ , como a pirenzepina (Brunton, 1996). Os antagonistas colinérgicos muscarínicos podem reduzir em 40 a

50 % a secreção basal de ácido gástrico, enquanto que a secreção estimulada é inibida em menor grau (Allen et al., 1993).

### 1.4.3 Antagonistas dos Receptores H<sub>2</sub>

A ativação dos receptores H<sub>2</sub>, nas células parietais do estômago, provoca um estímulo da secreção ácida. Embora existam mastócitos na mucosa gástrica, a histamina parece provir de células endócrinas ou parácrinas presentes nas glândulas oxínticas. Estas células tanto possuem receptores colinérgicos muscarínicos para a gastrina como também secretam histamina em resposta à ativação desses receptores (Wolfe e Soll, 1988). Os antagonistas H<sub>2</sub> inibem a secreção ácida induzida pela histamina e outros agonistas H<sub>2</sub>, assim como, pela gastrina e em menor grau pelos agonistas muscarínicos. As principais drogas deste grupo de compostos são a cimetidina e a ranitidina (Brunton, 1996).

### 1.4.4 Citoprotetores

A secreção de muco e bicarbonato estimulada pela secreção de ácido é uma conhecida resposta citoprotetora. As prostaglandinas E<sub>2</sub> e I<sub>2</sub>, sintetizadas pela mucosa gástrica apresentam propriedades citoprotetoras. Como foi demonstrado que as prostaglandinas protegem a mucosa gástrica em animais contra vários agentes ulcerogênicos e, considerando que sua vida média é extremamente curta, foram desenvolvidos alguns análogos estruturais das prostaglandinas. O misoprostol é a principal droga deste grupo (Brunton, 1996).

#### 1.4.5 Inibidores da H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase

O composto mais conhecido deste grupo, o omeprazol, que é um derivado benzimidazólico. Este composto contém um grupo sulfinil, o qual, após protonação ácida origina um ácido sulfênico e uma sulfenamida, que por sua vez, reagem com os grupos sulfidríla da H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase através da formação de pontes dissulfeto, inativando-a (Sachs et al., 1988; Brunton, 1996). O omeprazol produz inibição da secreção ácida, que persiste ainda após o desaparecimento da droga no plasma. Seu uso prolongado conduz a um aumento da secreção de gastrina e hiperplasia das células mucosais oxínticas (Brunton, 1996).

#### 1.4.6 Outros Agentes Antiulcerogênicos

a) Compostos derivados do bismuto: estes compostos são colóides utilizados na terapia dos distúrbios gastrointestinais, que provocam a retirada da *Helicobacter pylori* do epitélio gástrico (bactéria envolvida na etiologia de algumas formas de úlcera gástrica) e sua posterior lise (Elder, 1986).

b) Carbenoxolona: é um extrato da *Glycyrrhiza glabra* ou alcaçuz, cujo efeito antiulcerogênico é mediado por vários processos enzimáticos: inibição das enzimas que inativam as prostaglandinas, supressão da ativação de pepsinogênio e estimulação da secreção de glicoproteínas na mucosa gástrica (Lewis e Hanson, 1991).

c) Sucralfato: é um sal de alumínio de um dissacarídeo sulfatado (octasulfato de sacarose), que possui efeito curativo nas lesões ulcerosas da mucosa

gástrica. O mecanismo da ação antiulcerogênica do sulcrafato é desconhecido e poderia envolver a formação de uma barreira mecânica sobre a lesão ulcerosa e a estimulação local da síntese de prostaglandinas (Romano et al., 1990; Brunton, 1996).

## 1.5 Plantas Medicinais com Ação Antiulcerogênica

Nos últimos anos muitas substâncias puras ou extratos fracionados de origem vegetal, têm sido citados como fontes de atividade antiulcerogênica (Lewis e Hanson, 1991).

Os compostos obtidos de plantas que possuem atividade antiulcerogênica apresentam os mais variados tipos de estruturas químicas e tem sido propostos para eles diferentes mecanismos de ação. Entre os principais grupos destes compostos se encontram os triterpenos, terpenos, flavonóides, alcalóides e glicosídeos (Lewis e Hanson, 1991).

Em geral, os compostos antiulcerogênicos obtidos de material vegetal exercem seu efeito estimulando os fatores de proteção da mucosa do estômago, como por exemplo, aumentando o conteúdo de prostaglandinas ou estimulando a secreção de muco (Rafatullah et al., 1990; Lewis e Hanson, 1991; Souza-Formigoni et al., 1991; Kiyohara et al., 1994; Takase et al., 1994; Rafatullah et al., 1994).

A espécie *Croton cajucara* Benth da família Euphorbiaceae, fonte do produto deste estudo, conhecida popularmente sob o nome de “sacaca”, é um arbusto de até 6 metros de altura e somente é encontrada em Belém do Pará, na região norte

do Brasil. Nessa região, as folhas e as cascas são utilizadas na forma de chá para tratar problemas hepáticos e intestinais e também como hipoglicemiante (Araújo et al., 1971; Simões et al., 1979; Itokawa et al., 1989; Kubo et al., 1991).

Os relatos da literatura para o gênero *Croton* mostram que as diterpenolactonas obtidas da espécie *C. sublyratus* apresentam atividade antiúlcera gástrica (Kitazawa et al., 1979) e que os compostos presentes na *C. cajucara* possuem semelhança estrutural. Diferentes diterpenolactonas foram isoladas da espécie *Croton cajucara* Benth (Simões et al., 1979; Itokawa et al., 1989; Itokawa et al., 1990; Kubo et al., 1991; Ichihara et al., 1992) e o composto presente em maior quantidade corresponde à *trans*-desidrocrotonina (Spiro [furan-3(2H), 1'(7'H)-naftaleno]-2,7'-diona, 5-(3-furanil)-2', 3', 4, 4', 4'a, 5, 8',8'a-octaidro-2', 5'-dimetil-[1'α(R\*), 2'α, 4'αα, 8'αβ]) (Figura 3 ).

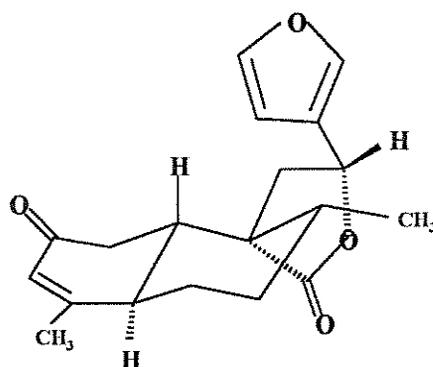


Figura 3. Estrutura química da *trans*-desidrocrotonina (Kubo et al., 1991).

Não há relatos sobre estudos posteriores com os produtos isolados por Kitazawa et al., (1979), provavelmente devido ao pequeno rendimento (1,5 - 4,5 g/85

Kg de material vegetal seco). No entanto, para a *Croton cajucara* o rendimento da *trans*-desidrocrotonina é de 8,2 g/Kg de cascas secas do caule (Kubo et al., 1991).

Algumas atividades biológicas da *trans*-desidrocrotonina foram estudadas. O composto possui atividade inibitória no crescimento de insetos (Kubo et al., 1991) e também como anti-inflamatório e anti-nociceptivo (Carvalho et al., 1996).

## **1.6 Modelos Experimentais para o Estudo da Atividade Antiulcerogênica**

Diversos modelos experimentais foram desenvolvidos visando estudar o possível efeito antiulcerogênico, curativo e preventivo, de extratos de plantas e compostos puros com suposta atividade farmacológica. Inicialmente estes modelos foram baseados na indução de úlcera gástrica utilizando diferentes procedimentos em animais como roedores e cães (Evans, 1996).

Os modelos disponíveis de indução experimental de úlcera gástrica em animais são múltiplos, podem ser conduzidos de diferentes modos e utilizam diversos agentes indutores (Lewis e Hanson, 1991).

Segundo Shay e colaboradores (1945), há três diferentes tipos de lesões gástricas induzidas pelos modelos experimentais. O primeiro tipo se caracteriza por ser inicialmente proliferativo e secundariamente ulcerativo, sendo encontrado principalmente no fundo gástrico. Um segundo tipo de lesão, somente ulcerativa, é observado exclusivamente na porção glandular do estômago, predominantemente no

corpo. O terceiro tipo de lesão desenvolve-se habitualmente no fundo e menos freqüentemente no antro, correspondendo ao tipo de lesão produzida pela ligadura do piloro. Este último modelo experimental de úlcera foi desenvolvido no laboratório do Shay e colaboradores (1945).

Quase todos os modelos experimentais de úlcera para testar novas drogas, utilizam a abordagem de determinação da eficiência na prevenção do aparecimento das lesões gástricas. No entanto, Takagi e Okabe (1968) reportaram um modelo de úlcera induzida por estresse onde a administração das substâncias com possível atividade antiulcerativa se faz após a indução das lesões, podendo avaliar assim as propriedades curativas e não as preventivas das substâncias. O modelo de úlcera induzida por ácido acético (Takagi et al., 1969) também segue este protocolo.

Nos últimos anos, devido a razões de ordem econômica (a manutenção de grande número de animais em biotérios com padrões internacionais é cara), ética (as pressões de grupos sociais protetores de animais) e científica (a possibilidade de minimizar efeitos interferentes), tem sido desenvolvidas metodologias *in vitro*. Elas se apoiam em culturas de células animais com o intuito de avaliar efeitos antiulcerogênicos de compostos ou extratos assim como estudar seus mecanismos de ação (Terano et al., 1982; Romano et al., 1990; Kinoshita et al., 1995; Murai, et al., 1996; Glavin et al., 1996).

## **1.7 Justificativa para Avaliação de Toxicidade através de Ensaios com Células em Cultura**

A avaliação da atividade biológica de compostos obtidos de plantas medicinais deve incluir, além dos testes farmacológicos, um completo estudo da toxicologia dos compostos. Isto permitirá ou não, sua utilização sem risco para a população. A pesquisa de novos compostos químicos com atividade farmacológica é de grande relevância tanto do ponto de vista científico quanto econômico, devido à obtenção de patentes e a conseqüente fonte de recursos financeiros para quem as possui.

Obter a autorização para comercializar uma nova droga é um processo longo, trabalhoso e dispendioso que pode demorar 5 - 12 anos e ter um custo estimado de 10 - 230 milhões de dólares (Mackler et al., 1996). O FDA (Food and Drug Administration) é o organismo responsável pelo controle do comércio de drogas, aparelhos médicos, cosméticos e aditivos de alimentos no mercado dos Estados Unidos de América (Klaassen, 1996).

Segundo determinações do FDA, todo composto da área biofarmacêutica deve passar por várias etapas de estudo antes de ser autorizada sua comercialização (Figura. 4).

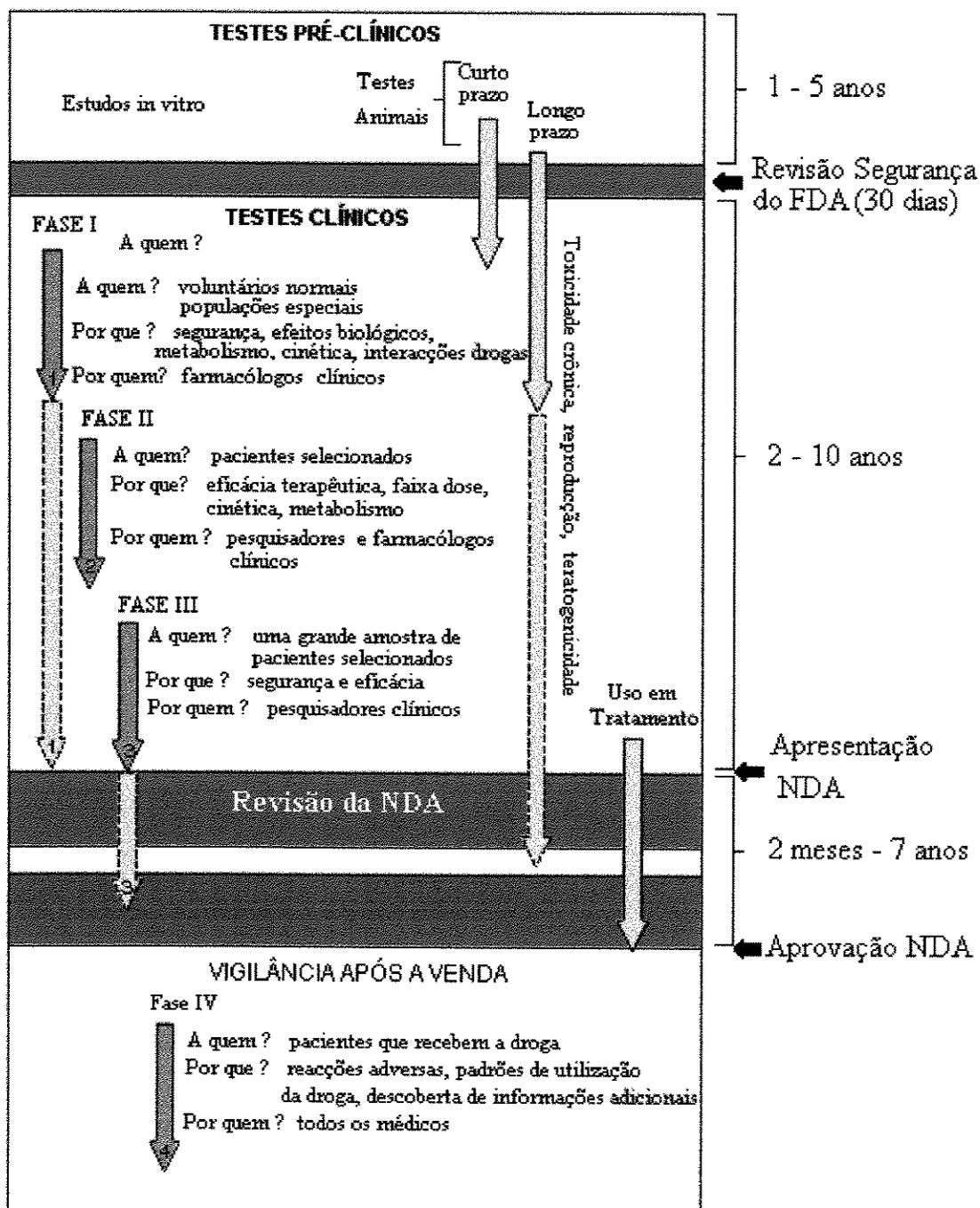


Figura 4. Etapas na aprovação de um novo medicamento pelo FDA nos Estados Unidos (Nies e Spielberg, 1996).

A primeira destas etapas é a fase pré-clínica, que compreende a pesquisa básica da substância e estudos de curto prazo com animais. O intuito é estabelecer condições que garantam segurança para seu uso, além de demonstrar seu efeito farmacológico potencial no tratamento de alguma doença. Nesta fase são realizados estudos de caracterização química do composto, otimização de sua produção, atividades farmacológicas, metabolização, cinética, toxicologia e segurança, o que irá ou não permitir o passo para a etapa seguinte sem riscos para os voluntários. Esta fase pré-clínica pode durar até cinco anos e demanda a utilização de um grande número de animais experimentais (Garthoff, 1995). Se aprovada esta etapa, o composto passará à fase clínica que inclui estudos de longo prazo com animais, produção piloto do composto e as fases I, II e III de estudos em humanos.

No Brasil, o estudo toxicológico pré-clínico para drogas sintéticas, semi-sintéticas ou fitoterápicas encontra-se sujeito às recomendações da Resolução N° 1/88 do Conselho Nacional de Saúde (1988). Essa resolução estabelece o tipo de estudo toxicológico que deve ser realizado com a droga, dependendo do período de exposição previsto para o homem. Assim, para drogas que serão empregadas em dose única deverão ser realizados estudos de toxicidade aguda, enquanto que aquelas que serão administradas até sete, até 30 dias ou além de 30 dias, terão que passar por estudos de toxicidade aguda e subcrônica, aguda e crônica (90 dias) e aguda e crônica (seis meses a um ano) respectivamente.

Uma substituição efetiva dos animais de experimentação por técnicas alternativas seja total ou parcial (cultura celular, por exemplo) deve passar necessariamente pela aceitação das técnicas e sua incorporação nos protocolos de

avaliação das agências que, como o FDA, são responsáveis pela aprovação de novos produtos para comercialização. Infelizmente, estas agências de controle se mostram extremamente conservadoras, e somente incorporaram um pequeno número de testes *in vitro* e, quase sempre, com o respaldo dos testes *in vivo* (Rajner, 1990).

Inúmeros trabalhos tem sido desenvolvidos para padronizar as novas técnicas de toxicologia *in vitro* e torná-las mais reprodutíveis (Clemenson et al., 1996). Em 1988 o MEIC elaborou uma lista de 50 compostos químicos para serem testados, com um protocolo padrão, inicialmente por vinte laboratórios associados, utilizando técnicas de toxicidade *in vitro*, nas quais foi incluída a cultura celular (Bassi et al., 1993; Roguet et al., 1993; Rasmussen, 1993). Estes compostos foram escolhidos porque havia dados e informações suficientes sobre seus efeitos tóxicos em humanos (Seibert et al., 1996). Os primeiros 30 compostos da lista do MEIC apresentaram resultados similares entre os diferentes laboratórios participantes embora fossem usadas 68 metodologias diferentes (Clemenson et al., 1996).

A utilização da cultura celular como técnica alternativa na avaliação de toxicidade apresenta vantagens e desvantagens. A possibilidade de utilização de material humano, a escolha de alvos específicos, a realização de vários protocolos experimentais como a determinação de faixas de concentração, doses repetidas e combinações e adições de drogas em um sistema relativamente livre de influências de outros tecidos ou órgãos são as principais vantagens. Como desvantagem e crítica ao uso ou substituição por cultura de células dos ensaios com animais é afirmado que o ensaio *in vitro* não reflete necessariamente a resposta de um organismo completo com

múltiplos tecidos alvo e diversas interações biológicas (Robinson, 1991; Roberfroid, 1995).

Vários fatores relativos à padronização das técnicas de citotoxicidade estão em estudo. Encontram-se em permanente revisão o tipo celular empregado, o uso de culturas primárias ou estabelecidas e os testes de citotoxicidade mais apropriados para avaliar a toxicidade sobre alvos celulares determinados (Garthoff, 1995; Fry et al., 1995; Frazier, 1995; Ponsoda et al., 1995; Seibert, 1996; Broadhead e Combes, 1996). Na atualidade estão sendo intensamente estudadas as possíveis correlações existentes entre os dados obtidos para a toxicidade *in vitro* e *in vivo* (Halle e Spielmann, 1992; Fautrel et al., 1993; Roguet et al., 1993; Garle, et al., 1994; Ponsoda et al., 1995; Ponsoda et al., 1997; Waterfield et al., 1997).

Fazendo regressão linear entre os valores de  $LD_{50}$  e  $IC_{50}$  encontrados na literatura para diferentes tipos de células, Halle e Spielmann (1992) determinaram a equação da reta que permite prever os valores de toxicidade *in vivo* a partir dos dados da citotoxicidade. Conseguir estabelecer a correlação *in vivo/in vitro* é de grande importância, já que o sucesso da substituição dos animais pelos testes de citotoxicidade dependerá da existência ou não da correlação procurada (Roberfroid, 1995).

## 1.8 Modelos Celulares para Estudos de Citotoxicidade

Nos ensaios de citotoxicidade podem ser empregados diferentes tipos de células. Existem linhagens celulares de animais e de humanos estabelecidas a partir

de células normais ou tumorais. Entre as células normais, estabelecidas como linhagem, são mais utilizadas em testes de citotoxicidade os fibroblastos V79 (Clemedson et al., 1996). Estas células são clonadas a partir de pulmão de hamster chinês por uma modificação genética introduzida pelo vírus do sarcoma 40 (SV 40) (Freshney, 1994). A célula V79, como todos os fibroblastos, é dependente de ancoragem e possui um tempo de duplicação de aproximadamente 14 horas (Cingi et al., 1991). Outra característica importante destas células é que apresentam um genoma diplóide e estável (Cernáková et al., 1993). Apesar de serem muito utilizadas, as células V79 oferecem bons resultados nos testes de citotoxicidade somente quando os efeitos tóxicos observados são provocados diretamente pela droga em estudo e não por seus metabólitos, já que os microsomas destas células não possuem expressão do citocromo P-450, principal sistema responsável pela metabolização de xenobióticos (Fentem et al., 1992; Fry et al., 1993). Por este motivo, os ensaios de citotoxicidade empregando células V79 representam um bom modelo para avaliar efeitos citotóxicos inespecíficos causados por ações diretas das drogas sobre as células (Clemedson et al., 1996).

Quando se deseja estudar efeitos citotóxicos mais específicos induzidos pela metabolização das drogas, são utilizadas culturas de hepatócitos (Ponsoda et al., 1995; Rogiers et al., 1995; Hammond e Fry, 1996; Walum et al., 1996). A cultura de células hepáticas mais empregada na atualidade é a cultura primária de hepatócitos de rato ou de humano, por apresentarem melhor correlação com os dados da toxicidade *in vivo* (Clemedson et al., 1996; Ponsoda et al., 1997 ). Os hepatócitos são células dependentes de ancoragem que não proliferam em cultura primária (Fry e Hammond, 1993) e normalmente apresentam um ou dois núcleos (Berthiaume et al., 1996).

A cultura primária de hepatócitos deve ser utilizada levando em consideração que, após isolamento, as células começam a perder diferenciação em forma rápida e logo após um certo período sua funcionalidade fica alterada (Roguet et al., 1993; Fry et al., 1995; Hammond e Fry, 1996). Foi estabelecido, por exemplo, que nas 48 horas após isolamento, os hepatócitos humanos e de rato perdem 85 % do valor total da atividade inicial de citocromo P-450, sendo que as diferentes isoformas deste citocromo apresentam decrescimentos individuais variáveis (Roguet et al., 1993; Hammond e Fry, 1996). Por estas razões, os experimentos de citotoxicidade com culturas primárias de hepatócitos habitualmente são realizados poucas horas após isolamento das células. Na procura de manter a funcionalidade dos hepatócitos em cultura primária, são usadas diversas metodologias, tais como a utilização de meio de cultura sem soro, a suplementação do meio com hormônios e fatores de crescimento, a co-cultura com outros tipos celulares e a utilização de biomatrizes extracelulares (Blaauboer et al., 1994; Rogiers et al., 1995; Berthiaume et al., 1996).

## **1.9 Os Testes de Citotoxicidade**

O efeito tóxico de um composto sobre um tecido ou órgão é devido a ação direta da droga ou metabólitos nos diferentes alvos celulares (Seibert et al., 1996). A necessidade de caracterizar um efeito tóxico levou ao desenvolvimento de vários testes de citotoxicidade (Freshney, 1994).

Os testes de citotoxicidade podem ser classificados em quatro categorias, dependendo do alvo celular avaliado (Cook e Mitchell, 1989). À primeira categoria pertencem os ensaios que avaliam alterações da permeabilidade da membrana

celular. Neste grupo se encontram os testes de inclusão e exclusão de corantes, os de liberação intracelular de substâncias exógenas como o  $^{51}\text{Cr}$  ou  $^{125}\text{I}$ -UDR e de substâncias endógenas como a enzima lactato desidrogenase (Cook e Mitchell, 1989; Freshney, 1994). A segunda categoria reúne os testes que avaliam funções metabólicas da célula. Pertencem a este grupo os ensaios que detectam níveis celulares de ATP, ADP, AMP, DNA e proteínas, assim como os que medem os gradientes de íons e aminoácidos, a atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase e a incorporação do corante vermelho neutro pelos lisossomas (Cook e Mitchell, 1989; Freshney, 1994). Na terceira categoria estão agrupados os ensaios que avaliam alterações morfológicas das células, como vesiculamento da membrana celular, mudança do volume da célula e modificações do citoesqueleto (Cook e Mitchell, 1989; Freshney, 1994). No quarto grupo encontramos os testes que avaliam os efeitos da droga sobre a reprodução celular. São os ensaios de formação de colônias e de velocidade de crescimento (Cook e Mitchell, 1989; Freshney, 1994).

Entre os testes de citotoxicidade de utilização mais comum se encontram o da redução do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (MTT) (Figura 5), que avalia a atividade da enzima succinato desidrogenase e o da incorporação do corante hidrocloreto de [3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina] (Vermelho Neutro) (Figura 6), que avalia a função dos lisossomas (Clemedson et al., 1996).

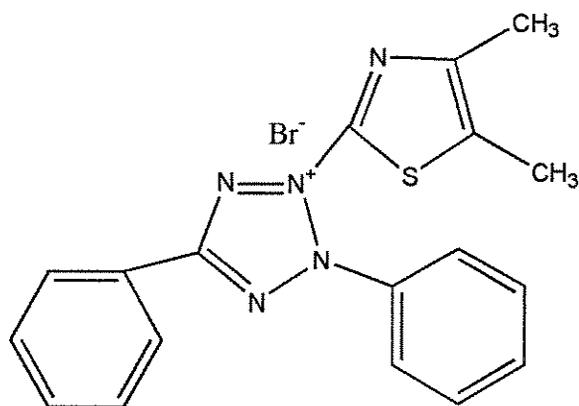


Figura 5. Estrutura química do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (MTT).

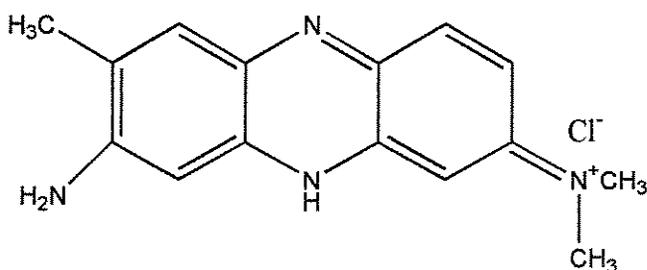


Figura 6. Estrutura química do corante hidrocloreto de [3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina] (Vermelho Neutro).

O ensaio da redução do sal hidrosolúvel MTT pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase, originando como produto o formazan, um composto azul e solúvel em solventes orgânicos, foi desenvolvido por Mosmann (1983) para estimar o número de células viáveis e se mostra apropriado para avaliar efeitos citotóxicos (Clemedson et al., 1996). Apesar disso, deve-se levar em consideração que o grau de redução do MTT pode ser modificado por vários outros fatores além do número de células (Vistica et al., 1991; Fry et al., 1995).

O teste da incorporação do corante vital vermelho neutro foi desenvolvido por Borenfreund e Puerner (1984) para avaliar a quantidade de células

viáveis. O corante é um composto fracamente catiônico e hidrossolúvel que atravessa as membranas celulares por difusão ou micropinocitose e é concentrado nos lisossomas funcionais, onde estabelece ligações com grupos carboxílicos ou fosfóricos da matriz lisossomal (Repetto e Sáenz, 1993). Contudo, deve-se considerar que a quantidade de corante incorporado nas células pode variar não apenas devido ao diferente número de células mas também à mudança do tamanho e do número de lisossomas presentes nas células (Olivier et al., 1995).

Quando se trabalha com cultura de linhagens celulares que possuem um genoma homogêneo e estável, por exemplo o fibroblasto V79 que é diplóide (Cernáková et al., 1993) ou no caso de culturas estáticas (não proliferativas) de curta duração (alguns dias), mesmo que não sejam células de genoma homogêneo, o número de células após tratamento com a droga pode ser estimado a partir do conteúdo de DNA na cultura (Cingi et al., 1991). Com este fim, as células são lisadas com uma solução de NaOH e sua absorbância lida a 260 nm, comprimento de onda que corresponde majoritariamente a DNA (Cingi et al., 1991; Bianchi e Fortunati, 1990).

Para se obter uma melhor caracterização da toxicidade de um composto, os testes de citotoxicidade incluem a avaliação de múltiplos alvos celulares (Renzi et al., 1993; Rodríguez-Farre et al., 1993; Phillips, 1996) assim como a utilização de células que possuem diferentes capacidades de metabolização de xenobióticos (Jover et al., 1992; Fentem et al., 1992; Fry et al., 1993; Ponsoda et al., 1995).

Neste trabalho, a avaliação da citotoxicidade em diferentes modelos de cultura de células contribuiu para reforçar a utilização da cultura celular, substituindo os testes em animais na primeira etapa (testes pré-clínicos) da aprovação de um novo medicamento.

## 2. Objetivos

### 2.1 Geral

Implantar no laboratório a metodologia para a obtenção de culturas primárias de rato

### 2.2 Específicos

- a) Avaliar a atividade antiulcerogênica da *trans*-desidrocrotonina, em quatro modelos de úlcera experimental.
- b) Determinar a toxicidade subcrônica oral (35 dias) da *trans*-desidrocrotonina em ratos.
- c) Estudar a citotoxicidade da *trans*-desidrocrotonina em culturas de células V79 e hepatócitos de rato.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Obtenção da *trans*-Desidrocrotonina (DHC)

##### 3.1.1 Isolamento e Purificação da DHC

A coleta da *C. cajucara* (sacaca) foi efetuada em Benfica, próximo à cidade de Belém, Pará, Brasil. A planta foi identificada pelo Dr. Nelson A. Rosa e uma amostra do material vegetal foi depositada no herbário do Museu Paranaense Emílio Goeldi sob o número 247. Foram coletados 25 Kg de planta seca (cascas do caule) os quais foram moídos e posteriormente pulverizados e extraídos em aparelho Soxhlet durante duas semanas, com 150 litros de hexano. Ao final da extração o volume de hexano foi reduzido em rotavapor para 20 litros e, ao final deste procedimento houve deposição de um precipitado castanho que foi separado e recristalizado com isopropanol, obtendo-se 85 g de DHC. Logo após a DHC foi submetida a 4 recristalizações com isopropanol:clorofórmio (15:1) e mais 4 com isopropanol, até obter um grau de pureza  $\geq 98\%$  estimado através da determinação do ponto de fusão, do espectro de absorção UV e do espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de prótons e carbono 13 (Kubo et al., 1991).

O volume de hexano que restou (20 litros) foi reduzido à metade e mais 30 g de DHC foram separados e recristalizados seguindo o mesmo procedimento anterior. Novas reduções do volume de hexano foram feitas levando à obtenção de mais 20 g da substância. Assim, após o término do trabalho químico de extração e purificação foram obtidos cerca de 130 g de DHC com pureza de  $\geq 98\%$ .

### 3.1.2 Caracterização Química da DHC

A caracterização química da DHC foi feita por determinação do ponto de fusão e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons ( $^1\text{H}$  RMN) e carbono ( $^{13}\text{C}$  RMN), infra-vermelho (IV) e ultra-violeta (UV).

Os espectros de absorção (UV/Vis) foram registrados em espectrofotômetro Beckman modelo DU-640 B, utilizando metanol como solvente. Os espectros de infra-vermelho (IV) foram obtidos em pastilhas de KBr em espectrofotômetro Perkin-Elmer modelo 180 e as frequências de absorção expressas em  $\text{cm}^{-1}$ . Os espectros de ressonância magnética nuclear de prótons ( $^1\text{H}$  RMN) e carbono ( $^{13}\text{C}$  RMN) foram registrados em aparelhos Varian-Gemini (80 e 300 Mhz) utilizando como solvente clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) e tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm, a multiplicidade indicada como singlete (s), dubleto (d), tripleto (t), quarteto (q) e multiplete (m).

Todos os espectros de infra-vermelho, de ressonância magnética nuclear protônica e de carbono foram analisados com base na literatura (Itokawa et al., 1989; Kubo et al., 1991).

## **3.2 Estudo da Atividade Antiulcerogênica da DHC em Modelos de Úlcera Experimental**

No nosso trabalho foram utilizados 4 modelos experimentais de úlcera gástrica induzidas por: a) antiinflamatório não esteroidal (indometacina), b) ligadura do piloro, c) estresse hipotérmico e d) etanol. Este modelos foram selecionados porque eles reproduzem os efeitos mais comuns de úlcera gástrica no homem (Souza Brito et al., 1997).

### **3.2.1 Úlcera Gástrica Induzida por Indometacina**

Um total de 21 ratos Wistar, machos, com pesos entre 250 a 300 g, foram separados aleatoriamente em 3 grupos, submetidos a jejum de 24 horas e mantidos em gaiola sem maravalha. Posteriormente, os animais foram tratados oralmente (por intubação gástrica), com o antiulcerogênico cimetidina (anti-histamínico H<sub>2</sub>) na dose de 100 mg/Kg, com 12 % Tween 80 (10 mL/Kg) o veículo utilizado para a dissolução da amostra (controle) e com a amostra de DHC na dose de 100 mg/Kg, dissolvida em 12 % Tween 80, 1 hora antes da administração do inibidor da síntese de prostaglandinas indometacina (agente ulcerogênico) na dose de 30 mg/Kg, por via subcutânea, na pele da região posterior do pescoço, de acordo com a metodologia descrita por Hayden e colaboradores (1978).

Após 4 horas os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos retirados e abertos no sentido da maior curvatura. As lesões ulcerativas

foram contadas utilizando uma lupa binocular e classificadas de acordo com sua área (+ pequena, até 1 mm; ++ média, de 1 a 3 mm e +++ grande, maior de 3 mm).

Os resultados foram expressos como índice médio de lesões ulcerativas (IMLU), conforme a metodologia descrita por Basile e colaboradores (1990) e calculados do modo seguinte:

$$\text{IMLU} = (3 \times A) + (2 \times B) + (C) / 6$$

A = N° de úlceras +++    B = N° de úlceras ++    C = N° de úlceras +

### 3.2.2 Úlcera por Ligadura do Píloro

Este modelo, além de permitir determinar o IMLU, permite também a avaliação do efeito de drogas sobre outros parâmetros, como volume do conteúdo estomacal e pH do suco gástrico.

Um total de 21 ratos Wistar, machos, com pesos de 250 a 300 g foram divididos aleatoriamente em 3 grupos e submetidos a jejum de 24 horas, sendo mantidos em gaiola sem maravalha de acordo com a metodologia descrita em 1945 por Shay e colaboradores. Após este tempo, os animais foram tratados por via oral (intubação gástrica) com o anti-histamínico H<sub>2</sub> cimetidina (100 mg/Kg), com uma solução de 12 % Tween 80 (10 mL/Kg) para o grupo controle e com DHC na dose de 100 mg/Kg, dissolvida em 12 % Tween 80. A indução da lesão ulcerativa foi feita através de procedimento cirúrgico, 30 minutos após o tratamento, pela ligadura do

piloro. Os animais foram anestesiados com éter etílico, sendo realizada uma tricotomia da região cirúrgica e logo uma incisão abaixo da apófise xifóide do esterno, em sentido longitudinal ao corpo do animal. Após localização do estômago e da identificação do piloro, se procedeu a sua ligadura. A incisão foi então suturada para posterior observação dos animais.

Três horas após a cirurgia, os animais foram sacrificados com éter etílico, e o mesmo local da cirurgia foi novamente aberto. Depois de amarrar a abertura gastroesofágica os estômagos foram retirados e lavados externamente com solução de soro fisiológico e o conteúdo gástrico coletado com o auxílio de uma seringa. O IMLU foi determinado como descrito anteriormente. Após determinar o volume e o pH da secreção gástrica, a mesma foi colocada num balão volumétrico, sendo o volume completado para 10 mL com água bidestilada. Esta solução foi titulada com NaOH 0,05 M, utilizando-se fenolftaleína como indicador. A concentração hidrogeniônica do conteúdo gástrico foi calculada usando a fórmula seguinte:

$$[H^+] \text{ mg/mL} = 1,825 \times \text{Vol NaOH (mL)} / \text{Vol gástrico (mL)}$$

### 3.2.3 Úlcera Induzida por Estresse Hipotérmico

Neste estudo foram utilizados 19 ratos Wistar, machos, com pesos variando entre 250 a 300 g, submetidos a jejum prévio de 48 horas. Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos. Os animais foram tratados previamente por via

oral 18 horas e 90 minutos antes da indução de ulceração por estresse hipotérmico, com o antiulcerogênico cimetidina (100 mg/Kg), com uma solução de 12 % Tween 80 (10 mL/Kg) como controle e com DHC na dose de 100 mg/Kg, dissolvida em 12 % Tween 80, de acordo com a metodologia de Levine (1971). Posteriormente, os animais foram colocados numa caixa de contenção e mantidos a 4 °C. Após 3 horas os animais foram sacrificados e o IMLU determinado como descrito anteriormente.

Em outro experimento de estresse hipotérmico, 3 grupos de 7 ratos machos Wistar, foram tratados como descrito anteriormente porém substituindo o uso de cimetidina por carbenoxolona (extracto da *G. glabra* que estimula a secreção de muco gástrico) na dose de 200 mg/Kg. A dose de 200 mg/Kg de carbenoxolona corresponde a um valor farmacológico padrão empregado habitualmente nos experimentos de úlcera com animais (Lewis e Hanson, 1991). No final do período de contenção de 3 h a 4 °C, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos retirados e abertos no sentido da maior curvatura. Os segmentos glandulares do estômago foram removidos e pesados. Cada segmento foi transferido imediatamente para um tubo contendo 10 mL de azul de alciano 0,1% (em solução de sacarose 0,16 M tamponada com acetato de sódio 0,05 M, pH 5). Após imersão por 2 horas nesta solução, o excesso de corante foi removido em duas lavagens sucessivas com 10 mL de solução de sacarose 0,25 M, primeiro por 15 minutos e depois por 45 minutos.

O corante complexado com o muco da parede gástrica foi extraído com 10 mL de MgCl<sub>2</sub> 0,5 M por agitação intermitente por 1 minuto, a intervalos de 30 minutos, durante 2 h. Uma alíquota de 4 mL do extrato azul foi vigorosamente agitada

com um volume igual de éter dietílico. A emulsão resultante foi centrifugada a 950 g por 20 minutos e a absorvância da camada aquosa foi determinada a 580 nm. A quantidade de azul de alciano extraída por grama de tecido glandular foi então calculada e expressa como concentração do corante em  $\mu\text{g/mL}$  por grama de porção glandular. Este valor foi utilizado para estimar o conteúdo de muco presente na parede gástrica (Rafatullah et al. 1990).

### 3.2.4 Úlcera Induzida por Etanol

Neste modelo, a indução das lesões ulcerativas é feita pela administração via oral de etanol 99,5 % (Soldato et al., 1984; Morimoto et al., 1991). Ratos Wistar, machos, (21 no total) com pesos de 250 a 300 g, foram divididos aleatoriamente em 3 grupos, mantidos em gaiola sem maravalha e submetidos a jejum de 24 horas. Após jejum, os animais foram tratados por intubação gástrica com o antiulcerogênico, inibidor da  $\text{H}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ , omeprazol (20 mg/Kg), com uma solução de 12 % Tween 80 (10 mL/Kg) como controle e com DHC na dose de 100 mg/Kg, dissolvida em 12 % Tween 80. Após 1 hora, todos os grupos receberam a administração de 1 mL de etanol 99,5% também através de intubação gástrica. Imediatamente após 1 hora da indução de úlcera pelo etanol, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os estômagos retirados e calculado o IMLU como descrito anteriormente.

### **3.3 Estudos da Toxicidade da DHC *IN VIVO***

#### **3.3.1 Toxicidade Aguda Intraperitoneal**

Os efeitos tóxicos da administração intraperitoneal da DHC foram avaliados em camundongos machos adultos Swiss albino, com 12 horas de jejum prévio, como descrito por Souza Brito (1995).

Quatro grupos de 10 animais por nível de dose receberam uma injeção intraperitoneal de DHC suspensa em uma solução aquosa de 12 % Tween 80 nas seguintes doses: 31,25; 62,5; 125 e 250 mg/Kg. Um grupo controle de 10 camundongos recebeu a administração de 12 % Tween 80. Após tratamento os animais foram observados a 0, 30, 60, 120, 180, e 240 min e posteriormente 2 vezes ao dia durante duas semanas, registrando durante o período os camundongos mortos.

Os resultados estão expressos como a dose que provocou a morte do cinquenta por cento dos animais ( $LD_{50}$ ), valor calculado dos dados experimentais utilizando o método de regressão de Litchfield e Wilcoxon (1949).

#### **3.3.2 Toxicidade Aguda Oral**

A toxicidade aguda de uma administração oral de DHC foi avaliada em camundongos machos adultos Swiss albino, com 12 de jejum prévio, como descrito por Souza Brito (1995).

Os animais foram separados aleatoriamente em grupos de 10 por nível de dose de DHC (250, 500, 750 e 1000 mg/Kg) preparada em suspensão aquosa de 12 % Tween 80 e administrada por intubação gástrica. Um grupo controle recebeu a administração de 12 % Tween 80 (10 mL/Kg). Os animais foram observados durante 14 dias, seguindo o protocolo anterior.

A partir dos dados experimentais foi calculada a LD<sub>50</sub> como descrito por Litchfield e Wilcoxon (1949).

### **3.3.3 Toxicidade Subcrônica Oral**

Ratos Wistar jovens, adultos e sadios, foram aclimatados às condições do laboratório durante 7 dias. O ensaio foi iniciado antes que os animais completassem 6 semanas. Foram utilizados 20 animais (10 fêmeas e 10 machos) por nível de dose, alocando 5 animais por gaiola. Além do controle (12% Tween 80) foram administrados por via oral 3 níveis de dose da DHC (25, 50 e 100 mg/Kg) suspensa em 12 % Tween 80. A administração foi feita 7 dias por semana, durante um período de 35 dias (OCDE, 1981; Souza Brito, 1994).

No decorrer do período de administração da DHC, os animais foram examinados uma vez ao dia (Wilson e Hayes, 1994). Duas vezes por semana foram efetuadas medidas do peso corporal e de excretas. Além disso, foram realizadas as determinações do consumo de ração e de água a cada 24 horas. Os animais que morreram durante a experiência foram autopsiados para a determinação da causa mortis.

No final do período de tratamento e estando em jejum de 12 horas, uma amostra de urina foi obtida de cada animal e analisados os seguintes parâmetros: pH, densidade, conteúdo de proteína, presença de corpos cetônicos, glicose e hemácias utilizando o kit fita de urina tipo I (Ames). Posteriormente, os animais foram pesados e retiradas duas amostras de sangue por punção do plexo retro-orbital, como descrito por Kraus (1980). Uma das amostras (aproximadamente 3 mL), foi colocada na estufa a 37° C durante uma hora para acelerar o processo de coagulação. Logo após, as amostras foram centrifugadas a 1000 g, durante 5 minutos, para separar o soro dos outros componentes sanguíneos. O soro foi usado para dosagem de glicose, proteínas totais, albumina, globulina, colesterol, triglicerídios, lipídios totais, ácido úrico, fosfatase alcalina,  $\gamma$ -glutamil transpeptidase (G-GT), aspartato aminotransferase (AsAT) e alanina aminotransferase (ALAT), empregando um analisador bioquímico automático (SBA-200, CELM, Brasil). Para cada animal foi feito um esfregaço desta amostra de sangue sem anticoagulante, deixado secar ao ar e fixado imediatamente com metanol durante 10 minutos, e então corado com Giemsa 5 % para contagem diferencial de leucócitos. A contagem das células brancas foi realizada utilizando um microscópio óptico comum, com aumento final de 1000 vezes.

A outra amostra de sangue (aproximadamente 1 mL), foi coletada em tubos de ensaio tratados previamente com uma solução aquosa de EDTA 2 %. Este sangue foi imediatamente utilizado para a determinação de: concentração de hemácias e leucócitos, hematócrito, volume corpuscular médio e conteúdo de hemoglobina, empregando um contador automático de células (CC-510, CELM, Brasil).

Após a obtenção das amostras de sangue, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e perfundidos, por punção cardíaca, com uma solução de soro fisiológico, para retirar o sangue residual dos órgãos, seguida imediatamente por uma solução aquosa de formol 10 %, para fixar os tecidos. Os animais foram abertos para retirar e pesar os seguintes órgãos: coração, baço, fígado, pulmão, rins, supra-renais, pâncreas, estômago e o conjunto ovário e útero ou vesículas seminais (WHO, 1978; Souza Brito, 1994).

Devido a diferenças observadas no peso dos fígados dos animais tratados com DHC em relação aos controles, foi retirado um pedaço do órgão para estudo histopatológico. Foi efetuado um corte do lóbulo médio do fígado dos animais (4 machos e 4 fêmeas de cada grupo) desde o hilio até a periferia tanto para os controle como para os tratados com a dose média (DHC 50 mg/Kg) e alta (DHC 100 mg/Kg). Os cortes dos fígados foram fixados em uma solução neutra de formol 10 % e incluídos em parafina sólida. Em seguida foram cortados num micrótomo convencional (Leitz-Wetzlar) em lâminas de 4 µm de espessura e corados com hematoxilina-eosina (Yoshitake et al., 1991). Os cortes histológicos dos fígados foram analisadas utilizando um microscópio óptico Leitz, com aumento total de 720 vezes. Na análise histopatológica foram observadas possíveis alterações ocorridas no citoplasma e núcleo dos hepatócitos. Para a quantificação do dano observado foram avaliados campos de aproximadamente 200 células por lamínula, utilizando-se o sistema de cruces: de 0 até 20 % de dano (-), 20 - 40 % (+), 40 - 60 % (++) , 60 - 80 % (+++) e 80 - 100 % (++++).

## 3.4 Estudo da Citotoxicidade da DHC

### 3.4.1 Cultura de Células V79

Foram utilizados clones de células V79, de fibroblastos de pulmão de hamster chinês, obtidas de uma linhagem oriunda do laboratório do Prof. Rogério Meneghini, Instituto de Química, USP, SP. Estas células são uma linhagem dependente de ancoragem e têm um tempo de duplicação de aproximadamente 14 horas (Cingi et al., 1991). As células V79 em cultura não possuem expressão do citocromo P 450 (citocromo envolvido no processo de detoxificação de drogas) (Fentem et al., 1992; Fry et al., 1993).

As células foram cultivadas em meio DMEM (meio Eagle modificado por Dulbecco), suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10 %, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). A incubação foi sempre realizada em estufa de cultura (Forma Scientific, Inc., modelo 3158) a 37 ° C, sob atmosfera úmida contendo 5 % de CO<sub>2</sub>, até a semiconfluência das células (metade da população na área disponível).

A manutenção da cultura foi feita por repiques periódicos (cada repique corresponde a uma passagem) durante a fase de crescimento logarítmico, utilizando uma solução de associação tripsina versene (ATV) (Solução ATV: 1 volume de solução 0,25 % de tripsina (1 : 250, Sigma, dissolvida em PBS-A) e 4 volumes de solução versene. Composição da solução PBS-A em mM: 136,9 NaCl; 2,68 KCl; 7,99 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,47 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,2. Composição da solução Versene em mM: 136,9



1,47  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1,24  $\text{CaCl}_2$ ; 0,5  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ) fixadas com solução aquosa de ácido tricloroacético (TCA) 5 %, lavadas 2 vezes com etanol (todas as soluções geladas) e deixadas secar ao ar. Posteriormente, as células foram lisadas com NaOH 0,5 M (1mL/poço) durante 1 hora a 37° C e a absorbância da solução de NaOH dos pocinhos lida em espectrofotômetro (Beckman, modelo DU 640B) a 260 nm (Cingi et al., 1991). Como controles foram utilizadas células de pocinhos contendo a mesma porcentagem de metanol presente nos pocinhos das células tratadas com DHC. Visto que a relação entre os valores de absorbância a 260 nm e o número de células V79 no lisado descrevem uma função linear (Bianchi e Fortunati, 1990) pode-se expressar a porcentagem de redução no número de células relativa aos efeitos da droga. O experimento foi repetido 3 vezes, com células provenientes de passagens diferentes, observando como limite a passagem (número de repique) 60.

A concentração de metanol presente na solução de DHC nunca foi maior a 1 %. Apesar da literatura relatar ausência de efeito tóxico nessa concentração, foi feita uma curva controle variando-se de 0,025 a 3 % a concentração do solvente.

#### ***3.4.1.2 Incorporação do hidrocloreto de [3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina] (Vermelho Neutro)***

O ensaio foi preparado de acordo com o protocolo já descrito. Depois da incubação com a droga o meio foi retirado e trocado por uma solução estéril de vermelho neutro (VN, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) dissolvido em meio DMEM sem soro, preparada 12 horas antes e filtrada imediatamente antes de usar. Após 3 horas de incubação, as células foram lavadas com uma solução de PBS- $\text{Ca}^{2+}$  a 37° C para retirada do excesso

de corante não incorporado pelos lisossomas. Posteriormente, foi acrescentado 1 mL de uma solução aquosa, composta por 1 % ácido acético glacial e 50 % etanol, a cada pocinho para extrair o corante incorporado pelas células. As placas foram agitadas por 10 minutos num agitador de placas (Lab-Line, modelo 4625) e a absorvância da solução presente nos pocinhos lida a 540 nm (Borenfreund e Puerner, 1984; Riddell et al., 1986; Försby et al., 1991; Renzi et al., 1993). O experimento foi repetido 3 vezes, com células provenientes de passagens diferentes. Os resultados foram expressos como porcentagem de absorvância em relação ao controle.

#### ***3.4.1.3 Redução do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (MTT)***

O ensaio foi preparado de acordo com o protocolo já descrito. Depois de tratadas as células foram lavadas com PBS - Ca<sup>2+</sup> e incubadas com 1 mL de uma solução de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (MTT) (0,5 mg/mL meio DMEM, sem soro) por pocinho durante 4 horas em estufa de cultura a 37° C. Logo após a remoção do meio, as células foram lavadas com PBS - Ca<sup>2+</sup> e os cristais de formazan produzidos foram dissolvidos acrescentando-se 1mL de etanol a cada pocinho. As placas foram agitadas durante 5 min em um agitador de placas e a absorvância da solução de etanol lida em espectrofotômetro a 570 nm (Denizot e Lang, 1986; Fentem et al., 1992; Jover et al., 1992). A viabilidade das células V79 foi estimada comparando os valores de absorvância dos pocinhos tratados em relação aos valores de absorvância dos controles. Os resultados foram expressos como porcentagem de absorvância em relação ao controle (100 %).

#### ***3.4.1.4 Efeito do Tempo de Exposição à DHC sobre a Viabilidade das Células V79***

Células V79 provenientes de uma cultura semiconfluente foram plaqueadas em três placas de 24 pocinhos ( $2 \times 10^4$  células/mL/pocinho) e incubadas a 37° C, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Logo após, as células foram tratadas com diferentes concentrações de DHC durante 24, 48 e 72 horas. Após os períodos de tratamento de 24 e 48 horas, o meio com a droga foi removido e trocado por meio fresco (sem droga) e as placas foram incubadas por mais 24 e 48 horas respectivamente. Completado o período de incubação de cada placa, o meio foi removido e determinado o conteúdo de DNA como descrito no item 3.4.1.1.

#### ***3.4.1.5 Recuperação das Células V79 após Tratamento com DHC***

Células V79 provenientes de uma cultura semiconfluente foram plaqueadas em três placas de 24 pocinhos ( $2 \times 10^4$  células/mL/pocinho) e incubadas a 37° C, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Logo após, as células foram tratadas com diferentes concentrações de DHC por um tempo fixo de 24 horas. Após tratamento, o meio com a droga foi removido, trocado por meio fresco e as placas foram incubadas por mais 24, 48 ou 72 horas. Ao término do respectivo período de incubação, o meio foi removido e o conteúdo de DNA nos pocinhos determinado como descrito no item 3.4.1.1.

### **3.4.1.6 Citotoxicidade da Cimetidina**

O efeito citotóxico da cimetidina, um conhecido farmaco anti-ulcerogênico, foi estudado em células V79 como descrito no item 3.4.1. Duas placas de cultura de 24 pocinhos com células V79 em estado de semiconfluência, foram tratadas em quadruplicata durante 24 horas com diferentes concentrações (0,3 - 1,5 mM) de cimetidina (Sigma) dissolvida no meio de cultura. Imediatamente após o tratamento, em uma placa foi determinado o conteúdo de DNA como descrito no item 3.4.1.1 e na outra a capacidade de reduzir o MTT como descrito no item 3.4.1.3. Os resultados estão expressos como porcentagem de absorbância em relação ao controle.

### **3.4.2 Cultura Primária de Hepatócitos**

Os hepatócitos utilizados nestes experimentos, foram obtidos do fígado de ratos Wistar machos (200 - 250 g), fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB). Para o isolamento das células hepáticas, utilizou-se a técnica da perfusão do fígado em duas etapas, com colagenase, como descrito por Seglen (1976) e modificado por Guguen-Guillouzo e Guillouzo (1986). Os animais foram anestesiados com éter e a pele do abdomen lavada com uma solução de etanol 70 %. Imediatamente foi realizada uma incisão na linha média do animal, desde a porção inferior do abdome até a base do pescoço. Após identificar e isolar a veia jugular, foi administrada uma dose intravenosa de heparina de sódio (Liquemine, Roche) na proporção de 100 UI/100 g de peso corporal. Rapidamente foi aberta a parede muscular do abdomen e identificada e isolada a veia porta hepática.

A veia porta foi amarrada em seu extremo distal em relação ao fígado e canulada após efetuar-se um pequeno hemicorte perpendicular a seu eixo. A cânula foi amarrada e os outros vasos sanguíneos do órgão seccionados (artéria e veias hepáticas), iniciando-se rapidamente a perfusão *in situ* do fígado com 500 mL de uma solução de tampão Hepes sem cálcio (Tampão Hepes sem cálcio em mM: 160,8 NaCl; 3,15 KCl; 0,7 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 12 H<sub>2</sub>O; 20 Hepes) pH 7,65 a 37 °C, com um fluxo de 25 mL/min utilizando uma bomba peristáltica (Cole-Parmer, modelo Masterflex 7518-10). Todo o procedimento cirúrgico foi efetuado em condições estéreis. Após 20 minutos a perfusão do fígado foi continuada com 300 mL de uma solução de tampão Hepes pH 7,65 contendo 25 mg/100 mL de colagenase (Tipo IV, Sigma) e CaCl<sub>2</sub> 5,1 mM com fluxo de 15 mL/min.

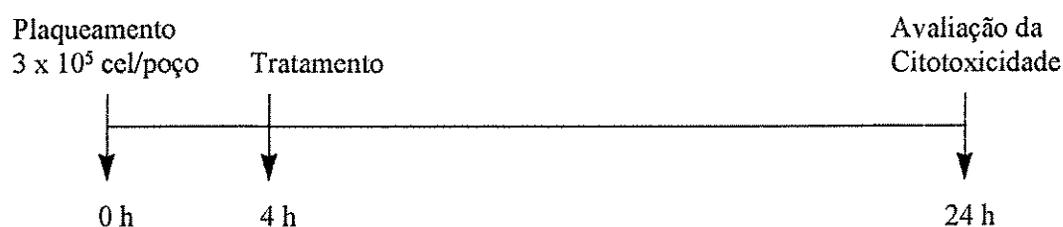
Ao fim da perfusão o fígado foi retirado e levado para a capela de fluxo laminar, onde rapidamente foi picotado várias vezes com uma tesoura e suspenso em meio Leibovitz (L-15) sem soro. Após breve homogeneização por agitação, a suspensão de fígado foi filtrada em gaze estéril e deixada repousar por 20 minutos. Foi descartado 50 % do volume e o sedimento centrifugado 3 vezes sucessivas a 50 g por 45 segundos, trocando cada vez o meio para lavar e eliminar das células a colagenase. A viabilidade dos hepatócitos após isolamento, avaliada pelo método de exclusão do azul de tripan, nunca foi inferior a 90 %.

Para o plaqueamento dos hepatócitos foi seguido o seguinte protocolo: As células foram semeadas em placas de cultura de 24 poços em densidade de  $3 \times 10^5$  células/poço/mL meio Ham F-12. O meio foi suplementado com soro fetal bovino SFB (10 %), albumina de soro bovino (0,2 %) (Fração V, Sigma), insulina bovina (0,1

UI/mL), dexametasona (1  $\mu$ M), penicilina (50 UI/mL), estreptomicina (50  $\mu$ g/mL) e incubado em estufa de cultura a 37 °C, em atmosfera humidificada contendo 5 % de CO<sub>2</sub> (Jover et al., 1992).

### ***3.4.2.1 Ensaios de Citotoxicidade em Cultura Primária de Hepatócitos***

Após o plaqueamento, esperou-se 4 horas para as células aderirem e então o meio foi trocado, para a remoção das células não aderidas, por meio sem soro, contendo diferentes concentrações de DHC. As células foram tratadas durante 20 horas e cada concentração de DHC testada em quadruplicata. O experimento foi repetido 3 vezes, usando hepatócitos isolados de animais diferentes. Os estudos de citotoxicidade foram realizados dentro das 24 horas seguintes ao isolamento para reduzir a influência das alterações funcionais que sofrem os hepatócitos em cultura primária (Guguen-Guillouzo et al., 1988; Roguet et al., 1993; Blaauboer et al., 1994; Rogiers et al., 1995; Hammond e Fry, 1996). Nos itens 3.4.2.1.1 - 3.4.2.1.3 a avaliação da citotoxicidade da DHC foi realizada de acordo com o esquema seguinte.



#### 3.4.2.1.1 Redução do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (MTT)

O ensaio da redução do MTT foi realizado de acordo com Denizot e Lang (1986). Após tratamento, as células foram lavadas com uma solução de tampão fosfato (PBS) gelado e incubadas com 1 mL de meio sem soro contendo MTT (0,5 mg/mL) por poço. Após 4 horas de incubação o sobrenadante foi retirado e foi colocado 1 mL de etanol em cada poço para dissolver o formazan formado. Após 15 minutos de agitação, foi registrada a absorbância da solução de etanol em um espectrofotômetro a 570 nm.

#### 3.4.2.1.2 Incorporação do hidrocloreto de [3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina] (Vermelho Neutro)

O ensaio da incorporação do corante vermelho neutro (VN) foi realizado de acordo com o método de Borenfreund e Puerner (1984). Este teste tem apresentado uma maior capacidade de expressar efeitos citotóxicos do que testes de liberação de LDH, de conteúdo de proteína e de redução do MTT na determinação de hepatotoxicidade em cultura primária (Roguet et al., 1993; Fautrel et al., 1993).

Depois do tratamento com DHC as células foram lavadas com PBS-Ca<sup>2+</sup> gelado e incubadas durante 4 horas com uma solução de meio sem soro contendo 50 µg/mL de vermelho neutro. Logo após o período de incubação, o meio foi descartado e as células lavadas com PBS-Ca<sup>2+</sup>. Finalmente, o PBS foi descartado e adicionado 1 mL de uma solução aquosa contendo 1 % de ácido acético glacial e 50 %

de etanol por poço, para dissolver o vermelho neutro incorporado nos lisossomas. Após uma breve agitação, a absorbância da solução foi lida a 540 nm.

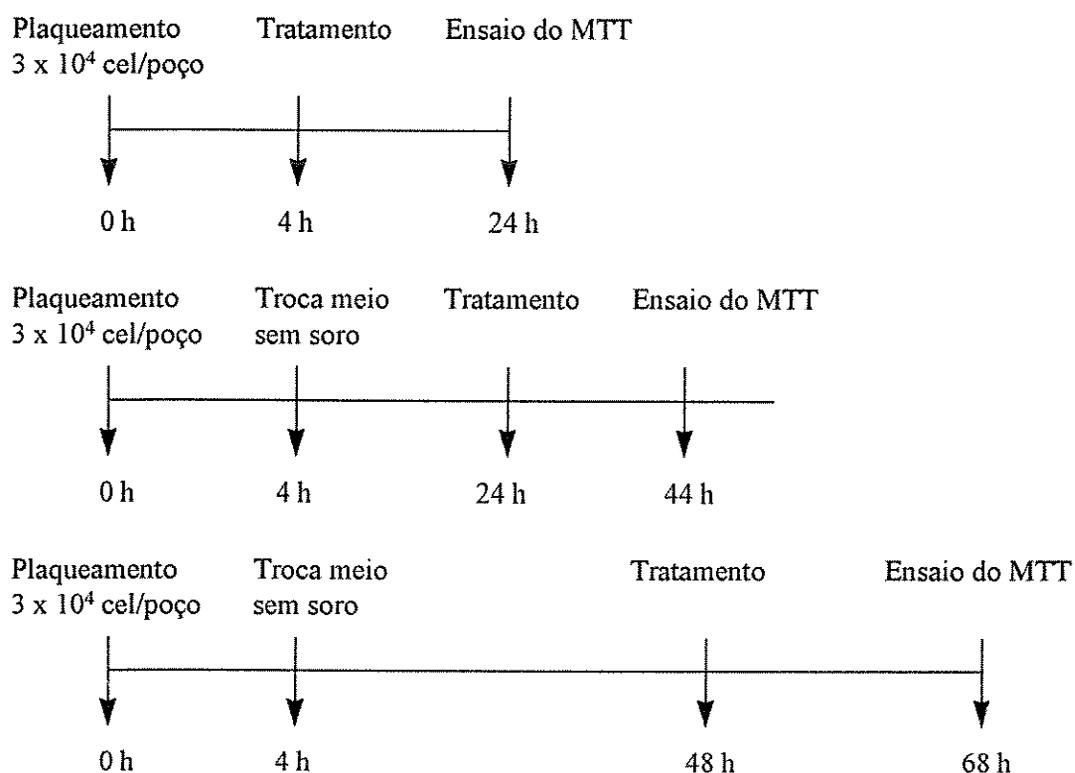
#### 3.4.2.1.3 Conteúdo de DNA

O número de células nos poços tratados e nos controles foi estimado a partir do conteúdo de DNA (Cingi et al., 1991). Após o tratamento, as células foram lavadas duas vezes com PBS-Ca<sup>2+</sup> gelado e fixadas durante 5 minutos com 1 mL de uma solução aquosa 5 % de ácido tricloroacético (TCA) por poço. O TCA foi descartado e adicionado 1 mL de etanol gelado por poço. O etanol foi deixado durante 5 minutos para lavagem e descarte dos nucleotídeos solúveis. Finalmente, as células foram dissolvidas com 1 mL de solução 0,5 M NaOH por poço, durante 1 hora a 37° C e a absorbância lida em um espectrofotômetro a 260 nm. A absorbância a 260 nm da fração de NaOH é utilizada como índice do número de células (Bianchi e Fortunati, 1990). À diferença das células V79, os hepatócitos em cultura primária não proliferam (Fry e Hammond, 1993; Rogiers et al., 1995), e por isso as leituras de DNA correspondem somente às células que sobreviveram ao tratamento.

#### 3.4.2.1.4 Efeito da Idade da Cultura de Hepatócitos sobre a Citotoxicidade da DHC

Para estudar a relação entre a idade da cultura e o efeito tóxico da DHC sobre a cultura primária de hepatócitos, as células foram plaqueadas em 3 placas de cultura de 24 pocinhos como descrito anteriormente no item 3.4.2 e o meio trocado após 4 horas por meio sem soro. As 3 placas foram tratadas durante 20 horas com uma dose fixa de 8 µM DHC adicionada a 4, 24 ou 48 horas após o plaqueamento. A dose

fixa de 8  $\mu\text{M}$  DHC utilizada neste experimento, foi escolhida por estar próxima do valor da  $\text{IC}_{50}$  obtido no experimento apresentado no item 3.4.2.1.1. Em todos os experimentos, células tratadas com meio sem soro e sem DHC contendo 1 % de metanol (meio em que foi dissolvida a DHC) foram usadas como controle. Depois dos respectivos períodos de tratamento foi avaliada a capacidade das células em reduzir o MTT como descrito no item 3.4.2.1.1. O experimento seguiu o seguinte esquema:



#### 3.4.2.1.5 Capacidade de Recuperação dos Hepatócitos após Tratamento com DHC

Os hepatócitos de rato foram isolados e cultivados em 4 placas de 24 pocinhos como descrito anteriormente no item 3.4.2. Quatro horas após o plaqueamento as células foram tratadas com diferentes concentrações de DHC durante 20 horas. Após o tratamento, o meio com a droga foi removido e duas placas foram

utilizadas para determinar conteúdo de DNA e capacidade das células em reduzir o MTT. Nas outras duas placas o meio de tratamento foi trocado por meio fresco e incubadas por mais 24 horas para permitir uma possível recuperação das células após retirada da DHC. Completado o período de recuperação, o meio foi removido e o conteúdo de DNA nos pocinhos assim como a capacidade de reduzir o MTT foram determinados segundo já descrito nos itens 3.4.2.1.3 e 3.4.2.1.1.

### **3.4.3 Co-Cultura de Hepatócitos e Células V79**

Visando avaliar o possível efeito citotóxico do (s) composto (s) produzidos durante a metabolização hepática da DHC, foi realizado um experimento de co-cultura de hepatócitos e células V79 como sugerido por Walum et al., (1996) e Seibert et al., (1996).

Os hepatócitos de rato foram isolados e cultivados em placas de 24 pocinhos como descrito anteriormente no item 3.4.2. Quatro horas após plaqueamento as células foram tratadas com diferentes concentrações de DHC durante 20 horas. Após o tratamento, o meio foi removido e utilizado para tratar culturas semiconfluentes de células V79 durante 24 h, como descrito no item 3.4.1. Os efeitos citotóxicos dos produtos da metabolização hepática da DHC sobre as células V79 foram avaliados pelos testes de redução do MTT e conteúdo de DNA.

### 3.5 Análise Estatística

A avaliação estatística dos resultados foi realizada empregando-se análise de variância de uma via (ANOVA), com nível crítico igual ou menor a 0,05 para rejeição da hipótese de nulidade. Na presença de significância procedeu-se à análise de contraste entre as médias aplicando-se os testes *pos-hoc* de Duncan ou de Fisher com nível crítico igual ou menor a 0,05 como descrito por Gad e Weil (1994). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa computacional Estatística, versão 5 produzido por Statsoft, Inc., 1995.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Caracterização da DHC

Os resultados dos dados espectroscópicos obtidos a partir dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , UV/Vis, o ponto de fusão da DHC isolada e purificada no nosso laboratório, assim como os valores que têm sido relatados por outros grupos de trabalho estão apresentados no anexo N° 1.

Os dados obtidos com o composto purificado foram analisados cuidadosamente e comparados com os valores encontrados na literatura, em relação às características químicas da DHC, concluindo-se que trata-se do composto *trans*-desidrocrotonina. Os possíveis contaminantes que poderiam ter aparecido juntamente com a DHC são o isômero *cis*-desidrocrotonina e a crotonina (Itokawa et al., 1989; Kubo et al., 1991). No entanto, o sinal obtido para o próton  $1\alpha$  da DHC purificada neste trabalho aparece como duplo dubleto a 2,53 ppm e não a 3,36 ppm que seria o esperado para a presença da *cis*-desidrocrotonina. Por outro lado, o sinal do próton 10 do nosso composto, encontra-se como triplo dupleto a 1,80 ppm e não aparece sinal registrado a 1,47 ppm que seria indicador da presença da crotonina. Além disso, o composto por nós purificado apresenta o carbono 3 a 126,27 ppm e não aparece sinal a 49,64 ppm que seria característica da presença da crotonina.

Estas observações permitem afirmar que o composto isolado e purificado corresponde à *trans*-desidrocrotonina e que seu grau de pureza encontra-se em níveis superiores a 98 % (Itokawa et al., 1989; Kubo et al., 1991).

## 4.2 Atividade Antiulcerogênica da DHC

A atividade antiulcerogênica da DHC foi estudada em quatro modelos experimentais de úlcera induzida em ratos. Os modelos selecionados foram os das úlceras induzidas por ligadura do piloro (Shay et al., 1945), administração de indometacina (Hayden et al., 1978), estresse hipotérmico (Levine et al., 1971) e etanol (Morimoto et al., 1991).

Os quatro modelos de úlcera induzida que foram estudados neste trabalho exercem sua ação de ulcerogênese por mecanismos diferentes (Desai e Parmar, 1993). O etanol atua como um fator agressor necrotizante da mucosa gástrica independentemente da secreção ácida (Lewis e Hanson, 1991; Cho e Ogle, 1992; Takase et al., 1994; Evans, 1996). A ligadura do piloro entretanto, induz lesões pelo estímulo e acumulação da secreção ácida no lume do estômago (Shay et al., 1945; Lewis e Hanson, 1991; Rafatullah et al., 1994). A indometacina, assim como em geral todos os anti-inflamatórios não esteróides, como por exemplo a aspirina, atuam inibindo a síntese de prostaglandinas e conseqüentemente, os mecanismos de citoproteção da mucosa gástrica que são mediados por estas moléculas (Lewis e Hanson, 1991; Morimoto et al., 1994; Takase et al., 1994; Evans, 1996). Por outro lado, as alterações circulatórias da mucosa gástrica e a estimulação da secreção ácida têm sido apontadas como fatores reponsáveis pelo aparecimento das úlceras no modelo

do estresse hipotérmico (Yano et al., 1978; Raffatullah et al., 1990; Cho e Ogle, 1992; Allen et al., 1993; Evans, 1996).

Os efeitos antiulcerogênicos da administração por via oral em dose única de DHC 100 mg/Kg estão apresentados na Figura 7. Nesta figura é possível observar que a DHC foi efetiva como antiulcerogênico nos modelos de úlcera induzida pela ligadura do piloro, pelo estresse hipotérmico e pelo etanol, e pouco efetiva na prevenção da úlcera induzida pela indometacina. O melhor efeito preventivo foi observado nos modelos do estresse hipotérmico (64,8 %) e do etanol (54 %) (Figura7).

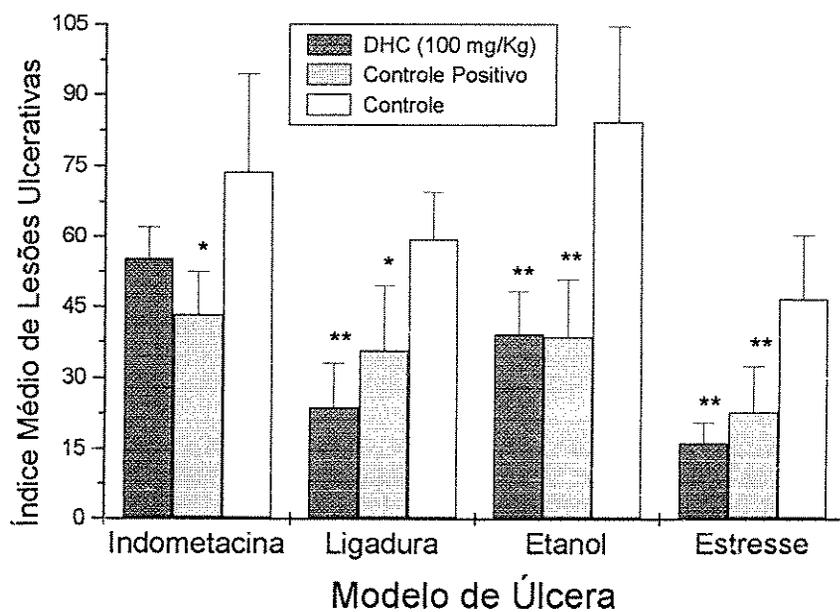


Figura 7. Efeito antiulcerogênico da DHC (100 mg/Kg) sobre as úlceras gástricas induzidas por indometacina (controle positivo: cimetidina 100 mg/Kg, N= 21), ligadura do piloro (controle positivo: cimetidina 100 mg/Kg, N= 21), etanol (controle positivo: omeprazol 20 mg/Kg, N= 21) e estresse hipotérmico (controle positivo: cimetidina 100 mg/Kg, N= 19) em ratos. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  DP. Os asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle correspondente (ANOVA seguido do teste de Duncan). \* P < 0,05; \*\* P < 0,01

A cimetidina é uma droga anti-histamínica que foi projetada especificamente para inibir os receptores histamínicos do tipo  $H_2$  e exerce seus efeitos antiulcerogênicos inibindo a secreção ácida estimulada pela histamina (Johnson, 1997a). Em todos os modelos onde utilizamos cimetidina como droga antiulcerogênica de referência, ela inibiu o aparecimento de úlceras em forma estatisticamente significativa. Sabe-se que a cimetidina possui efeito antiulcerogênico nos modelos de úlcera experimental induzida por estresse, ligadura do piloro, agonistas de receptores  $H_2$ , aspirina e análogos da acetilcolina (Brunton, 1996), enquanto que não é efetiva na prevenção das úlceras induzidas por etanol (Cho e Ogle, 1992). Por esse motivo a cimetidina foi substituída por omeprazol como antiulcerogênico de referência no modelo do etanol. A DHC empregada na mesma dose da cimetidina teve efeitos de grandeza similar, exceto no modelo da úlcera induzida pela indometacina, onde foi observada uma tendência, não significativa, à diminuição do número de úlceras nos animais tratados com DHC.

Já que tem sido observado que a maioria dos compostos de origem vegetal com atividade antiulcerogênica exerce seu efeito estimulando os mecanismos de proteção da mucosa gástrica (Lewis e Hanson, 1991), foi estudado o efeito da administração oral única de DHC (100 mg/Kg) sobre a produção de muco gástrico no modelo de estresse hipotérmico assim como sobre o pH e volume do conteúdo gástrico no modelo de ligadura do piloro. A administração da DHC não provocou mudanças estatisticamente significativas na secreção/retenção de muco gástrico (Tabela 1), pelo contrário, observou-se uma tendência à diminuição do conteúdo de muco nos estômagos dos animais tratados com DHC. A carbenoxolona, um extrato vegetal utilizado comercialmente como droga antiulcerogênica, estimulou a secreção

de muco no estômago dos animais (Tabela 1). Foi determinado que a carbenoxolona exerce uma parte de seu efeito antiulcerogênico estimulando a secreção de glicoproteínas na mucosa gástrica (Lewis e Hanson, 1991), estando assim os nossos resultados em concordância com os efeitos esperados para essa droga. Nos animais tratados com DHC, para os valores de pH, conteúdo ácido total e volume gástrico (Tabela 2) tampouco foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle, em adição, foi observada uma tendência à diminuição do pH e do volume gástrico. Podemos afirmar por tanto que os efeitos antiulcerogênicos da DHC não são devidos à estimulação da secreção de muco, quando usamos o modelo do estresse, nem à estimulação da secreção de água e bicarbonato no modelo de ligadura do piloro.

Tabela 1. Efeitos da DHC e carbenoxolona no conteúdo gástrico de muco em ratos submetidos a estresse hipotérmico.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	Muco na parede gástrica (µg Azul Alciano /g tecido glandular)
DHC	100	7	101,7 ± 8,8
Carbenoxolona	200	7	267,3 ± 24,8*
Controle	-	7	188,4 ± 32,0

Os resultados são expressos como média ± EP. ANOVA,  $F_{(2,18)} = 11,96$   $P < 0,01$  Teste de Duncan (em relação ao grupo controle): \*  $P < 0,05$

Tabela 2 . Efeitos da DHC e cimetidina na secreção gástrica, volume gástrico, pH e conteúdo ácido total no modelo de úlcera gástrica induzida por ligadura do piloro em ratos.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	Volume Gástrico (mL)	pH Gástrico	Ácido Gástrico Total (mEq/mL)
DHC	100	6	3,2 ± 0,9	1,3 ± 0,3	0,9 ± 0,1
Cimetidina	100	7	5,1 ± 0,7	2,1 ± 0,4	0,5 ± 0,2
Controle	-	7	4,6 ± 0,7	2,6 ± 0,7	0,9 ± 0,1

Os resultados são expressos como média ± EP. ANOVA,  $F_{(2,17)}$ ; volume gástrico = 2,12  $P > 0,05$ , pH = 2,13  $P > 0,05$  e ácido gástrico total = 2,98  $P > 0,05$

Os animais tratados com cimetidina apresentaram uma tendência à diminuição do conteúdo ácido gástrico total. Os efeitos da cimetidina estão relacionados com sua capacidade de inibir a ação da histamina sobre os receptores  $H_2$  na mucosa gástrica. A diminuição do conteúdo ácido gástrico total que foi observada neste experimento, está em completa concordância com os resultados esperados de acordo com dados da literatura (Brunton, 1996).

É sabido que as prostaglandinas inibem o aparecimento das lesões gástricas nos modelos da ligadura do piloro, do etanol, da indometacina e do estresse (Lewis e Hanson, 1991; Rafatullah et al., 1994; Evans, 1991). A DHC mostrou-se efetiva como antiulcerogênico no modelo da ligadura, do etanol e do estresse hipotérmico. Apesar de ser objetivo deste trabalho demonstrar apenas o efeito antiulcerogênico da DHC, e não determinar seu mecanismo de ação farmacológica, estes resultados permitem supor que, pelo menos em parte, o efeito antiulcerogênico da DHC poderia estar relacionado com a estimulação da síntese de prostaglandinas na mucosa gástrica. O menor efeito observado na prevenção das úlceras induzidas pela

indometacina pode ser explicado como uma consequência da inibição da síntese de prostaglandinas provocada pela própria indometacina (Rafatullah et al., 1994). Os efeitos não significativos da DHC sobre o volume, pH e produção de muco gástrico não são incompatíveis com a hipótese de uma participação das prostaglandinas no mecanismo antiulcerogênico. As prostaglandinas estimulam a secreção gástrica de água, bicarbonato e muco, mas também possuem outras ações citoprotetoras da mucosa gástrica tais como a prevenção do estase microvascular, a manutenção do fluxo sanguíneo e a recuperação do epitélio gástrico após o dano (Lewis e Hanson, 1991; Allen et al., 1993), efeitos que poderiam estar sendo estimulados pela DHC.

### **4.3 Toxicidade Aguda Oral e Intraperitoneal**

A toxicidade aguda oral e intraperitoneal da administração de DHC foi avaliada em camundongos machos Swiss albino. Os valores da dose letal 50 % ( $LD_{50}$ ) obtidos pelo método de regressão linear de Litchfield e Wilcoxon (1949) foram 876 mg/Kg e 47,2 mg/Kg para a administração oral e intraperitoneal (ip), respectivamente. Estes valores de toxicidade são altos quando comparados com as  $LD_{50}$  da toxicidade para algumas drogas utilizadas habitualmente no tratamento da úlcera gástrica como, por exemplo, cimetidina (oral 5 g/Kg, ip 650 mg/Kg), carbenoxolona (oral 3,2 g/Kg), omeprazol (oral > 4 g/Kg), e menos tóxica que outras como a prostaglandina sintética misoprostol (oral 81 mg/Kg) (Budavari, 1989).

#### 4.4 Toxicidade Oral Subcrônica (35 dias)

Os efeitos tóxicos da administração oral da DHC durante 35 dias (toxicidade subcrônica) foram estudados em ratos machos e fêmeas Wistar. Esta forma de estudo é empregada na avaliação da toxicidade de drogas e produtos químicos em animais (Szymanska, 1996; Levine et al., 1997; Poon et al., 1997; Koskelo et al., 1997).

Na Tabela 3 e Figuras 8 a 15 podem ser observados os efeitos do tratamento subcrônico com DHC sobre o ganho de peso corporal, eliminação de fezes e urina e consumo de água e ração ao longo do período de tratamento. Através da análise destas figuras parece evidente que o tratamento não induziu diferenças entre os grupos tratados e seus respectivos controles, nos parâmetros avaliados.

Tabela 3. Peso corporal (g) em ratos Wistar depois de tratamento oral com DHC durante 35 dias.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	Machos			Fêmeas		
		n	inicial	final	n	inicial	final
Controle		10	127,7 ± 10,4	280,0 ± 14,7	9	105,3 ± 8,1	194,3 ± 9,6
DHC	25	10	123,9 ± 8,3	282,3 ± 13,7	8	104,4 ± 8,3	185,6 ± 10,3
	50	10	120,1 ± 14,7	266,4 ± 10,2	9	102,0 ± 10,3	178,6 ± 15,5
	100	10	121,6 ± 7,2	266,0 ± 17,7	10	104,8 ± 7,3	185,8 ± 12,4

Valores expressos como médias ± DP. ANOVA Machos  $F_{(3,36)}$  Para inicial = 0,989  $P > 0,05$ ; Para final = 1,713  $P > 0,05$  ANOVA Fêmeas  $F_{(3,32)}$  Para inicial = 0,271  $P > 0,05$ ; Para final = 2,504  $P > 0,05$

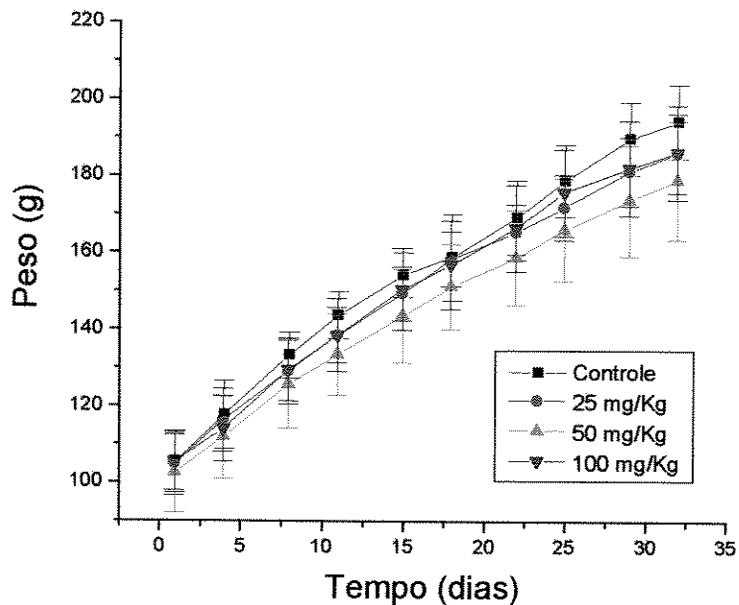


Figura 8. Evolução do peso corporal em ratos fêmeas Wistar durante o tratamento oral de 35 dias com DHC. Cada ponto representa a média  $\pm$  DP (Controle n= 9; grupo 25 mg/Kg n= 8; grupo 50 mg/Kg n= 9; grupo 100 mg/Kg n= 10).

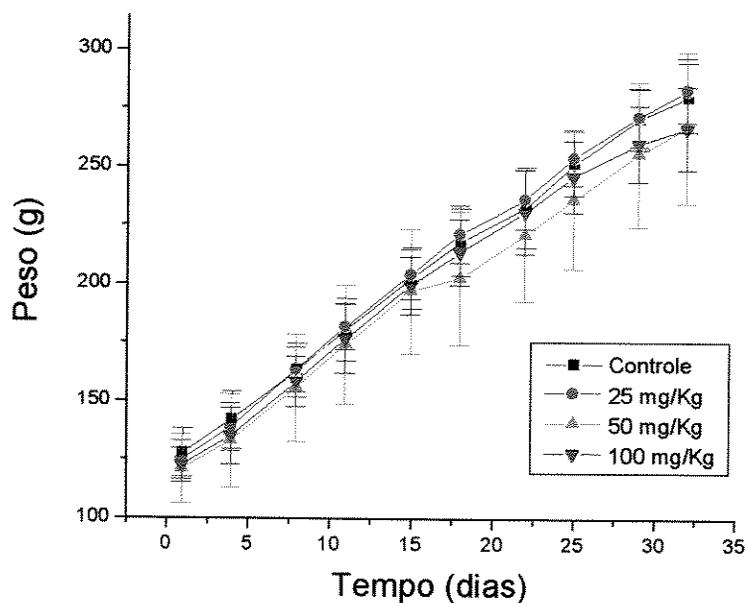


Figura 9. Evolução do peso corporal em ratos machos Wistar durante o tratamento oral de 35 dias com DHC. Cada ponto representa a média  $\pm$  DP (Em todos os grupos n= 10).

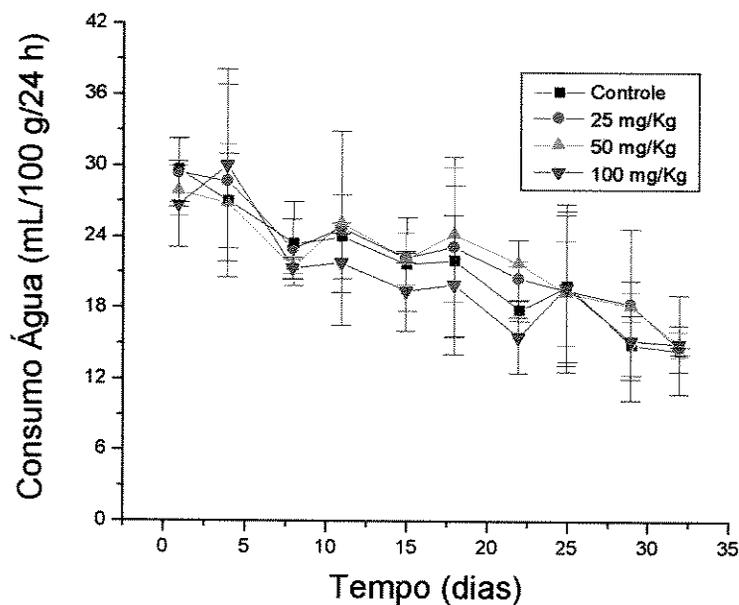


Figura 10. Evolução do consumo de água em ratos fêmeas Wistar, durante o tratamento oral de 35 dias com DHC. Cada ponto representa a média  $\pm$  DP (Controle n= 9; grupo 25 mg/Kg n= 8; grupo 50 mg/Kg n= 9; grupo 100 mg/Kg n= 10). ANOVA  $F_{(3,32)}$  Para dia 1 = 0,48395  $P > 0,05$ ; Para dia 32 = 0,01591  $P > 0,05$

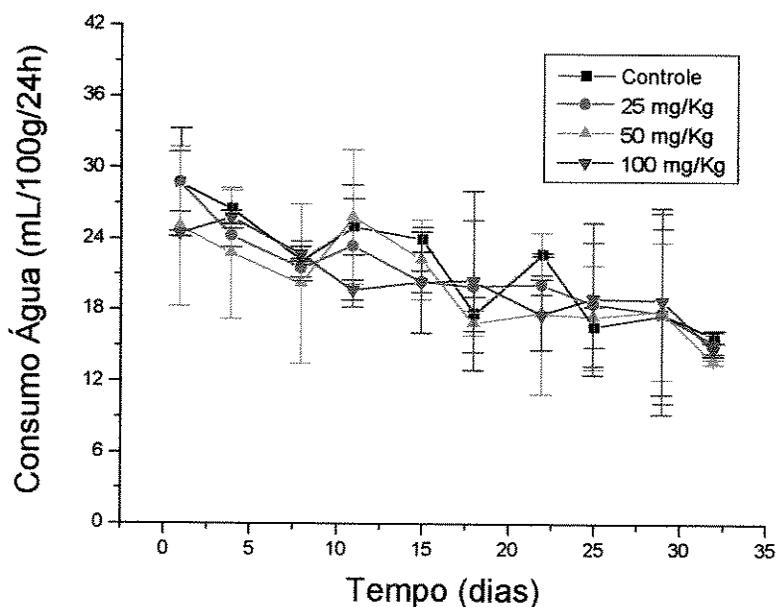


Figura 11. Evolução do consumo de água em ratos machos Wistar, durante o tratamento oral de 35 dias com DHC. Cada ponto representa a média  $\pm$  DP (Em todos os grupos n= 10). ANOVA  $F_{(3,36)}$  Para dia 1 = 0,61511  $P > 0,05$ ; Para dia 32 = 4,1715  $P > 0,05$

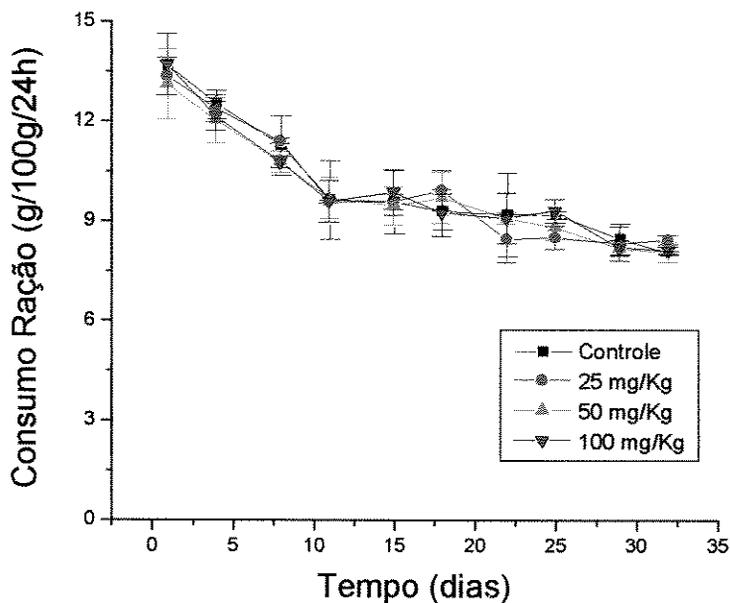


Figura 12. Evolução do consumo de ração em ratos fêmeas Wistar, durante o tratamento oral de 35 dias com DHC. Cada ponto representa a média  $\pm$  DP (Controle n= 9; grupo 25 mg/Kg n= 8; grupo 50 mg/Kg n= 9; grupo 100 mg/Kg n= 10). ANOVA  $F_{(3,32)}$  Para dia 1 = 0,2185  $P > 0,05$ ; Para dia 32 = 1,9918  $P > 0,05$

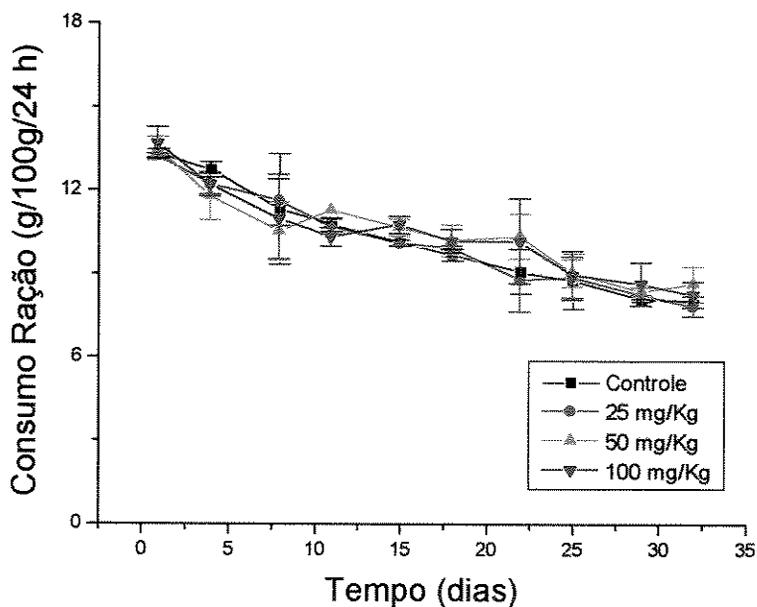


Figura 13. Evolução do consumo de ração em ratos machos Wistar, durante o tratamento oral de 35 dias com DHC. Cada ponto representa a média  $\pm$  DP (Em todos os grupos n= 10). ANOVA  $F_{(3,36)}$  Para dia 1 = 0,54934  $P > 0,05$ ; Para dia 32 = 1,1296  $P > 0,05$

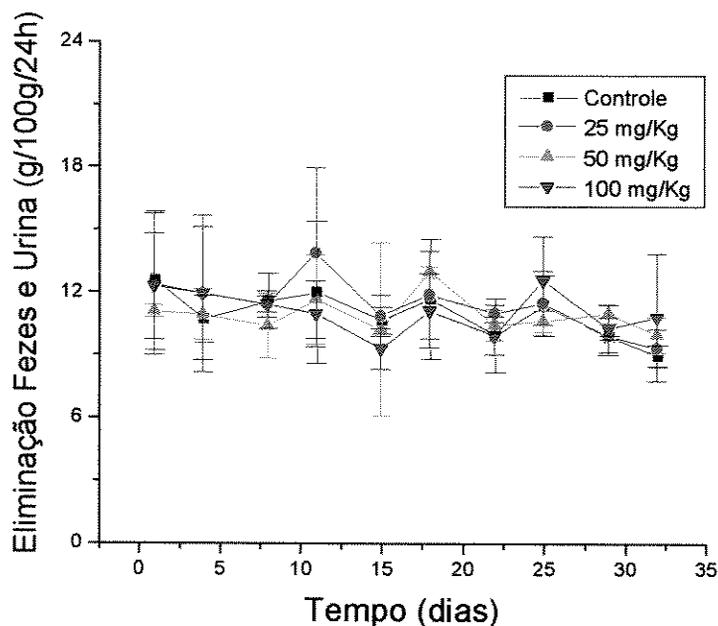


Figura 14. Evolução da eliminação de fezes e urina em ratos fêmeas Wistar, durante o tratamento oral de 35 dias com DHC. Cada ponto representa a média  $\pm$  DP (Controle n= 9; grupo 25 mg/Kg n= 8; grupo 50 mg/Kg n= 9; grupo 100 mg/Kg n= 10). ANOVA  $F_{(3,32)}$  Para dia 1 = 0,1311  $P > 0,05$ ; Para dia 32 = 0,44076  $P > 0,05$

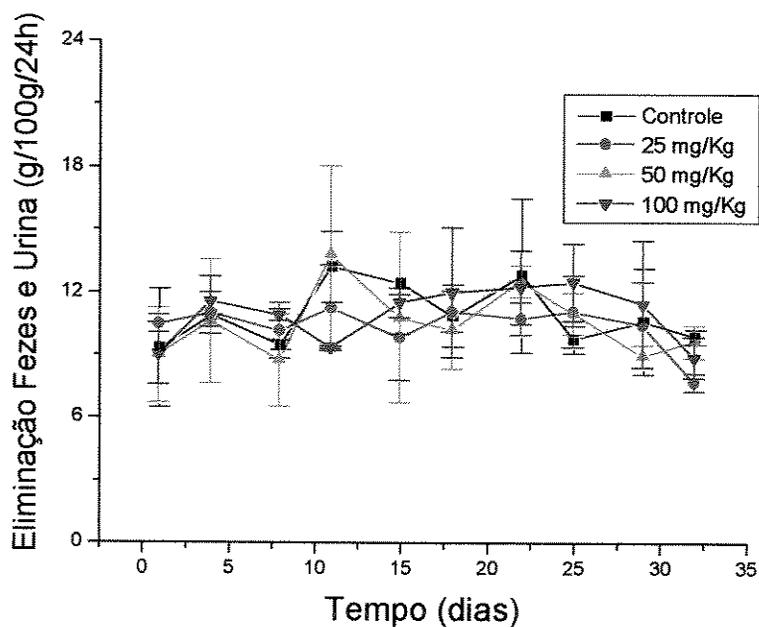


Figura 15. Evolução da eliminação de fezes e urina em ratos machos Wistar, durante o tratamento oral de 35 dias com DHC. Cada ponto representa a média  $\pm$  DP (Em todos os grupos n= 10). ANOVA  $F_{(3,36)}$  Para dia 1 = 0,25142  $P > 0,05$ ; Para dia 32 = 3,2539  $P > 0,05$

Estes resultados que demonstram ausência de efeitos sobre o peso corporal, consumos de água e ração e eliminação de urina e fezes após o tratamento subcrônico com DHC, são similares aos resultados obtidos durante tratamentos de longa duração com drogas antiulcerogênicas conhecidas. Nos estudos realizados pelo grupo de Crean et al., (1981), do tratamento oral com 144 mg/Kg de cimetidina durante 54 meses em cães, não provocou diferenças entre os grupos tratados e os controles. Leslie et al., (1981) demonstraram que o tratamento oral com cimetidina nas doses de 150, 378 e 950 mg/Kg durante dois anos, tampouco induzia alterações nesses parâmetros em ratos. Além disso, o tratamento oral subcrônico com extratos etanólicos que possuem atividade antiulcerogênica, obtidos das plantas *Styrax camporum* e *Caesalpinia ferrea*, não provoca alterações de peso nem do consumo de água e ração em ratos (Bacchi et al., 1995).

No final do período de tratamento os animais foram pesados, autopsiados e seus órgãos vitais retirados e pesados para observar possíveis efeitos de atrofia ou hipertrofia induzidos pela droga.

Nas Figuras 16 e 17 estão apresentados os pesos dos órgãos após tratamento, expressos em relação a 100 g do peso corporal de cada animal. Em ambos os sexos foi encontrado um aumento no peso dos fígados que mostrou-se dependente da dose, enquanto que os outros órgãos não apresentaram diferenças de peso em relação a seus controles.

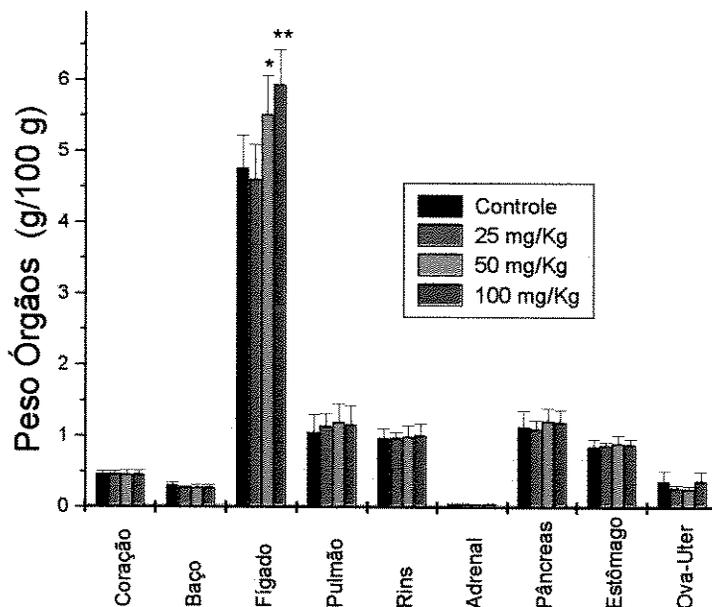


Figura 16. Pesos dos órgãos vitais em ratos fêmeas Wistar, após tratamento oral de 35 dias com DHC. Cada ponto representa a média  $\pm$  DP (Controle n= 9; grupo 25 mg/Kg n= 8; grupo 50 mg/Kg n= 9; grupo 100 mg/Kg n= 10). Os asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle (ANOVA seguido do teste de Fisher). \* P < 0,05; \*\* P < 0,01

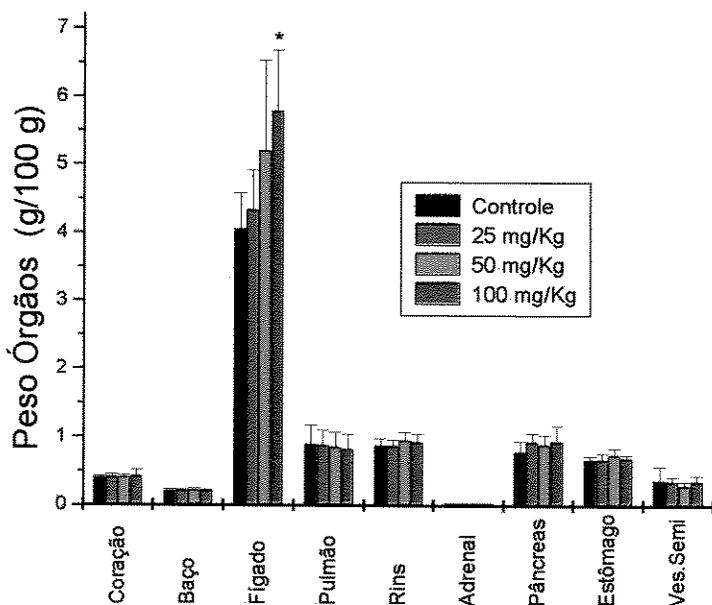


Figura 17. Pesos dos órgãos vitais em ratos machos Wistar, após tratamento oral de 35 dias com DHC. Cada ponto representa a média  $\pm$  DP (Em todos os grupos n= 10). O asterisco indica diferença significativa em relação ao controle (ANOVA seguido do teste de Fisher). \* P < 0,05

O aumento no peso do fígado (hepatomegalia) dos animais tratados é uma das características da hepatotoxicidade induzida por drogas (Lalwani et al., 1997; Poon et al., 1997). A hepatomegalia que foi encontrada nos nossos estudos após o tratamento subcrônico com DHC, não foi observada pelo grupo de Crean (1981) depois de 54 meses de tratamento oral com 144 mg/Kg de cimetidina em cães, nem após dois anos de tratamento oral com cimetidina nas doses de 150 e 378 mg/Kg em ratos (Leslie et al., 1981). Na dose de 950 mg/Kg o tratamento de dois anos provocou aumento no peso dos fígados dos ratos que foi estatisticamente significativo somente nas fêmeas (Leslie et al., 1981).

O tratamento crônico de ratos com cimetidina provocou também uma diminuição do peso dos testículos, das vesículas seminais e da próstata que foi dependente da dose. Estes efeitos foram explicados pela atividade antiandrogênica da cimetidina (Leslie et al., 1981).

Na avaliação dos parâmetros bioquímicos não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos tratados e seus controles nas concentrações séricas de ácido úrico, albumina, globulina, uréia e glicose (Figuras 18 e 19).

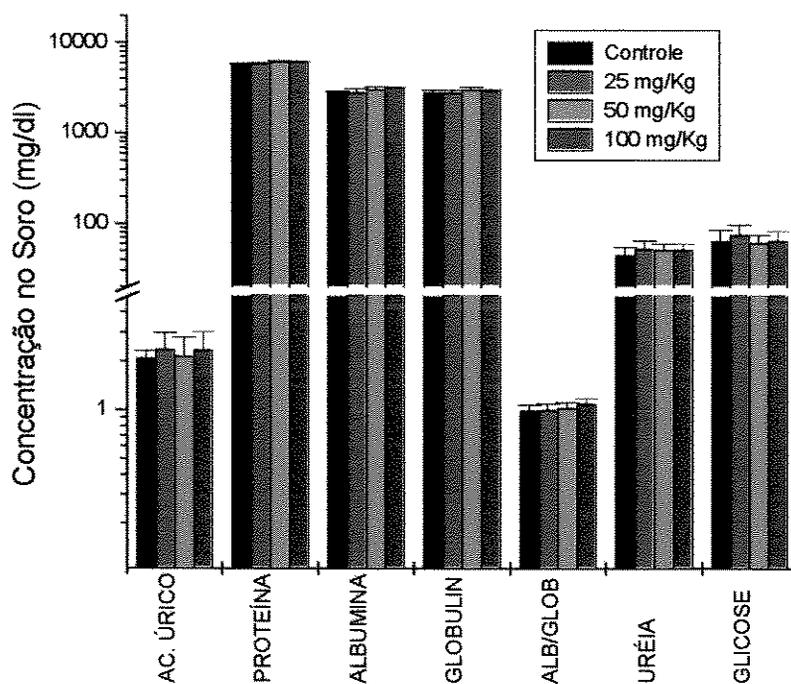


Figura 18. Parâmetros bioquímicos avaliados no soro de ratos fêmeas Wistar, após tratamento oral de 35 dias com DHC. Cada ponto representa a média  $\pm$  DP (Controle n= 9; grupo 25 mg/Kg n= 8; grupo 50 mg/Kg n= 9; grupo 100 mg/Kg n= 10). ANOVA sem diferenças significativas.

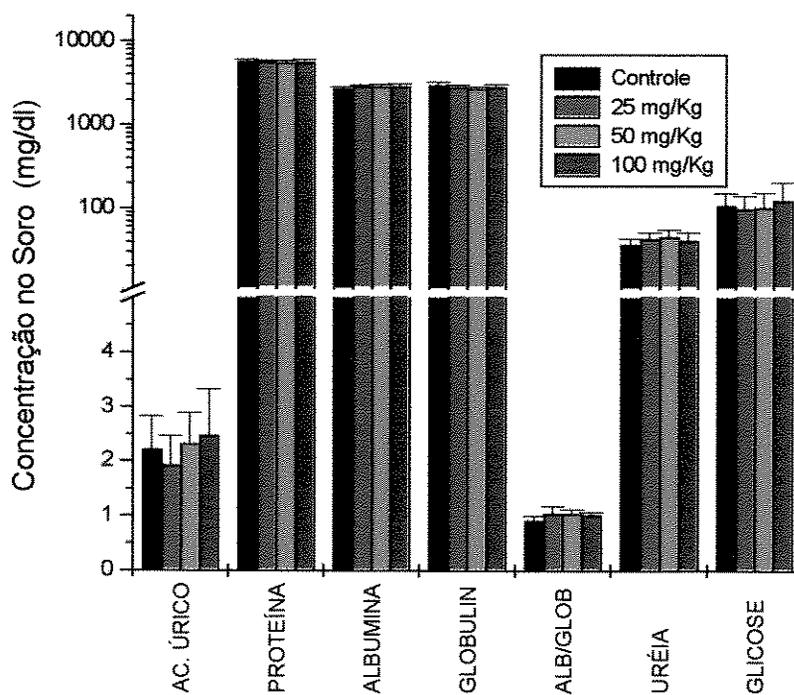


Figura 19. Parâmetros bioquímicos avaliados no soro de ratos machos Wistar, após tratamento oral de 35 dias com DHC. Cada ponto representa a média  $\pm$  DP (Em todos os grupos n= 10). ANOVA sem diferenças significativas.

Uma diminuição estatisticamente significativa nos níveis séricos da enzima fosfatase alcalina e do colesterol, acompanhados por um aumento da atividade da enzima gama glutamil transferase (G-GT), foram observados nas fêmeas (Figuras 20 e 22). Os níveis das enzimas aspartato amino transferase (ASaT) e alanina amino transferase (ALAT) assim como dos lipídios totais e triglicerídios não sofreram modificações. Nos machos tratados estas alterações bioquímicas não foram observadas, exceto uma elevação da atividade da enzima G-GT que não foi estatisticamente significativa (Figuras 21 e 23).

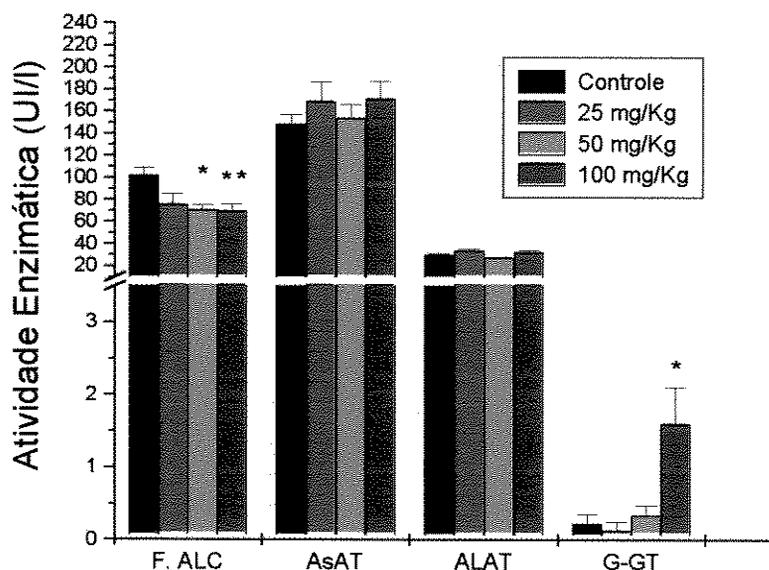


Figura 20. Atividade da enzima fosfatase alcalina (F. ALC), aspartato amino-transferase (AsAT), alanina amino-transferase (ALAT) e  $\gamma$ -glutamil transpeptidase (G-GT), no soro de ratos fêmeas Wistar, após tratamento oral de 35 dias com DHC. Cada ponto representa a média  $\pm$  EP (Controle n= 9; grupo 25 mg/Kg n= 8; grupo 50 mg/Kg n= 9; grupo 100 mg/Kg n= 10). Os asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle (ANOVA seguida do teste de Fisher). \* P < 0,05; \*\* P < 0,01

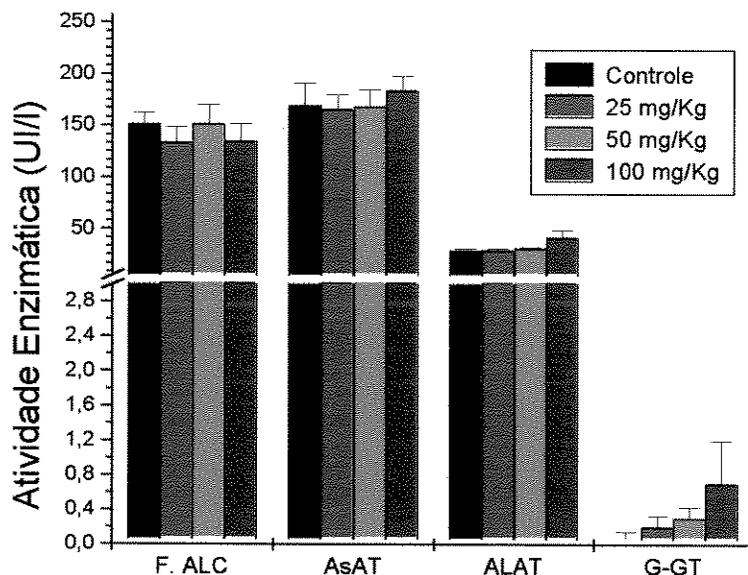


Figura 21. Atividade da enzima fosfatase alcalina (F. ALC), aspartato amino-transferase (AsAT), alanina amino-transferase (ALAT) e  $\gamma$ -glutamil transferase (G-GT), no soro de ratos machos Wistar, após tratamento oral de 35 dias com DHC. Cada ponto representa a média  $\pm$  EP (Em todos os grupos n= 10). ANOVA sem diferenças significativas.

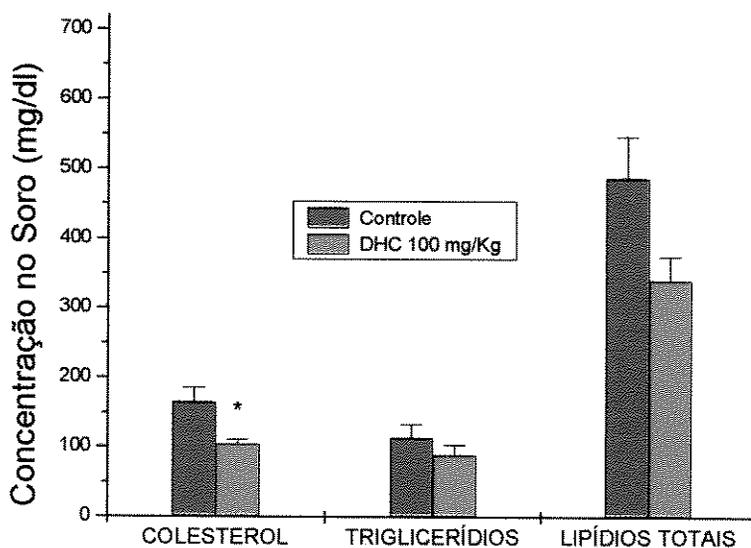


Figura 22. Concentração de lípidios no soro de ratos fêmeas Wistar após tratamento oral de 35 dias com DHC na dose de 100 mg/Kg. Cada ponto representa a média  $\pm$  EP (Controle n= 9; grupo 100 mg/Kg n= 10). O asterisco indica diferença significativa em relação ao controle (ANOVA seguido do teste de Fisher). \* P < 0,05

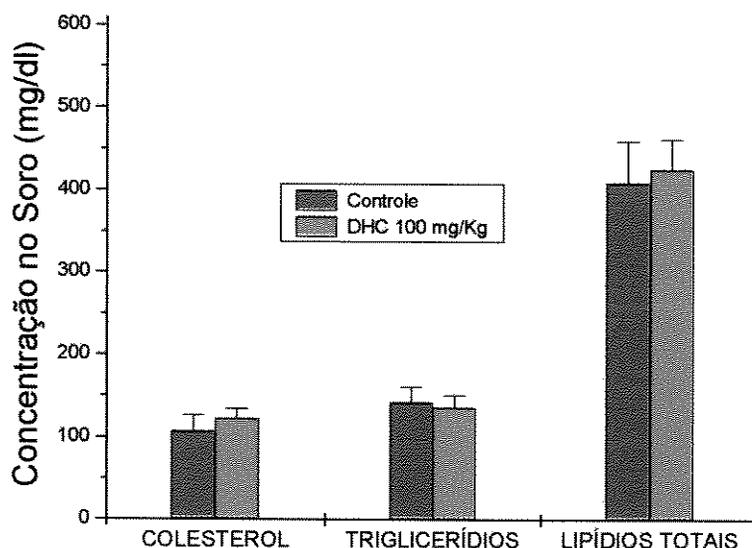


Figura 23. Concentração de lipídios no soro de ratos machos Wistar após tratamento oral de 35 dias com DHC na dose de 100 mg/Kg. Cada ponto representa a média  $\pm$  EP (Em todos os grupos n= 10). ANOVA sem diferenças significativas.

No tratamento oral crônico de dois anos, ratos tratados com cimetidina nas doses de 150 e 378 mg/Kg não evidenciaram efeitos sobre os parâmetros bioquímicos do soro. Na dose de 950 mg/Kg alguns ratos machos apresentaram uma elevação da atividade das enzimas aspartato amino-transferase e alanina amino-transferase (Leslie, et al., 1981). Tampouco foram observadas alterações bioquímicas no soro de cães tratados durante 54 meses com cimetidina na dose de 144 mg/Kg (Crean et al., 1981). Após o tratamento com o antiulcerogênico omeprazole por períodos de dois ou mais anos, um baixo número de pacientes apresentou aumento da atividade plasmática das amino-transferases hepáticas (McTavish et al., 1991).

O estudo dos parâmetros hematológicos não mostrou diferenças estatisticamente significativas para o número de glóbulos vermelhos, concentração de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, número de glóbulos brancos

nem para a contagem diferencial de glóbulos brancos entre os diferentes grupos de ratos fêmeas tratados com a droga e seus controles (Tabela 4 e Figura 24).

Tabela 4. Parâmetros hematológicos de ratos fêmeas Wistar após tratamento oral de 35 dias com DHC.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	GV (x 10 <sup>6</sup> )	Hb (g %)	HCT (%)	VCM (μ <sup>3</sup> )	GB (x 10 <sup>3</sup> )
Controle		9	7,5 ± 0,8	14,9 ± 1,5	38,1 ± 3,8	50,6 ± 0,9	11,0 ± 2,9
DHC	25	8	7,9 ± 0,7	15,5 ± 0,9	40,0 ± 2,6	50,1 ± 1,1	11,4 ± 3,0
	50	9	7,9 ± 0,4	15,7 ± 0,7	39,1 ± 2,3	49,7 ± 0,8	11,8 ± 3,4
	100	10	7,5 ± 0,7	14,8 ± 1,6	37,4 ± 3,6	49,9 ± 1,0	10,3 ± 1,7

Os valores estão expressos como média ± DP. ANOVA F<sub>(3,32)</sub> Para Glóbulos Vermelhos (GV) = 1,259 P > 0,05; Para Hemoglobina (Hb) = 1,306 P > 0,05; Para Hematócrito (Hto) = 1,462 P > 0,05; Para Volume Corpuscular Médio (VCM) = 1,285 P > 0,05; Para Glóbulos Brancos (GB) = 0,511 P > 0,05

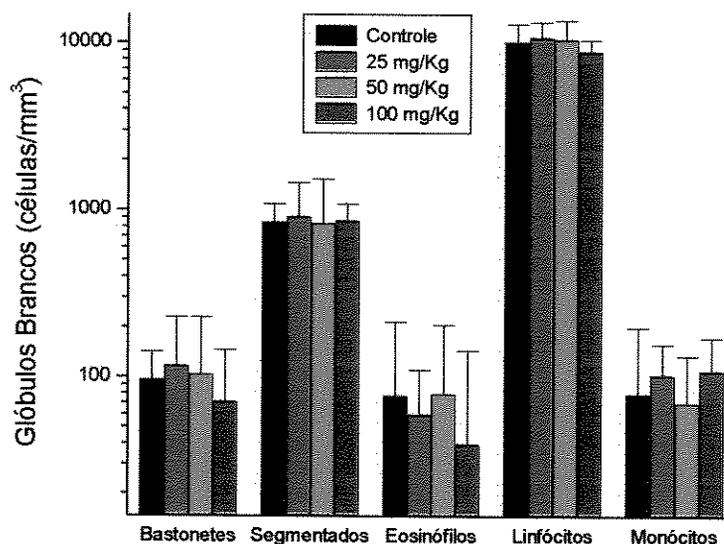


Figura 24. Contagem diferencial de glóbulos brancos em ratos fêmeas Wistar após tratamento oral de 35 com DHC. Cada ponto representa a média ± DP (Controle n = 9; grupo 25 mg/Kg n = 7; grupo 50 mg/Kg n = 8; grupo 100 mg/Kg n = 7). ANOVA sem diferenças significativas.

Resultados similares aos anteriores foram encontrados nos grupos de ratos machos, excetuando uma diminuição no número de glóbulos vermelhos, na

concentração de hemoglobina e hematócrito no grupo tratado com a dose de 100 mg/Kg (Tabelas 5 e Figura 25).

Tabela 5. Parâmetros hematológicos de ratos machos Wistar após tratamento oral de 35 dias com DHC.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	GV (x 10 <sup>6</sup> )	Hb (g %)	HCT (%)	VCM (μ <sup>3</sup> )	GB (x 10 <sup>3</sup> )
Controle		10	8,4 ± 0,4	16,8 ± 0,9	43,4 ± 2,4	51,1 ± 0,8	11,5 ± 2,5
DHC	25	10	8,3 ± 0,7	16,1 ± 0,9	42,9 ± 3,2	51,2 ± 0,9	11,2 ± 2,0
	50	10	8,1 ± 0,7	15,9 ± 1,0	42,2 ± 3,2	50,9 ± 0,8	12,0 ± 2,7
	100	10	7,7 ± 0,7*	15,3 ± 1,5*	38,1 ± 4,1*	50,1 ± 0,9	11,4 ± 2,3

Os valores estão expressos como média ± DP. ANOVA F<sub>(3,36)</sub> Para Glóbulos Vermelhos (GV) = 3,102 P < 0,05; Para Hemoglobina (Hb) = 3,175 P < 0,05; Para Hematócrito (HCT) = 5,524 P < 0,05; Para Volume Corpuscular Médio (VCM) = 1,38007 P > 0,05; Para Glóbulos Brancos (GB) = 0,225 P > 0,05; Teste de Fisher: \* P < 0,005

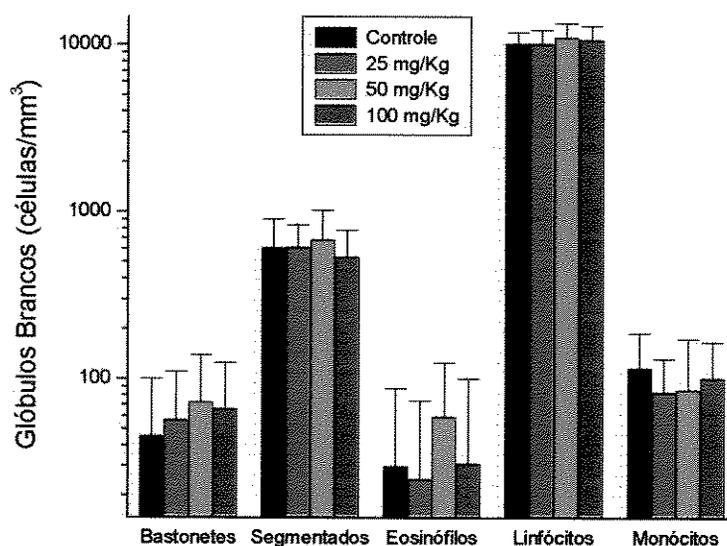


Figura 25. Contagem diferencial de glóbulos brancos em ratos machos Wistar após tratamento oral de 35 dias com DHC. Cada ponto representa a média ± DP (Controle n= 9; grupo 25 mg/Kg n=9; grupo 50 mg/Kg n=10; grupo 100 mg/Kg n= 10). ANOVA sem diferenças significativas.

No tratamento oral crônico com cimetidina não foram observados efeitos sobre os parâmetros hematológicos de ratos (150, 378 e 950 mg/Kg) nem de cães (144 mg/Kg) (Leslie et al., 1981; Crean et al., 1981).

Na análise da urina após tratamento tampouco foram observadas diferenças entre os ratos machos ou fêmeas tratados e seus respectivos controles. Os valores de proteínas, pH e densidade dos animais tratados foram iguais aos controles (Tabelas 6 e 7), e não foi detectada a presença de glicose, bilirrubina, corpos cetônicos nem hemácias na urina dos animais.

O tratamento oral crônico de ratos (150, 378 e 950 mg/Kg) e cães (144 mg/Kg) com cimetidina não provocou alterações dos parâmetros da urina dos animais (Leslie et al., 1981; Crean et al., 1981).

Tabela 6. Características da urina de ratos fêmeas Wistar após tratamento oral de 35 dias com DHC.

Dose (mg/Kg)	n	Proteína (mg/dl)	pH	Densidade
Controle	8	65 ± 37	6,37 ± 0,4	1,028 ± 0,003
25	8	73 ± 36	6,25 ± 0,3	1,026 ± 0,004
50	8	65 ± 37	6,68 ± 0,4	1,026 ± 0,005
100	10	51 ± 33	6,55 ± 0,4	1,026 ± 0,005

Os valores estão expressos como média ± DP. ANOVA F<sub>(3,30)</sub> Para Proteína = 0,6214 P > 0,05; Para pH = 2,5270 P > 0,05; Para Densidade = 0,8486 P > 0,05.

Tabela 7. Características da urina de ratos machos Wistar após tratamento oral de 35 dias com DHC.

Dose (mg/Kg)	n	Proteína (mg/dl)	pH	Densidade
Controle	10	58 ± 36	6,35 ± 0,2	1,029 ± 0,001
25	10	44 ± 30	6,45 ± 0,3	1,029 ± 0,001
50	10	58 ± 36	6,45 ± 0,4	1,028 ± 0,003
100	9	45 ± 31	6,55 ± 0,4	1,027 ± 0,004

Os valores estão expressos como média ± DP. ANOVA F<sub>(3,35)</sub> Para Proteína = 0,5164 P > 0,05; Para pH = 0,63177 P > 0,05; Para Densidade = 1,2643 P > 0,05.

Devido às diferenças de peso encontradas nos fígados dos animais tratados, quatro destes órgãos de cada grupo foram retirados para análise histopatológica, dos animais controle e dos tratados com DHC na dose de 50 mg/Kg e 100 mg/Kg. Os resultados desta avaliação, registrados de acordo com sua intensidade: de 0 até 20 % de dano (-), 20 - 40 % (+), 40 - 60 % (++) , 60 - 80 % (+++) e 80 - 100 % (++++), estão apresentados na Tabela 8. Pode ser observado que o tratamento provocou alterações degenerativas das células hepáticas caracterizadas como tumefação turva (turbid swelling), vacuolização citoplasmática e alterações nucleares definidas. Há núcleos condensados e densos (picnose), núcleos quebrados em pequenos fragmentos (kariorexis) engrossamentos da membrana nuclear e núcleos vazios. Estes efeitos tóxicos mostraram-se dependentes da dose e do sexo do animal, sendo mais pronunciados nas fêmeas.

Tabela 8. Histopatologia dos fígados de ratos Wistar após tratamento oral de 35 dias com DHC.

Dose (mg/Kg)	n	Tumefação Turva					Vacuolização Citoplasmática					Alterações Nucleares				
		-	+	2+	3+	4+	-	+	2+	3+	4+	-	+	2+	3+	4+
<b>Machos</b>																
Controle	4	4					4					4				
50	4			4			1	3				4				
100	4				4					4				4		
<b>Fêmeas</b>																
Controle	4	4					4					4				
50	4				4			1	3					4		
100	4					4					4					4

No tratamento oral crônico (dois anos) com cimetidina os ratos que receberam doses de 150 e 378 mg/Kg não apresentaram alterações histopatológicas hepáticas. No grupo de animais que recebeu a dose de 950 mg/Kg foi observada vacuolização citoplasmática e necrose dos hepatócitos. Estes resultados foram mais freqüentes nos machos, e concordam com a elevação da atividade das enzimas aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase nessas condições experimentais (Leslie et al., 1981).

Os achados no tratamento subcrônico com DHC tais como o aumento no peso dos fígados dos animais tratados, conjuntamente com as alterações séricas das enzimas fosfatase alcalina e G-GT e do nível de colesterol, assim como a diminuição dos glóbulos vermelhos, devem ser considerados como uma clara evidência de dano hepático (Szymanska, 1996; Lalwani et al., 1997; Poon et al., 1997; Henry et al., 1997; Crowell et al., 1997; Tillman et al., 1997). A análise histopatológica não deixa dúvidas

em relação ao efeito hepatotóxico do tratamento com DHC. As alterações morfológicas a nível celular são comuns nos casos de hepatotoxicidade induzida por compostos químicos e geralmente se expressam como vacuolização citoplasmática, tumefação turba e alterações do núcleo celular (Yoshitake et al., 1991; Corcuera et al., 1996; Rogiers et al., 1997; Poon et al., 1997; Crowell et al., 1997; Kleiner, 1997).

É sabido que muitos compostos são **biotransformados** no fígado originando metabólitos que podem ser menos tóxicos (**destoxificação**) ou mais tóxicos (**bioativação**) (Van Iersel et al., 1986; Roguet et al., 1993; Fry et al., 1995; Ponsoda et al., 1995; Klaasen, 1996; Lieber, 1997a).

Há diferentes etapas na metabolização hepática de drogas e produtos químicos e têm sido classificadas em duas fases. A fase I, que envolve reações catalizadas pelas diversas isoformas do citocromo P-450 e a fase II, que corresponde a reações nas quais os metabólitos gerados na fase I são conjugados com glutathione, sulfeto e ácido glucurônico, entre os mais importantes, para facilitar sua eliminação (Roguet et al., 1993; Klaasen, 1996; Allameh et al., 1997). Os compostos que sofrem o fenômeno de bioativação habitualmente são produzidos na fase I; e dependerá do nível hepático das enzimas transferases e substratos que participam na fase II se estes metabólitos tóxicos provocarão algum dano no fígado. Por exemplo, é comum observar que compostos que são bioativados no fígado, primeiramente esgotam a reserva de glutathione para em seguida exercer seu efeito hepatotóxico (Carvalho et al., 1996; Lekehal et al., 1996; Gao et al., 1996; Allameh et al., 1997) Esta toxicidade pode ser inibida experimentalmente elevando o conteúdo celular de glutathione reduzida (Gao et al., 1996), ou empregando inibidores do citocromo P-450 o que impediria a

bioativação (Hammond et al., 1996 ; Fransson-Steen et al., 1997; Rodríguez e Acosta, 1997).

Uma das principais causas da grande hepatotoxicidade encontrada para diferentes drogas e compostos químicos que são bioativados é que a maioria das isoformas conhecidas do citocromo P-450 pode ser induzida no contato do fígado com as diferentes drogas (Bernhart, 1995; Klaasen, 1996; Lieber 1997a). Desta forma cria-se um ciclo de intoxicação onde a indução do citocromo P-450 pela droga amplifica o efeito tóxico dos metabólitos reativos gerados na fase I durante sua metabolização ou mesmo de outros compostos bioativados, que em condições de não indução, apresentariam níveis menores de toxicidade (Lieber, 1997b).

Atualmente sabe-se que em muitos casos a hepatotoxicidade produzida pela bioativação de drogas e compostos químicos ocorre devido à formação de adutos covalentes entre o metabólito reativo que foi formado na fase I e as macromoléculas do próprio hepatócito (Klassen, 1996; Kim e Cho, 1997; Njoku et al., 1997; Pumford et al., 1997). Entre os casos melhor documentados podemos citar o analgésico acetaminofeno (paracetamol) e o anestésico halotano, cujos metabólitos produzidos na fase I são capazes de ligar-se covalentemente às proteínas dos hepatócitos induzindo hepatotoxicidade (Madan e Parkinson, 1996; Matthews et al., 1996; Landin et al., 1996; Njoku et al., 1997). Foi demonstrado que o metabólito do acetaminofeno se liga covalentemente a resíduos de cisteína das proteínas do hepatócito (Matthews et al., 1996). Um mecanismo similar de intoxicação por metabólitos da fase I tem sido descrito também para outros compostos químicos tais como bromodichlorometano,

anfetamina e dicloropropanois (Gao et al., 1996; Carvalho et al., 1996; Hammond et al., 1996; Kim e Cho, 1997).

Entre as proteínas alvo para a formação de adutos covalentes com os metabólitos da fase I têm sido encontradas proteínas do citoesqueleto e da membrana celular (Lekehal et al., 1996), enzimas citosólicas (Pumford et al., 1997) proteínas microsossomais (Madan e Parkinson, 1996) e enzimas mitocondriais (Landin et al., 1996; Hammond et al., 1996). Por outro lado, Gao e colaboradores (1996) têm referido a formação de adutos covalentes entre os metabólitos do composto bromo biclorometano e os lipídios microsossomais, sendo o efeito revertido pela glutathione reduzida, o que permite pensar que, além das proteínas, outras moléculas do hepatócito poderiam participar na formação de adutos covalentes com os metabólitos produzidos na bioativação.

Outros diterpenos provenientes de plantas causam efeitos hepatotóxicos pela formação de adutos covalentes entre seus metabólitos da fase I e as proteínas dos hepatócitos (Lekehal et al., 1996). Os diversos tipos de alterações encontradas após tratamento oral de 35 dias com a diterpenolactona *trans*-desidrocrotonina, são encontrados na literatura como evidência incontestável de intoxicação química do fígado (Szymanska, 1996; Lalwani et al., 1997; Poon et al., 1997; Henry et al., 1997; Crowell et al., 1997; Tillman et al., 1997), e podem ser explicados por um mecanismo similar onde a DHC é bioativada na fase I e seus metabólitos reativos formam adutos covalentes com as proteínas do hepatócito induzindo a toxicidade observada. Esta hipótese encontra-se fundamentada e apoiada pelos achados experimentais do estudo da citotoxicidade da DHC em culturas primárias de hepatócitos de rato, onde foi

observado que a citotoxicidade do composto é diminuída quando as células expressam níveis menores de atividade do citocromo P-450.

As diferentes intensidades da intoxicação hepática observada entre as fêmeas e os machos, para alguns dos parâmetros avaliados, reflete as diferenças no nível de expressão das diversas isoformas do citocromo P-450. Sabe-se que na regulação da expressão do citocromo P-450 existem diferenças devidas ao sexo dos animais (Legraverend et al., 1992; Bernhardt, 1995; Lieber, 1997a) e têm sido descritos diferentes níveis de hepatotoxicidade dependentes do sexo dos animais expostos ao mesmo composto químico em iguais condições experimentais (Carfagna et al., 1996).

Embora a DHC tenha apresentado efeitos hepatotóxicos no tratamento subcrônico, sua possível utilização como droga antiulcerogênica não pode ser completamente descartada. Diversas drogas comerciais são indutoras de hepatotoxicidade, dependendo da dose e do tempo de administração (Rogiers et al., 1997; Allameh et al., 1997; Bauer e Bircher, 1997; Rodríguez e Acosta, 1997). Conhecidos antiulcerogênicos como a cimetidina e outros anti-histamínicos  $H_2$  encontram-se sob suspeita de serem hepatotóxicos potenciais (García-Rodríguez et al., 1997). Por outro lado, deve-se considerar que habitualmente estes quadros de dano hepático induzido por agentes químicos se reverterem gradualmente após o término do tratamento, devido ao reparo do tecido hepático (Kulkarni et al., 1996; Levine et al., 1997; Bruccoleri et al., 1997).

#### 4.5 Citotoxicidade em Culturas de Células V79

Na Figura 26 estão apresentados os efeitos do metanol, sobre a viabilidade de culturas de células V79. Para a concentração de 1 %, correspondente a 0,246 M, que foi a concentração final de metanol empregada em todos os experimentos de citotoxicidade, não são observados efeitos tóxicos. Os valores de  $IC_{50}$  que são encontrados na literatura para o tratamento de 24 h com metanol estabelecem concentrações de 1,445 M para as células V79 e 1,230 M para cultura primária de hepatócitos de rato (Clemenson et al., 1996).

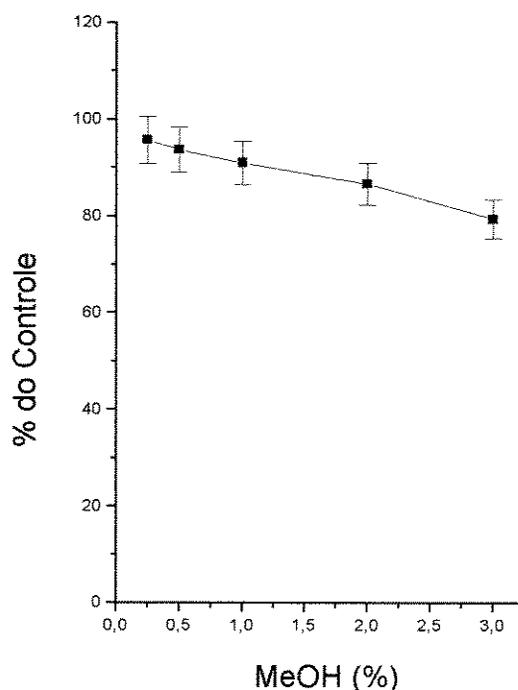


Figura 26. Citotoxicidade do metanol sobre culturas de células V79 após tratamento de 24 horas, avaliada pelo conteúdo de DNA (Abs 260 nm). Cada ponto representa a média de 3 experimentos  $\pm$  DP.

De acordo com estes resultados, nos experimentos de citotoxicidade da DHC, onde a droga foi sempre dissolvida inicialmente em metanol, para dar uma concentração final no meio de tratamento de 1% de metanol, não é esperado encontrar

efeitos tóxicos causados pelo solvente. Embora exista uma margem de segurança grande, os testes de citotoxicidade foram sempre realizados mantendo a concentração de metanol em 1 %.

Os efeitos citotóxicos da DHC sobre culturas de células V79 foram avaliados pelo conteúdo de DNA, incorporação do vermelho neutro e redução do MTT após 24 h de tratamento. Na Figura 27 pode ser observado que o efeito tóxico mostrou-se dependente da dose e que os valores das  $IC_{50}$  obtidas pelos três métodos são próximos, dentro de uma faixa que abrange desde 230  $\mu$ M para o conteúdo de DNA até 360  $\mu$ M para a redução do MTT.

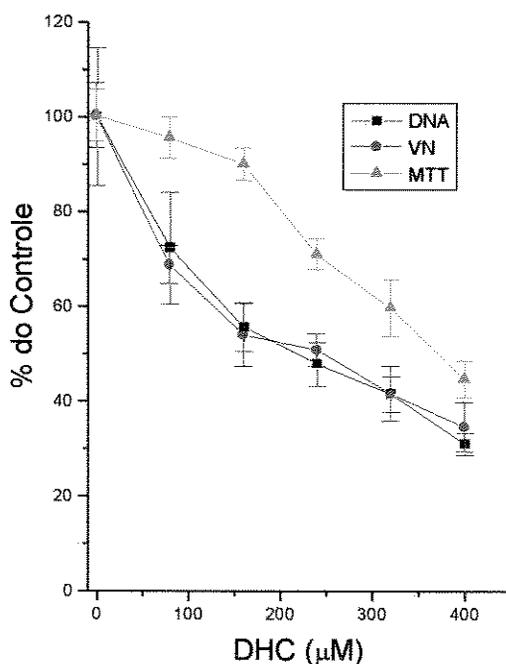


Figura 27. Viabilidade celular de culturas de células V79 após tratamento de 24 horas com DHC, avaliada pelo conteúdo de DNA (Abs 260 nm), pela incorporação de Vermelho Neutro (VN) (Abs 540 nm) e pela redução do MTT (Abs 570 nm). Cada ponto representa a média de três experimentos  $\pm$  DP.

Se considerarmos que o conteúdo de DNA permite estimar o número de células (Bianchi e Fortunati 1990) e, que o valor da  $IC_{50}$  para a incorporação do

vermelho neutro encontra-se próximo, é possível afirmar que a menor incorporação do corante vermelho neutro, observado como consequência do tratamento com a droga, é proporcionalmente menor devido ao menor número de células presentes na cultura e não a efeitos tóxicos específicos da DHC sobre os lisossomas.

É interessante destacar que a curva da redução do MTT apresentou um deslocamento à direita, em relação ao conteúdo de DNA e à incorporação de vermelho neutro (Figura 27). Este resultado indica que as células V79 que sobreviveram ao tratamento com DHC possuem uma maior capacidade de reduzir o MTT. A redução do MTT ocorre nas mitocôndrias, é catalisada pela enzima succinato desidrogenase e permite estimar a viabilidade celular (Mosmann, 1983). Nos últimos anos foi estabelecido que a capacidade das células para reduzir o MTT depende não apenas da enzima succinato desidrogenase mas também do balanço  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  (Fry et al., 1995). Pode-se especular que o tratamento com a DHC alterou esse balanço ou então, de alguma forma, aumentou a atividade dessa enzima mitocondrial por um mecanismo ainda desconhecido por nós.

Recentemente os efeitos citotóxicos dos produtos químicos têm sido classificados em três categorias (Clemedson et al., 1996; Seibert et al., 1996). A **citotoxicidade geral** ou **basal** que está referida a efeitos adversos sobre a integridade das membranas ou do citoesqueleto, metabolismo, síntese, degradação ou liberação de componentes ou produtos celulares, à regulação dos íons e à divisão celular, em células pouco o não diferenciadas (Clemedson et al., 1996; Seibert et al., 1996). Nos fenômenos de citotoxicidade basal todos os tipos celulares apresentam uma sensibilidade similar, e os valores das  $\text{IC}_{50}$  obtidos nos ensaios de citotoxicidade,

avaliando diferentes alvos celulares, geralmente se encontram próximos (Clemedson et al., 1996).

Por outro lado, a **citotoxicidade seletiva** ou **órgão específica** é referida à situações onde alguns tipos de células diferenciadas (por exemplo hepatócitos ou neurônios) são mais sensíveis que outros aos efeitos tóxicos de um produto químico. Isso pode ocorrer como consequência da biotransformação do composto ou sua interação com receptores específicos das células ou ainda à presença de carregadores específicos de incorporação do composto, localizados na membrana celular (Seibert et al., 1996).

A terceira categoria é chamada de **citotoxicidade específica de funções celulares** ou **toxicidade de organização**, e corresponde a efeitos tóxicos que afetam estruturas ou processos comuns das células em geral e, conseqüentemente, envolvem todo o organismo. São exemplos deste tipo de toxicidade as alterações das comunicações entre as células que ocorrem a nível de síntese, liberação, degradação e união com seus respectivos receptores das citoquinas, neurotransmissores e hormônios (Seibert et al., 1996).

De acordo a estes critérios, os resultados obtidos no estudo da citotoxicidade da DHC sobre as células V79 devem ser classificados como fenômenos de citotoxicidade basal. Segundo Clemedson e colaboradores (1996) a toxicidade basal pode ser testada empregando linhagens de células não diferenciadas, como a V79, já que a maioria destas células possui uma resposta similar, independentemente da linhagem ou do alvo celular avaliado no ensaio.

Outra idéia importante que deve ser discutida nesta parte do trabalho é a relação *in vivo* - *in vitro* dos resultados obtidos no estudo da DHC. Como foi dito na introdução, um dos objetivos fundamentais no desenvolvimento dos testes *in vitro* é conseguir estabelecer correlações com os valores de toxicidade *in vivo* o que permitirá reduzir o consumo de animais de experimentação. Após estudar as correlações entre as toxicidades *in vivo* ( $LD_{50}$ ) e as citotoxicidades ( $IC_{50}$ ) de 44 compostos químicos, Halle e Spielmann (1992) graficando todos os valores de  $LD_{50}$  e  $IC_{50}$  obtidos por diferentes técnicas para os 44 compostos criaram uma equação que relaciona os valores de  $IC_{50}$  obtidos nos ensaios com células V79 e as  $LD_{50}$  esperadas para testes de toxicidade oral aguda em ratos. A relação matemática proposta por estes autores estabelece que  $\text{Log } LD_{50} = a + b \text{ Log } IC_{50}$ , onde **a** é o intercepto em y e **b** é a inclinação da reta de regressão, valores que para as células V79 correspondem a 0,577 e 0,485 respectivamente. De acordo com esta equação e utilizando os três valores das  $IC_{50}$  obtidas nos testes de citotoxicidade com células V79 (230 - 360  $\mu\text{M}$ ), a  $LD_{50}$  esperada na toxicidade oral aguda para a DHC em ratos seria de aproximadamente 600-800 mg/Kg. Este valor encontra-se muito próximo dos 876 mg/Kg que foram encontrados nos testes com animais e que estão detalhados no item 4.3. Isto apoia e justifica continuar o desenvolvimento de técnicas *in vitro* visando a substituição gradual dos testes com animais.

O valor da  $IC_{50}$  para a DHC em culturas de células V79 encontra-se na mesma faixa de algumas drogas de uso comum, como por exemplo diazepam ( $IC_{50}$  209  $\mu\text{M}$ ), propranolol ( $IC_{50}$  120  $\mu\text{M}$ ), indometacina ( $IC_{50}$  170  $\mu\text{M}$ ) e fenilbutazona ( $IC_{50}$  660  $\mu\text{M}$ ) (Halle e Spielmann, 1992; Clemedson et al., 1996). Apesar do anterior, a citotoxicidade da DHC parece como extremamente alta quando comparada com a

cimetidina que na concentração de 1,5 mM provocou só leves efeitos tóxicos nas culturas de células V79 (Figura 28).

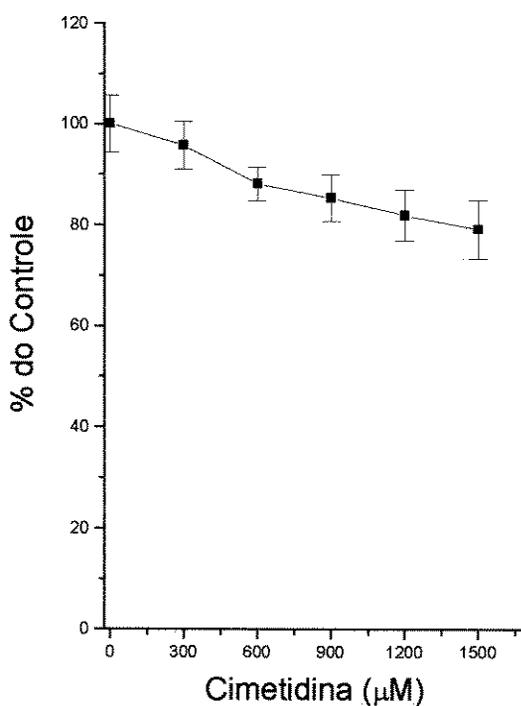


Figura 28. Viabilidade celular de culturas de células V79 após tratamento de 24 horas com cimetidina, avaliada pelo conteúdo de DNA (Abs 260 nm). Cada ponto representa a média de três experimentos  $\pm$  DP.

Outros dois parâmetros que permitem caracterizar o efeito citotóxico de um composto são o tempo de exposição à droga (Clemenson et al., 1996) e a capacidade de recuperação das células após tratamento (Walum et al., 1996). Nas Figuras 29 e 30 é possível observar que o efeito tóxico da DHC sobre as células V79 é dependente do tempo de exposição e que após tratamento as células não apresentam capacidade de recuperação do dano produzido pela droga.

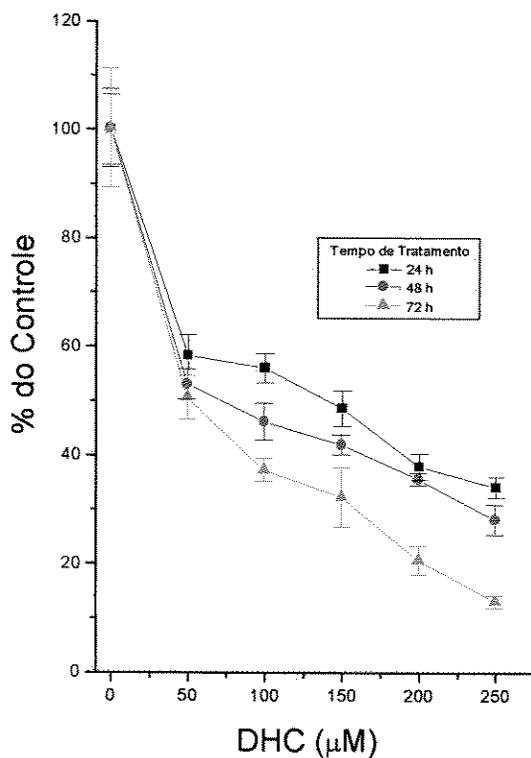


Figura 29. Efeito do tempo de exposição à DHC sobre culturas de células V79 avaliada pelo conteúdo de DNA (Abs 260 nm). Cada ponto representa a média de três experimentos  $\pm$  DP.

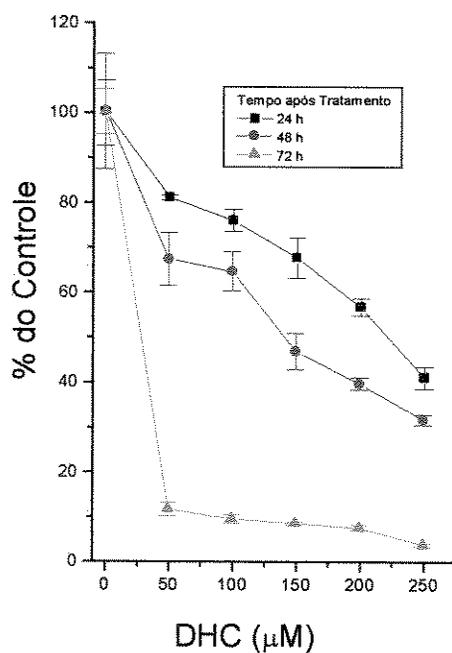


Figura 30. Recuperação de culturas de células V79 após tratamento com DHC durante 24 horas avaliada pelo conteúdo de DNA (Abs 260 nm). Cada ponto representa a média de três experimentos  $\pm$  DP.

Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que as células V79 em cultura não apresentam expressão do sistema microsomal de metabolização de drogas (Fry et al., 1993) e conseqüentemente a DHC, uma molécula pouco polar, se acumula nas células provocando alterações que serão dependentes do tempo de tratamento. Deve-se lembrar que nos compostos com efeitos de citotoxicidade basal, foi encontrada uma correlação entre sua lipofilicidade e a toxicidade celular. É sabido que os compostos mais lipofílicos apresentam uma maior citotoxicidade (Rosenkranz et al., 1992). Os efeitos tóxicos dos compostos lipofílicos estão em geral intimamente relacionados com as alterações que eles induzem na estrutura das membranas celulares. McKarns et al., (1997) demonstraram que existe correlação positiva ( $r = 0,993$ ) entre a hidrofobicidade de vários álcoois de cadeia curta e sua citotoxicidade, avaliada pela liberação da enzima lactato desidrogenase. Esse ensaio permite estimar a integridade da membrana plasmática.

Num sistema de cultura como o nosso, onde não existe metabolização da droga nem troca permanente do meio, um composto lipofílico permanecerá um tempo maior incorporado nas membranas das células, prolongando seus efeitos tóxicos.

#### **4.6 Citotoxicidade em Culturas Primárias de Hepatócitos**

As Figuras 31 e 32 apresentam os efeitos citotóxicos da DHC sobre culturas primárias de hepatócitos de rato, avaliados pelo conteúdo de DNA, incorporação do corante vermelho neutro e a redução do MTT. É possível observar que os valores das  $IC_{50}$  obtidas nos testes de conteúdo de DNA ( $300 \mu M$ ) e

incorporação do vermelho neutro (400  $\mu\text{M}$ ) encontram-se próximos e são similares aos valores obtidos nos ensaios de citotoxicidade utilizando células V79, enquanto que pelo teste do MTT (Figura 32) a DHC mostrou-se extremamente tóxica, com uma  $\text{IC}_{50}$  de 5  $\mu\text{M}$ . É claro que o efeito citotóxico encontrado no ensaio do MTT não pode ser atribuído a um menor número de células já que o conteúdo de DNA demonstra que o número de células não foi alterado. Em outras palavras, as células estão vivas, já que se mantêm aderidas e incorporam vermelho neutro, mas apresentam alterações na capacidade mitocondrial para reduzir o MTT.

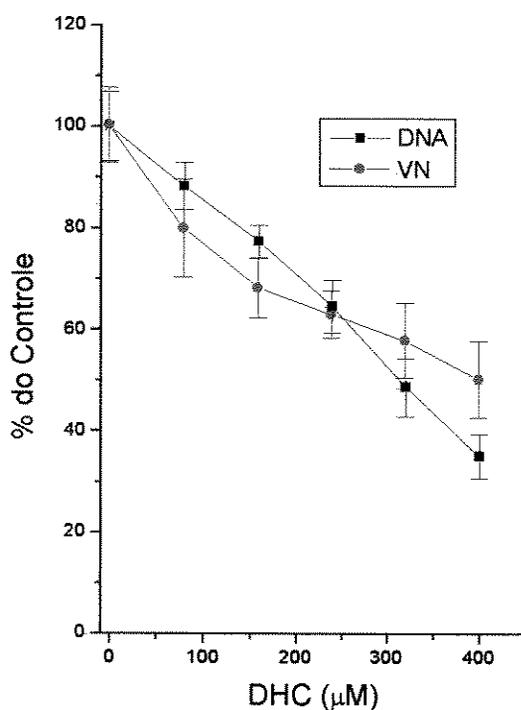


Figura 31. Viabilidade celular de culturas primárias de hepatócitos de rato após tratamento de 20 horas com DHC, avaliada pelo conteúdo de DNA (Abs 260 nm) e pela incorporação de Vermelho Neutro (VN) (Abs 540 nm). Cada ponto representa a média de três experimentos  $\pm$  DP.

Estes resultados nos permitem propor que a biotransformação hepática da DHC produz um ou mais metabólitos com efeito tóxico a nível mitocondrial, o que poderia ser classificado como uma citotoxicidade seletiva (Seibert et al., 1996; Walum et al., 1996).

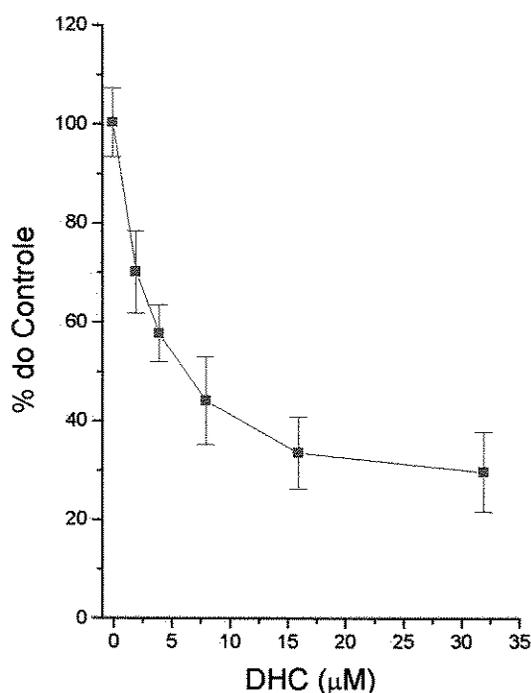


Figura 32. Viabilidade celular de culturas primárias de hepatócitos de rato após tratamento de 20 horas com DHC, avaliada pela redução do MTT (Abs 570 nm). Cada ponto representa a média de três experimentos  $\pm$  DP.

Landin et al., (1996) demonstraram que existe ligação covalente entre o produto da metabolização hepática do acetaminofeno e a enzima mitocondrial aldeído desidrogenase, e que como conseqüência dessa ligação a atividade da enzima diminui rapidamente após o tratamento com a droga. Hammond et al., (1996) observaram que a metabolização dos dicloropropanois pelo citocromo P-450 induz depleção da glutathiona reduzida e do ATP e diminuição da diferença de potencial da membrana interna das mitocôndrias de hepatócitos em cultura primária.

Um dos principais problemas encontrados na utilização de culturas primárias de hepatócitos para o estudo da biotransformação de drogas e citotoxicidade, é que após isolamento ocorre uma rápida perda da diferenciação das células hepáticas caracterizada por uma queda gradual do conteúdo de citocromo P-

450, embora as atividades das enzimas da fase II permaneçam estáveis por um período mais longo (Roguet et al., 1993; Fry et al., 1995; Hammond e Fry 1996).

Visando manter as características funcionais dos hepatócitos em cultura primária diversas estratégias experimentais foram desenvolvidas. Elas incluem a utilização de meio sem soro, suplementação do meio de cultura com hormônios e fatores de crescimento, co-cultura dos hepatócitos com outros tipos celulares do próprio fígado e o emprego de biomatrizes extracelulares (Blaauboer et al., 1994; Berthiaume et al., 1996). Mesmo assim, tem sido demonstrado que nas primeiras 24 h de cultura, o conteúdo de citocromo P-450 cai para 60 a 80 % do valor inicial enquanto que após 48 h esse valor já é somente de 15 % (Roguet et al., 1993; Hammond e Fry, 1996).

Aproveitando estas características das culturas primárias de hepatócitos, é possível estudar a participação do citocromo P-450 na metabolização de um determinado composto (Hammond e Fry, 1996). Com o intuito de avaliar o envolvimento do citocromo P-450 na citotoxicidade hepática observada no ensaio do MTT, culturas primárias de hepatócitos de rato foram tratadas durante 20 horas com uma concentração fixa de DHC 8  $\mu$ M às 4, 24 ou 48 horas após isolamento. Na Figura 33 pode ser observado que na medida em que os hepatócitos possuem uma idade maior, o efeito citotóxico da DHC a nível mitocondrial é revertido. As células com 48 horas de cultura, que apresentam níveis mínimos de expressão dos citocromos P-450, mas possuem valores similares aos dos hepatócitos recém isolados das enzimas da fase II (Roguet et al., 1993), não evidenciaram efeitos citotóxicos após tratamento com DHC.

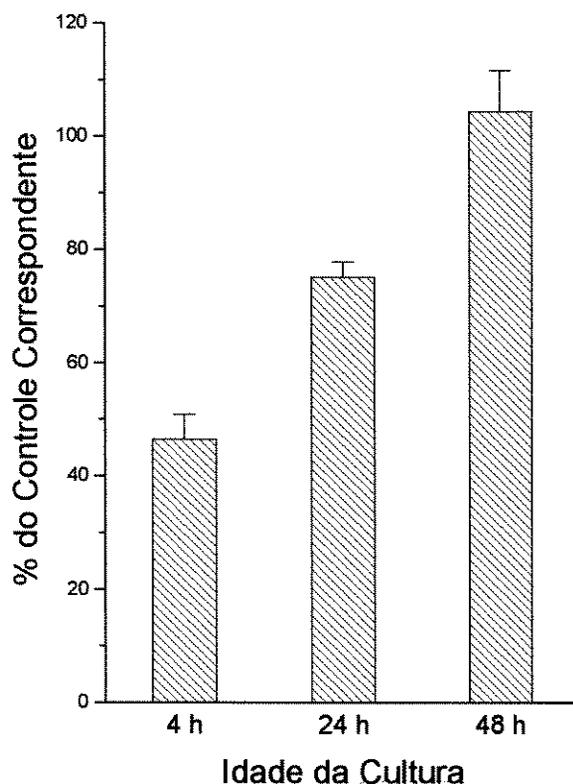


Figura 33. Viabilidade celular de culturas primárias de hepatócitos de rato, com diferentes idades de preparação, após tratamento de 20 horas com DHC 8  $\mu$ M, avaliada pela redução do MTT. Cada ponto representa a média de dois experimentos  $\pm$  DP. (ANOVA  $P < 0.01$ ).

Estes resultados não deixam dúvidas em relação ao envolvimento do citocromo P-450 na metabolização da DHC. Por outro lado, estes achados nos estudos da citotoxicidade da DHC em culturas de hepatócitos, encontram-se em concordância com o que foi observado na toxicidade subcrônica em ratos onde o único órgão que apresentou alterações foi o fígado.

Na Figura 34 podem ser observados os resultados obtidos no estudo da capacidade de recuperação das culturas de hepatócitos 24 horas depois do tratamento com DHC, avaliada pela redução do MTT. Quatro horas após isolamento os hepatócitos foram tratados com a droga durante 20 horas logo após o meio de tratamento foi trocado por meio sem DHC e as células incubadas por mais 24 horas

(período de recuperação). Hepatócitos que não foram submetidos a esse período de recuperação após tratamento aparecem nas Figuras 34 e 35 como sem período de recuperação.

A Figura 35 mostra que na mesma faixa de concentração empregada para o experimento do MTT o número de células não foi modificado pelo tratamento com DHC independentemente de se houve o não esse período de recuperação, enquanto que na Figura 34 são observados efeitos tóxicos no ensaio do MTT que após recuperação do tratamento apresentam algum grau de recuperação em relação aos hepatócitos não recuperados.

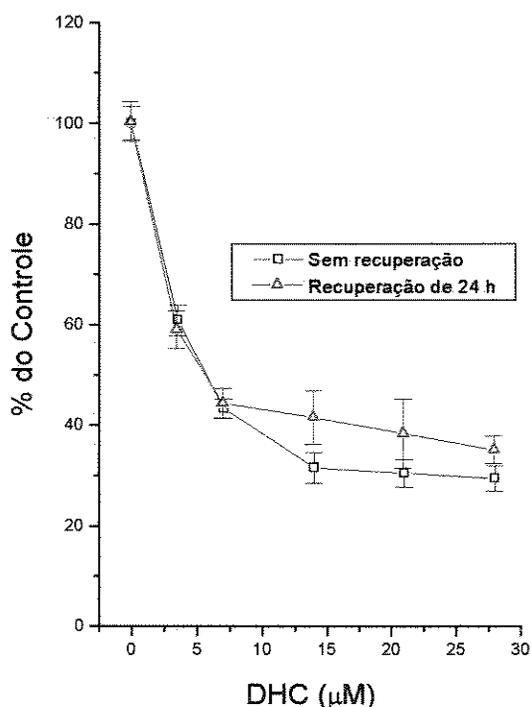


Figura 34. Capacidade de recuperação de culturas de hepatócitos 24 horas após tratamento de 20 horas com DHC, avaliada pela redução do MTT (Abs 570 nm). Cada ponto representa a média de dois experimentos  $\pm$  DP.

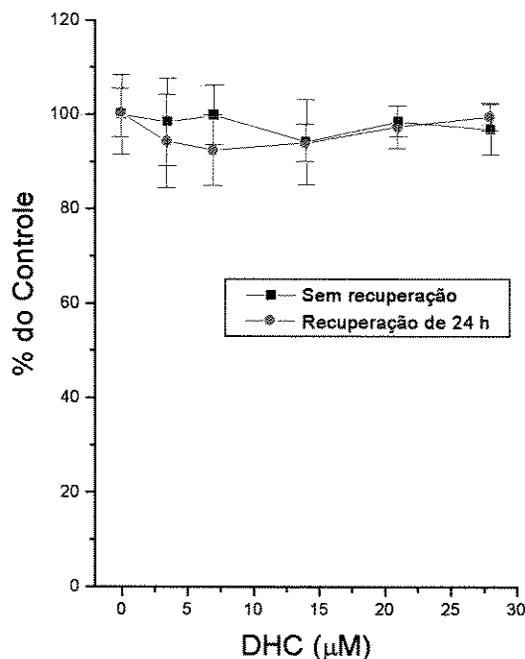


Figura 35. Capacidade de recuperação de culturas de hepatócitos 24 horas após tratamento de 20 horas com DHC, avaliada pelo conteúdo de DNA (Abs 260 nm). Cada ponto representa a média de dois experimentos  $\pm$  DP.

#### 4.7 Citotoxicidade em Co-Cultura de Hepatócitos e Células V79

Até esta parte do trabalho pode-se supor que a DHC possui um efeito citotóxico basal (pouco específico) e que a biotransformação da DHC pelo citocromo P-450 no fígado estaria gerando um metabólito (s) tóxico para as mitocôndrias, como mostra o ensaio do MTT (Figura 33).

Antes de ingressar na circulação geral do organismo, toda substância que seja ingerida pela via oral deve passar pela circulação portal hepática. É devido a isto que esse órgão sofre o maior impacto dos agentes tóxicos (Jover et al., 1992). Como foi dito, é a própria biotransformação que irá gerar metabólitos potencialmente

ainda mais tóxicos que o composto original (Van Iersel et al., 1986; Roguet et al., 1993; Fry et al., 1995; Ponsoda et al., 1995; Klaasen, 1996) podendo intoxicar outros órgãos. É por essa causa que alguns autores têm proposto realizar ensaios de co-culturas onde os hepatócitos são cultivados conjuntamente com outras células e tratados com a droga em estudo, permitindo avaliar os efeitos dos metabólitos sobre as células não hepáticas (Walum et al., 1996; Seibert et al., 1996). Outra proposta é usar o meio de cultura após tratamento com hepatócitos, meio este que contém os produtos da biotransformação, para em seguida tratar culturas de outros tipos celulares (Walum et al., 1996; Seibert et al., 1996). Desta maneira pode ser avaliado facilmente o efeito tóxico produzido pela metabolização hepática das drogas e produtos químicos sobre outros órgãos.

Na Figura 36 estão apresentados os efeitos citotóxicos do tratamento de células V79 durante 24 h com o meio proveniente do tratamento de culturas primárias de hepatócitos com DHC durante 20 horas, avaliados pelo conteúdo de DNA, incorporação do vermelho neutro e a redução do MTT. Nesta Figura pode ser observado que não foram evidenciados efeitos citotóxicos nas células V79 tratadas com o meio de pós-tratamento dos hepatócitos. O número de células permanece igual e as células apresentam uma funcionalidade mitocondrial e lisossomal similar. Como foi observado nos ensaios de citotoxicidade com células V79 apresentados no item 4.5, os valores de  $IC_{50}$  determinados pelo conteúdo de DNA, incorporação do vermelho neutro e redução do MTT se encontram localizados numa faixa de DHC 230 - 360  $\mu M$  (Figura 27).

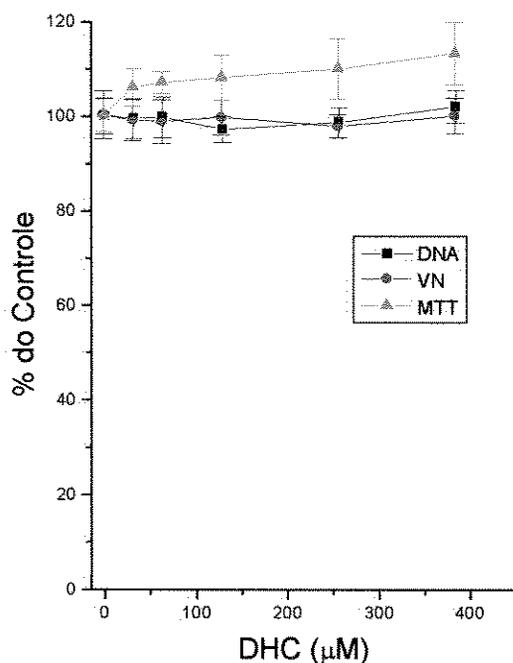


Figura 36. Viabilidade celular de culturas de células V79 após tratamento de 24 horas com o meio proveniente do tratamento de culturas de hepatócitos que por sua vez foram tratados com DHC durante 20 horas, avaliada pelo conteúdo de DNA (Abs 260 nm), pela incorporação de Vermelho Neutro (VN) (Abs 540 nm) e pela redução do MTT (Abs 570 nm). A concentração da DHC é referida ao valor de concentração no meio de tratamento dos hepatócitos. Cada ponto representa a média de três experimentos  $\pm$  DP.

O fato de não serem detectados efeitos tóxicos até 380  $\mu$ M (Figura 36) para nenhum dos alvos celulares avaliados permite pensar que a DHC foi metabolizada pelos hepatócitos, não encontrando-se a molécula original ou está em baixas concentrações no meio empregado para tratar as células V79. Por outro lado, a ausência de toxicidade observada na Figura 36 permite supor que o metabólito (s) da DHC produzido durante a biotransformação da droga pelos hepatócitos não é tóxico para os fibroblastos V79 e, conseqüentemente, a toxicidade mitocondrial que foi observada nas culturas de hepatócitos corresponde a uma citotoxicidade órgão específica deste composto (Clemedson et al., 1996; Seibert et al., 1996). Esta afirmação está apoiada pelos resultados da toxicidade oral subcrônica com animais, onde não foram observados efeitos tóxicos em outros órgãos além do fígado.

Os resultados obtidos no estudo da citotoxicidade da DHC sobre cultura primária de hepatócitos e co-cultura de hepatócitos com fibroblastos V79, sustenta fortemente a hipótese de que a DHC é bioativada pelos hepatócitos durante a fase I e um das interpretações possíveis é que um ou mais metabólitos reativos poderiam estar formando adutos covalentes com proteínas das células hepáticas.

A observação de uma toxicidade específica a nível mitocondrial dos hepatócitos, como foi observado no teste de redução do MTT, é compatível com resultados obtidos por outros grupos que têm relatado a formação de adutos entre metabólitos da fase I e enzimas mitocondriais, com alterações da função mitocondrial (Landin et al., 1996 ; Hammond et al., 1996). A ausência de citotoxicidade encontrada quando as células V79 foram tratadas com o meio proveniente do tratamento dos hepatócitos é um reflexo da metabolização da DHC pelas células hepáticas, e também que o metabólito (s) produzido não conseguiu intoxicar as células V79.

Por que motivo não foi observada citotoxicidade do metabólito (s) para os fibroblastos V79 ? Uma possibilidade é que o composto (s) formado simplesmente não seja tóxico para as células V79 e conseqüentemente sua toxicidade basal é baixa. Outra possibilidade é que o composto (s) formado não se encontra presente no meio pós-tratamento dos hepatócitos que foi utilizado para tratar as células V79, devido à formação dos adutos com as proteínas intracelulares dos hepatócitos permanecendo no interior das células hepáticas. Neste último caso observaríamos um efeito tóxico específico a nível hepático, como foi observado, e poderíamos especular com que a leve tendência à recuperação dos hepatócitos depois da retirada da droga do meio de

cultura (Figura 34 ), reflete a capacidade de renovação (turnover) das proteínas que foram alteradas pela formação dos adutos covalentes.

## 5. Conclusões

Após estudar o efeito antiulcerogênico da DHC em quatro modelos de úlcera experimental em ratos pode-se concluir que o composto possui atividade antiulcerogênica quando administrado pela via oral, com uma eficácia similar a outras drogas utilizadas atualmente na terapêutica da úlcera gástrica.

Elucidar o mecanismo de ação da atividade farmacológica antiulcerogênica da DHC não foi objetivo deste trabalho, porém seu efeito protetor da mucosa gástrica não pode ser atribuído a mudanças no volume nem na composição da secreção gástrica.

Os estudos da toxicidade *in vivo* da DHC demonstraram que na administração oral única o valor da LD<sub>50</sub> corresponde a oito vezes a dose farmacológica efetiva. O tratamento oral de 35 dias evidenciou um efeito hepatotóxico da DHC caracterizado por alterações bioquímicas, hematológicas e histopatológicas, que foram dependentes da dose e do sexo dos animais.

Na avaliação dos efeitos citotóxicos da DHC sobre fibroblastos V79 foi observada uma citotoxicidade de tipo basal enquanto que em culturas primárias de hepatócitos de rato, foi confirmado um efeito citotóxico seletivo.

Existe uma boa correlação entre as toxicidades *in vivo* e *in vitro* para a DHC. Os valores de  $IC_{50}$  obtidos para as células V79 permitem predizer o valor da  $LD_{50}$  para a administração oral de dose única.

## 6. Perspectivas

Em função dos resultados obtidos neste trabalho, novos experimentos poderão ser desenvolvidos visando obter uma droga antiulcerogênica com potencial terapêutico. Resulta de grande importância, por exemplo, tentar esclarecer o mecanismo celular e molecular da atividade antiulcerogênica do composto DHC. Além disso, a modificação da estrutura da molécula pode permitir melhorar sua ação farmacológica e/ou reduzir sua hepatotoxicidade.

Por outro lado, as características da citotoxicidade da DHC que foram observadas durante o nosso trabalho, permitem pensar que o composto pode-se tornar um modelo interessante para estudos de hepatotoxicidade *in vitro*.

## 7. Referências Bibliográficas

ALLAMEH, A., VANSOUN, E. & ZARGHI, A. Role of glutathione conjugation in protection of weanling rat liver against acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Mech. Ageing Dev.** v.95., p. 71-79, 1997.

ALLEN, A., FLEMSTRÖM, G., GARNER, A. & KIVILAAKSO, E. Gastroduodenal mucosal protection. **Physiol. Rev.** v.73., p. 823-857, 1993.

ALY, A., GREEN, K. & JOHANSSON, C. Acid instillation increases gastric luminal prostaglandin E<sub>2</sub> output in man. **Acta Med. Scand.** v.218., p. 505-510, 1985.

ARAÚJO, V. C., CORREIA, G. C., MAIA, J. G. S., SILVA, M. L., GOTTLIEB, O. R., MARX, M. C. & MAGALHÃES, M. T. Óleos essenciais da Amazônia contendo linalol. **Acta Amazônica.** v.1., p. 45-47, 1971.

BACCHI, E., SERTIÉ, J., VILLA, N. & KATZ, H. Antiulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. **Planta Med.** v.61., p. 204-207, 1995.

BASILE, A. C., SERTIÉ, J. A., PANIZZA, S., OSHIRO, T. T. & AZZOLINI, C. A. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I. Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **J. Ethnopharmacol.** v.30., p. 185-197, 1990.

- BASSI, A. M., BOSCO, O., BRENCI, S., ADAMO, D., PENCO, S., PIANA, S., FERRO, M. & NANNI, G. Evaluation of the cytotoxicity of the first 20 MEIC chemicals in two hepatoma cell lines with different xenobiotic metabolism capacities. **ATLA-Altern. Lab. Anim.** v.21., p. 65-72, 1993.
- BAUER, T. & BIRCHER, A. Drug-induced hepatocellular liver injury due to benzylpenicillin with evidence of lymphocyte sensitization. **J. Hepatol.** v.26., p. 429-432, 1997.
- BELL, A. E., SELLERS, L. A., ALLEN, A., CUNLIFFE, W. J., MORRIS, E. R. & ROSS-MURPHY, S. B. Properties of gastric and duodenal mucus: effect of proteolysis, disulfide reduction, bile, acid, ethanol and hypertonicity on mucus gel structure. **Gastroenterology.** v.88., p. 269-280, 1985.
- BERNHARDT, R. Cytochrome P450: structure, function and generation of reactive oxygen species. **Rev. Physiol. Bioch. P.** v.127., p. 137-221, 1995.
- BERTHIAUME, F., MOGHE, P., TONER, M. & YARMUSH, M. Effect of extracellular matrix topology on cell structure, function, and physiological responsiveness: hepatocytes cultures in a sandwich configuration. **FASEB J.** v.10., p. 1471-1484, 1996.
- BIANCHI V. & FORTUNATI E. Cellular effects of an anionic surfactant detected in V79 fibroblasts by different cytotoxicity tests. **Toxicol. in Vitro.** v.4., p. 9-16, 1990.

BLAAUBOER, B. J., BOOBIS, A. R., CASTELL, J. V., COECKE, S., GROOTHUIS, G. M., GUILLOUZO, A., HALL, T. J., HAWKSWORTH, G. M., LORENZON, G., MILTENBURGER, H. G., ROGIERS, V., SKETT, P., VILLA, P. & WIEBEL, F. J. The practical applicability of hepatocyte cultures in routine testing. **ATLA-Altern. Lab. Anim.** v.22., p. 231-241, 1994.

BLASER, M. & PARSONNET, J. Parasitism by the "slow" bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. **J. Clin. Invest.** v.94., p. 4-8

BORENFREUND, E. & PUERNER., J. A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/VN 90). **J. Tiss. Cult. Meth.** v.9., p. 7-9, 1984.

BROADHEAD, C. L. & COMBES, R. D. FRAME recommendations for the application of the three Rs to the regulatory toxicity testing of food additives. **ATLA-Altern. Lab. Anim.** v.24., p. 467-472, 1996.

BRUCCOLERI, A., GALLUCCI, R., GERMOLEC, D., BLACKSHEAR, P., SIMEONOVA, P., THURMAN, R. & LUSTER, M. Induction of early-immediate genes by tumor necrosis factor alpha contribute to liver repair following chemical-induced hepatotoxicity. **Hepatology.** v.25., p. 133-141, 1997.

BRUNTON, L. Agents for Control of Gastric Acidity and Treatment of Peptic Ulcers. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9th Edition. Ed. J. Hardman, L.

Limbird, P. Molinoff, R. Ruddon and A. Goodman. Mc Graw Hill, New York, p. 901-916, 1996.

BUDAVARI, S. In: *The Merck Index*. S. 11th Edition. Ed. S. Budavari. Merck e Co, Inc. New Jersey, p. 1-964, 1989.

CARFAGNA, M., YOUNG, K. & SUSICK, R. Sex differences in rat hepatic cytolethality of the protein kinase C inhibitor safingol: Role of biotransformation. **Toxicol. Appl. Pharm.** v.137., p. 173-181, 1996.

CARVALHO, F., REMIAO, F., AMADO, F., DOMINGUES, P., CORREIA, A. & BASTOS, M. Delta-Amphetamine interaction with glutathione in freshly isolated rat hepatocytes. **Chem. Res. Toxicol.** v.9., p. 1031-1036, 1996.

CASPARY, W. F. Measurement of intragastric potential difference. In: *Antiacids in the eighties*. Ed. H. Halter. Urban e Schwarzenberg, Munich, p. 64-69, 1982.

CERNÁKOVÁ, M., SLAMENOVÁ, D., GOLIS, E. & SUTÝ L. Application of the cell growth and DNA-inhibition tests for characterizing sulfate pulp mill waste waters. **Folia Microbiol.** v.38., p. 406-410, 1993.

CHO, C. H. & OGLE C. W. The pharmacological differences and similarities between stress- and ethanol-induced gastric mucosal damage. **Life Sci.** v.51., p. 1833-1842, 1992.

CINGI, M. R., DE ANGELIS, I., FORTUNATI, E., REGGIANI, D., BIANCHI, V., TIOZZO, R. & ZUCCO, F. Choice and standarization of test protocols in cytotoxicology: a multicentre approach. **Toxicol. in Vitro.** v.5., p. 119-125, 1991.

CLEMEDSON, C., McFARLANE-ABDULLA, E., ANDERSON, M., BARILE, F. A., CALLEJA, M. C., CHESNÉ, C., CLOTHIER, R., COTTIN, M., CURREN, R., DANIEL-SZOLGAY, E., DIERICKX, P., FERRO, M., FISKESJÖ, G., GARZA-OCAÑAS, L., GÓMEZ-LECHÓN, M. J., GÜLDEN, M., ISOMAA, B., JANUS, J., JUDGE, P., KAHRU, A., KEMP, R. B., KERSZMAN, G., KRISTEN, U., KUNIMOTO, M., KÄRENLAMPI, S., LAVRIJSEN, K., LEWAN, L., LILIUS, H., OHNO, T., PERSOONE, G., ROGUET, R., ROMERT, L., SAWYER, T. W., SEIBERT, H., SHRIVASTAVA, R., STAMMATI, A-L., TANAKA, N., TORRES-ALANIS, O., VOSS, J-U., WAKURI, S., WALUM, E., WANG, X., ZUCCO, F. & EKWALL, B. MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Part II. *In vitro* results from 68 toxicity assays used to test the first 30 reference chemicals and a comparative cytotoxicity analysis. **ATLA-Altern. Lab. Anim.** v.24., Suppl. 2., p. 273-311, 1996.

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE. Resolução N° 001 de 13.06.88. **Diário Oficial da União**, 1988

COOK, J. A. & MITCHELL, J. B. Viability measurements in mammalian cell systems. **Anal. Biochem.** v.179., p. 1-7, 1989.

- CORCUERA, T., ALONSO, M., PICAZO, A., GOMEZ, F., ROLDAN, M., ABAD, M., MUNOZ, E. & LOPEZ-BRAVO, A. Hepatic morphological alterations induced by zidovudine (ZDV). in an experimental model. **Pathol. Res. Pract.** v.192., p. 182-187, 1996.
- CRAMPTON, J. R., GIBBONS, L. C. & REES, W. D. Stimulation of amphibian gastroduodenal bicarbonate secretion by sucralfate and aluminium - role of local prostaglandin metabolism. **Gut.** v.29., p. 903-908, 1988.
- CREAN, G., LESLIE, G., WALKER, T., WHITEHEAD, S. & ROE, F. Safety evaluation of cimetidine: 54 month interim report on long-term study in dogs. **J. Appl. Toxicol.** v.1., p. 159-164, 1981.
- CROWELL, J., PAGE, J., RODMAN, L., HEATH, J., GOLDENTHAL, E., HALL, L. & KELLOFF, G. Chronic toxicity studies of 5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiole-3-thione, a potential chemopreventive agent. **Fund. Appl. Toxicol.** v.35., p. 9-21, 1997.
- DEMAREST, J. R. Electrophysiology of the parietal cell. **Annu. Rev. Physiol.** v.52., p. 307-319, 1990.
- 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.** v.89., p. 271-277, 1986.

DESAI, J. K. & PARMAR, N. S. Gastric and duodenal anti-ulcer activity of sulperide, a dopamine D<sub>2</sub> receptor antagonist, in rats. **Agents Actions**. v.42., p. 149-152, 1993.

DOCKRAY, G. J., VARRO, A. & DIMALINE, R. Gastric endocrine cells: gene expression, processing and targeting of active products. **Physiol. Rev.** v.76., p. 767-798, 1996.

ELDER, J. B. Recent experimental and clinical studies on the pharmacology of colloidal bismuth subcitrate. **Scand. J. Gastroentero.** v.21., p. 14-16, 1986.

EVANS, F. The Gastro-intestinal Tract. In: *Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material*. Ed. E. M. Williamson, D. T. Okpako and F. J. Evans. John Wiley e Sons, Ltd., Chichester, p. 25-45, 1996.

FAUTREL, A., CHESNÉ, C., GUILLOUZO, A., DE SOUSA, G., PLACIDI, M., RAHMANI, R., BRAUT, F., PICHON, J., HOELLINGER, H., VINTEZÒU, P., DIARTE, I., MELCION, C., CORDIER, A., LORENZON, G., BENICOURT, M., VANNIER, B., FOURNEX, R., PELOUX, A. F., BICHET, N., GOUY, D., CANO, J. P. & LOUNES, R. A multicentre study of acute *in vitro* cytotoxicity in rat liver cells. **Toxicol. in Vitro.** v.5., p. 543-547, 1991.

FAUTREL, A., CHESNÉ, C., GUILLOUZO, A., DE SOUSA, G., PLACIDI, M., RAHMANI, R., BRAUT, F., PICHON, J., HOELLINGER, H., VINTEZÒU, P., MELCION, C., CORDIER, A., LORENZON, G., BENICOURT, M.,

FOURNEX, R., BICHET, N. & GOUY, D. A multicentre study of acute in vitro cytotoxicity in rat hepatocytes: tentative correlation between in vitro toxicities and in vivo data. **ATLA-Altern. Lab. Anim.** v.21., p. 281-284, 1993.

FENTEM, J. H., HAMMOND, A. H., GARLE, M. J. & FRY, J. R. Toxicity of coumarin and various methyl derivatives in cultures of rat hepatocytes and V79 cells. **Toxicol. in Vitro.** v.6., p. 21-25, 1992.

FÖRSBY, A., ANDERSSON, M., LEWAN, L. & STERNER, O. The cytotoxicity of 22 sesquiterpenoid unsaturated dialdehydes, as determined by the neutral red absorption assay and by protein determination. **Toxicol. in Vitro.** v.5., p. 9-14, 1991.

FORTE, J. G. Gastrointestinal physiology. **Annu. Rev. Physiol.** v.48., p. 73-76, 1986.

FRANSSON-STEEN, R., GOLDSWORTHY, T., KEDDERIS, G. & MARONPOT, R. Furan-induced liver cell proliferation and apoptosis in female B6C3F1 mice. **Toxicology.** v.118., p. 195-204, 1997.

FRAZIER, J. M. Interdisciplinary approach to toxicity test development and validation. **Toxicol. in Vitro.** v.9., p. 845-849, 1995.

FRESHNEY, R. I. Measurement of Viability and Cytotoxicity In: *Culture of Animal Cells*. Ed. R. I. Freshney. John Wiley e Sons, Inc., New York, p. 287-307, 1994.

FRY, J. R., & HAMMOND, A. H. Assesment of the functional integrity of hepatocytes: a brief review. **ATLA-Altern. Lab. Anim.** v.21., p. 324-329, 1993.

FRY, J. R., HAMMOND, A. H., GARLE, M. J. & LAL, K. Comparison of Xenobiotic-mediated cytotoxicity in rat cultured hepatocytes and V79 chinese hamster lung fibroblast cell line: can metabolically-activated hepatotoxins be identified by selective cytotoxicity to hepatocytes ?. **ATLA-Altern. Lab. Anim.** v.21., 8-12, 1993.

FRY, J. R., HAMMOND, A. H., ATMACA, M., DHANJAL, P. & WILKINSON, D. J. Toxicity testing using hepatocytes: some methodological aspects. **ATLA-Altern. Lab. Anim.** v.23., p. 91-96, 1995.

GAD, S. C. & WEIL, C. S. Statistics for toxicologists. In: *Principles and Methods of Toxicology*. Ed. A. H. Wallace. Raven Press, Ltd., New York, p. 221-274, 1994.

GAO, P. THORNTON-MANNING, J. & PEGRAM, R. Protective effects of glutathione on bromodichloromethane in vivo toxicity and in vitro macromolecular binding in Fisher 344 rats. **J. Toxicol. Env. Health.** v.49., p. 145-159, 1996.

GARCIA-RODRIGUEZ, L., WALLANER, M. & STRICKER, B. The risk of acute liver injury associated with cimetidine and other acid-suppressing anti-ulcer drugs. **Brit. J. Clin. Pharmacol.** v.43., p. 183-188, 1997.

GARLE, M. J., FENTEM, J. H. & FRY, J. R. In vitro cytotoxicity tests for the prediction of acute toxicity in vivo. **Toxicol. in Vitro.** v.8., p. 1303-1313, 1994.

GARTHOFF, B. Alternative testing in drug research and development. The validation issue. **Toxicol. in Vitro.** v.9., p. 789-793, 1995.

GLAVIN, G., SZABO, S., JOHNSON, B., XING, P. L., MORALES, R. E., PLEBANI, M. & NAGY, L. Isolated rat gastric mucosal cells: optimal conditions for cell harvesting, measures of viability and direct cytoprotection. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v.276., p. 1174-1179, 1996.

GUGUEN-GUILLOUZO C. & GUILLOUZO A. Methods for preparation of adult and fetal hepatocytes. In *Isolated and Cultured Hepatocytes*. Ed. A. Guillouzo and C. Guguen-Guillouzo. Les Editions INSERM, Paris and John Libbey Eurotext, London, p. 1-12, 1986.

GUGUEN-GUILLOUZO, C. GRIPON, P. VANDENBERGHE, Y., LAMBALLE, F., RATANASAVANH, D. & GUILLOUZO, A. Hepatotoxicity and molecular aspects of hepatocyte function in primary culture. **Xenobiotica.** v.18., p. 773-783, 1988.

HALLE, W. & SPIELMANN, H. Two procedures for the prediction of acute toxicity (LD<sub>50</sub>). from cytotoxicity data. **ATLA-Altern. Lab. Anim.** v.20., p. 40-49, 1992.

- HAMMOND, A. H. & FRY, J. R. Effects of culture duration, cytochrome P-450 inhibition and glutathione depletion on toxicity of diverse xenobiotics. **Toxicol. in Vitro.** v.10., p. 315-321, 1996.
- HAMMOND, A. GARLE, M. & FRY, J. Toxicity of dichloropropanols in rat hepatocyte cultures. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** v.1., p. 39-43, 1996.
- HAYDEN, L.J., THOMAS, G. & WEST, G. B. Inhibitors of gastric lesions in the rat. **J. Pharm. Pharmacol.** v.30., p. 244-246, 1978.
- HENRY, S., ZUCKERMAN, J., ROJKO, J., HALL, W., HARMAN, R., KITCHEN, D. & CROOKE, S. Toxicological properties of several novel oligonucleotide analogs in mice. **Anticancer Drug Des.** v.12., p. 1-14, 1997.
- HERSEY, S. J. & SACHS, G. Gastric acid secretion. **Physiol. Rev.** v.75., p. 155-189, 1995.
- ICHIHARA, Y., TAKEYA, K., HITOTSUYANAGI, Y., MORITA, H., OKUYAMA, S., SUGANUMA, M., FUJIKI, H., MOTIDOME, M. & ITOKAWA, H. Cajucarinolide and isocajucarinolide: anti-inflammatory diterpenes from *Croton cajucara*. **Planta Med.** v.58., p. 549-551, 1992.
- ITOKAWA, H., ICHIHARA, Y., KOJIMA, H., WATANABE, K. & TAKEYA, K. Nor-clerodane diterpenes from *Croton cajucara*. **Phytochemistry.** v.28., p. 1667-1669, 1989.

- ITOKAWA, H., ICHIHARA, Y., SHIMIZU, M., TAKEYA, K., & MOTIDOME, M.  
Cajucarins A and B, new clerodane diterpenes from *Croton cajucara* and their conformations. **Chem. Pharm. Bull.** v.38., p. 701-705, 1990.
- JOHNSON, L. R. (a). Gastric Secretion. In: *Gastrointestinal Physiology*. Ed. Leonard R. Johnson. Mosby, St. Louis, p. 69-88, 1997.
- JOHNSON, L. R. (b). Regulation: Peptides of the Gastrointestinal Tract. In: *Gastrointestinal Physiology*. Ed. Leonard R. Johnson. Mosby, St. Louis, p. 1-14, 1997.
- JOVER, R., PONSODA, X., CASTELL, J. V., & GÓMEZ-LECHÓN, M. J.  
Evaluation of the cytotoxicity of ten chemicals on human cultured hepatocytes: predictability of human toxicity and comparison with rodent cell culture systems. **Toxicol. in Vitro.** v.6., p. 47-52, 1992.
- KIM, S. & CHO, J. Y. The effects of isopropyl 2-(1,3-dithioethane-2-ylidene)-2-(N-(4-methyl-thiazol-2-yl).carbamoyl).acetate (YH439) on potentiated carbon tetrachloride hepatotoxicity. **Korean J. Pharmacol.** v.32., p. 407-416, 1997.
- KINOSHITA, Y., HASSAN, S., NAKATA, H., ASAHARA, M., MATSUSHIMA, Y., KAWANAMI, C., PING, C. Y., MIN, D., NAKAMURA, A. & CHIBA, T.  
Establishment of primary epithelial cell culture from elutriated rat gastric mucosal cells. **J. Gastroenterol.** v.30., p. 135-141, 1995.

KITAZAWA, E., SATO, A., TAKAHASHI, S., KUWANO, H. & OGISO A. Novel diterpenelactones with anti-peptic ulcer activity from *Croton sublyratus*. **Chem. Pharm. Bull.** v.28., p. 227-234, 1979.

KIYOHARA H., HIRANO, M., WEN, X., MATSUMOTO, T., SUN, X. & YAMADA, H. Characterisation of an anti-ulcer pectic polysaccharide from leaves of *Panax ginseng* C. A Meyer. **Carbohydr. Res.** v.263., p. 89-101, 1994.

KLAASSEN, C. D. Principles of toxicology and treatment of poisoning. In : *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9th Edition. Ed. J. Hardman, L. Limbird, P. Molinoff, R. Ruddon and A. Goodman. Mc Graw Hill, New York, p. 63-76, 1996.

KLEINER, D., GAFFEY, M., SALLIE, R., TSOKOS, M., NICHOLS, L., McKENZIE, R., STRAUS, S. & HOOFNAGLE, J. Histopathologic changes associated with fialuridine hepatotoxicity. **Modern Pathol.** v.10., p. 192-199, 1997.

KOSKELO, E., BOSWELL, K., CARL, L., LANOUE, S., KELLY, C. & KYLE, D. High levels of dietary arachidonic acid triglyceride exhibit no subchronic toxicity in rats. **Lipids.** v.32., p. 397-405, 1997.

KRAUS, A. L. Research Applications. In: *The Laboratory Rat, Vol II*. Ed. Baker, H. J., Russell, J. and Weisbroth, S. H. Academic Press, Inc. New York, p. 2-28, 1980.

KUBO, I., ASAKA, Y. & SHIBATA, K. Insect growth inhibitory nor-diterpenes, cis-dehydrocrotonin and trans-dehydrocrotonin, from *Croton cajucara*. **Phytochemistry**. v.30., p. 2545-2546, 1991.

KULKARNI, S., DUONG, H., GOMILA, R. & MEHENDALE, H. Strain differences in tissue repair response to 1,2-dichlorobenzene. **Arch. Toxicol.** v.70., p. 714-723, 1996.

LACY, E. R. Gastric mucosal defence after superficial injury. **Clin. Invest. Med.** v.10., p. 189-200, 1987.

LALWANI, N., DETHLOFF, L., HASKINS, J., ROBERTSON, D. & DE LA IGLESIA, F. Increased nuclear ploidy, not cell proliferation, is sustained in the peroxisome proliferator-treated rat liver. **Toxicol. Pathol.** v.25., p. 165-176, 1997.

LANDIN, J., COHEN, S. & KHAIRALLAH, E. Identification of a 54-kDa mitochondrial acetaminophen-binding protein as aldehyde dehydrogenase. **Toxicol. Appl. Pharm.** v.141., p. 299-307, 1996.

LEGRAVEREND, C., MODE, A., WELLS, T., ROBINSON, I. & GUSTAFSSON, J. Hepatic steroid hydroxylating enzymes are controlled by the sexually dimorphic pattern of growth hormone secretion in normal and dwarf rats. **FASEB J.** v.6., p. 711-718, 1992.

- LEKEHAL, M., PESSAYRE, D., LEREAU, J., MOULIS, C., FOURASTE, I. & FAU, D. Hepatotoxicity of the herbal medicine germander: Metabolic activation of its furano diterpenoids by cytochrome P450 3A depletes cytoskeleton-associated protein thiols and forms plasma membrane blebs in rat hepatocytes. **Hepatology**. v.24., p. 212-218, 1996.
- LESLIE, G., NOAKES, D., POLLITT, F., ROE, F. & WALKER, T. A two-year study with cimetidine in the rat: assessment for chronic toxicity and carcinogenicity. **Toxicol. Appl. Pharm.** v.61., p. 119-137, 1981.
- LEVINE, B., FUREDI-MACHACEK, E., BROWN, A. & TOMLINSON, M. Subchronic toxicity and reversibility of WR6026 dihydrochloride, an 8-aminoquinoline antileishmanial drug, in rats and dogs. **Drug Develop. Res.** v.40., p. 75-87, 1997.
- LEVINE, R. J. A method for rapid production of stress ulcers in rats. In: *Peptic Ulcer*. Ed. C. J. Pfeiffer. Munksgaard, Copenhagen, p. 92-97, 1971.
- LEWIS, D. A. & HANSON, P. J. Anti-Ulcer Drugs of Plant Origin. In: *Progress in Medicinal Chemistry-Vol 28*. Ed. G. P. Ellis and G. B. West. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p. 201-231, 1991.
- LIEBER, C. S. (a). Cytochrome P-450E1: its physiological and pathological role. **Physiol. Rev.** v.77., p. 517-544, 1997.

LIEBER, C. S. (b). Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. **Clin. Chim. Acta.** v.257., p. 59-84, 1997.

LIND, T., CEDERBERG, C., EKENVED, G., HAGLAND, U. & OLBE, L. Effect of omeprazol (a gastric proton pump inhibitor) on pentagastrin stimulated acid secretion in man. **Gut.** v.24., p. 270-276, 1983.

LITCHFIELD JR., J. T. & WILCOXON, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v.96., p. 99-113, 1949.

MACKLER, B. F., LANDA, M. M. & GAMERMAN, G. E. FDA Primer: I. the drug and biologic approval process. **Biotechnol. Appl. Bioc.** v.23., p. 191-196, 1996.

McKARNS, S., HANSCH, C., CALDWELL, W., MORGAN, W., MOORE, S. & DOOLITTLE D. Correlation between hydrophobicity of short-chain aliphatic alcohols and their ability to alter plasma membrane integrity. **Fund. Appl. Toxicol.** v. 36., p. 62-70, 1997.

McTAVISH, D., BUCKLEY, M. & HEEL, R. Omeprazole. an updated review of its pharmacology and therapeutic use in acid-related disorders. **Drugs.** v.42., p. 138-170, 1991.

MADAN, A. & PARKINSON, A. Characterization of the NADPH-dependent covalent binding of (14C) halothane to human liver microsomes: A role for

cytochrome P4502E1 at low substrate concentrations. **Drug Metab. Dispos.** v.24., p. 1307-1313, 1996.

MATTHEWS, A., ROBERTS, D., HINSON, J. & PUMFORD, N. Acetaminophen-induced hepatotoxicity: Analysis of total covalent binding vs. specific binding to cysteine. **Drug Metab. Dispos.** v.24., p. 1192-1196, 1996.

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. **Jpn. J. Pharmacol.** v.57., p. 495-505, 1991.

MORIMOTO, Y., SHIMOHARA, K., OSHIMA, S., HARA, H & SUKAMOTO, T. Effects of KB-5492, a new anti-ulcer agent with a selective affinity for the sigma-receptor, on aspirin-induced disruption of the rat gastric mucosal barrier. **Jpn. J. Pharmacol.** v.64., p. 49-55, 1994.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.** v.65., p. 55-63, 1983.

MURAI, T., WATANABE, S., HIROSE, M., MIWA, H., MIYAZAKI, A. & SATO, N. Ethanol retards gastric epithelial restoration in monolayer cultures. **Digest. Dis. Sci.** v.41., p. 2062-2069, 1996.

NIH. Consensus development panel on *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease.

**JAMA.** v.272., p. 65-69.

NIES, A. S. & SPIELBERG, S. P. Principles of Therapeutics. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9th Edition. Ed. J. Hardman, L. Limbird, P. Molinoff, R. Ruddon and A. Goodman. Mc Graw Hill, New York, p. 43-62, 1996.

NJOKU, D., LASTER, M., GONG, D., EGER, E., REED, G. & MARTIN, J. Biotransformation of halothane, enflurane, isoflurane, and desflurane to trifluoroacetylated liver proteins: Association between protein acylation and hepatic injury. **Anesth. Analg.** v.84., p. 173-178, 1997.

OLIVIER, P., TESTARD, P., MARZIN, D. & ABBOTT, D. Effect of high polyol concentrations on the neutral red absorption assay and tetrazolium-MTT test of rat hepatocytes in primary culture. **Toxicol. in Vitro.** v.9., p. 133-138, 1995.

ORGANISATION DE COOPERATION ET DE DEVELOPPEMENT  
ECONOMIQUES Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits  
chimiques; effets sur la santé (section 4). Diffusion General. Paris, p. 1-12, 1981.

PEZARD, C. Le cancer de l'estomac, une maladie infectieuse?. **La Recherche.** v.26.,  
p. 570-571, 1995.

PHILLIPS, B. J. Development of cell culture techniques for assessment of the toxicity of plant products. **Toxicol. in Vitro.** v.10., p. 69-76, 1996.

PONSODA, X., JOVER, R., NÚÑEZ, C., ROYO, M., CASTELL, J. V. & GÓMEZ-LECHÓN, M. J. Evaluation of the cytotoxicity of 10 chemicals in human and rat hepatocytes and in cell lines: correlation between *in vitro* data and human lethal concentration. **Toxicol. in Vitro.** v.9., p. 959-966, 1995.

PONSODA, X., NÚÑEZ, C., CASTELL, J. V. & GÓMEZ-LECHÓN, M. J. Evaluation of the cytotoxic effects of MEIC chemicals 31-50 on primary culture of rat hepatocytes and hepatic and non-hepatic cell lines. **ATLA-Altern. Lab. Anim.** v.25., p. 423-436, 1997.

POON, R., LECAVALIER, P., MUELLER, R., VALLI, V., PROCTER, B. & CHU, I. Subchronic oral toxicity of di-n-octyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate in the rat. **Food Chem. Toxicol.** v.35., p. 225-239, 1997.

PUMFORD, N., HALMES, N., MARTIN, B., COOK, R., WAGNER, C. & HINSON, J. Covalent binding of acetaminophen to N-10-formyl-tetrahydrofolate dehydrogenase in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v.280., p. 501-505, 1997.

RABON, E. C. & REUBEN, M. A. The mechanism and structure of the gastric H,K-ATPase. **Annu. Rev. Physiol.** v.52., p. 321-344, 1990.

- RAFATULLAH, S., TARIQ, M., AL-YAHYA, M. A., MOSSA, J. S. & AGEEL A. M. Evaluation of turmeric (*CURCUMA LONGA*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. **J. Ethnopharmacol.** v.29., p. 25-34, 1990.
- RAFATULLAH, S., TARIQ, M., MOSSA, J. S., AL-YAHYA, M. A., AL-SAID, M. S. & AGEEL A. M. Anti-secretagogue, anti-ulcer and cytoprotective properties of *Acorus calamus* in rats. **FITOTERAPIA.** v.65., p. 19-23, 1994.
- RAJNER, M. Toward using *in vitro* toxicology in the drug approval process. **BIO-TECHNOL.** v.8., p. 1248-1249, 1990.
- RASMUSSEN, E. S. Evaluation of the cytotoxicity of the first ten MEIC chemicals in 3T3 mouse fibroblasts with and without microsomal activation, using the neutral red assay. **ATLA-Altern. Lab. Anim.** v.21., p.157-163, 1993.
- RENZI, D., VALTOLINA, M. & FORSTER, R. The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. **ATLA-Altern. Lab. Anim.** v.21., p. 89-96, 1993.
- REPETTO, G. & SANZ, P. Neutral red uptake, cellular growth and lysosomal function: In vitro effects of 24 metals. **ATLA-Altern. Lab. Anim.** v.21., p. 501-507, 1993.
- RICHARDSON, C. T. Úlcera péptica. Em: *Tratado de Medicina Interna*. Ed. J. C. Wyngaarden, L. H. Smith and J. C. Bennett. Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro, p. 663-667, 1993.

RIDDELL, R., PANACER, D., WILDE, S., CLOTHIER, R. & BALLS, B. The Importance of Exposure Period and Cell Type in In Vitro Cytotoxicity Tests. **ATLA-Altern. Lab. Anim.** v.14., p. 86-92, 1986.

ROBERFROID, M. Toxicology: a science and an art. **ATLA-Altern. Lab. Anim.** v.9., p. 839-844, 1995.

ROBINSON, C. J. Cell-based assays - technology providing alternatives to animal testing. **Trends Biotechnol.** v.9., p. 407-408, 1991.

RODRÍGUEZ, R. & ACOSTA, D. JR. N-deacetyl ketoconazole-induced hepatotoxicity in a primary culture system of rat hepatocytes. **Toxicology.** v.117., p. 123-131, 1997.

RODRÍGUEZ-FARRE, E., ROBERFROID, M. & FRACCHIA, G. Research and development of *in vitro* pharmacotoxicology: A european perspective. **ATLA-Altern. Lab. Anim.** v.21., p. 285-293, 1993.

ROGIERS, V., BLAAUBOER, B., MAUREL, P. PHILLIPS, I. & SHEPHARD, E. Hepatocyte-based *in vitro* models and their application in pharmacotoxicology. **Toxicol. in Vitro.** v.9., p. 685-694, 1995.

ROGIERS, V., VANDENBERGHE, Y., VANHAECKE, T., GEERTS, A., CALLAERTS, A., CARLEER, J., ROBA, J. & VERCRUYSSSE, A. Observation

of hepatotoxic effects of 2-n-pentylaminoacetamide (Milacemide) in rat liver by a combined in vivo/in vitro approach. **Arch. Toxicol.** v.71., p. 271-282, 1997.

ROGUET, R., COTOVIO, J., GAETANI, Q., DOSSOU, K. & ROUGIER, A. Cytotoxicity of 28 MEIC chemicals to rat hepatocytes using two viability endpoints: correlation with acute toxicity data in rat and man. **ATLA-Altern. Lab. Anim.** v.21., p. 216-224, 1993.

ROMANO, M., RAZANDI, M. & IVEY, K. J. Effect of Sucralfate and its components on taurocholate-induced damage to rat gastric mucosal cells in tissue culture. **Digest. Dis. Sci.** v.35., p. 467-476, 1990.

ROSENKRANZ H. S., MATTHEWS, E. J. & KLOPMAN, G. Relationships between cellular toxicity, the maximum tolerated dose, lipophilicity and electrophilicity. **ATLA-Altern. Lab. Anim.** v.20., p. 549-562, 1992.

SACHS, G., CARLSSON, E., LINDBERG, P. & WALLMARK, B. Gastric H,K-ATPase as therapeutic target. **Annu. Rev. Pharmacol.** v.28., p. 269-284, 1988.

SEGLEN, P. O. Preparation of isolated rat liver cells. **Method Cell. Biol.** v.13., p. 29-83, 1976.

SEIBERT, H., BALLS, M., FENTEM, J., BIANCHI, V., CLOTHIER, R. H., DIERICKX, P. J., EKWALL, B., GARLE, M. J., GÓMEZ-LECHÓN, M. J., GRIBALDO, L., GÜLDEN, M., LIEBSCH, M., RASMUSSEN, E., ROGUET,

R., SHRIVASTAVA, R. & WALUM, E. Acute toxicity testing *in vitro* and the classification and labelling of chemicals. **ATLA-Altern. Lab. Anim.** v.24., p. 499-510, 1996.

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.** v.5., p. 43-61, 1945.

SHIRHATTI, V. & KRISHNA, G. A simple and sensitive method for monitoring drug-induced cell injury in cultured cells. **Anal. Biochem.** v.147., p. 410-418, 1985.

SHORROCK, C. J., GARNER, A., HUNTER, A. H., CRAMPTON, J. R. & REES, W. D. Effect of bismuth subcitrate and sulcralfate on rat duodenal and human gastric bicarbonate secretion *in vivo*. **Gut.** v.31., p. 26-31, 1990.

SIMÕES, J. C., DA SILVA, A. J. R., SERRUYA, H. & DA SILVA BENTES, M. H. Desidrocrotonina, um norditerpeno de *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae). **Ciência e Cultura.** v.31., p. 1140-1141, 1979.

SLAMENOVÁ, D., GÁBELOVÁ, A. & RUPPOVÁ, K. Cytotoxicity and genotoxicity testing of sodium fluoride on Chinese hamster V79 cells and human EUE cells. **Mutation Res.** v.279., p. 109-115, 1992.

SOLDATO, P., FOSHI, D., VARIN, L. & DANIOTTI, S. Comparison of the gastric cytoprotective properties of atropine, ranitidine and PGE<sub>2</sub> in rats. **Eur. J. Pharmacol.** v.106., p. 53-60, 1984.

SOUZA BRITO, A. R. M. Em: *Manual de Ensaaios Toxicológicos "In Vivo"*. Ed. da Unicamp, Campinas, p. 15-60, 1994.

SOUZA BRITO, A. R. M., RODRÍGUEZ, J. A., HIRUMA-LIMA, C. A., HAUN, M. & NUNES, D. S. Antiulcerogenic activity of trans-Dehydrocrotonin from *Croton cajucara* Benth. **Planta Med.** (no prelo), 1997.

SOUZA-FORMIGONI, M.L.O., OLIVEIRA, M.G., MONTEIRO, M.G., SILVEIRA-FILHO, N.G., BRAZ, S. & CARLINI, E.A. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **J. Ethnopharmacol.** v.34., p. 21-27, 1991.

SZYMANSKA, J. Biochemical alterations as measures of acute and subacute hepatotoxicity of 1,3-dibromobenzene in rat. **Arch. Toxicol.** v.71., p. 99-106, 1996.

TAKAGI, K. & OKABE, S. The effects of drugs on the production and recovery processes of the stress ulcer. **Jpn. J. Pharmacol.** v.18., p. 9-18, 1968.

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. **Jpn. J. Pharmacol.** v.19., p. 418-426, 1969.

TAKAGI, K. & OKABE, S. Studies of the mechanisms involved in the production of stress and stress-atropine ulcers in rats. **Eur. J. Pharmacol.** v10., p. 378-384, 1970.

TAKASE, H., YAMAMOTO, K., HIRANO, H., SAITO, Y. & YAMASHITA, A. Pharmacological profile os gastric mucosal protection by marmin and nobiletin from traditional herbal medicine, *Aurantii fructus immaturus*. **Jpn. J. Pharmacol.** v.66., p. 139-147, 1994.

TERANO, A., IVEY, K. J., STACHURA, J., SEKHON, S., HOSOJIMA, H., McKENZIE, W., KRAUSE, W. & WYCHE J. H. Cell culture of rat gastric fundic mucosa. **Gastroenterology.** v.83., p. 1280-1291, 1982.

TILLMANN, H., VAN PELT, F., MARTZ, W., LUECKE, T., WELP, H., DOERRIES, F. VEUSKENS, A., FISCHER, M. & MANNS, M. Accidental intoxication with methylene dianiline p,p'-diaminodiphenylmethane: Acute liver damage after presumed Ecstasy consumption. **J. Toxicol. Clin. Toxic.** v.35., p. 35-40, 1997.

- VAN IERSEL, A. A., DE BOER, A. J., VAN HOLSTEIJN, W. M. & BLAAUBOER, B. J. Hepatocyte culture as a model system for the study of hepatotoxicity. **Food. Chem. Toxicol.** v.24., p. 569-570, 1986.
- VISTICA, D. T., SKEHAN, P., SCUDIERO, D., MONKS, A., PITTMAN, A. & BOYD, M. R. Tetrazolium-based assays for cellular viability: A critical examination of selected parameters affecting formazan production. **Cancer Res.** v.51., p. 2515-2520, 1991.
- WALUM, E., FORSBY, A., CLEMEDSON, C. & EKWALL, B. Dynamic qualities of validation and the evolution of new in vitro toxicological tests. **ATLA-Altern. Lab. Anim.** v.24., p. 333-338, 1996.
- WATERFIELD, C., DELANEY, J., KERAI, D. & TIMBRELL, J. A. Coorelations between in vivo and in vitro effects of toxic compounds: studies with hydrazine. **Toxicol. In Vitro.** v.11., p. 217-227, 1997.
- WEISBRODT, N. W. Regulation: Nerves and Smooth Muscle. In: *Gastrointestinal Physiology*. Ed. Leonard R. Johnson. Mosby, St. Louis, p 15-22, 1997.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Principles and Methods for Evaluating the Toxicity of Chemicals; Environmental Health Criteria. WHO Publication. Geneva, V. 6, p 200, 1978.

WILSON, N. H. & HAYES, J. R. Short-term repeated dosing and subchronic toxicity studies. In : *Principles and Methods of Toxicology*. Ed. A. Wallace Hayes, Raven Press, New York, p. 649-672, 1994.

WOLFE, M. & SOLL, A. H. The physiology of gastric acid secretion. **New. Engl. J. Med.** v.319., p. 1707-1715, 1988.

YANO, S., AKAHANE, M. & HARADA, M. Role of gastric motility in development of stress-induced gastric lesions of rats. **Jpn. J. Pharmacol.** v.28., p. 607-615, 1978.

YOSHITAKE, I., OHISHI, E. & KUBO, K. Hepatoprotective effects of 1-[(2-Thiazolin-2-yl)-amino]acetyl-4-(1,3-dithiol-2-ylidene) -2,3,4,5-tetrahydro-1*H*-1-benzazepin-3,5-dione Hydrochloride (KF-14363) in various experimental liver injuries. **Jpn. J. Pharmacol.** v.57., p. 127-136, 1991.

## 8. Anexo N° 1

Tabela 1a. Dados Espectroscópicos UV/Vis, IV e ponto de fusão da DHC.

	DHC após purificação	DHC dados na literatura (Itokawa et al., 1989)
Ponto de fusão	139 - 141 ° C	138,5 - 140,5 ° C
UV/Vis (MeOH) nm	$\lambda$ máx 239	$\lambda$ máx 239
IV (KBr) $\text{cm}^{-1}$	$\nu$ máx 2959,7; 1759,2 (C=O); 1657,1 (C=O); 1507; 872,1 (furano)	$\nu$ máx 2970; 1760 (C=O); 1660 (C=O); 1620 (C=C); 1510; 875 (furano)

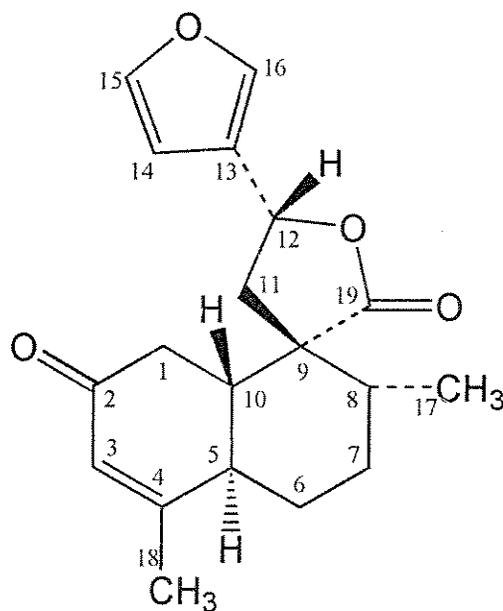


Figura 1a. Estrutura química da *trans*-desidrocrotonina (Kubo et al., 1991).

Tabela 2a.  $^1\text{H}$  RMN e  $^{14}\text{C}$  RMN da DHC após purificação, comparada com os dados de Kubo e colaboradores (1991).

H	DHC	DHC (Kubo et al., 1991)	C	DHC	DHC (Kubo et al., 1991)
1 $\alpha$	2,51 dd	2,53 dd	1	39,9	39,9
1 $\beta$	2,17 dd	2,17 dd	2	198,1	197,7
3	5,85 br s	5,88 br s	3	126,9	126,8
5	3,15 br t	3,16 br t	4	166,2	165,9
6 $\alpha$	1,15 dq	1,16 dq	5	39,7	39,7
6 $\beta$	2,25 dq	2,25 dq	6	28,3	28,4
7 $\alpha$	1,65 †	1,65 †	7	30,2	30,3
7 $\beta$	1,83 †	1,85 †	8	41,8	41,9
8	1,69 m	1,70 m	9	51,6	51,6
10	1,81 ddd	1,79 ddd	10	46,2	46,3
11	2,30 - 2,46	2,30 - 2,46	11	40,6	40,6
12	5,45 t	5,42 t	12	72,5	72,4
14	6,39 dd	6,39 dd	13	125,3	125,2
15	7,43 d	7,43 d	14	108,2	108,1
16	7,45 br s	7,44 br s	15	144,6	144,4
17	1,14 d	1,14 d	16	139,7	139,5
18	1,95 br s	1,95 br s	17	17,7	17,7
			18	22,0	22,0
			19	177,4	177,1

† Superposição de sinais.

NAME "DHC" 0013/7MS  
EXPS PULSE SEQUENCE: 2SPUL  
DATE 10-20-94  
SOLVENT CDCL3  
FILE H

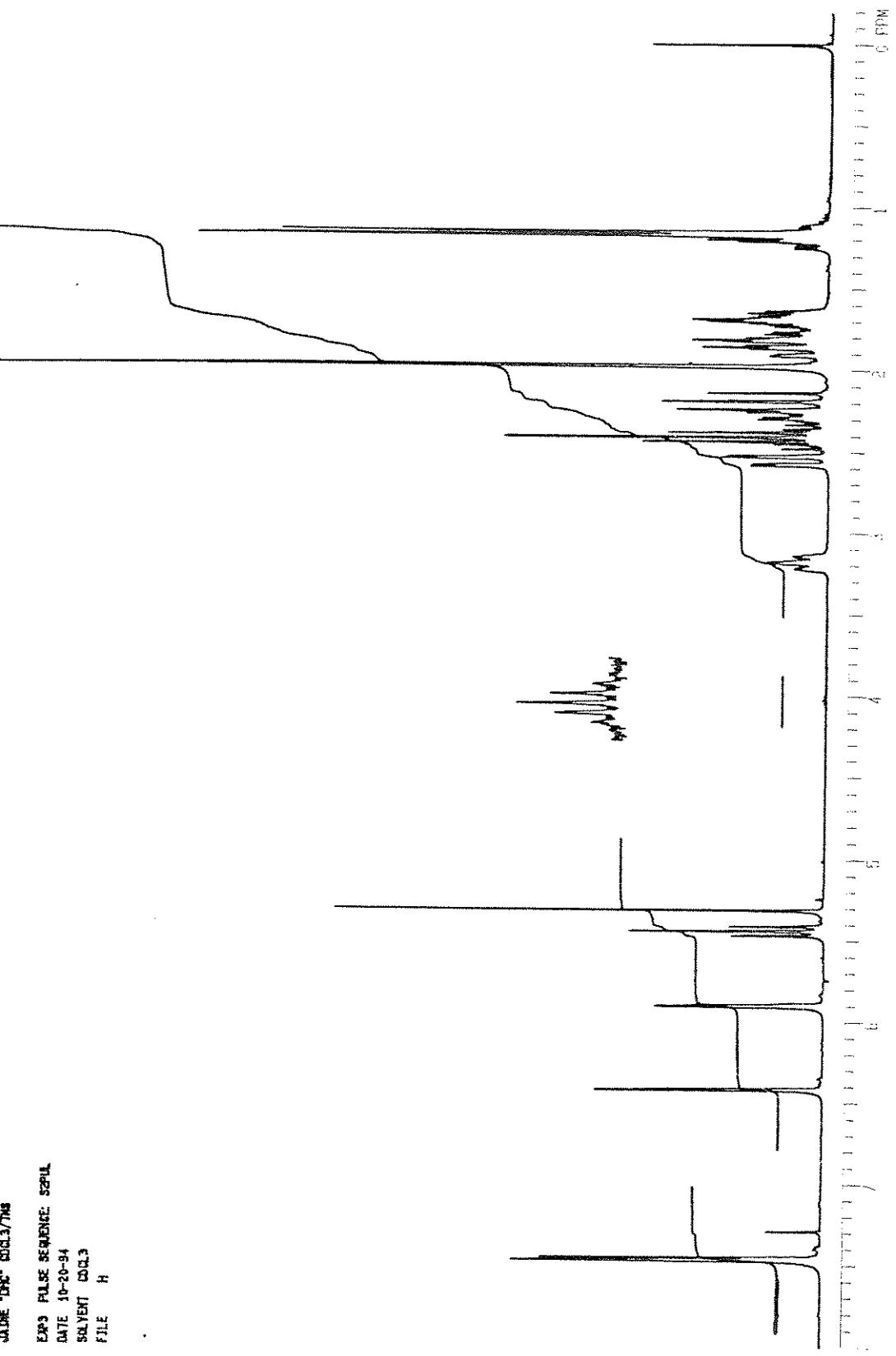


Figura 2a. Espectro de ressonância magnética nuclear de prótons da DHC

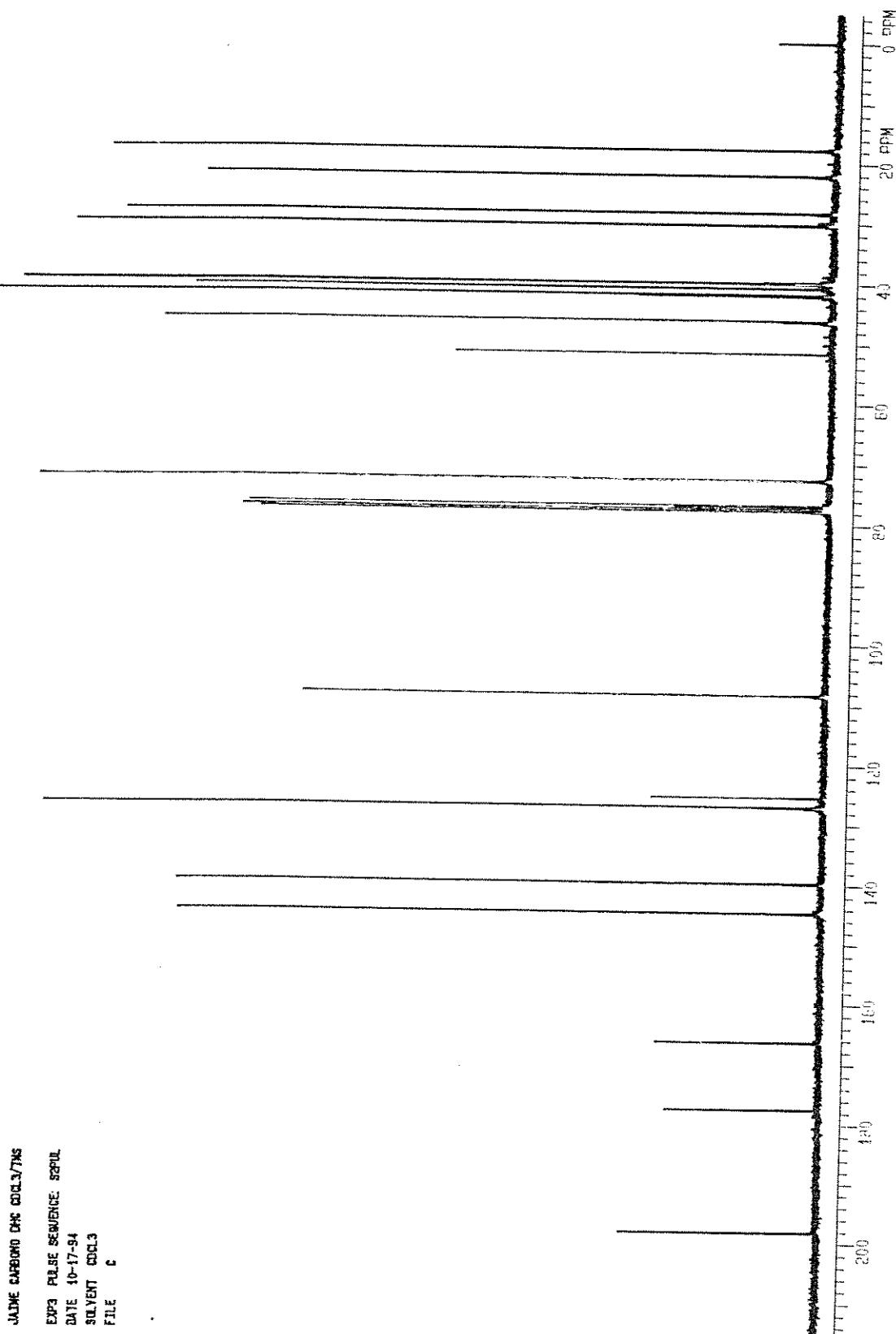


Figura 3a. Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono da DHC

JADME CARBONO DMS CDCL3/7MS  
EXP3 PULSE SEQUENCE: SPUL  
DATE 10-17-94  
SOLVENT CDCL3  
FILE C

## 9. Participações Científicas

### 9.1 Congressos

#### 9.1.1 Congressos Nacionais

Rodríguez J.A., Haun M. and Souza Brito A.R.M. 1996. Acute toxic effects and cytotoxicity of ethanolic extract of *Geranium core-core*. XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) Caxambu. Brasil.

Rodríguez J. A., Maria, S. S. and Melo, P. S. 1997. Muscular primary culture standardization as a tool to evaluate effects of anabolic steroids drugs. I Brazilian Meeting of Graduate Studies on Structural Biology. UNICAMP. Campinas, S. P., Brasil.

Rodríguez J. A., Haun M. and Souza Brito A. R. M. 1997. Cytotoxic effects of dehydrocrotonin. XXVI Reunião Anual da SBBq. Caxambu. Brasil.

Rodríguez J. A., Souza-Torsoni A., Franco D. W. and Haun M. 1997. Cytotoxic evaluation of new synthesized ruthenium nitrosyl compounds. XXVI Reunião Anual da SBBq. Caxambu. Brasil.

#### 9.1.2 Congressos Internacionais

Rodríguez J.A., Hiruma-Lima C.A., Cota R.H.S., Souza Brito A.R.M. and Haun M. 1996. Dehydrocrotonin a new antiulcerogenic drug: *in vitro/in vivo* toxicity relationship. VII PABMB Congress. Pucón. Chile.

Rodríguez J. A. and Haun M. 1997 P-450 mediated dehydrocrotonin toxicity on rat hepatocyte cultures. 17 ° IUBMB Congress. San Francisco, California. USA.

Souza Brito A. R. M., Hiruma-Lima C.A., Rodríguez J. A., Haun M. and Nunes D. S. 1997. Anti-ulcerogenic effects of dehydrocrotonin from *Croton cajucara* Benth. Some mechanisms of action. 2nd International Symposium on Natural Drugs. Nápoles, Italy.

## 9.2 Artigos Científicos

Souza Brito A.R.M., Rodríguez J.A., Hiruma-Lima C.A., Haun M. and Nunes D.S. 1997. Anti-ulcerogenic activity of dehydrocrotonin, a diterpene isolated from *Croton cajucara* Benth. *Planta Medica* (no prelo).

Rodríguez J. A., Haun M. and Souza Brito A. R. M. Acute toxic effects and cytotoxicity of ethanolic extract of *Geranium core-core*. *Fitoterapia* (submetido).

Rodríguez J. A., Hiruma-Lima C.A., Souza Brito A.R.M. and Haun M. Sub-chronic toxicity of trans-dehydrocrotonin, an anti-ulcerogenic compound. *Planta Medica* (submetido).

Artigos em preparação:

Hiruma-Lima C.A., Rodríguez J. A., Souza Brito A.R.M. and Haun M. Antiulcerogenic mechanism of dehydrocrotonin. *Planta Medica*.

Rodríguez J. A., and Haun M. Differential cytotoxic effects of dehydrocrotonin on V79 and primary rat hepatocyte cultures. *Toxicology in Vitro*.