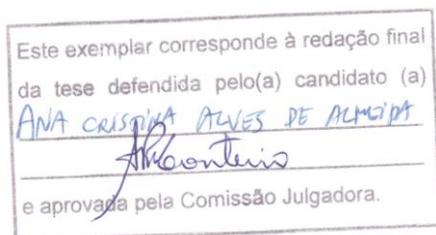


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ANA CRISTINA ALVES DE ALMEIDA

**ANÁLISE DOS MECANISMOS ANTIOXIDANTES NA
ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA DE *Anacardium humile*
ST. HIL. (ANACARDIACEAE)**



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

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Alba Regina Monteiro Souza Brito

Campinas, 2010

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

AL64a

Almeida, Ana Cristina Alves de

Análise de mecanismos antioxidantes na atividade antiulcerogênica de *Anacardium humile* St. Hil. (Anacardiaceae) / Ana Cristina Alves de Almeida. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadora: Alba Regina Monteiro Souza Brito.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Úlcera gástrica. 2. *Anacardium humile*. 3. Atividade antioxidante. 4. Compostos fenólicos. 5. Plantas medicinais. I. Brito, Alba Regina Monteiro Souza. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Analysis of antioxidants mechanisms in the antiulcerogenic activity of *Anacardium humile* St. Hil. (Anacardiaceae).

Palavras-chave em inglês: Gastric ulcer; *Anacardium humile*; Antioxidant activity; Phenolic compounds; Medicinal plants.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Alba Regina Monteiro Souza Brito, Clélia Akiko Hiruma Lima, Marcos José Salvador.

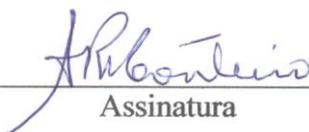
Data da defesa: 18/02/2010.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 18 de fevereiro de 2010.

BANCA EXAMINADORA

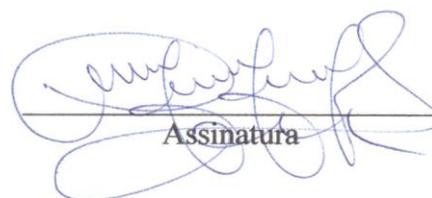
Prof^a. Dr^a. Alba Regina Monteiro Souza Brito (Orientadora)


Assinatura

Prof^a. Dr^a. Clélia Akiko Hiruma Lima


Assinatura

Prof. Dr. Marcos José Salvador


Assinatura

Prof^a. Dr^a. Leônia Maria Batista

Assinatura

Prof. Dr. Edson Antunes

Assinatura

Aos meus pais,

Maurício e Celina

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

À Prof^a Dr^a Alba Regina Monteiro Souza Brito pela oportunidade de realizar esse trabalho e pela confiança. Confiança extrema que às vezes assusta, que traz responsabilidades extras, mas que permite aprender mais, ousar mais... trilhar mais passos firmes em nosso caminho de formação... obrigada pelo carinho!

À Dr^a Elisângela Farias Silva pela co-orientação no início desse projeto.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Produtos Naturais com quem, desde minha iniciação científica, dividi não só momentos de trabalho e experimentos, mas alegrias, conquistas, idéias, angústias, histórias, saberes... Não cito todos os nomes, mas ressalto que cada um é uma parte do que torna esse laboratório um lugar mágico, de que eu tanto gosto. Muito obrigada a todos pela convivência e pela aprendizagem!

Ao Anderson, a alegria do laboratório, pela ajuda constante, pelos conselhos e pela amizade, que com certeza é um grande presente.

Ao Felipe, a “sementinha da discórdia”, pela imprescindível parceria nesse projeto, pela realização das análises químicas, por toda ajuda e amizade, a qual eu muito estimo.

Aos queridos amigos Camila, Christiane, Cibele, Deborah, Eduardo, Erikinha, Luís, Ricardo, Silene, Victor e Vinícius pela ótima convivência (não só no laboratório) durante o mestrado, pela diversão cotidiana, por todo apoio e disposição em ajudar!

Às amigas queridas, Cibele, Erikinha, Fabi (companhia e parceria constante na iniciação científica), Pati e Tati pelas boas conversas e todo apoio.

Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas, à Prof^a Dr^a Lourdes Campaner dos Santos e equipe do Laboratório de Química e Produtos Naturais do IQAr/UNESP pela preparação da fração e toda ajuda.

À Prof^a Dr^a Claudia Helena Pellizzon, pela receptividade, pela paciência e orientação na realização das análises histológicas e imunohistoquímicas. Obrigada aos funcionários do Depto. De Morfologia do IBB/UNESP e alunos de seu laboratório pela

ajuda, especialmente à Ariane (Sponja). Ao Hélio (Pon-Pon) pela hospitalidade e amizade. À Catarina pela companhia e boas conversas em Botucatu.

Ao Prof. Dr. Marcelo Silva pelo grande auxílio na interpretação do espectro de massas.

À Prof^a Dr^a Clélia Akiko Hiruma Lima pela participação na banca de defesa. Tornou-se presença obrigatória nas defesas de tese do nosso laboratório, devido ao olhar único e criterioso e valiosa contribuição. Obrigada pela disposição e atenção.

Ao Prof. Dr. Marcos José Salvador pela imensa ajuda, pela paciência, pela solicitude e valiosa participação nas bancas de qualificação e defesa.

Aos docentes Prof^a Dr^a Maria Cristina G. C. Marcondes, Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas e Prof. Dr. Marcos José Salvador pela participação em meu exame de qualificação, sugestões e comentários sobre meu trabalho.

Aos colegas e amigos do Depto. de Fisiologia e Biofísica (DABCFB) pela colaboração. Especialmente ao André (Lab.13), sempre disposto a ajudar!

Aos docentes e funcionários do Depto. de Fisiologia e Biofísica (DABCFB) e da Coordenadoria de Pós-graduação do IB/Unicamp.

Aos meus pais, Maurício e Celina, por tudo! Às minhas irmãs, Adriana e Aline, e ao meu irmão, Eduardo, pelas risadas e por todo o apoio. A toda minha família, em especial as minhas tias Maria e Cida, minha avó Celesta e meu padrinho Armando, pelo grande incentivo!

Aos meus amigos de graduação, de pós, de Unicamp, de Unesp, de moradia, de dança, de música, de projetos, de atividades, de sempre... por me ensinarem muito, por aprenderem e crescerem junto comigo, pelo carinho, pela força e por serem um pedacinho do que sou.

Ao CNPq e à FAPESP pelo apoio financeiro para minha formação científica e para o desenvolvimento desse projeto.

O meu olhar é nítido como um girassol.
Tenho o costume de andar pelas estradas
Olhando para a direita e para a esquerda,
E de, vez em quando olhando para trás...
E o que vejo a cada momento
É aquilo que nunca antes eu tinha visto,
E eu sei dar por isso muito bem...
Sei ter o pasmo essencial
Que tem uma criança se, ao nascer,
Reparasse que nascera deveras...
Sinto-me nascido a cada momento
Para a eterna novidade do Mundo...
Creio no mundo como num malmequer,
Porque o vejo. Mas não penso nele
Porque pensar é não compreender...
O Mundo não se fez para pensarmos nele
(Pensar é estar doente dos olhos)
Mas para olharmos para ele e estarmos de acordo...
Eu não tenho filosofia: tenho sentidos...
Se falo na Natureza não é porque saiba o que ela é,
Mas porque a amo, e amo-a por isso,
Porque quem ama nunca sabe o que ama
Nem sabe por que ama, nem o que é amar ...
Amar é a eterna inocência,
E a única inocência não pensar...

Alberto Caeiro

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	xii
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT	xix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Considerações Gerais	1
1.2. Úlcera Péptica.....	1
1.3. Espécies Reativas de Oxigênio e Resposta Inflamatória.....	3
1.4. Mecanismos Protetores da Mucosa Gástrica.....	6
1.5. Modelos Experimentais de Úlcera Gástrica	12
1.6. Tratamento de Úlcera Gástrica	14
1.7. Plantas Medicinais.....	15
1.8. Compostos Fenólicos.....	15
1.9. <i>Anacardium humile</i> St. Hil.	18
2. OBJETIVOS.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Material Vegetal.....	22
3.2. Preparação da Fração Acetato de Etila das Folhas de <i>A. humile</i> (AHFAC) ...	22
3.3. Caracterização Química de AHFAC.....	23
3.4. Avaliação da Atividade Antioxidante <i>in vitro</i>	25
3.5. Avaliação da Atividade Antiulcerogênica.....	26
3.6. Análise dos Mecanismos de Ação	29
3.7. Análise Estatística.....	33
4. RESULTADOS.....	34
4.1. Caracterização Química de AHFAC.....	34
4.2. Análise da Atividade Antioxidante <i>in vitro</i>	38
4.3. Análise da Atividade Antiulcerogênica e Antioxidante <i>in vivo</i>	39
4.4. Análise de Mecanismos de Ação	47
5. DISCUSSÃO.....	59
6. CONCLUSÃO.....	68
7. PERSPECTIVAS	69
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
9. APÊNDICE.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[M] = peso molecular

[M - H]⁻ = íon molecular (molécula desprotonada)

Abs. = absorvância

ADP = adenosina difosfato

AGEq = ácido gálico equivalente

AHFAC = fração acetato de etila das folhas de *A. humile*

AHFAq = fração aquosa das folhas de *A. humile*

ALFAC = solução de álcool, formalina e ácido acético

ALU = área de lesão ulcerativa

AMP = adenosina monofosfato

ANOVA = análise de variância de uma via

AP-1 = ativador protéico 1

Art. = artéria

ATP = adenosina trifosfato

C/EBP β = Proteína β intensificadora de ligação a CCAAT

CAT = catalase

COX = ciclooxigenase

CuZnSOD = superóxido dismutase dependente de cobre e zinco/ superóxido dismutase citoplasmática

DAB = 3-3'diaminobenzidina

DAINE = drogas antiinflamatórias não esteroidais

DNA = ácido desoxirribonucléico

dp = desvio padrão

DPPH = 1,1-difenil-1-picril-hidrazila

DTNB = ácido 5,5 ditiobis (2-nitrobenzóico)

EC₅₀ = concentração mínima para redução de 50% do radical DPPH

ECSOD = superóxido dismutase extracelular

EDCM = extrato diclorometano

EDTA = ácido etilenodiaminotetraacético

EGF = fator de crescimento epidermal

EMeOH = extrato metanólico
eNOS = enzima óxido nítrico sintase endotelial
epm = erro padrão da média
ERO = espécies reativas de oxigênio
ESI-MS = espectroscopia de massas com ionização por *eletrospray*
FADH₂ = flavina adenina dinucleotídeo
GSH = glutationa reduzida
G-SH = grupamentos sulfidríla
GPx = enzima glutationa peroxidase
GSSG = glutationa oxidada
GR = enzima glutationa redutase
H₂ = receptor histamínico do tipo 2
HE = hemtoxilina-eosina
HNE = 4-hidroxinonenal
HPLC-DAD = cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultra violeta
IL = interleucina
iNOS = enzima óxido nítrico sintase induzida
Inc. abdom. = incisão abdominal
i.p. = intra-peritoneal
m = mucosa
m/z = relação massa/carga
MAPK = proteíno-quinase ativada por mitógenos
MD = marcador
min = minuto
MIP-2 = proteína inflamatória de macrófagos 2
MnSOD = enzima superóxido dismutase dependente de manganês/ superóxido dismutase mitocondrial
MPO = enzima mieloperoxidase
NADH + H⁺ = nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NBT = azul de nitrotetrazólio

NF κ B = fator de transcrição nuclear κ B
nNOS = enzima 6xido n6trico sintase neuronal
NOS = enzima 6xido n6trico sintase
PAS = 6cido peri6dico de Schiff
PGE₂ = prostaglandina E₂
pH = potencial hidrogeni6nico
PPI = inibidor de bomba prot6nica
ppm = parte por milh6o
s/ = sem
sm = submucosa
SOD = enzima super6xido dismutase
TGF α = fator de crescimento tumoral α
TNF α = fator de necrose tumoral α
T_R = tempo de retenao
Tris = hidroximetilaminometano
U = unidade
UV = ultra-violeta
 λ = comprimento de onda

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1:** Mecanismo proposto para geração de ERO pela XO no processo de isquemia e reperfusão. Durante a isquemia, há aumento de Ca^{2+} intracelular, que estimula conversão da xantina desidrogenase (XD) em sua forma oxidase (XO) e acúmulo de hipoxantina. Na reperfusão, XO forma xantina, com redução de O_2 a $\text{O}_2^{\bullet-}$. Adaptado de Silva Jr *et al.*, 2002..... 5
- Figura 2:** Principais mecanismos de defesa da mucosa gástrica são: camada de muco e bicarbonato (1), células superficiais (2) e renovação do epitélio (3), fluxo alcalino (4), fluxo sanguíneo (5), fatores neurais (6) e humorais como as prostaglandinas (7). Adaptado de Laine *et al.*, 2008. 7
- Figura 3:** Representação esquemática da ação de enzimas antioxidantes. A enzima SOD catalisa a dimutação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , o qual é convertido em H_2O e O_2 pela enzima CAT, ou em H_2O , pela atividade da GPx, que nessa reação oxida uma molécula de GSH. A enzima GR retorna GSSG a sua forma reduzida (GSH). Adaptado de Kwiecien *et al.*, 2002..... 11
- Figura 4:** *Anacardium humile* St. Hil (Anacardiaceae), conhecida popularmente como cajuzinho-do-cerrado. (A) Inflorescências de *A. humile*, extraído de Lorenzi & Matos (2002). (B) Parte aérea vegetativa e (C) pseudofrutos e frutos de *A. humile*, extraído de Luiz-Ferreira, 2005. 18
- Figura 5:** Principais constituintes da fração AHFAc. (A) (+)-catequina, (B) amentoflavona, (C) galato de metila, (D) ácido gálico, segundo trabalho de Luiz-Ferreira, 2005. 20
- Figura 6:** Representação esquemática do protocolo experimental do modelo de indução de úlcera gástrica por isquemia e reperfusão..... 27
- Figura 7:** Representação esquemática do protocolo experimental do modelo de indução de úlcera gástrica por etanol absoluto. 28

- Figura 8:** Cromatograma obtido por HPLC-DAD da fração acetato de etila de das folhas de *A. humile* (AHFAC)..... 34
- Figura 9:** Espectro de massas (ESI-MS) da fração acetato de etila de das folhas de *A. humile* (AHFAC). 36
- Figura 10:** Curva de redução da fração acetato de etila das folhas de *A. humile* (AHFAC) em ensaio com radical DPPH. 38
- Figura 11:** Efeito da administração de AHFAC na área de lesão ulcerativa (ALU) no estômago de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão. (A) Visualização macroscópica das lesões. (B) Área de lesão ulcerativa (ALU). O pré-tratamento com AHFAC (50 e 100 mg.kg⁻¹) reduziu significativamente a ALU. Dados expressos em média ± epm. Análise estatística ANOVA, seguida de teste de Tukey. 39
- Figura 12:** Fotomicrografias de estômagos de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão. Cortes histológicos corados com HE. Em A e D (grupo SHAM) se observa a organização morfológica da parede gástrica íntegra. Em B e E (grupo VEÍCULO) são observadas áreas de alteração celular na região apical da glândulas gástricas, indicadas por setas. Em C e F (grupo AHFAC) nota-se integridade da mucosa, semelhante ao grupo SHAM. Barras: 30 µm em A, B, C e 20 µm em D, E, F..... 41
- Figura 13:** Fotomicrografias de estômagos de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão. Cortes histológicos corados com PAS, marcador de glicoproteínas.(A) SHAM, (B) VEÍCULO, (C) AHFAC. As setas indicam área de células secretoras de muco. Barras: 50 µm. 42
- Figura 14:** Efeito da administração de AHFAC na área de lesão ulcerativa (ALU) no estômago de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto. (A) Visualização macroscópica das lesões. (B) Área de lesão ulcerativa (ALU). O pré-tratamento com AHFAC (50 mg.kg⁻¹) reduziu a ALU

observada no grupo VEÍCULO. Dados expressos em média \pm epm. Análise estatística ANOVA, seguida de teste de Dunnett. 43

Figura 15: Fotomicrografias de estômagos de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto. Cortes histológicos corados com HE. A e D apresentam fotos do grupo SHAM, onde se observa a organização morfológica da parede gástrica não lesionada. No controle negativo (VEÍCULO) são observadas áreas de lesão (B) e hemorragia no epitélio (D), indicadas por setas. Em C e F (grupo AHFAc) nota-se melhor integridade da mucosa gástrica com áreas de alteração celular menores e mais superficiais (seta) e ausências de pontos de hemorragia. Barras: 30 μ m em A, B, C e 20 μ m em D, E, F. 45

Figura 16: Fotomicrografias de estômagos de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto. Cortes histológicos corados com PAS, marcador de glicoproteínas. (A) SHAM, (B) VEÍCULO, (C) AHFAc. As setas indicam áreas de células secretoras de muco. Barras: 20 μ m. 46

Figura 17: Atividade da enzima MPO na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão. Dados expressos em média \pm epm. Análise estatística ANOVA, seguida de teste de Dunnett. 47

Figura 18: Fotomicrografias de estômagos de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão. Cortes histológicos submetidos à imunolocalização de MPO. Áreas positivas para MPO são marcadas em cor marrom (setas), encontradas principalmente na lâmina própria da mucosa e na submucosa do estômago de ratos do grupo SHAM (A), VEÍCULO (B) e AHFAc (C). Barras: 20 μ m. m = mucosa; sm = submucosa. 48

Figura 19: Atividade da enzima MPO na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto. Dados expressos em média \pm epm. Análise estatística ANOVA, seguida de teste de Dunnett. 49

Figura 20: Fotomicrografias de estômagos de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto. Cortes histológicos submetidos à imunolocalização

de MPO. Áreas positivas para MPO são marcadas em cor marrom (setas), encontradas principalmente na lâmina própria da mucosa e na submucosa do estômago de ratos do grupo SHAM (A), VEÍCULO (B) e AHFAc (C). Barras: 20 μ m. m = mucosa; sm = submucosa. 50

Figura 21: Níveis de G-SH na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto. Dados expressos em média \pm epm. Análise estatística ANOVA, seguida de teste de Dunnett. 51

Figura 22: Taxa de apoptose na mucosa gástrica de ratos expostos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto. (A) Fragmentação de DNA na mucosa gástrica. (B) Representação gráfica percentual de fragmentação de DNA, considerando a taxa de fragmentação máxima aquela obtida na mucosa gástrica de ratos pré-tratados apenas com o veículo. Análise estatística Kruskal-Wallys, seguido de teste de Dunns. MD = marcador. 52

Figura 23: Atividade da enzima GPx na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão (A) ou por etanol absoluto (B). Dados expressos em média \pm epm. Análise estatística ANOVA, seguida de teste de Dunnett. 53

Figura 24: Atividade da enzima GR na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão (A) ou por etanol absoluto (B). Dados expressos em média \pm epm. Análise estatística ANOVA, seguida de teste de Dunnett. 54

Figura 25: Atividade da enzima SOD na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão (A) ou por etanol absoluto (B). Dados expressos em média \pm epm. Análise estatística ANOVA, seguida de teste de Dunnett. 55

Figura 26: Fotomicrografias de estômagos de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão. Cortes histológicos submetidos à imunolocalização de SOD. Áreas positivas para SOD são marcadas em cor

marrom (setas), encontradas principalmente na lâmina própria e glândulas da mucosa e na submucosa do estômago de ratos do grupo SHAM (A), VEÍCULO (B) e AHFAc (C). No grupo TWEEN também são observadas áreas positivas para SOD na superfície apical do epitélio. m = mucosa; sm = submucosa. 56

Figura 27: Fotomicrografias de estômagos de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto. Cortes histológicos submetidos à imunolocalização de SOD. Áreas positivas para SOD são marcadas em cor marrom (setas), encontradas principalmente na lâmina própria e glândulas da mucosa e na submucosa do estômago de ratos do grupo SHAM (A), VEÍCULO (B) e AHFAc (C). No grupo TWEEN também são observadas áreas positivas para SOD na superfície apical do epitélio. m = mucosa; sm = submucosa. 57

Fluxograma 1: Etapas na preparação da fração acetato de etila de *A. humile* (AHFAc). EDCM – extrato diclorometano, EMeOH – extrato metanólico. AHFAq – fração aquosa. 23

Tabela 1: Esqueleto básico das principais classes de compostos fenólicos sintetizados por vegetais. Adaptado de Crosier *et al.*, 2009 16

Tabela 2: Concentração de compostos fenólicos em AHFAc (Luiz-Ferreira, 2005). 19

Tabela 3: Anticorpos e diluições específicas para as reações de imunohistoquímica. 33

Tabela 4: Constituintes sugeridos para a fração acetato de etila de das folhas de *A. humile* (AHFAc), segundo resultados de análises em HPLC-DAD e ESI-MS. 37

Anacardium humile, popularmente conhecida como cajuzinho-do-cerrado, é utilizada na medicina tradicional para o tratamento de diversas inflamações. Extratos e frações de suas folhas apresentam compostos fenólicos e significativa atividade anti-úlceras. Nesse trabalho, avaliou-se possíveis mecanismos antioxidantes na gastroproteção conferida pela fração acetato de etila das folhas de *A. humile* (AHFAC).

AHFAC é rica em compostos fenólicos, há mais de 30% de fenólicos solúveis nessa fração, segundo resultados do ensaio de Folin-Ciocalteu. AHFAC apresenta atividade redutora em ensaio de redução de 1,1-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), o que representa ação sequestradora de radicais livres em potencial. Foram registrados o perfil cromatográfico de AHFAC, em cromatografia líquida de alta eficiência e o espectro de massas com ionização por *electrospray*, que indicam a presença de ácido gálico e/ou derivados, quercetina, kaempferol e amentoflavona (um biflavonóide).

A atividade farmacológica de AHFAC foi analisada em modelos de indução de úlcera gástrica por isquemia e reperfusão e por etanol absoluto. Ratos Unib: WH foram tratados com o veículo Tween 80[®] 12% (10 ml.kg⁻¹) ou AHFAC (25, 50 e 100 mg.kg⁻¹) e submetidos à isquemia (30 minutos) e reperfusão (60 minutos) do estômago ou à administração de 1 ml de etanol absoluto. Um grupo SHAM foi formado por animais não tratados, expostos aos procedimentos experimentais, mas sem efetiva indução de úlcera. Após a realização dos modelos de indução de úlcera gástrica, o estômago dos animais foi removido, a área de lesão ulcerativa determinada, uma porção do estômago foi fixada para análises histológicas (colorações hematoxilina-eosina e ácido periódico de Schiff) e imunohistoquímicas (reação para mieloperoxidase e superóxido dismutase) e o restante da

porção glandular do estômago foi raspado e homogeneizado para ensaios bioquímicos. Foram dosados os níveis de grupamentos sulfidrila (G-SH), fragmentação de DNA, atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e superóxido dismutase (SOD).

O pré-tratamento com AHFAc (50 mg.kg^{-1}) apresenta efeito gastroprotetor nos dois modelos experimentais de úlcera gástrica analisados, com manutenção da integridade da mucosa e tendência de aumento dos níveis de muco. AHFAc evitou o aumento da atividade de MPO na mucosa gástrica de ratos submetidos aos dois modelos experimentais investigados, o que indica menor infiltração de neutrófilos no estômago dos animais tratados com a fração. Além disso, a administração de AHFAc também foi eficaz em manter os níveis normais de G-SH e fragmentação de DNA bem como da atividade da SOD e GPx na mucosa gástrica exposta à ação lesiva do etanol absoluto.

A ação antiulcerogênica de AHFAc deve envolver atividade antioxidante, garantida pela sua composição fenólica, aliada a outros mecanismos de ação. Uma vez que não foi observada modulação na atividade das enzimas antioxidantes, e por apresentar capacidade redutora do DPPH, a atividade antioxidante de AHFAc provavelmente envolve sequestro de radicais livres.

Anacardium humile, popularly known as “cajuzinho-do-cerrado”, is used in traditional medicine for the treatment of various inflammatory diseases. Extracts and fractions of leaves of *A. humile* present phenolic compounds and significant antiulcer activity. In this study, we evaluated the possible antioxidant mechanisms in the antiulcerogenic activity conferred by the ethyl acetate fraction of leaves of *A. humile* (AHFAc).

AHFAc is rich in phenolic compounds; there are more than 30% of soluble phenolic compounds in this fraction, according to results from the Folin-Ciocalteu assay. AHFAc shows antioxidant activity in the 1,1-diphenyl-1-picryl-picrylhydrazyl (DPPH) assay, which represents a potential free radical scavenging action. There have been recorded the chromatographic profile AHFAc in high performance liquid chromatography and the mass spectrum by electrospray ionization mass spectrometry, which indicate the presence of gallic acid and derivatives, quercetin, kaempferol and amentoflavone (biflavonoid).

The pharmacological activity of AHFAc was examined in ischemia and reperfusion-induced and absolute ethanol-induced gastric ulcer models. Unib: WH rats were treated with the vehicle Tween 80 12% (10 ml.kg⁻¹) or AHFAc (25, 50 and 100 mg.kg⁻¹) and underwent ischemia (30 minutes) and reperfusion (60 minutes) of stomach or the administration of 1 ml of absolute ethanol. SHAM group was formed by untreated animals exposed to experimental procedures, but without effective induction of ulcer. After experimental models, the stomach of the animals was removed, the ulcerative lesion area (ULA) determined, a portion of the stomach was fixed for histological analysis (hematoxylin-eosin staining and periodic acid Schiff staining) and immunohistochemistry

analysis (myeloperoxidase and superoxide dismutase), the remaining portion of the glandular stomach was scraped and homogenized for biochemical assays. We measured the levels of sulfhydryl groups (G-SH), DNA fragmentation, activity of myeloperoxidase (MPO), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and superoxide dismutase (SOD) enzymes.

The pre-treatment with AHFAc (50 mg.kg⁻¹) showed gastroprotective effect in both experimental models of gastric ulcer, while maintaining the integrity of the mucosa and a tendency for increased levels of mucus. The administration of AHFAc was also effective in maintaining normal levels of G-SH and fragmentation of DNA, SOD and GPx activities in the gastric mucosa exposed to the harmful effect of absolute ethanol. In addition, AHFAc prevented the increase of MPO activity in gastric mucosa of rats subjected to the experimental models investigated, indicating less infiltration of neutrophils in the stomach of animals treated with the fraction.

The anti-ulcer action of AHFAc must involve antioxidant activity, due to its phenolic composition, combined with other mechanisms of action. Since there was no modulation in the activity of antioxidant enzymes, and for presenting reduction capacity of DPPH, the antioxidant activity of AHFAc probably involves scavenger activity of free radicals.

1.1. Considerações Gerais

O uso de plantas para o tratamento de enfermidades é uma tradição milenar, baseada no conhecimento empírico, acumulado e transmitido ao longo de gerações. O conhecimento popular sobre uso terapêutico de plantas se configura como uma das bases para investigação e identificação de moléculas com atividade farmacológica e para desenvolvimento de medicamentos. Dessa forma, a diversidade de moléculas sintetizadas por vegetais possibilita a descoberta de novos princípios ativos ou modelos para a síntese química de moléculas para o tratamento de diversas enfermidades. Entre o rol de doenças que são alvo da pesquisa de novas substâncias terapêuticas de origem vegetal está a úlcera péptica (Gurib-Fakim, 2006; Guerra & Nodari, 2007).

1.2. Úlcera Péptica

A úlcera péptica, que engloba as úlceras gástrica e duodenal, acomete cerca de 10% da população mundial. A incidência dessa enfermidade no mundo é estimada em 1500 a 3000 casos por 100000 habitantes por ano. No Brasil, a incidência de úlcera péptica não é precisamente conhecida e os poucos estudos estatísticos indicam incidência de 1 a 20% (Berstad & Berstad, 1993; d'Accampora *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2009). Complicações decorrentes da úlcera péptica como hemorragia, perfuração e obstrução gástricas são estimadas em 15-20%, 5% e 2%, respectivamente. A perfuração é uma complicação que se mantém constante, apesar da redução da incidência de úlcera (Zittel *et al.*, 2000; Butte *et al.*, 2007; d'Accampora *et al.*, 2008).

A úlcera péptica foi por muito tempo uma importante causa de mortalidade e morbidade (Chan & Leung, 2002). A úlcera péptica consiste em lesões profundas, no estômago ou duodeno, que se estendem através da mucosa e penetram a camada muscular (Leong & Chan, 2004 *apud* Leong, 2009). Essas lesões podem surgir quando ocorre sobreposição de agentes agressores frente a uma mucosa íntegra ou quando os mecanismos de defesa da mucosa tornam-se deficientes (Laine *et al.*, 2008). Na mucosa gástrica, o desequilíbrio entre fatores agressores e protetores está relacionado a diversos fatores exógenos como estresse, uso de drogas antiinflamatórias não esteroidais (DAINE), tabagismo, consumo de álcool e infecção por *Helicobacter pylori* (Tarnawski, 2005; Yuan *et al.*, 2006).

A infecção por *H. pylori* é apontada como um dos principais fatores etiológicos da úlcera péptica. Cerca de 90% dos casos de úlcera duodenal e 75% dos casos de úlcera gástrica está associado à presença de *H. pylori*, sendo a erradicação dessa bactéria eficiente na redução das taxas de recidiva de úlceras (Napolitano; 2009). A utilização de DAINÉ é o segundo maior fator etiológico da úlcera gástrica. Estima-se que usuários crônicos de DAINÉ tem risco de desenvolver úlcera gástrica 46 vezes maior que a média da população e a prevalência de úlcera gástrica nesse grupo é de 9 a 13% (Castro *et al.*, 2009).

A maior parte dos casos de úlceras pépticas está relacionada à *H. pylori* e uso de DAINÉ, mas outros fatores podem estar entre os agentes etiológicos como a doença de Chron, hipercalcemias, linfomas, mastocitose sistêmica, hiperfunção de células G, infecção por *Helicobacter heilmannii*, citomegalovírus ou herpes do tipo I. Para uma pequena parcela de indivíduos com úlcera péptica não se identifica a causa etiológica da doença; são os casos de úlceras idiopáticas (Castro *et al.*, 2009). Chow & Sung (2007) relatam que a

prevalência de úlceras idiopáticas está aumentando, desde a última década. Na América do Norte, 20 a 40% dos casos de úlceras pépticas não estão associados à infecção por *H. pylori* ou ao uso crônico de DAINE.

Yuan *et al.* (2006) relatam que recentes avanços no conhecimento e no tratamento de úlceras pépticas reduziram a incidência dessa doença; entretanto, existem alguns problemas a serem resolvidos: como tratar úlceras quando há falhas na erradicação de *H. pylori*, como prevenir o desenvolvimento e evitar a reincidência de úlceras em usuários de DAINE e como tratar úlceras não relacionados à infecção por *H. pylori* ou ao uso de DAINE.

1.3. Espécies Reativas de Oxigênio e Resposta Inflamatória

Átomos e moléculas que possuem número ímpar de elétrons (elétrons desemparelhados) em sua órbita externa são denominados radicais livres e possuem grande instabilidade e reatividade. Em meios biológicos, os principais radicais livres são formados a partir do metabolismo do oxigênio molecular (O_2), como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxila ($\bullet OH$). A partir de O_2 também são geradas outras moléculas não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio *singlet* (1O_2), mas que participam da liberação de radicais livres. Assim, ânion superóxido, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio e oxigênio *singlet* são denominados, em conjunto, espécies reativas do oxigênio (ERO) (Cheeseman, 1993; de Zwart *et al.*, 1999; Naito & Yoshikawa, 2002).

Por sua alta reatividade, ERO podem oxidar moléculas biológicas (lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos) causando danos aos tecidos e levando a enfermidades. Em condições fisiológicas, os prejuízos relacionados à geração de ERO são evitados ou minimizados através de um complexo sistema antioxidante, envolvendo

agentes enzimáticos e não enzimáticos. Quando a formação de ERO excede a capacidade antioxidante do organismo tem-se o chamado estresse oxidativo, um estado que propicia diversas alterações em macromoléculas e danos celulares, relacionado a diversas doenças (Naito & Yoshikawa, 2002; Barreiros *et al.*, 2006).

ERO podem ser formadas na cadeia de transporte de elétrons, que ocorre na membrana mitocondrial interna, durante a síntese de ATP. Quatro elétrons, doados por $\text{NADH} + \text{H}^+$ ou FADH_2 depois de atravessarem a cadeia de transporte, são transferidos pela citocromo oxidase ao O_2 , formando água. A transferência monovalente de elétrons pode resultar em redução incompleta do oxigênio e gerar $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Naito & Yoshikawa, 2002; Barreiros *et al.*, 2006).

A dismutação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ produz H_2O_2 , que não apresenta grande reatividade, mas pode dar origem a $\bullet\text{OH}$, o radical mais deletério ao organismo, através de reações com metais de transição, como Fe^{2+} ou Cu^+ (Blake *et al.*, 1987; Lazar *et al.*, 1989; Naito & Yoshikawa, 2002; Barreiros *et al.*, 2006).

Outra fonte de produção de radicais livres em meios biológicos é o processo inflamatório onde O_2 é reduzido a $\text{O}_2^{\bullet-}$, por meio da enzima NADPH oxidase, presente na membrana plasmática de células fagocitárias (Grisham & Hernandez, 1986). O ânion superóxido é convertido a peróxido de hidrogênio, que pode originar ácido hipocloroso ou hipoclorito, na presença de Cl^- , em reação catalisada pela mieloperoxidase (Grisham & Hernandez, 1986; Fialkow *et al.*, 2007).

ERO também podem ser geradas pela enzima xantina oxidase (XO), a qual é ativada em condições de baixa relação ATP/ADP e alta concentração de Ca^{2+} intracelular, o que ocorre no processo de isquemia e reperfusão. Nesse caso, duas moléculas de ADP são

convertidas a ATP e AMP, o qual é degradado e resulta em acúmulo de hipoxantina. A XO converte hipoxantina a xantina e utiliza O_2 como acceptor de elétrons, gerando $O_2^{\bullet-}$, conforme esquema apresentado na figura 1 (McCord, 1985; Parks & Granger, 1988).

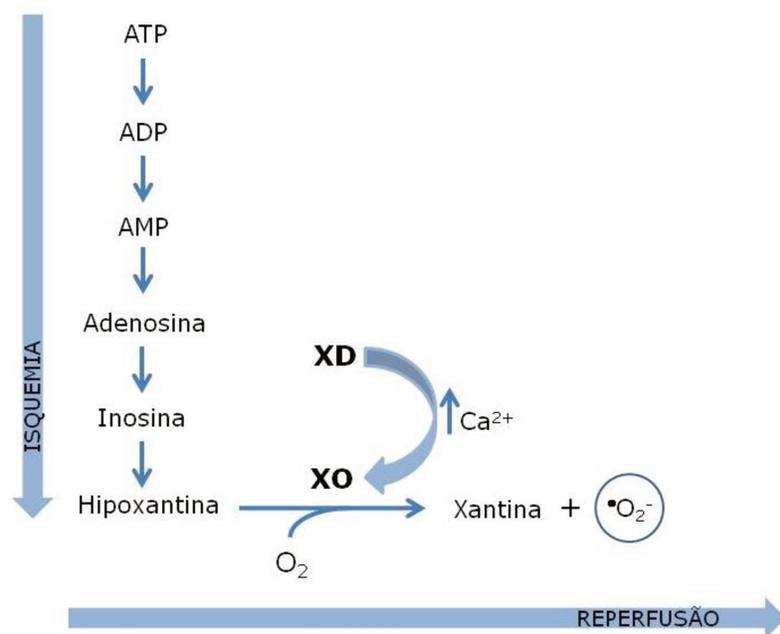


Figura 1: Mecanismo proposto para geração de ERO pela XO no processo de isquemia e reperfusão. Durante a isquemia, há aumento de Ca^{2+} intracelular, que estimula conversão da xantina desidrogenase (XD) em sua forma oxidase (XO) e acúmulo de hipoxantina. Na reperfusão, XO forma xantina, com redução de O_2 a $O_2^{\bullet-}$. Adaptado de Silva Jr *et al.*, 2002.

Além de causar oxidação de moléculas biológicas, ERO são capazes de modular vias de sinalização intracelular ou agir como substâncias parácrinas, através da ativação de citocinas, angiotensina e fatores de crescimento. ERO também são apontadas como fatores reguladores da resposta inflamatória modulando eventos como fagocitose, secreção de citocinas, expressão gênica e apoptose, principalmente relacionados à função de neutrófilos (Ganguly *et al.*, 2006; Fialkow *et al.*; 2007).

Entre os elementos ativados por ERO está o fator nuclear de transcrição κB (NF κB), que regula a expressão de diversos genes importantes para o processo inflamatório

(Halliwell & Gutteridge, 2007). NFκB regula a expressão de várias citocinas como interleucinas 1, 2, 6 e 8 (IL-1, IL-2, IL-6 e IL-8), a quimiocina proteína inflamatória de macrófagos 2 (MIP-2) e das enzimas óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2), além de outros mediadores inflamatórios como moléculas de adesão (Conner & Grisham, 1996; Fialkow *et al.*, 2007).

NFκB é ativado em situações de estresse (mecânico, oxidativo, e aqueles produzidos por choque e infecções), em resposta a estímulos como citocinas (IL-1, TNFα) ou outras substâncias como H₂O₂, lipopolissacarídeos, níquel e cobalto (Das & Maulik, 2004; Fialkow *et al.*, 2007; Halliwell & Gutteridge, 2007). A ativação de NFκB é observada em várias doenças, desde gastrite até artrite reumatóide. Lee e colaboradores (2005) observaram aumento na ativação de NFκB em modelo experimental de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto. O estresse oxidativo, associado à resposta inflamatória, com ativação de NFκB e liberação de citocinas (IL-1, IL-8, TNFα), é observado em casos de gastrite e úlcera gástricas causados por *H. pylori* (Naito & Yoshikawa, 2002; Halliwell & Gutteridge, 2007).

1.4. Mecanismos Protetores da Mucosa Gástrica

A integridade da mucosa gástrica envolve diversos fatores como organização do epitélio e sua adequada reconstituição, fluxo sanguíneo, camada de muco e secreção de bicarbonato (barreira protetora à ação do ácido no lúmen do estômago), sistema antioxidante, síntese de prostaglandinas e óxido nítrico (NO) (McCord & Fridovich, 1969; Garner *et al.*, 1979; Whittle *et al.*, 1981; Whittle *et al.*, 1990). Os principais fatores de proteção da mucosa gástrica são ilustrados na Figura 2.

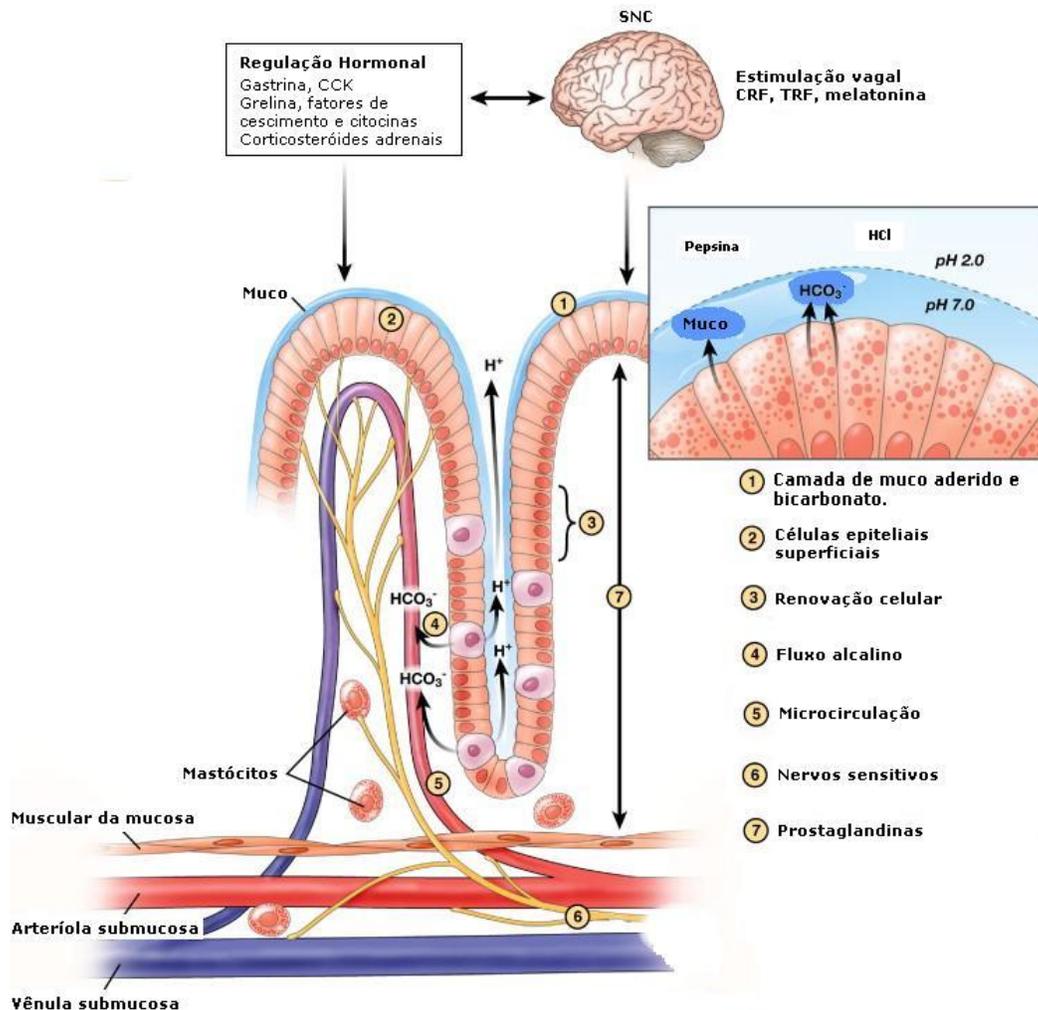


Figura 2: Principais mecanismos de defesa da mucosa gástrica são: camada de muco e bicarbonato (1), células superficiais (2) e renovação do epitélio (3), fluxo alcalino (4), fluxo sanguíneo (5), fatores neurais (6) e humorais como as prostaglandinas (7). Adaptado de Laine *et al.*, 2008.

A camada de muco, bicarbonato e fosfolípidos que cobre o epitélio do estômago é considerada primeira linha de defesa da mucosa gástrica, com capacidade de lubrificar e proteger a mucosa gástrica de forças mecânicas da digestão, além de favorecer a difusão e neutralização do ácido luminal (Garner *et al.*, 1984; Laine *et al.*, 2008). O muco, formado por glicoproteínas mucinas (5 %) e água (95 %), é secretado pelas células superficiais do epitélio gástrico e sua produção é estimulada por hormônios gastrintestinais (gastrina e

secretina), agentes colinérgicos e prostaglandina (Laine *et al.*, 2008); o bicarbonato secretado pelas células epiteliais superficiais é retido pelo muco, criando um gradiente de pH entre o lúmen e o epitélio gástrico, mantendo pH neutro na superfície das células epiteliais, além de impedir o contato da pepsina com o epitélio do estômago devido à presença de fosfolípídeos hidrofóbicos (Garner *et al.*, 1984; Laine *et al.*, 2008). A camada de muco também protege as células epiteliais de danos provocados por radicais livres; essa ação antioxidante do muco está relacionada às suas glicoproteínas que podem seqüestrar $\bullet\text{OH}$ e H_2O_2 (Cross *et al.*, 1984; Garner *et al.*, 1984; Repetto e Llesuy, 2002).

As prostaglandinas do estômago, principalmente PGE_2 , estimulam a produção de muco e bicarbonato, reduzem a secreção ácida, regulam o fluxo sanguíneo, estimulam a renovação epitelial, além de inibir a expressão de $\text{TNF}\alpha$, contribuindo para a integridade da mucosa (Brzozowski *et al.*, 2005); são sintetizadas a partir do ácido araquidônico pela ação das ciclooxigenases (COX). Existem duas isoformas conhecidas de COX: a COX-1, constitutiva, está relacionada à síntese fisiológica de prostaglandina, enquanto a COX-2, induzida, aumenta a síntese de prostanóides na inflamação e em várias doenças (Chandrasekharan *et al.*, 2002; Gudis & Sakamoto, 2005).

DAINE inibem, de forma não seletiva, as enzimas COX e, conseqüentemente, a síntese de prostaglandinas (Vonkeman & van de Laar, 2010). O uso frequente de DAINES está relacionado ao desenvolvimento de gastrite e úlcera gástrica, fato que evidencia a importância das prostaglandinas para a manutenção da integridade da mucosa gástrica.

As células superficiais do epitélio do estômago são responsáveis pela secreção de muco, bicarbonato e fosfolípídeos e formam uma importante barreira contra a difusão do ácido e da pepsina, devido à presença de junções oclusivas (*tight junctions*) (Laine *et al.*,

2008). Considerando a importância da superfície epitelial para prevenção de lesões no estômago, um balanço adequado entre perda e renovação celular torna-se fundamental para manter a integridade da mucosa gástrica. Aumento na degradação ou redução na proliferação de células epiteliais está associado a danos na mucosa (Konturek, 1985). Uma alta taxa de renovação celular no estômago é garantida por células progenitoras, que proliferam em resposta a fatores de crescimento (Jones *et al.*, 1999; Laine *et al.*, 2008). As células progenitoras, localizadas na base das glândulas gástricas, respondem a estímulo do fator de crescimento epidermal (EGF) e do fator de crescimento e transformação α (TGF α) (Jones *et al.*, 1999).

A microcirculação é outro fator importante na manutenção da integridade da mucosa, sendo a redução do fluxo sanguíneo um agente facilitador do desenvolvimento de úlceras (Konturek, 1985; Laine *et al.*, 2008). O contato da mucosa com agentes irritantes resulta em aumento do fluxo sanguíneo na mucosa, enquanto condições de redução da microcirculação na mucosa, como choque hemorrágico, microtrombos e agentes vasoconstritores, aumentam a formação de lesões no estômago (Konturek, 1985). Menguy e colaboradores (1974) relatam que a indução de choque hemorrágico em ratos resulta em redução dos níveis de ATP, de forma coincidente ao surgimento de necrose celular e erosões.

O fluxo sanguíneo supre a mucosa gástrica de nutrientes, oxigênio, hormônios e fatores responsáveis pela rápida restituição do epitélio, pela secreção de muco e bicarbonato, ambas importantes para manutenção da integridade do estômago, além de permitir remoção de agentes lesivos e excesso de prótons (Kawano & Tsuji, 2000). Assim, a microcirculação gástrica regula a capacidade do estômago reagir a agentes lesivos; a

redução do fluxo sanguíneo torna a mucosa gástrica mais suscetível a danos (Abdel-Salam *et al.*, 2001).

O óxido nítrico (NO) possui ação protetora na mucosa gástrica por regular a homeostase da microcirculação e atuar na cicatrização, além de ser uma molécula capaz de inibir infiltração de neutrófilos, diminuindo a expressão de moléculas de adesão e algumas citocinas (Wallace & Ma, 2001; Tatemichi *et al.*, 2003). Entretanto, em altas concentrações, NO pode inibir enzimas de reparo do DNA e aquelas dependentes de grupamentos sulfidríla, além de formar peroxinitrito (ONOO⁻), após reagir com O₂^{•-}, e contribuir com o estresse oxidativo (Cho, 2001). A enzima óxido nítrico sintase (NOS), a partir da L-arginina, produz NO, um mediador envolvido tanto na inflamação e ocorrência de danos ao tecido, quanto na proteção frente à úlcera gástrica e na manutenção de determinadas funções fisiológicas (Elliot & Wallace, 1998; Naito *et al.*, 1998). A enzima NOS possui diferentes isoformas, que podem ser do tipo constitutivo (endotelial – eNOS e neuronal – nNOS) ou induzido (iNOS). A ação citotóxica do NO está principalmente relacionada à atividade da iNOS que, ao ser estimulada, produz NO por longos períodos de tempo, em grande quantidade, favorecendo a formação de ONOO⁻ (Cho, 2001; Wallace & Ma, 2001).

O organismo possui agentes antioxidantes como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona redutase (GR). Importantes antioxidantes não-enzimáticos são as vitaminas A, E, C e a provitamina A (β-caroteno), glutaciona (GSH), α-tocoferol, transferrina, compostos com grupamento sulfidríla (G-SH) e quelantes como EDTA (Szelenyi & Brune, 1988; Konturek *et al.*, 1990; Das *et al.*, 1997; Halliwell, 1997). As enzimas SOD, CAT, GPx e GR fazem parte do

sistema antioxidante, um mecanismo de defesa do organismo que impede os danos causados por ERO (Zabłocka e Janusz, 2008).

A enzima SOD catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ e tem como co-fatores cobre e zinco, no caso das isoformas citoplasmática (CuZnSOD) e extracelular (ECSOD), ou manganês, no caso da enzima mitocondrial (MnSOD). CAT degrada o H_2O_2 , requerendo ferro como co-fator, enquanto a GPx, cujo co-fator é o selênio, facilita a “varredura” de radicais livres, associada à oxidação de glutationa (GSH). A glutationa oxidada (GSSG) é reduzida pela enzima GR (Conner & Grisham, 1996; Halliwell, 1997; Havsteen, 2002; Imai & Nakagawa, 2003; Baker, 2004; Kock *et al.*, 2004; Rukkumani *et al.*, 2004). Um esquema das reações catalizadas pelas enzimas do sistema antioxidante é apresentado na Figura 3.

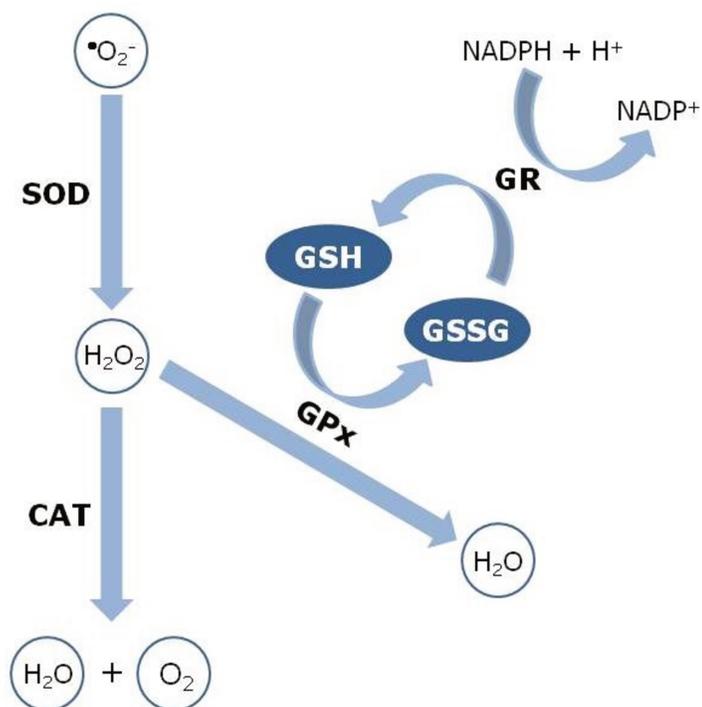


Figura 3: Representação esquemática da ação de enzimas antioxidantes. A enzima SOD catalisa a dimutação de $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , o qual é convertido em H_2O e O_2 pela enzima CAT, ou em H_2O , pela atividade da GPx, que nessa reação oxida uma molécula de GSH. A enzima GR retorna GSSG a sua forma reduzida (GSH). Adaptado de Kwiecien *et al.*, 2002.

Quando os eventos oxidativos excedem a capacidade do sistema antioxidante ocorre o estado conhecido como “estresse oxidativo”, observado em grande parte dos processos patológicos. Com o estresse oxidativo há aumento da peroxidação lipídica e da carbonilação de proteínas, redução dos níveis de grupamentos sulfidrila e indução de apoptose (Halliwell & Gutteridge, 1990; Das & Banerjee, 1993).

1.5. Modelos Experimentais de Úlcera Gástrica

Devido ao caráter multifatorial da úlcera gástrica, existem diversos modelos experimentais para indução de lesões na mucosa gástrica, a partir de diferentes agentes, como etanol absoluto, ácido acético, estresse, isquemia/reperfusão, ligadura do piloro e DAINÉ. A geração de radicais livres tem sido relatada em modelos de indução por etanol, estresse, DAINÉ e isquemia/reperfusão (Itoh & Guth, 1985; Das & Banerjee, 1993; Konturek *et al.*, 2000; Brzozowski *et al.*, 2001).

Na úlcera gástrica induzida por etanol há a formação de edema no tecido, hemorragia sub-epitelial, esfoliação celular, redução de muco aderido ao epitélio, infiltração de células inflamatórias, e conseqüente liberação de substâncias vasoativas, aumento da permeabilidade da mucosa e geração de ERO (Szabo *et al.*, 1985; Hiraishi *et al.*, 1999; Kountouras *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2006). A liberação de $O_2^{\bullet-}$ na lesão induzida pelo etanol, pode estar relacionada à produção de acetaldeído, formado pela ação da enzima álcool desidrogenase sobre o etanol. O acetaldeído serve como substrato para a xantina oxidase, a qual produz radicais livres (Steinbeck *et al.*, 1993; Hiraishi *et al.*, 1999; Koch, *et al.*, 2004). A administração de inibidores da xantina oxidase, como alupurinol e oxipurinol, preveniu a formação de úlceras gástricas em trabalho realizado por Mizui e colaboradores (1987).

No modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão, a liberação de ERO é relatada como evento patológico central; a utilização de compostos antioxidantes e *scavengers* de radicais livres têm se mostrado benéfica em animais expostos a este processo (Itoh & Guth, 1985; Wadhwa *et al.*, 1987; Yoshikawa *et al.*, 1989; Andrews *et al.*, 1992; Sakurai *et al.*, 1994; Brzozowski *et al.*, 1999; Naito *et al.*, 1999; Derin *et al.*, 2004; Derin *et al.*, 2006). A isquemia, por si só, é capaz de provocar lesões no tecido gástrico; entretanto, é após a reperfusão que ocorrem os principais eventos lesivos. Kitano *et al.* (2005) mostraram que após reoxigenização da mucosa gástrica as lesões são aumentadas em cerca de três vezes em relação às ocasionadas pelo período de isquemia.

Durante a isquemia ocorre aumento no nível de cálcio citosólico, levando a várias disfunções celulares como conversão de xantina desidrogenase à xantina oxidase e catabolização de ATP à hipoxantina. Com a reperfusão, a hipoxantina é metabolizada pela xantina oxidase formando $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 (Derin *et al.*, 2004). Outra fonte de geração de radicais livres no processo de isquemia e reperfusão são os neutrófilos que liberam $O_2^{\bullet-}$, através da enzima NADPH oxidase, além de proteases e colagenases (Andrews *et al.*, 1994; Naito *et al.*, 1998, Watanabe *et al.*, 2000; Erkasap *et al.*, 2003; Derin *et al.*, 2004).

Zhang e colaboradores (2008) observaram aumento da ativação de NF κ B na mucosa gástrica, logo após indução de úlceras por isquemia e reperfusão; essa ativação está relacionada, provavelmente, à geração de ERO, evidenciada pelo aumento de peroxidação lipídica, e à liberação de citocinas.

Entre as citocinas capazes de ativar NF κ B está o TNF α , o qual tem níveis aumentados em casos de úlcera gástrica. Produzido por macrófagos, TNF α tem importante papel na infiltração de neutrófilos na mucosa gástrica, além de estimular a expressão de

iNOS (Hamaguchi *et al.*, 2001; El-Moselhy *et al.*, 2008). Trabalhos apresentam aumento de TNF α no soro e na mucosa gástrica de ratos submetidos aos modelos de indução de úlcera por etanol, DAINÉ e isquemia e reperfusão (Kyoj *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2007; El-Moselhy *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008).

1.6. Tratamento de Úlcera Gástrica

Por muito tempo, o tratamento para úlceras gástricas consistiu em procedimento cirúrgico, com altas taxas de morbimortalidade. Na década de 1970, surgiu a terapia baseada na redução da secreção ácida, com uso de inibidores de receptores histamínicos (H₂) como a cimetidina. Com o advento dos inibidores dos receptores H₂ houve redução significativa no uso de procedimento cirúrgico como terapia de úlceras pépticas (Gustavsson & Nyren, 1989). Na década de 1980, o surgimento de inibidores de bomba protônica (PPI), como o lansoprazol, permitiu aumento dos índices de cicatrização de úlceras gástricas (Sachs, 1997 *apud* Yuan *et al.*, 2006). Também na década de 1980, foi descoberta a associação de *H. pylori* (denominada, na época, *Campylobacter pylori*) e o surgimento de úlceras gástricas, fato que revolucionou a terapêutica dessa enfermidade (Marshall & Warren, 1984; Chan & Leung, 2002).

Assim, o tratamento de primeira linha em casos de úlcera gástrica consiste, atualmente, na administração de inibidores de bomba protônica ou de receptores histaminérgicos, associados a antibióticos (Chan & Leung, 2002). Entretanto existem algumas limitações na atual terapêutica, como a reincidência de úlceras em usuários de DAINÉ ou a baixa eficácia em úlceras não associadas a *H. pylori* ou DAINÉ (Yuan *et al.*, 2006), o que torna necessário investigar novas substâncias para o tratamento dessa enfermidade.

1.7. Plantas Medicinais

As plantas são utilizadas na medicina popular, há milhares de anos, para o tratamento das mais diversas enfermidades. A fitoterapia é baseada em observações empíricas acumuladas e transmitidas ao longo das gerações, o que permite utilizar o conhecimento popular sobre o uso terapêutico de plantas como base para extração, estudo, isolamento e purificação de compostos com ação farmacológica. Plantas são fontes de diversos fármacos utilizados clinicamente: um quarto dos medicamentos é de origem vegetal ou contêm substâncias sintetizadas a partir de estruturas encontradas em plantas (Gurib-Fakim, 2006).

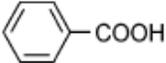
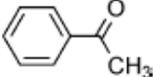
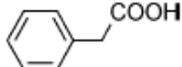
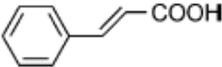
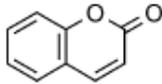
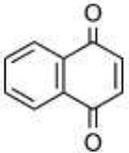
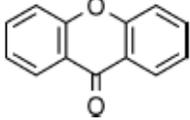
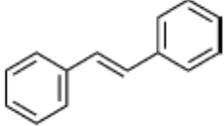
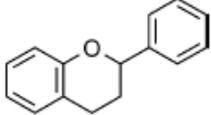
O Brasil é um dos países mais ricos do mundo em megadiversidade, o que representa um vasto potencial de medicamentos a serem descobertos (Gotlieb, 1991; Mittermeier *et al.*, 2005), a partir de produtos naturais (plantas, toxinas, animais e microrganismos). A investigação farmacológica de espécies vegetais oferece grandes avanços no tratamento de várias patologias, além de ferramentas para o estudo de fisiologia e farmacologia (Dohadwalla, 1985). Nas últimas décadas, aumentaram as pesquisas para obtenção de novas drogas antiúlcera de fontes naturais (Souza-Brito *et al.*, 1997). Uma das mais novas drogas para o tratamento de úlceras gástricas, a carbenoxona, é derivada do ácido glicirretínico, extraído de *Glycyrrhiza glabra* ou alcaçuz (Barrowman & Pfeiffer, 1982 *apud* Barbastefano, 2007; Asl & Hosseinzadeh, 2008).

1.8. Compostos Fenólicos

Compostos fenólicos formam um dos principais grupos de metabólitos secundários vegetais e são caracterizados pela presença de ao menos um anel aromático, com uma ou

mais hidroxilas ligadas. Entre os compostos fenólicos estão os flavonóides (flavonas, flavonóis, antocianinas, chalconas, taninos), cumarinas, ácidos fenólicos, diferenciados pelo número e arranjo dos átomos de carbono, conforme é apresentado na tabela 1 (Karakaya, 2004; Crosier *et al.*, 2009).

Tabela 1: Esqueleto básico das principais classes de compostos fenólicos sintetizados por vegetais. Adaptado de Crosier *et al.*, 2009

Esqueleto*	Classificação	Estrutura
C6-C1	Ácidos Fenólicos	
C6-C2	Acetofenonas	
C6-C2	Ácido Fenilacético	
C6-C3	Ácidos Hidroxicinâmicos	
C6-C3	Cumarinas	
C6-C4	Naftoquinonas	
C6-C1-C6	Xantonas	
C6-C2-C6	Estilbenos	
C6-C3-C6	Flavonóides	

* C6 indica a posição do anel aromático.

Compostos fenólicos, principalmente flavonóides, apresentam efeitos benéficos sobre diversas doenças; além de atividade antioxidante, são relatadas atividades analgésica, ansiolítica, antiaterogênica, anticancerígena, antiespasmolítica, antimalárica, antimicrobiana, antiinflamatória, entre outras (Halliwell, 1994; Di Carlo *et al.* 1999; Borelli & Izzo, 2000; Harbone & Williams, 2000).

Estes compostos apresentam ação protetora em diversos modelos experimentais de úlcera gástrica, em geral, atribuída à sua atividade antioxidante (La Casa *et al.*; 2000; Kahraman *et al.*; 2003; Andreo *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2006; Calvo *et al.*; 2007; Nwafor & Bassey *et al.*, 2007; Rao & Vijayakumar, *et al.*; 2007; Xu *et al.*, 2007; Vasconcelos *et al.*, 2008; Mota *et al.*, 2009). Além de “capturarem” radicais livres, compostos fenólicos podem inibir atividade de enzimas oxidantes como a xantina oxidase, atuar como quelantes de metais de transição, diminuir a peroxidação lipídica, aumentar atividade de enzimas antioxidantes, reduzir secreção ácida gástrica, aumentar fluxo sanguíneo, estimular a síntese de prostaglandinas e de muco (Robak & Gryglewski, 1988; Yeh & Yen, 2006; Mota *et al.*, 2009).

Além disso, compostos fenólicos podem apresentar efeitos farmacológicos por modular respostas celulares, através da interação com moléculas de sinalização celular como NFκB, de *downregulation* de moléculas pró-inflamatórias (iNOS e COX-2), ou da modulação de genes envolvidos no ciclo celular ou sobrevivência da célula (Soobrattee *et al.*, 2005). Lee e colaboradores (2005) relatam que a administração de extrato de chá verde, rico em polifenóis, reduz a área de lesão em modelo de indução de úlcera por etanol, inibindo a ativação de MAPK, dos fatores de transcrição AP-1, NFκB e C/EBPβ e expressão das enzimas COX-2 e iNOS na mucosa gástrica.

1.9. *Anacardium humile* St. Hil.

Anacardium humile St. Hil. (Figura 4) é uma espécie subarbustiva do cerrado, pertencente à família Anacardiaceae, popularmente conhecida como cajuzinho-do-cerrado, cajuí ou cajueiro-do-campo. Possui altura média de 50 cm e forma touceira aberta com muitos ramos a partir de um sistema subterrâneo bem desenvolvido. Suas folhas são alternas, ovadas com apêndice alargado e não têm tricomas. As flores são delicadas, vermelho-rosadas e os frutos (aquênios) são acinzentados em forma de rim com uma semente (castanha); já o pedúnculo é bem desenvolvido (pseudofruto), vermelho com polpa esbranquiçada (Pott & Pott, 1994).

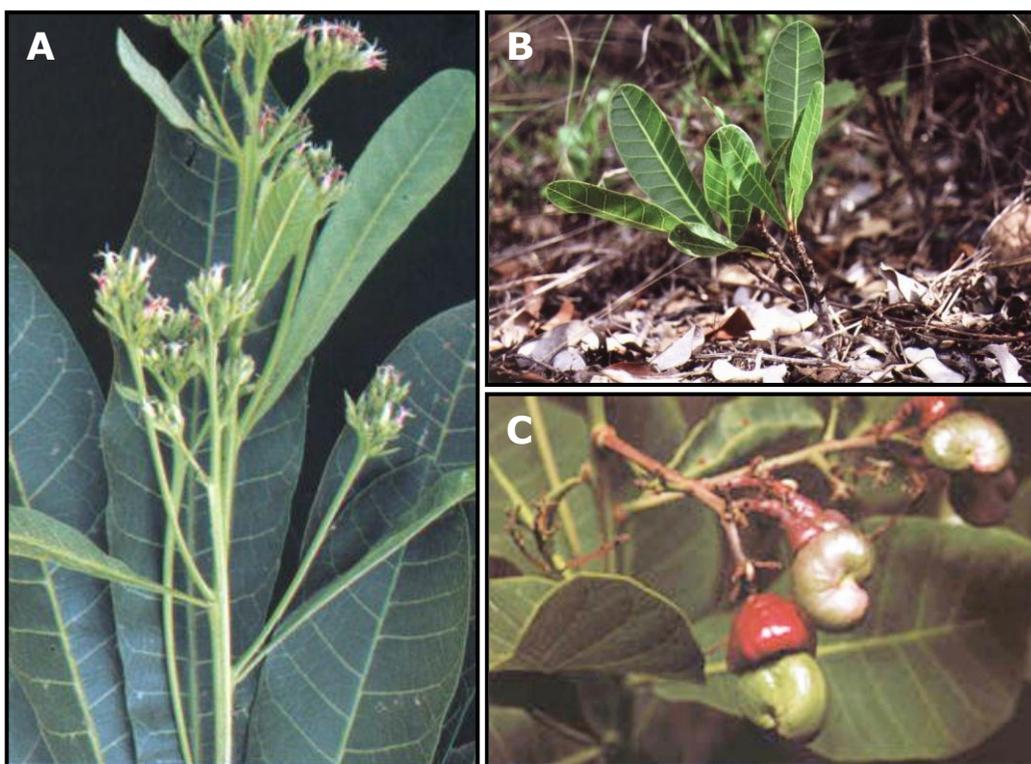


Figura 4: *Anacardium humile* St. Hil (Anacardiaceae), conhecida popularmente como cajuzinho-do-cerrado. (A) Inflorescências de *A. humile*, extraído de Lorenzi & Matos (2002). (B) Parte aérea vegetativa e (C) pseudofrutos e frutos de *A. humile*, extraído de Luiz-Ferreira, 2005.

Os pseudofrutos são doces e comestíveis, utilizados para a produção de doces, geléias e compotas ou consumidos *in natura*. Suas folhas são utilizadas no tratamento de inflamações gerais e diarreias; há relatos do uso de outras partes da planta no combate à tosse, hiperglicemia, afecções da pele, calosidades, verrugas, sífilis e dor de dente (Lorenzi & Matos, 2002; Guarim-Neto & Moraes, 2003).

Luiz-Ferreira e colaboradores (2008) observaram atividade antiulcerogênica do extrato metanólico das folhas de *A. humile*, em modelos de indução de úlcera por etanol absoluto e por DAINE (piroxicam); este trabalho identificou vários compostos fenólicos nas folhas de *A. humile* – ácido gálico, galato de metila, (+)-catequina, quercetina-3-O- β -D-alopironosídeo, quercetina-3-O- β -D-galactopironosídeo, rutina e amentoflavona.

Frações aquosa e acetato de etila de folhas de *A. humile* apresentaram atividade gastroprotetora em diferentes modelos de indução de úlcera. A fração acetato de etila apresentou aumento da produção de muco e de PGE₂ no estômago de ratos como mecanismos de ação na atividade antiulcerogênica. Análises químicas dessa fração indicam presença de compostos fenólicos, mostrados na tabela 2 e figura 5 (Luiz-Ferreira, 2005).

Tabela 2: Concentração de compostos fenólicos em AHFAc (Luiz-Ferreira, 2005).

Substâncias ou classes	Concentração Média \pm dp (mg.g ⁻¹)
Derivados de ácido gálico	
Ácido gálico	103.08 \pm 0.64
Galato de metila	228.04 \pm 1.11
Derivados de ácido gálico desconhecidos	329.59 \pm 3.65
Catequinas	
(+)-Catequina	21.14 \pm 0.45
Catequinas desconhecidas	4.34 \pm 0.08
Flavonóides	
Amentoflavona	29.33 \pm 0.82
Flavonóides desconhecidos	92.76 \pm 0.75

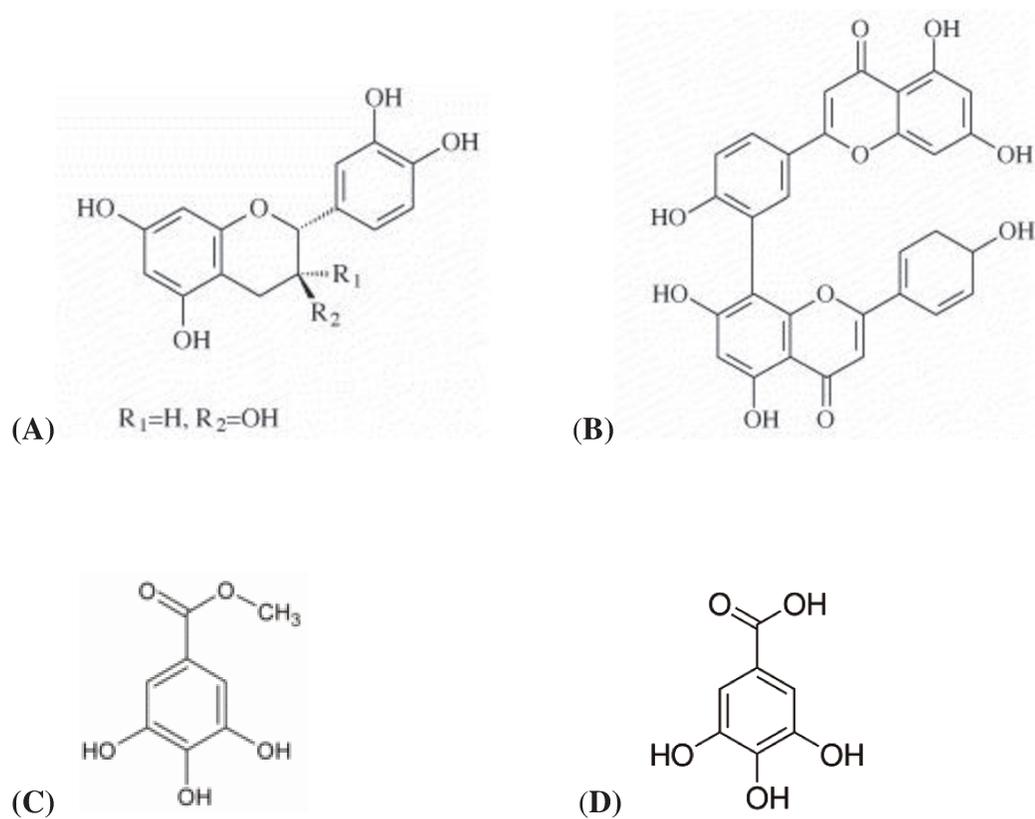


Figura 5: Principais constituintes da fração AHFAc. (A) (+)-catequina, (B) amentoflavona, (C) galato de metila, (D) ácido gálico, segundo trabalho de Luiz-Ferreira, 2005.

Os principais constituintes da fração acetato de etila das folhas *de A. humile*, revelados em perfil cromatográfico, pertencem a classes de compostos com efeitos benéficos sobre úlceras gastrintestinais (Nardini *et al.*, 2001).

2. OBJETIVOS

Foram objetivos deste trabalho:

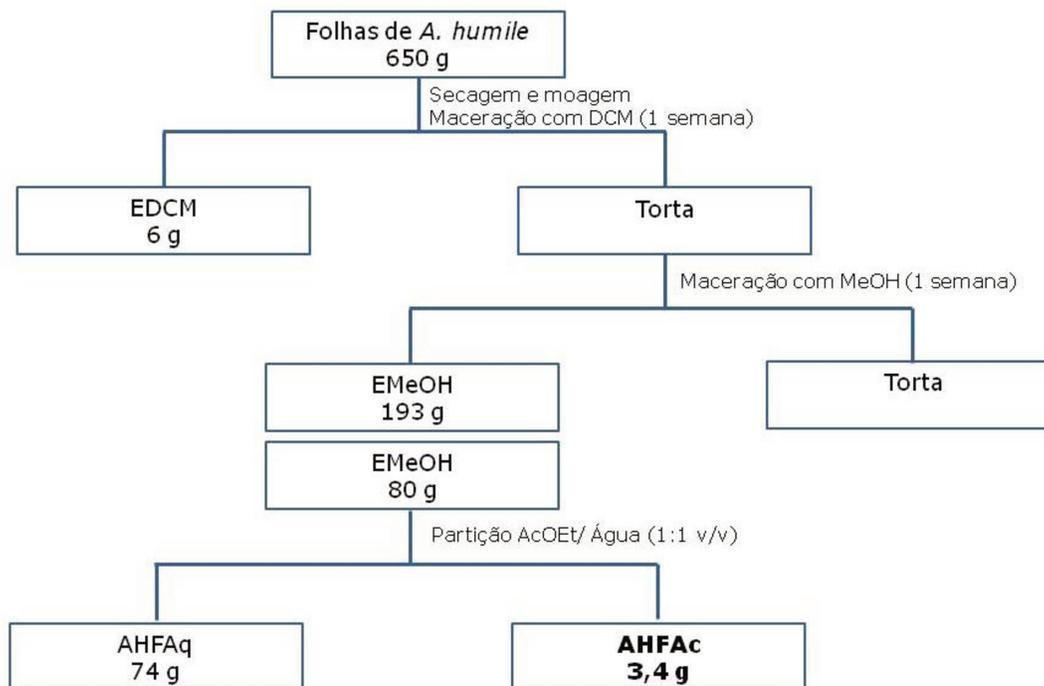
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de *A. humile* (fração AHFAc).
- ✓ Avaliar a atividade antiulcerogênica e antioxidante *in vivo* no modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão.
- ✓ Avaliar os mecanismos antioxidantes de AHFAc na atividade antiulcerogênica – em modelos de indução de úlcera por etanol absoluto e isquemia e reperfusão.
- ✓ Avaliar a atividade antiulcerogênica e antioxidante de AHFAc em relação a sua composição química.

3.1. Material Vegetal

Partes aéreas de *A. humile* foram coletadas na Fazenda Palmeira da Serra, município de Pratânia, Estado de São Paulo, pelo Prof. Jorge Yoshio Tamashiro do Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia – UNICAMP. Uma excicata foi depositada no Herbário da UNICAMP (HUEC, nº 1427).

3.2. Preparação da Fração Acetato de Etila das Folhas de *A. humile* (AHFAc)

As folhas de *A. humile* foram secas em estufa (60°C) e moídas em moinho de facas. Realizou-se extração com 650 g de folhas e 5 L de diclorometano (DCM) e 5 L de metanol (MeOH), sucessivamente, em temperatura ambiente, uma semana para cada solvente. Os solventes foram evaporados sob pressão reduzida (60 °C), resultando em 6 g de extrato diclorometano (EDCM) e 193 g de extrato metanólico (EMeOH). Uma porção do extrato metanólico (80 g) foi particionada com 5 L de uma mistura de EtOAc/água (1:1) rendendo 3,4 g da fração acetato de etila (AHFAc) e 74 g da fração aquosa (AHFAq), conforme esquema apresentado no Fluxograma 1. Estes procedimentos foram realizados pela equipe do Laboratório de Química de Produtos Naturais do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara – UNESP, sob orientação do Prof. Dr. Wagner Vilegas.



Fluxograma 1: Etapas na preparação da fração acetato de etila de *A. humile* (AHFAc). EDCM – extrato diclorometano, EMeOH – extrato metanólico. AHFAq – fração aquosa.

3.3. Caracterização Química de AHFAc

3.3.1. Ensaio com Reagente de Folin-Ciocalteu

O conteúdo de compostos fenólicos totais solúveis da fração acetato de etila de *A. humile* (AHFAc) foi determinado pelo método colorimétrico Folin-Ciocalteu (Piccinelli *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2004). Após solubilização de AHFAc em etanol, foram preparadas diluições com concentrações entre 20 e 200 ppm, além de uma curva padrão de ácido gálico, com concentrações entre 3,125 e 200 ppm. A absorvância das amostras e amostra-padrão foi medida em leitor de elisa ($\lambda=726$ nm) e os resultados foram expressos como mg de ácido gálico equivalentes (AGEq) por grama de fração em base seca (mg de AGEq/g). Como controle negativo foi utilizado o diluente das amostras e como controle positivo,

ácido gálico (200 ppm). Os experimentos foram realizados em triplicata. Estes procedimentos foram realizados no Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia – UNICAMP, com colaboração do Prof. Dr. Marcos José Salvador.

3.3.2. Determinação de Perfil Cromatográfico (HPLC) de AHFAc

O perfil cromatográfico da AHFAc foi obtido usando sistema HPLC (Shimadzu) equipado com um detector UV-DAD e coluna ACE 5 C18 (250 x 4.6 mm, i.d. 5 µm). A fase móvel foi formada por acetonitrila (bomba A) e H₂O com 1% de ácido acético pH 2,88 (bomba B), em gradiente [0 a 15min – 15% A; 15 a 22 min – 15 a 20% A; 22 a 25 min – 20% A; 25 a 30 min – 20 a 40% A; 30 a 35 min – 40% A; 35 – 50 min – 40 a 100% A; 50 a 55 min - 100 a 15% A; 55 a 60 min – 15% A]. O volume de amostra injetado foi 20 µl, com concentração igual a 1 mg/ml e o efluente foi monitorado em 280 nm. Foram utilizados como padrões ácido gálico, catequina, quercetina, rutina e kaempferol. Estes procedimentos foram realizados no Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia – UNICAMP, com colaboração do Prof. Dr. Marcos José Salvador.

3.3.3. Determinação do Espectro de Massas (ESI-MS) de AHFAc

Os espectros de massas foram registrados em espectrômetro Micromass Q-TOF, de alta resolução, em modo negativo (30 V). AHFAc (10 µl) foi dissolvida na fase móvel (água e metanol (1:1), com 1% de hidróxido de amônio), na relação 1:100 e foi usada uma solução de água e metanol (1:1), com 1% de ácido fosfórico para calibração do equipamento. As impressões digitais (*fingerprint*) ou perfil de ESI-MS da fração no modo negativo foram adquiridas e acumuladas ao longo de 60s, e os espectros foram escaneados na faixa entre m/z 100 e 1000, utilizando um Micromass-Waters Q-TOF mass spectrometer

(Waters, Manchester, England). As tensões de capilares e cone foram fixadas para -3000 V e -40 V, respectivamente, com uma temperatura de 100°C. O ESI-MS foi feito por injeção direta, com fluxo típico de vazão de 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ utilizando uma micro-seringa acoplada a uma bomba (Harvard Apparatus, MA, E.U.A.). Esses procedimentos foram realizados no Laboratório Thomson do Instituto de Química – UNICAMP, com colaboração do Prof. Dr. Marcos Eberlin. Os constituintes foram identificados por comparação dos pesos moleculares com dados da literatura.

3.4. Avaliação da Atividade Antioxidante *in vitro*

O radical DPPH (1,1-difenil-1-picril-hidrazila) é estável de coloração púrpura; porém, quando reduzido passa a ter coloração amarela. Através deste ensaio foi avaliada a capacidade de AHFAc de reduzir o radical DPPH. Para tanto, 2,6 mg da fração foram dissolvidos em 1 ml de etanol, obtendo-se uma solução estoque. Várias diluições foram preparadas em etanol, com concentrações finais no ensaio de 3,125 a 200 ppm. Para cada amostra (10 μL) foram adicionados 100 μL de etanol, 100 μL de tampão fosfato (100 mM) e 50 μL de solução de DPPH (250 μM). Decorridos 30 min a absorbância foi medida em leitor de elisa ($\lambda=517$ nm) e a porcentagem de redução do radical foi calculada pela equação: % redução = $100 - [(Abs. Amostra - Abs. controle negativo) / (Abs. controle DPPH - Abs. controle negativo)] \times 100$ (Cuendet *et al.*, 1997; Ou *et al.*, 2001; Prior *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005). Como controle negativo foi utilizado o diluente das amostras e como controle positivo, o flavonóide quercetina. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Estes procedimentos foram realizados no Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia – UNICAMP, com colaboração do Prof. Dr. Marcos José Salvador.

3.5. Avaliação da Atividade Antiulcerogênica

3.5.1. Animais

Foram utilizados ratos machos Unib: WH (150 a 220 g), provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da UNICAMP (CEMIB – UNICAMP), aclimatados às condições do laboratório por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, em temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclos claro-escuro de 12h controlados, alimentados com ração nuvital (Nuvilab) e água *ad libitum*. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA-IB-UNICAMP, protocolo nº 1279-1).

3.5.2. Grupos Experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais:

- ✓ SHAM: animais expostos aos procedimentos experimentais, sem tratamento e sem efetiva indução de úlcera;
- ✓ VEÍCULO: controle negativo, tratado oralmente, por gavagem, com o veículo Tween 80[®] 12 % (10 ml.kg⁻¹) e exposto à indução de úlcera gástrica;
- ✓ AHFAc: grupo experimental tratado oralmente, por gavagem, com a fração acetato de etila das folhas de *A. humile*, dissolvida em Tween 80[®] 12%, nas doses de 25, 50 ou 100 mg.kg⁻¹, no modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão, e na dose de 50 mg.kg⁻¹, no modelo de indução de úlcera por etanol absoluto.

3.5.3. Indução de Úlcera Gástrica por Isquemia e Reperfusão

Os animais (n = 8, por grupo) foram mantidos em jejum por 24 horas antes do experimento, com livre acesso à água e então tratados com Tween 80[®] 12% ou AHFAc,

oralmente por gavagem. Os animais foram anestesiados com tiopental (50 mg/kg, i.p.) e submetidos a procedimento cirúrgico para colocação de um “clamp” na artéria celiaca, 30 minutos após o tratamento. Depois de meia hora de isquemia, o “clamp” foi retirado e os ratos submetidos à uma hora de reperfusão e, então, à eutanásia por deslocamento cervical (Ueda *et al.*, 1989). Os procedimentos realizados no modelo de indução de úlcera gástrica por isquemia e reperfusão estão esquematizados na figura 6.

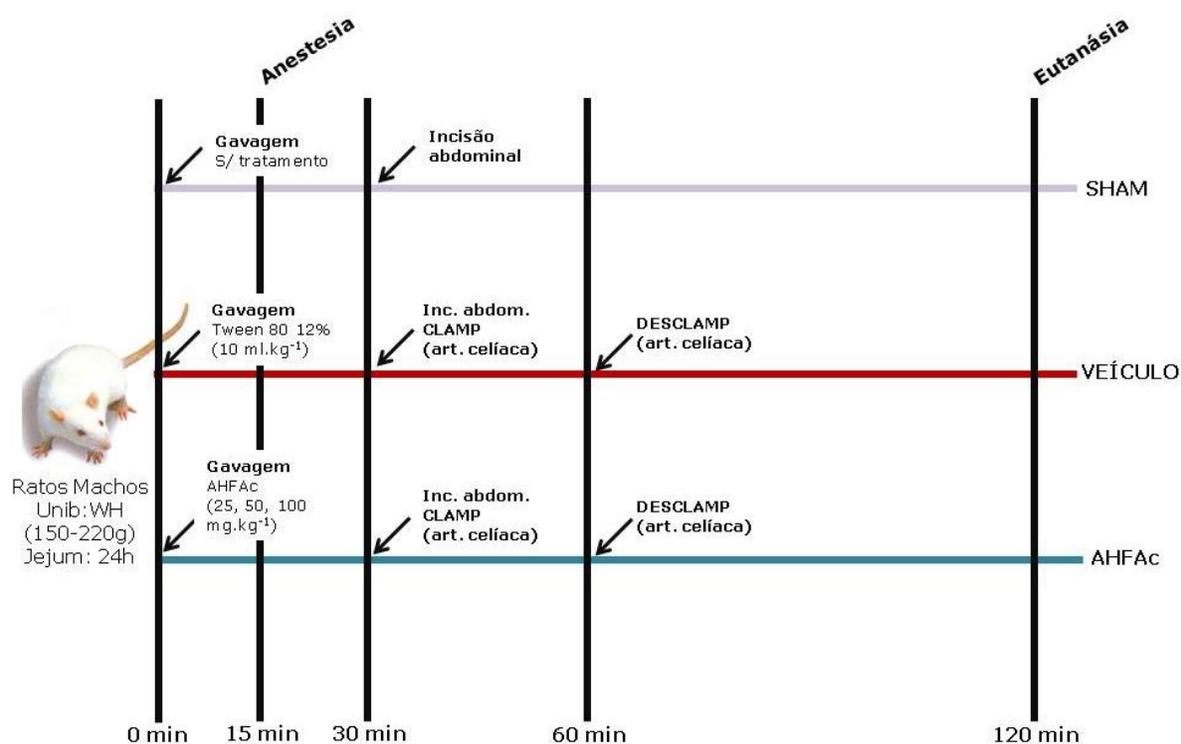


Figura 6: Representação esquemática do protocolo experimental do modelo de indução de úlcera gástrica por isquemia e reperfusão.

3.5.4. Indução de Úlcera Gástrica por Etanol Absoluto

Os animais (n = 6, por grupo) foram mantidos em jejum por 24 horas antes do experimento, com livre acesso à água e então tratados com AHFAC ou Tween 80[®] 12%, oralmente por gavagem. Uma hora depois, os animais receberam 1 ml de etanol absoluto, oralmente, e sofreram eutanásia por deslocamento cervical uma hora após a administração

3.5.6. Análises Histológicas

Foram realizadas análises histológicas para avaliação da organização da mucosa do estômago. Após a realização dos experimentos de indução de úlcera gástrica por etanol absoluto e isquemia e reperfusão, uma porção (0,5 x 1,0 cm) do estômago foi retirada, esticada em placa de isopor e imersa em solução ALFAC (formalina 40%, etanol 80% e ácido acético) por 24 horas e transferida para um frasco com álcool 80%. Após desidratação, a peça foi incluída em parafina, cortada em micrótomo (6 µm), fixada em lâminas histológicas coradas com hematoxilina-eosina (HE) (Behmer *et al.*, 1976) ou ácido periódico de Schiff (PAS) (Vacca, 1985). Estes procedimentos foram realizados no Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, com orientação da Prof^a Dr^a Cláudia Helena Pellizzon.

3.6. Análise dos Mecanismos de Ação

Para análise dos mecanismos de ação de AHFAc na gastroproteção, após realização dos modelos de indução de úlcera por etanol absoluto ou por isquemia e reperfusão, o estômago foi removido e aberto ao longo da maior curvatura. A porção glandular foi raspada exaustivamente com lâminas de vidro e imediatamente congelada a -70° C, até a realização dos ensaios. As amostras foram homogeneizadas em 1 ml de tampão fosfato 0,1 M, pH 7.4, centrifugadas a 12000 rpm, por 15 minutos a 4° C e o sobrenadante aproveitado. A concentração de proteínas foi determinada de acordo com método descrito por Bradford (1976), em comparação a uma curva padrão de albumina de soro bovino.

3.6.1. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A atividade da MPO, uma evidência da infiltração de neutrófilos, foi determinada de acordo com método descrito por Krawisz e colaboradores (1984), com algumas modificações. As amostras do raspado da mucosa gástrica foram centrifugadas a 12000 rpm, por 15 min, a 4°C. A uma alíquota do sobrenadante foi adicionada solução de O-dianisidina (0,167 g/l) e 0,0005 % H₂O₂ em tampão fosfato 50 mM, pH 6,0, na proporção 1:30. As absorbâncias foram lidas a 460 nm, por 10 minutos e os resultados expressos em U/g de proteína, a partir de uma curva padrão de mieloperoxidase de eritrócito humano.

3.6.2. Dosagem de grupamentos sulfidrila (G-SH)

As amostras foram centrifugadas (12000 rpm, a 4°C, por 15 minutos) e o sobrenadante diluído (1:10) em tampão fosfato (0,1 M, pH = 7,4). A seguir, fez-se a leitura da absorbância de 100 µl da amostra, acrescidos de 100 µl de solução de Tris-HCl (1,0 mM, pH = 8,2) e EDTA (0,02 mM), a 412 nm (A1). Após esta leitura adicionou-se 20 µl de ácido 5,5 ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB – 0,01 mM), diluído em metanol. Decorridos 15 minutos de reação, realizou-se nova leitura (A2), a 412 nm, para determinação de grupamentos sulfidrila não protéicos (G-SH). A concentração de G-SH é dada pela diferença A1-A2, analisada em comparação a uma curva padrão de glutathione (Faure & Lafond, 1995).

3.6.3. Fragmentação de DNA

A fragmentação de DNA, um marcador dos níveis de apoptose, foi avaliada na mucosa gástrica de ratos expostos à indução de úlcera, segundo método de Tilly & Hsueh (1993, com modificações). O DNA foi extraído a partir de 150 mg do raspado da mucosa

gástrica e homogeneizado com Tris HCl (50 mM), EDTA (10 mM) e Triton X-100 (1 %). O DNA fragmentado foi extraído com uma mistura seqüencial de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (na proporção de 25: 24: 1, por volume), para remoção protéica. O extrato de DNA livre de proteína foi mantido em solução de etanol (100 %) contendo 0,1 M de acetato de sódio, em temperatura de -20°C, para a precipitação do DNA. Uma vez precipitado, este foi submetido à lavagem com solução de etanol a 70 % e re-suspendido em água deionizada. Alíquotas de 6 µl de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (2 %, contendo 1,0 mg/ml de brometo de etídio). A eletroforese foi realizada sob tensão de 100 V, durante 15 minutos e o DNA foi visualizado pela emissão de fluorescência ultra violeta (UV), capturando a imagem através de equipamento e software GelDoc (Bio-Rad). A análise das bandas foi realizada com o auxílio do software AVSoft BioView 4.

3.6.4. Atividade da Glutaciona Peroxidase (GPx)

O raspado estomacal foi centrifugado a 12000 rpm, a 4°C, por 15 minutos e o sobrenadante diluído em tampão fosfato 0,1 M (pH = 7,4) na proporção 1:10. A uma alíquota de 100 µl da amostra foram adicionados 150 µl de solução de glutaciona reduzida (10 mM), NADPH (4 mM) e glutaciona redutase (1U) e 20 µl de H₂O₂ (25 mM), de acordo com método de Yoshikawa e colaboradores (1993). A absorbância foi determinada a 340 nm, por 10 minutos, com intervalos de 1 minuto.

3.6.5. Atividade da Glutaciona Redutase (GR)

Para determinação da atividade da GR, a reação enzimática foi preparada com 100 µl da amostra (após centrifugação e diluição do sobrenadante em tampão fosfato pH = 7,4, na relação 1:10) e 150 µl de solução formada por EDTA (0,20 mM), glutaciona oxidada (1

mM) e NADPH (0,1 mM). A absorvância foi lida a 340 nm, por 10 minutos, em intervalos de 1 minuto (Carlberg & Mannervik, 1985).

3.6.6. Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

As amostras foram centrifugadas e diluídas em tampão fosfato (0,1 M, pH = 7,4), na proporção 1:20. A 100 µl do homogenato foram adicionados 150 µl da solução de hipoxantina (0,1 mM), xantina oxidase (0,07 U) e azul de nitrotetrazólio (NBT - 0,6 mM). As absorvâncias foram lidas a 560 nm. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína (Winterbourn *et al.*, 1975).

3.6.7. Análises Imunohistoquímicas

Foram utilizadas duas lâminas representativas de cada grupo de animais submetidos à úlcera induzida por isquemia e reperfusão e por etanol absoluto, que foram desparafinizadas, re-hidratadas e destinadas a imunohistoquímica com método de revelação para peroxidase. O bloqueio de reação inespecífica foi feito com solução de leite desnatado, posteriormente à recuperação antigênica com tampão citrato 0,01 M e irradiação por microondas, e as amostras foram incubadas com anticorpos específicos (MPO e SOD, segundo informações na tabela 3) em solução de bloqueio “overnight”. Posteriormente, amostras foram lavadas em tampão fosfato (0,01 mol/L, pH 7.4) e incubadas em anticorpo secundário (Kit ABC Vector) e revelado com Avidina-Biotina associado com 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma), e analisadas em microscópio Leica DM acoplado ao software de captura de imagens Leica QWin Standard, Reino Unido. Estes procedimentos foram realizados no Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, com orientação da Prof^a Dr^a Cláudia Helena Pellizzon.

Tabela 3: Anticorpos e diluições específicas para as reações de imunohistoquímica.

Anticorpo	Marca	Diluição	Recuperação Antigênica	Referência
MPO	Santa Cruz	1 : 4000	Citrato + MW	Shimamura <i>et al.</i> , 2006
SOD	Santa Cruz	1 : 250	Citrato + MW	Hagg <i>et al.</i> , 2004

Citrato + MW = tampão citrato 0,01M + irradiação com microondas.

3.7. Análise Estatística

A avaliação estatística dos resultados obtidos foi realizada empregando-se análise de variância (ANOVA) de uma via, com nível crítico igual ou menor a 0,05 para rejeição da hipótese de nulidade, com teste *a posteriori* de Tukey ou Dunnett. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism 5.

4.1. Caracterização Química de AHFAC

A fração acetato de etila das folhas de *A. humile* (AHFAC) apresenta 338,78 mg AGEq/g, de acordo com resultados obtidos através do método de Folin-Ciocalteu, o que representa uma composição por fenólicos solúveis de cerca de 34 %.

O perfil cromatográfico (HPLC-DAD) da fração AHFAC está apresentado na figura 8. A comparação do tempo de retenção dos constituintes de AHFAC com o de substâncias padrão, nas condições cromatográficas utilizadas, sugere a presença de ácido gálico (pico 1 – 3,6 min) e dos flavonóides quercetina (pico 2 – 34,6) e kaempferol (pico 3 – 36,9 min) na fração (Tabela 4).

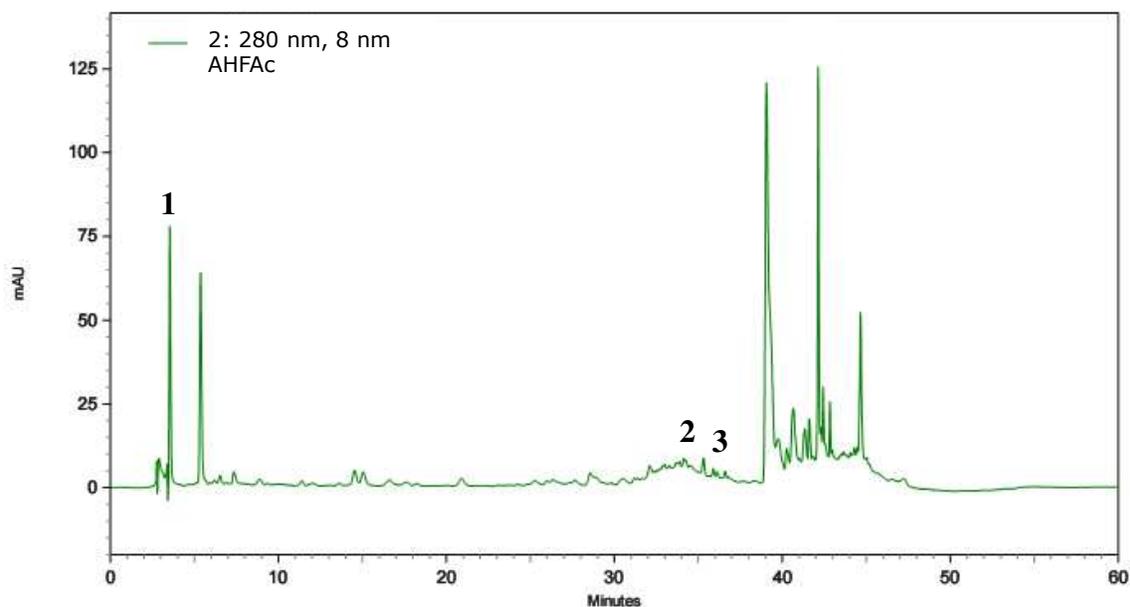


Figura 8: Cromatograma obtido por HPLC-DAD da fração acetato de etila de das folhas de *A. humile* (AHFAC).

A figura 9 apresenta o espectro de massas de AHFAc (ESI-MS, em modo negativo). Os picos se referem a registros de relação massa/carga (m/z) de moléculas desprotonadas ($[M - H]^-$).

Entre as substâncias constituintes de AHFAc, sugere-se amentoflavona ($m/z = 537$ - Sanchez-Rabaneda *et al.*, 2003), um biflavonóide já encontrado em partes aéreas de *A. humile* (Luiz-Ferreira *et al.*, 2008), e ácido gálico, que apresenta $m/z = 169$ (Lin *et al.*, 2008). O pico $m/z = 153$ pode se referir a aldeído gálico (Amarowicz *et al.*, 2009) ou ácido protocatecuico (Liu *et al.*, 2007; Touriño *et al.*, 2008).

Outro proposto componente de AHFAc é o flavonóide kaempferol, que apresenta $m/z = 285$ (Sanchez-Rabaneda *et al.*, 2003; Touriño *et al.*, 2008), também indicado pelas análises em HPLC-DAD. O pico de registro $m/z = 373$ pode se referir a um derivado de galato de metila, e o pico $m/z = 401$ pode ser um derivado de catequina/epicatequina, como apresentado em trabalho de Hvattum (2002). O registro $m/z = 447$ é relatado para alguns flavonóides, como luteolina 6 - c - glucosídeo, luteolina 8 - c - glucosídeo, kaempferol-hexosídeo, kaempferol 3 - o - glucosídeo, quercetina-3-o-rhamnosídeo (Sanchez-Rabaneda *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2008; Touriño *et al.*, 2008; Wojdylo *et al.*, 2008). Na tabela 4 são apresentadas as substâncias sugeridas na composição de AHFAc, segundo análises por HPLC e ESI-MS.

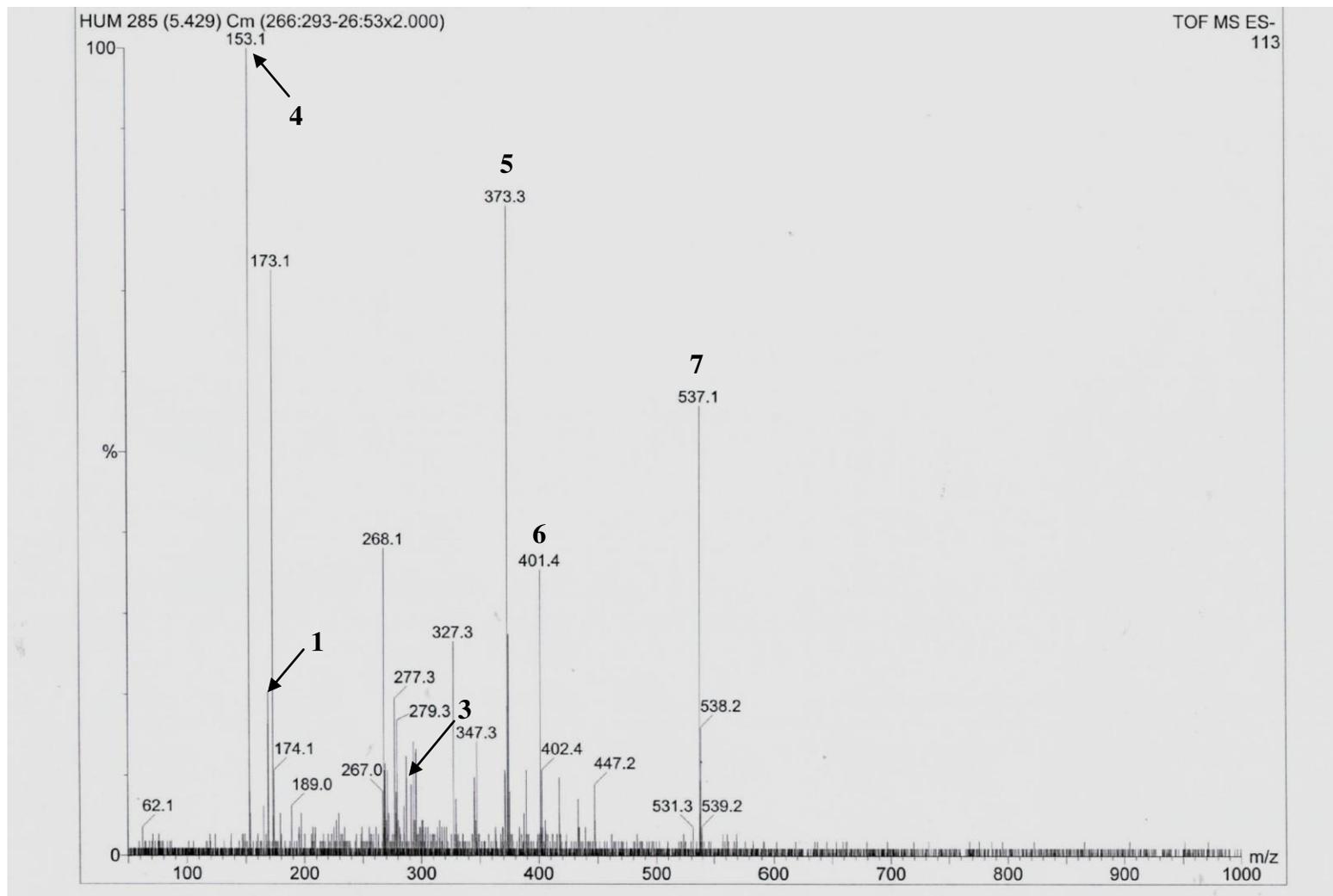


Figura 9: Espectro de massas (ESI-MS) da fração acetato de etila de das folhas de *A. humile* (AHFAC).

Tabela 4: Constituintes sugeridos para a fração acetato de etila de das folhas de *A. humile* (AHFAc), segundo resultados de análises em HPLC-DAD e ESI-MS.

	Substâncias	HPLC T_R (min)	ESI-MS [M-H]⁻ m/z	Peso Molecular [M]
1	Ácido gálico	3,6	169	170
2	Quercetina	34,5	*	302
3	Kaempferol	36,9	285	286
4	Aldeído gálico	--	153	154
5	Derivado de galato de metila	--	373	374
6	Kaempferol-hexosídeo ou Quercetina-rhamnosídeo	--	447	448
7	Amentoflavona	--	537	538

-- = amostra padrão não disponível

* = não observada

4.2. Análise da Atividade Antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante *in vitro* de AHFAc foi analisada através de ensaio de redução do radical DPPH. A curva de redução de DPPH de AHFAc e do controle, quercetina, são apresentadas na figura 10.

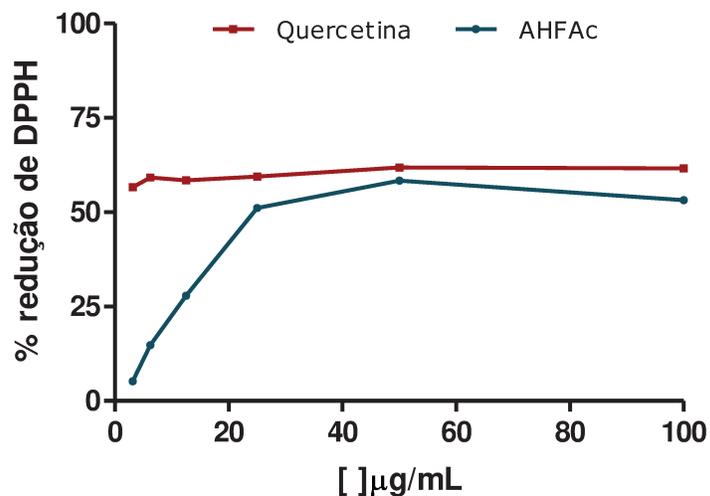


Figura 10: Curva de redução da fração acetato de etila das folhas de *A. humile* (AHFAc) em ensaio com radical DPPH.

Os constituintes de AHFAc apresentaram capacidade de redução de DPPH, o que indica atividade antioxidante da fração, nesse ensaio. A concentração mínima suficiente para redução de 50 % do radical DPPH (EC_{50}) de AHFAc foi igual a 28,171 µg/ml, cerca de dez vezes maior do que a do controle quercetina, cuja EC_{50} determinada foi igual a 2,924 µg/ml.

4.3. Análise da Atividade Antiulcerogênica e Antioxidante *in vivo*

No modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão do estômago, a administração de AHFAC apresentou uma atividade protetora (figura 11).

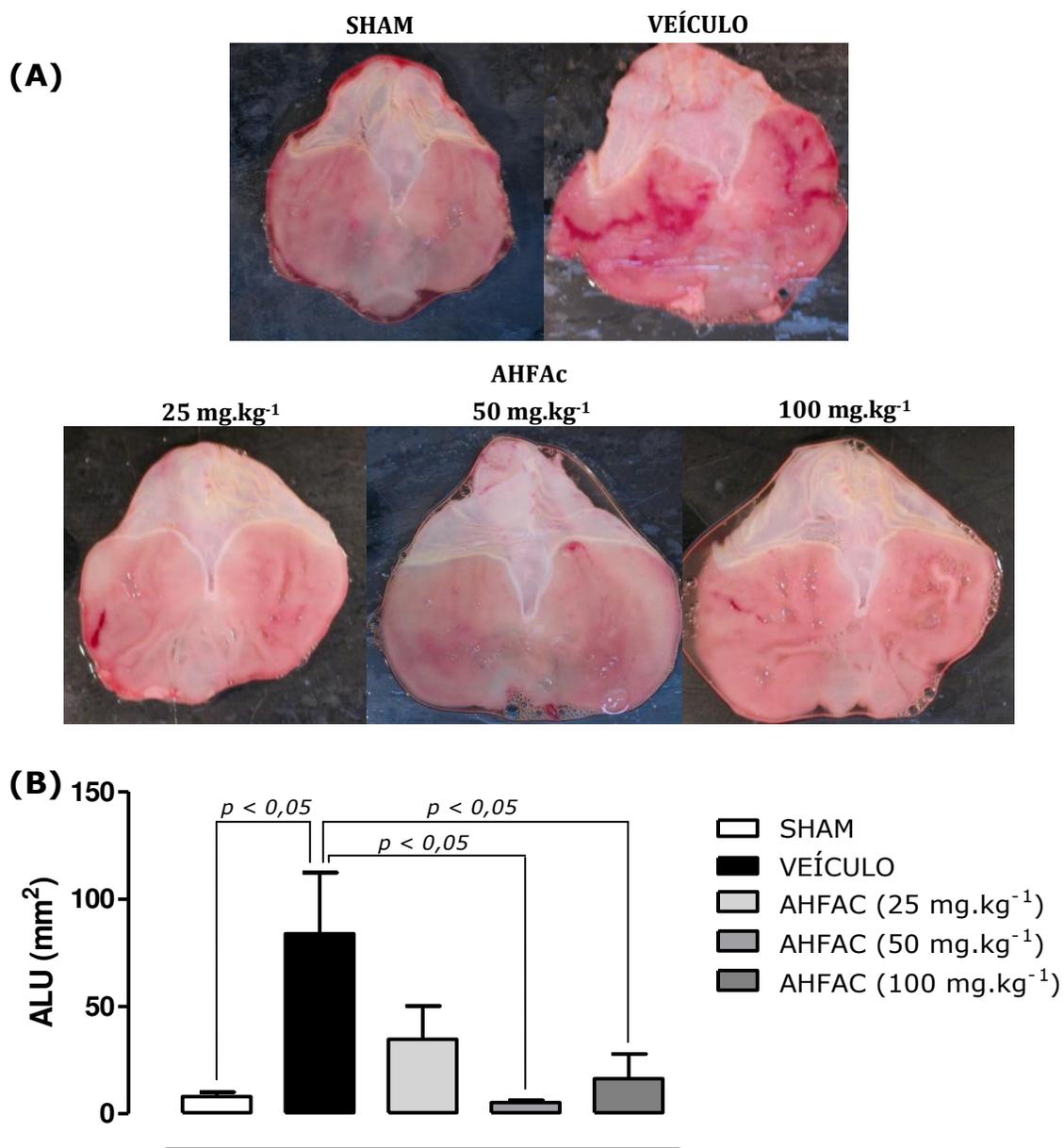


Figura 11: Efeito da administração de AHFAC na área de lesão ulcerativa (ALU) no estômago de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão. (A) Visualização macroscópica das lesões. (B) Área de lesão ulcerativa (ALU). O pré-tratamento com AHFAC (50 e 100 mg.kg⁻¹) reduziu significativamente a ALU. Dados expressos em média \pm epm. Análise estatística ANOVA, seguida de teste de Tukey.

O pré-tratamento com AHFAc, nas doses 25, 50 e 100 mg.kg⁻¹, reduziu a área de lesão ulcerativa (ALU) observada no grupo VEÍCULO (83,8 ± 28,5 mm²) em 58 % (redução não significativa), 93 % e 80 %, respectivamente. A atividade gastroprotetora nesse modelo pode ser considerada evidência de atividade antioxidante, devido à geração de ERO ser fator predominante no desenvolvimento de lesões. Para as análises histológicas e de mecanismos de ação, foi utilizada a dose 50 mg.kg⁻¹, a menor dose, administrada oralmente, com atividade gastroprotetora significativa em modelos de indução de úlcera por isquemia e reperfusão e por etanol absoluto.

Análises morfológicas de estômagos de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão são observadas nas figuras 12 e 13, em lâminas histológicas coradas com hematoxilina-eosina (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS), respectivamente.

Esse modelo experimental de úlcera ocasiona alteração celular, principalmente na porção apical das glândulas da mucosa gástrica, o que pode ser observado no controle negativo VEÍCULO (Figura 12, B e E), em comparação à mucosa íntegra do grupo SHAM (Figuras 12, A e D). Nos animais tratados com AHFAc (50 mg.kg⁻¹), o epitélio se mostra com melhor integridade sem alteração de organização apical das células (Figura 12, C e F).

Na figura 13B, em que a coloração de PAS evidencia a presença de muco no epitélio, no grupo tratado com o veículo tween, observa-se pequena quantidade de muco nas glândulas gástricas. No grupo pré-tratado com AHFAc (50 mg.kg⁻¹) (Figura 13C), nota-se que as glândulas apresentam uma quantidade de muco semelhante à observada no grupo SHAM (Figura 13A).

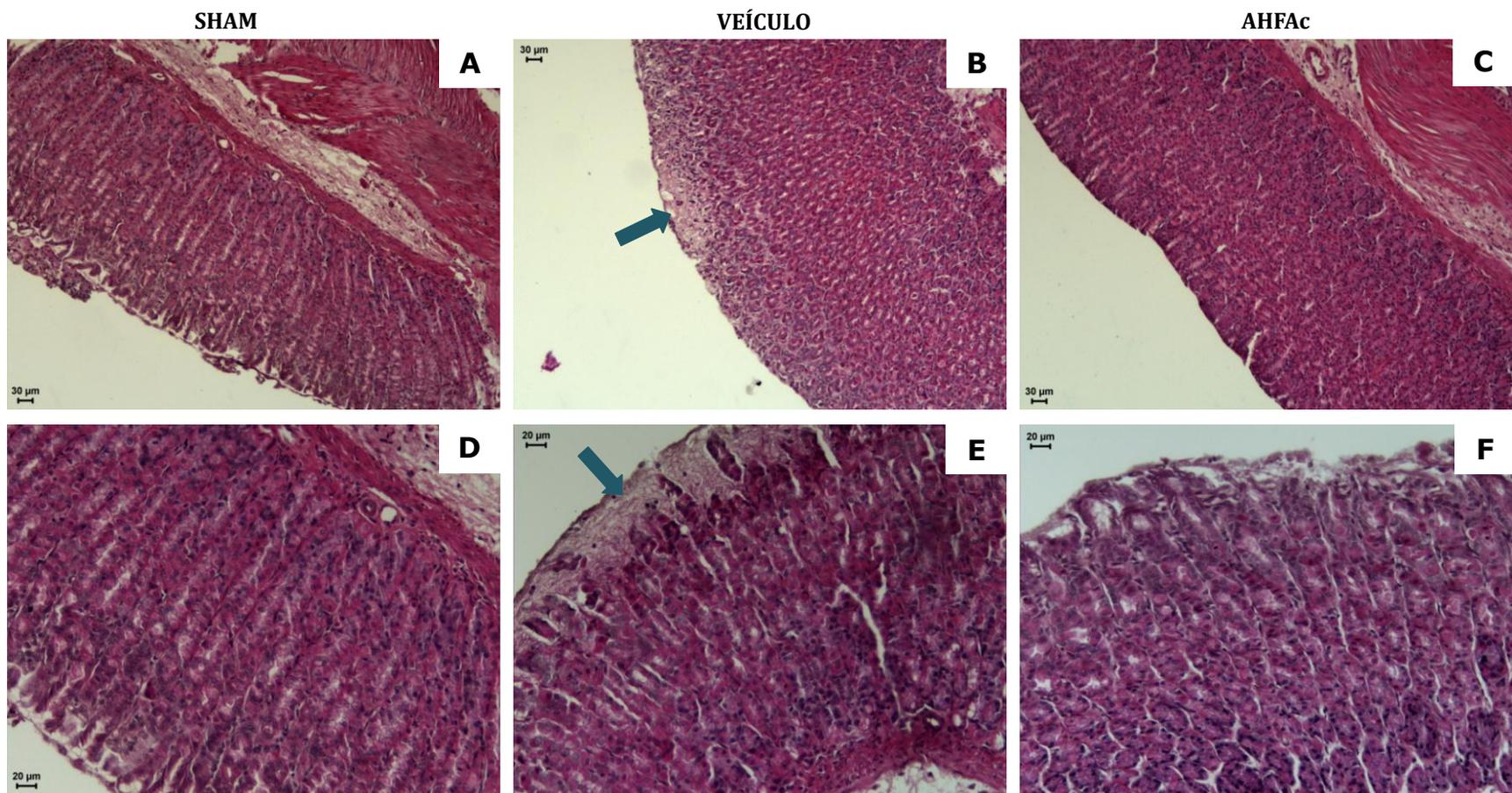


Figura 12: Fotomicrografias de estômagos de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão. Cortes histológicos corados com HE. Em A e D (grupo SHAM) se observa a organização morfológica da parede gástrica íntegra. Em B e E (grupo VEÍCULO) são observadas áreas de alteração celular na região apical da glândulas gástricas, indicadas por setas. Em C e F (grupo AHFAC) nota-se integridade da mucosa, semelhante ao grupo SHAM. Barras: 30 μm em A, B, C e 20 μm em D, E, F.

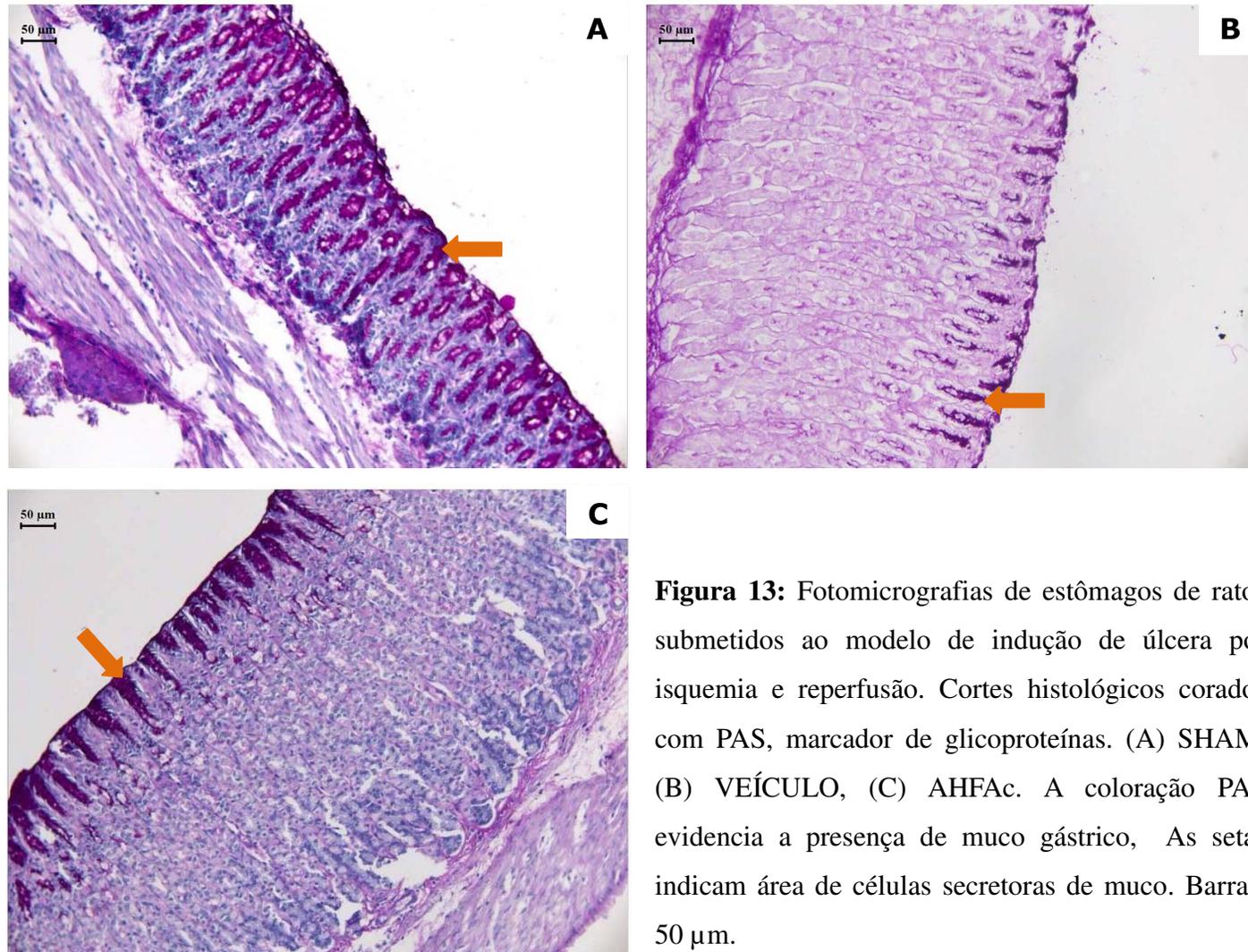


Figura 13: Fotomicrografias de estômagos de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão. Cortes histológicos corados com PAS, marcador de glicoproteínas. (A) SHAM, (B) VEÍCULO, (C) AHFAc. A coloração PAS evidencia a presença de muco gástrico, As setas indicam área de células secretoras de muco. Barras: 50 µm.

A administração de etanol absoluto em ratos causa lesões hemorrágicas no estômago, como se observa no grupo VEÍCULO. O efeito do pré-tratamento com AHFAc (50 mg.kg⁻¹) nesse modelo experimental de úlcera é apresentado na figura 14.

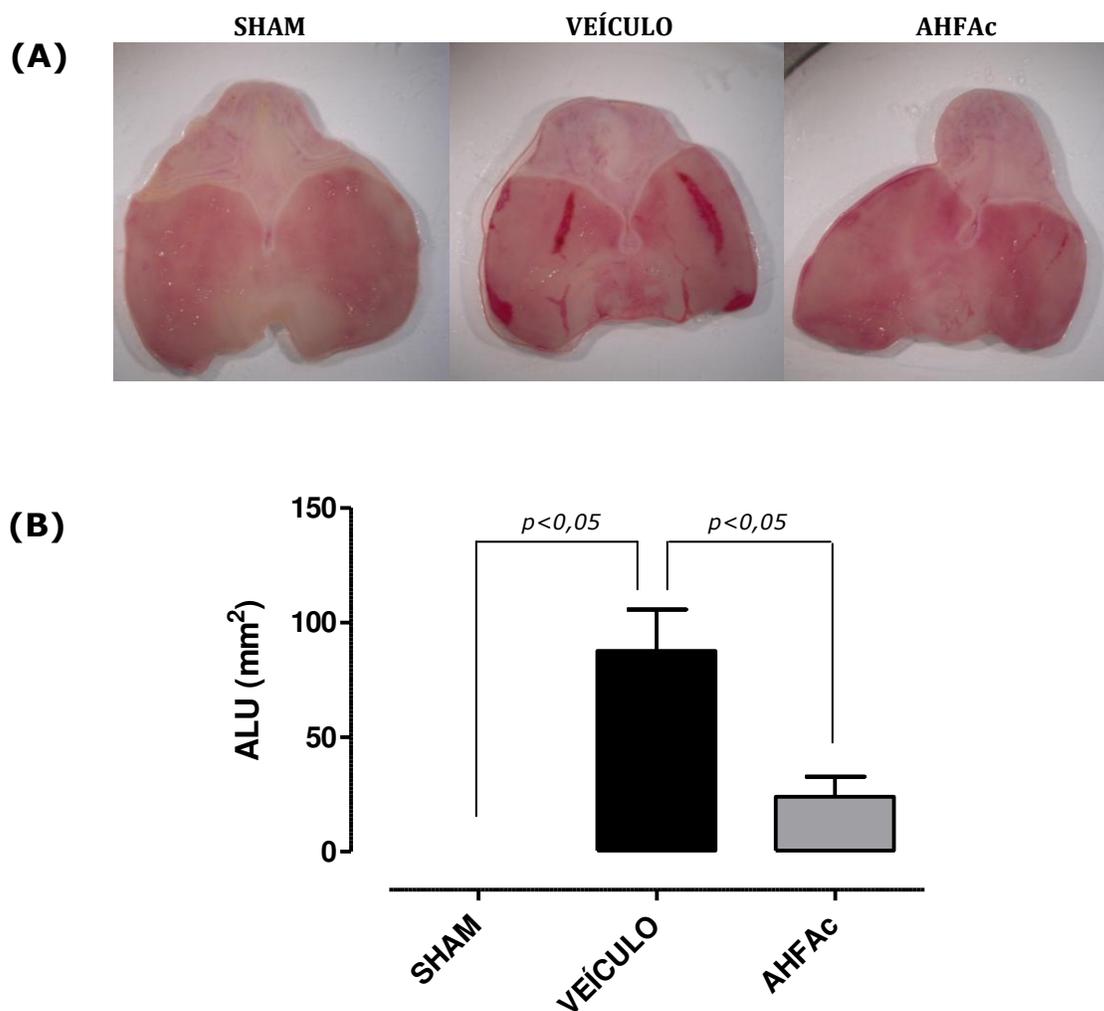


Figura 14: Efeito da administração de AHFAc na área de lesão ulcerativa (ALU) no estômago de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto. (A) Visualização macroscópica das lesões. (B) Área de lesão ulcerativa (ALU). O pré-tratamento com AHFAc (50 mg.kg⁻¹) reduziu a ALU observada no grupo VEÍCULO. Dados expressos em média ± epm. Análise estatística ANOVA, seguida de teste de Dunnett.

A administração de AHFAc (50 mg.kg⁻¹) apresentou significativa gastroproteção no modelo de indução de úlcera por etanol absoluto, com ALU 73 % menor que aquela do grupo controle negativo (VEÍCULO). Para o grupo AHFAc, a área média de lesão ulcerativa foi 24,0 ± 21,4 mm², enquanto o grupo VEÍCULO apresentou média de ALU igual a 87,5 ± 44,2 mm².

As análises histológicas de estômagos de ratos submetidos à indução de úlcera por etanol absoluto são apresentadas nas figuras 15 e 16, em cortes corados com HE e PAS. Após esse modelo de indução de úlcera, observam-se pontos de hemorragia e áreas de lesões no epitélio gástrico de animais do grupo VEÍCULO (Figura 15, B e E). Nos cortes histológicos de estômagos analisados de animais tratados com AHFAc não foram observadas áreas de hemorragia (Figura 15, C e F).

Considerando que um dos efeitos lesivos da administração oral de etanol absoluto é a redução na camada de muco, foram feitas análises histológicas com coloração por PAS para avaliação da secreção mucosa gástrica. Foi observada a presença de muco na região apical das glândulas gástricas nos grupos SHAM (Figura 16A), VEÍCULO (Figura 16B) e AHFAc (Figura 16C). A administração de AHFAc (50 mg.kg⁻¹) apresentou tendência de aumento na produção de muco no epitélio gástrico, nesse modelo experimental (Figura 16C).

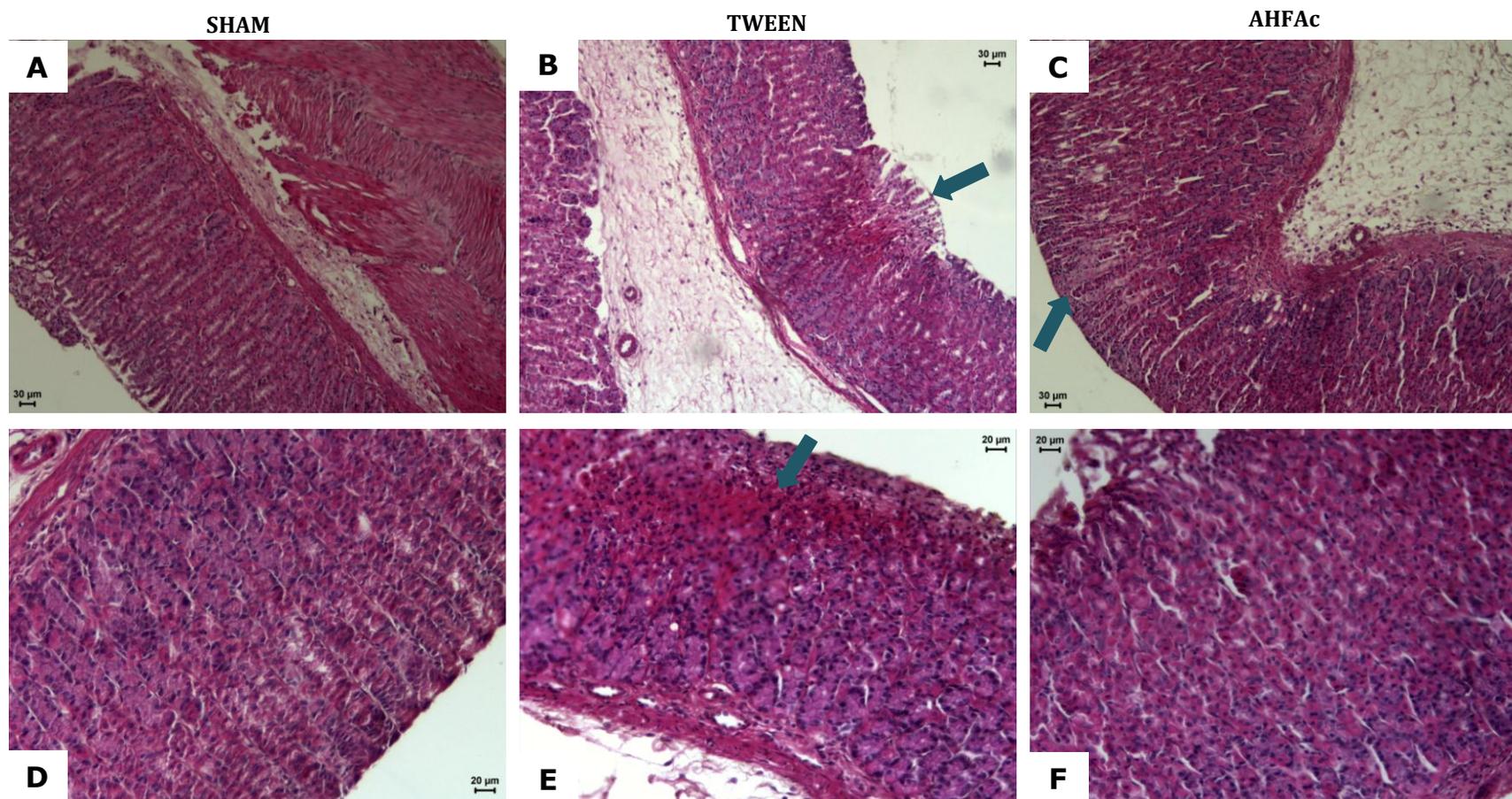


Figura 15: Fotomicrografias de estômagos de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto. Cortes histológicos corados com HE. A e D apresentam fotos do grupo SHAM, onde se observa a organização morfológica da parede gástrica não lesionada. No controle negativo (VEÍCULO) são observadas áreas de lesão (B) e hemorragia no epitélio (D), indicadas por setas. Em C e F (grupo AHFAC) nota-se melhor integridade da mucosa gástrica com áreas de alteração celular menores e mais superficiais (seta) e ausência de pontos de hemorragia. Barras: 30 µm em A, B, C e 20 µm em D, E, F.

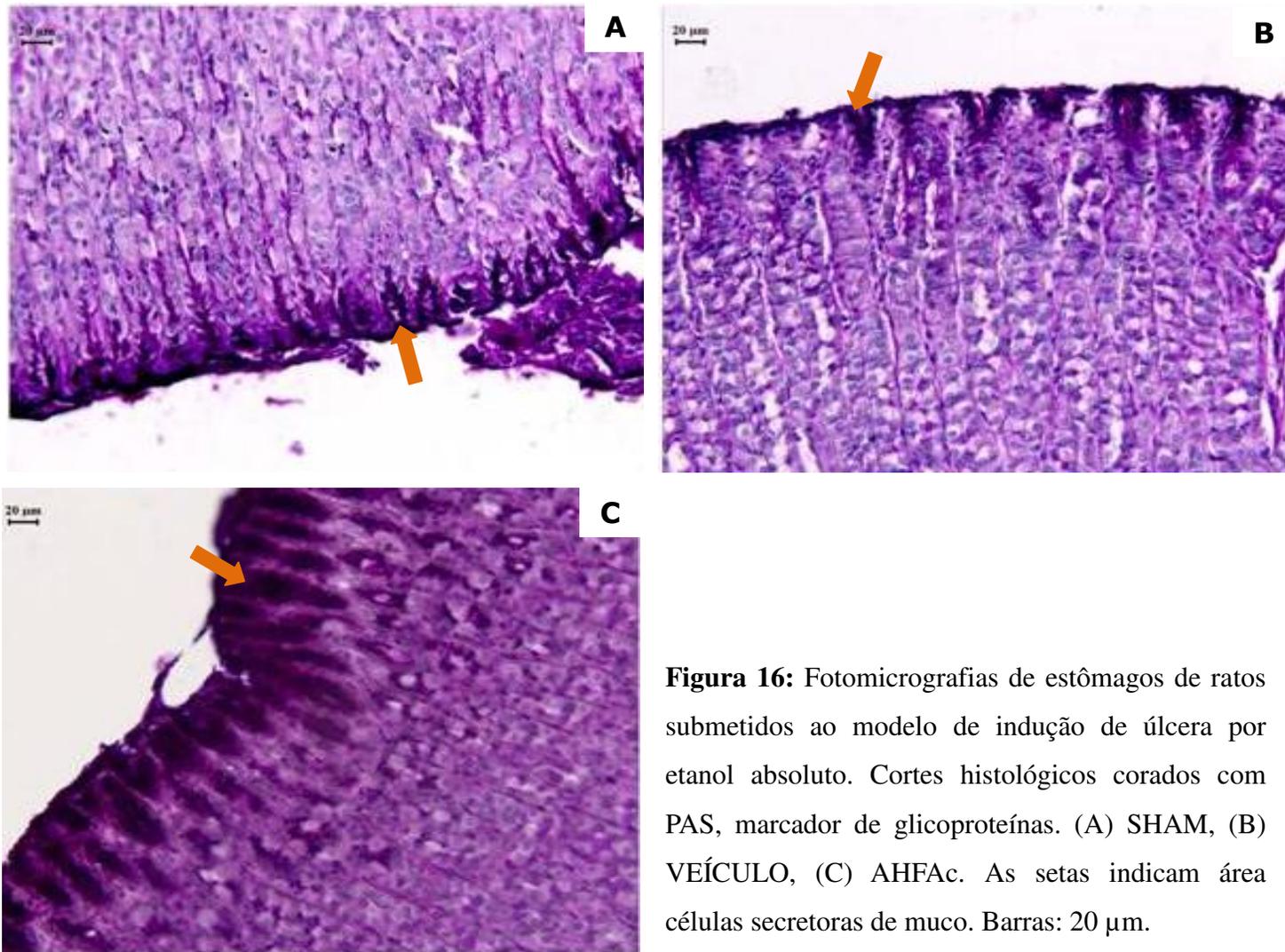


Figura 16: Fotomicrografias de estômagos de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto. Cortes histológicos corados com PAS, marcador de glicoproteínas. (A) SHAM, (B) VEÍCULO, (C) AHFAC. As setas indicam área células secretoras de muco. Barras: 20 µm.

4.4. Análise de Mecanismos de Ação

4.4.1. Infiltração de neutrófilos

O aumento de atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) indica infiltração de neutrófilos no tecido. A atividade da MPO na mucosa gástrica de ratos expostos à isquemia e reperfusão do estômago está mostrada na figura 17.

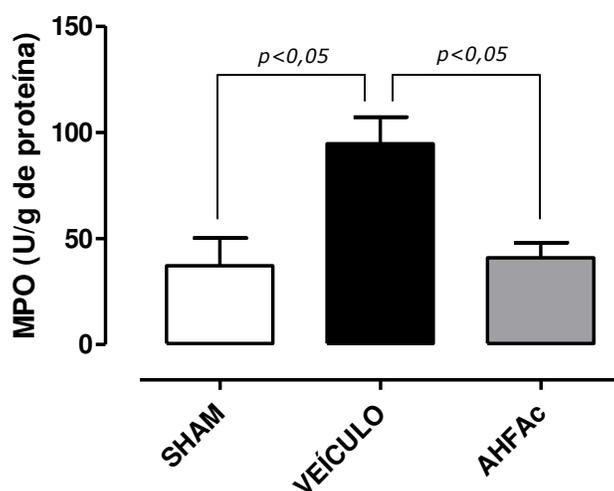


Figura 17: Atividade da enzima MPO na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão. Dados expressos em média \pm epm. Análise estatística ANOVA, seguida de teste de Dunnett.

Houve aumento na atividade da MPO no grupo VEÍCULO, em relação ao grupo SHAM. Esse aumento foi abolido pelo tratamento com AHFAc, ou seja, houve menor infiltração de neutrófilos no estômago de ratos tratados com a fração, que apresentou atividade de MPO em níveis próximos ao grupo SHAM. Em análises imunohistoquímicas mostradas na figura 18, foi analisada a localização da MPO em estômago de ratos submetidos à úlcera induzida por isquemia e reperfusão.

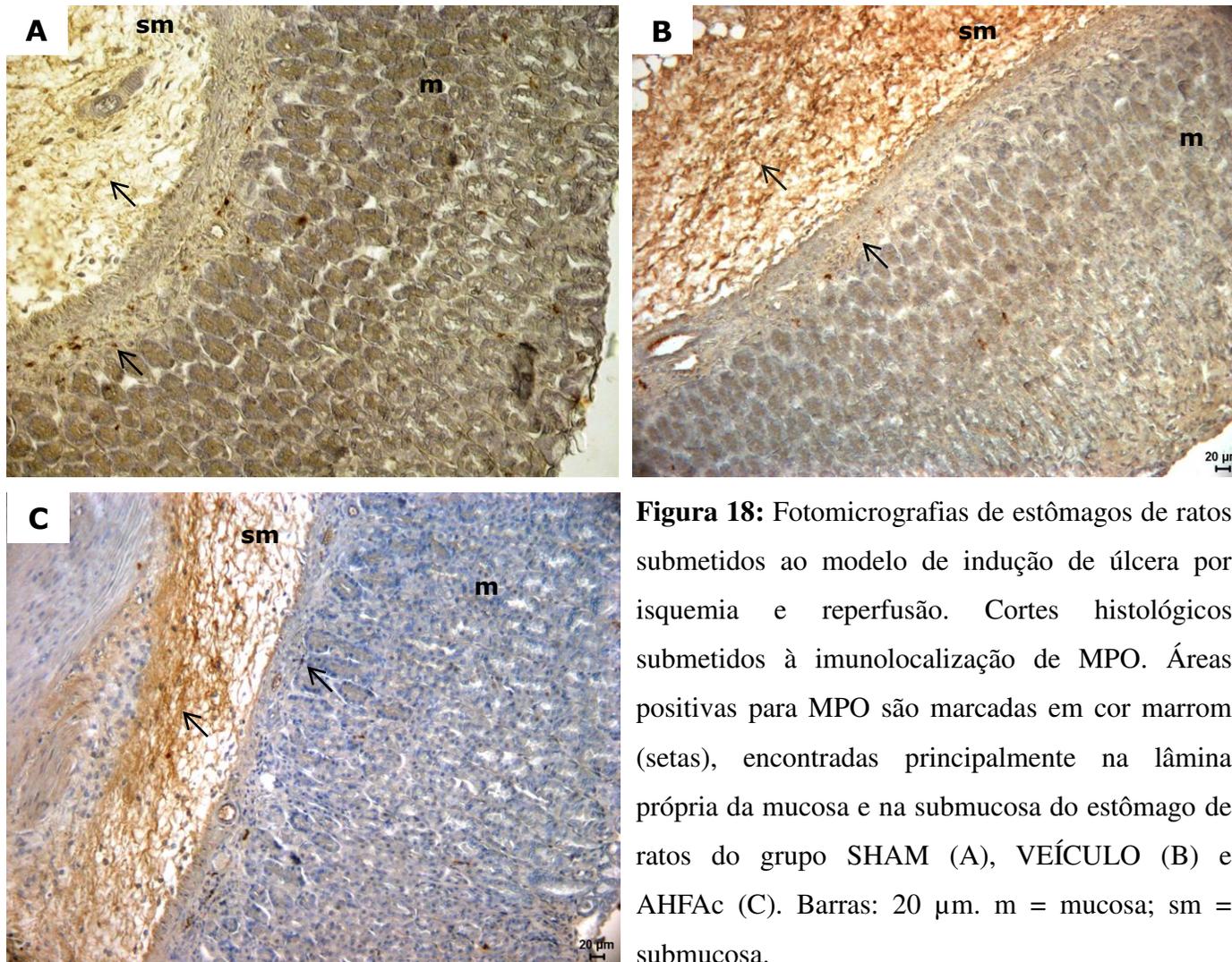


Figura 18: Fotomicrografias de estômagos de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão. Cortes histológicos submetidos à imunolocalização de MPO. Áreas positivas para MPO são marcadas em cor marrom (setas), encontradas principalmente na lâmina própria da mucosa e na submucosa do estômago de ratos do grupo SHAM (A), VEÍCULO (B) e AHFAC (C). Barras: 20 μm. m = mucosa; sm = submucosa.

Observa-se que a presença de MPO é marcada principalmente na lâmina própria e submucosa do estômago de ratos dos três grupos experimentais (Figura 18). Também são encontradas algumas pequenas áreas positivas para MPO dispersas no epitélio gástrico. No grupo VEÍCULO (Figura 18B), a presença de MPO na submucosa é mais evidente.

A figura 19 traz os resultados obtidos na ausência ou presença de AHFAC sobre a atividade da MPO no modelo de indução de úlcera por etanol absoluto.

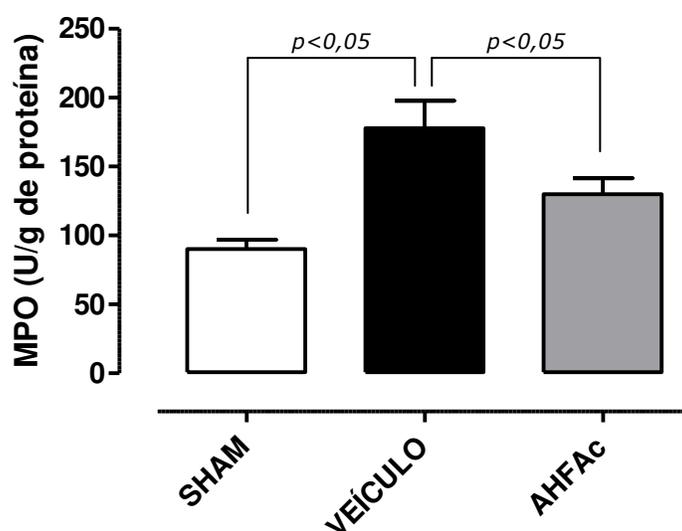


Figura 19: Atividade da enzima MPO na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto. Dados expressos em média \pm epm. Análise estatística ANOVA, seguida de teste de Dunnett.

Após indução de úlcera por etanol absoluto, a enzima MPO apresentou maior atividade no grupo VEÍCULO, em comparação ao grupo SHAM, o que indica infiltração de neutrófilos como evento associado à formação de lesões ulcerativas. A administração de AHFAC foi eficaz em evitar o aumento na atividade da MPO. A imunolocalização da enzima MPO em estômagos de ratos expostos a esse modelo experimental de úlcera é apresentada na figura 20.

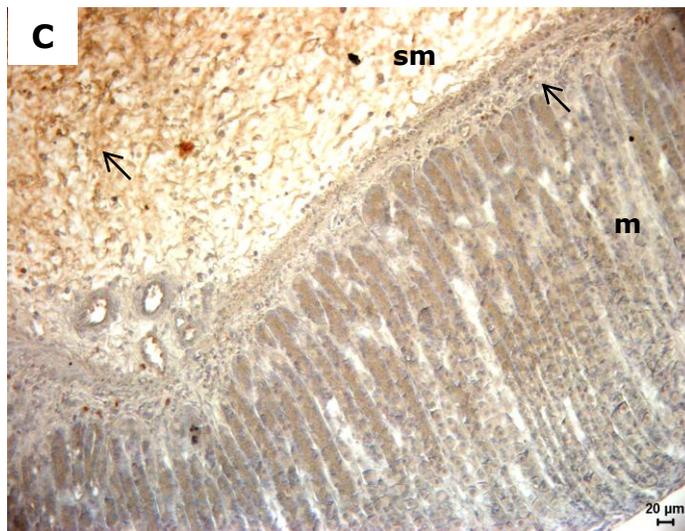
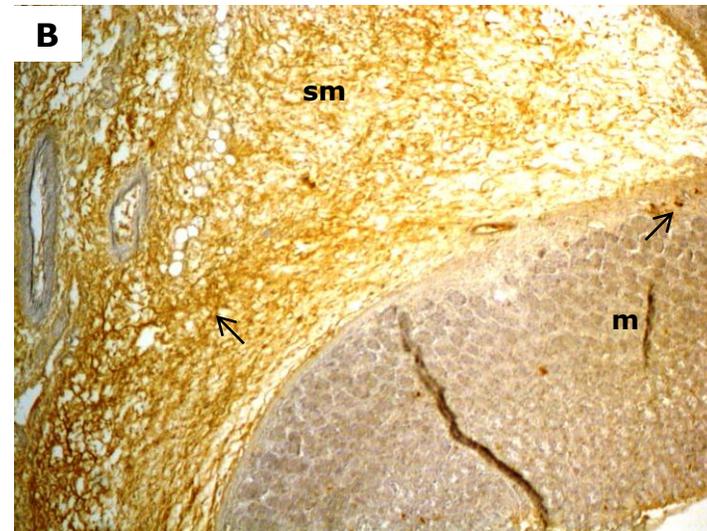
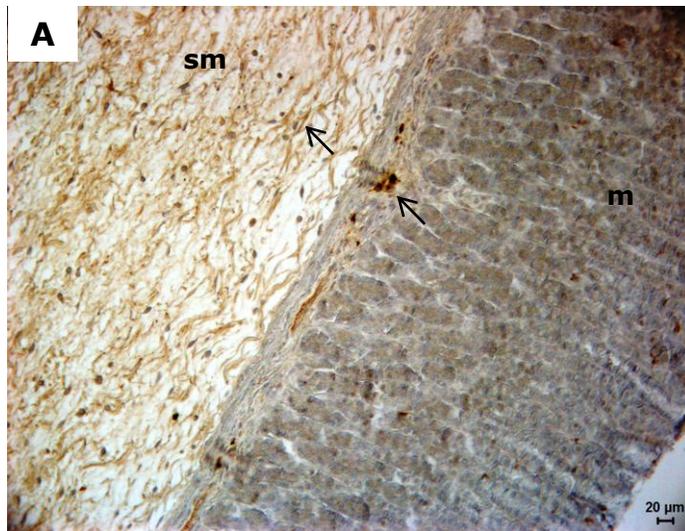


Figura 20: Fotomicrografias de estômagos de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto. Cortes histológicos submetidos à imunolocalização de MPO. Áreas positivas para MPO são marcadas em cor marrom (setas), encontradas principalmente na lâmina própria da mucosa e na submucosa do estômago de ratos do grupo SHAM (A), VEÍCULO (B) e AHFAc (C). Barras: 20 µm. m = mucosa; sm = submucosa.

Da mesma forma que ratos submetidos à isquemia e reperfusão, os animais dos grupos experimentais do modelo de indução de úlcera por etanol apresentam predomínio de reações positivas para MPO na submucosa gástrica. Foi observada maior intensidade de marcação de MPO em estômago de animais tratados apenas com o veículo (Grupo VEÍCULO – Figura 20B), o que indica possivelmente maior infiltração de neutrófilos no estômago, associada ao maior índice de lesões gástricas desses animais.

4.4.2. Marcadores de estresse oxidativo

A depleção de grupamentos sulfidril (G-SH) é observada na úlcera gástrica induzida por etanol absoluto, como indício de estresse oxidativo; os níveis de G-SH encontrados na mucosa gástrica de ratos expostos a esse modelo experimental encontram-se na Figura 21.

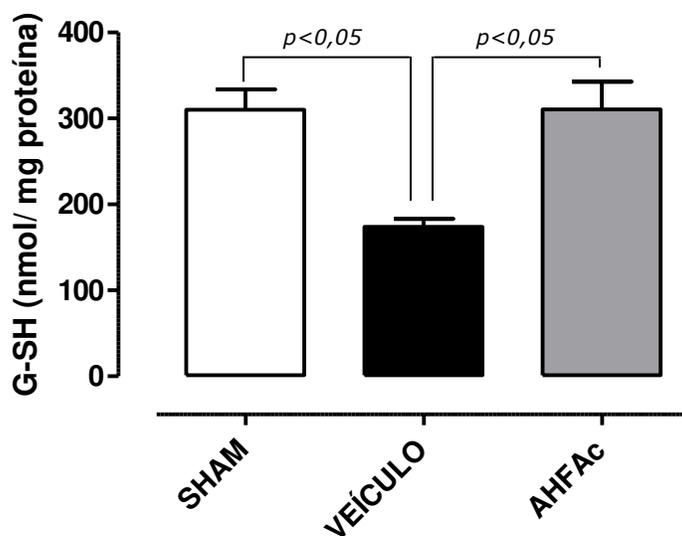


Figura 21: Níveis de G-SH na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto. Dados expressos em média \pm epm. Análise estatística ANOVA, seguida de teste de Dunnett.

Após exposição ao agente ulcerogênico, o grupo VEÍCULO, pré-tratado apenas com o veículo, apresentou redução significativa nos níveis de G-SH, em relação ao grupo SHAM. O pré-tratamento com AHFAc (50 mg.kg⁻¹) impediu a redução de G-SH, mantendo níveis semelhantes ao grupo SHAM, o que indica menor estresse oxidativo no estômago dos animais desse grupo.

Apoptose é um dos eventos celulares estimulados pelo estresse oxidativo. Um dos marcadores de apoptose nos tecidos é o aumento da fragmentação de DNA, que pode ser observado no modelo de indução de úlcera por etanol absoluto, conforme os resultados expressos na figura 22.

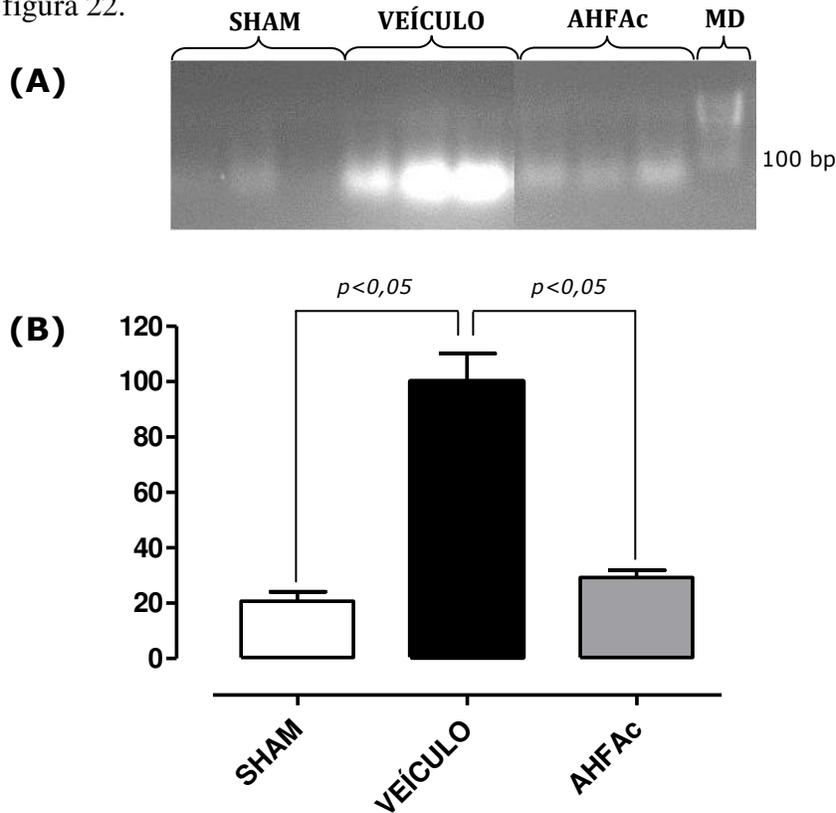


Figura 22: Taxa de apoptose na mucosa gástrica de ratos expostos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto. (A) Fragmentação de DNA na mucosa gástrica. (B) Representação gráfica percentual de fragmentação de DNA, considerando a taxa de fragmentação máxima aquela obtida na mucosa gástrica de ratos pré-tratados apenas com o veículo. Análise estatística Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunns. MD = marcador.

A administração de etanol produziu maior fragmentação de DNA na mucosa gástrica no grupo VEÍCULO (controle negativo), em comparação ao grupo SHAM. O grupo pré-tratado com AHFAc (50 mg.kg⁻¹) apresentou menores níveis de apoptose na mucosa gástrica.

4.4.3. Atividade de enzimas antioxidantes

A atividade das enzimas antioxidantes, glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR) e superóxido dismutase (SOD) na mucosa gástrica de ratos submetidos aos modelos de indução de úlcera por etanol absoluto e por isquemia e reperfusão é apresentada nas figuras 23, 24 e 25, respectivamente.

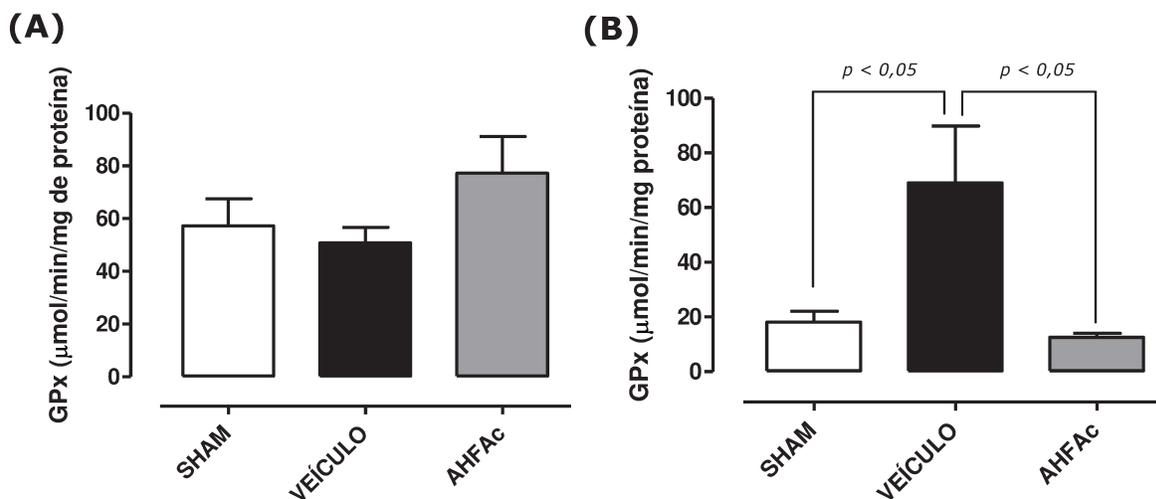


Figura 23: Atividade da enzima GPx na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão (A) ou por etanol absoluto (B). Dados expressos em média \pm epm. Análise estatística ANOVA, seguida de teste de Dunnett.

Após indução de úlcera gástrica por etanol absoluto, foi observado aumento na atividade da enzima GPx no estômago dos animais do grupo VEÍCULO. O aumento na atividade dessa enzima pode ser indicativo de estresse oxidativo. O grupo AHFAc apresentou atividade da GPx semelhante ao grupo SHAM, indicando novamente menor

estresse oxidativo no estômago. Já no modelo de úlcera induzida por isquemia e reperfusão, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais na atividade da GPx na mucosa gástrica.

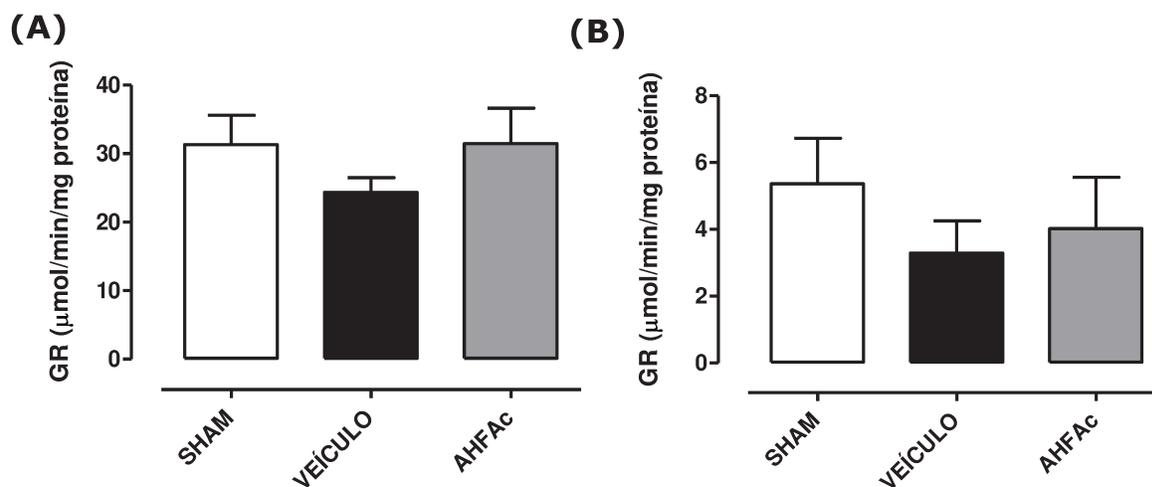


Figura 24: Atividade da enzima GR na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão (A) ou por etanol absoluto (B). Dados expressos em média \pm epm. Análise estatística ANOVA, seguida de teste de Dunnett.

A atividade da glutathiona redutase (GR), que tem papel importante na mucosa gástrica não apresentou diferença significativa entre os grupos após indução de úlcera por etanol ou por isquemia e reperfusão.

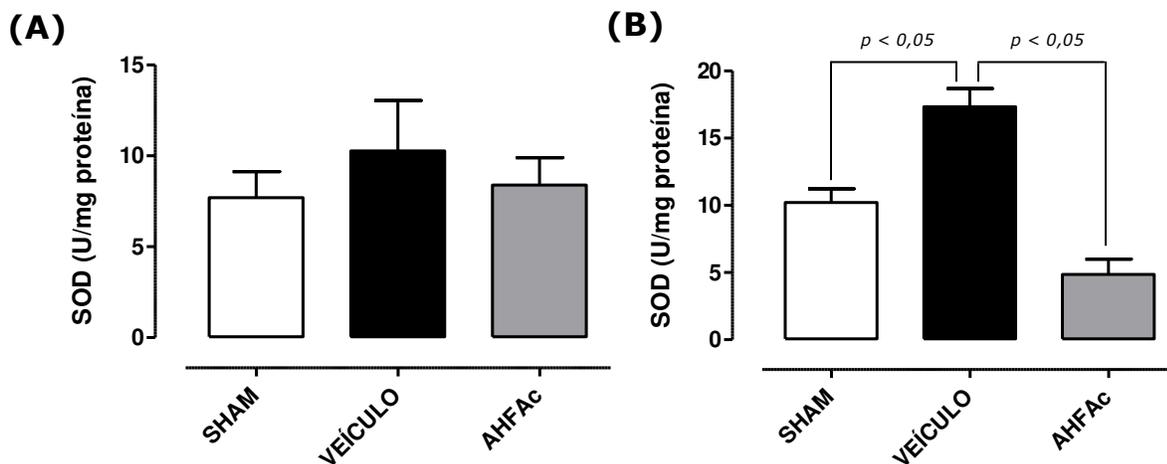


Figura 25: Atividade da enzima SOD na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão (A) ou por etanol absoluto (B). Dados expressos em média \pm epm. Análise estatística ANOVA, seguida de teste de Dunnett.

A determinação da atividade da enzima SOD na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão não mostrou diferenças significativas entre os grupos SHAM, VEÍCULO e AHFAc. No modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, a enzima SOD teve sua atividade aumentada no grupo VEÍCULO, em relação ao SHAM. No grupo tratado com AHFAc, a atividade da SOD se manteve menor que aquela do grupo VEÍCULO ($p < 0,05$). A enzima SOD pode ser considerada primeira linha de defesa frente à geração de ERO. Aumento na atividade dessa enzima pode ser evidência de estresse oxidativo; dessa forma, a manutenção da atividade da SOD em níveis normais no grupo tratado com AHFAc indica menor ação de ERO no estômago dos animais que receberam esse tratamento.

Experimentos de imunolocalização da enzima SOD no estômago de animais expostos à isquemia e reperfusão ou à administração de etanol absoluto são apresentados nas figuras 26 e 27, respectivamente.

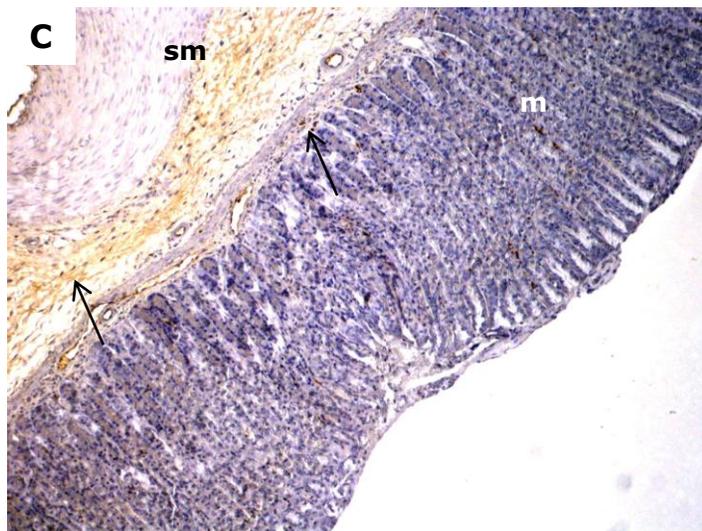
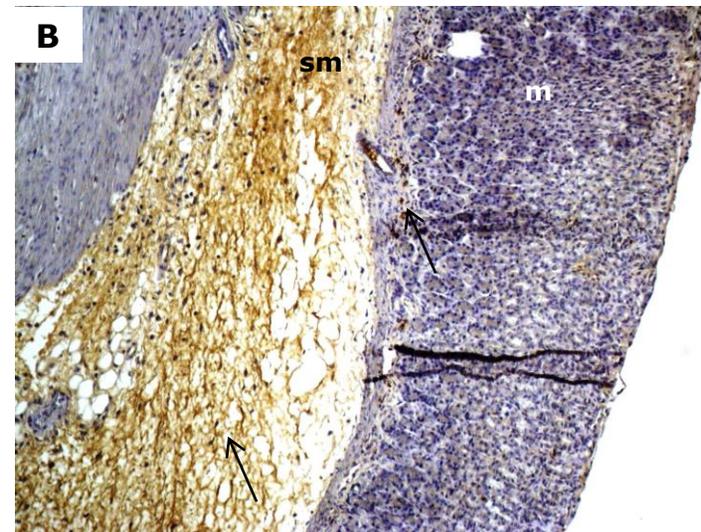
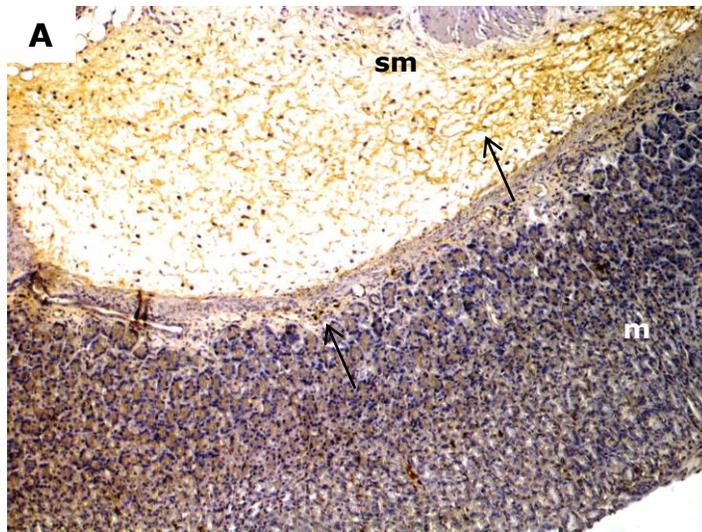


Figura 26: Fotomicrografias de estômagos de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão. Cortes histológicos submetidos à imunolocalização de SOD. Áreas positivas para SOD são marcadas em cor marrom (setas), encontradas principalmente na lâmina própria e glândulas da mucosa e na submucosa do estômago de ratos do grupo SHAM (A), VEÍCULO (B) e AHFAc (C). No grupo VEÍCULO também são observadas áreas positivas para SOD na superfície apical do epitélio. m = mucosa; sm = submucosa.

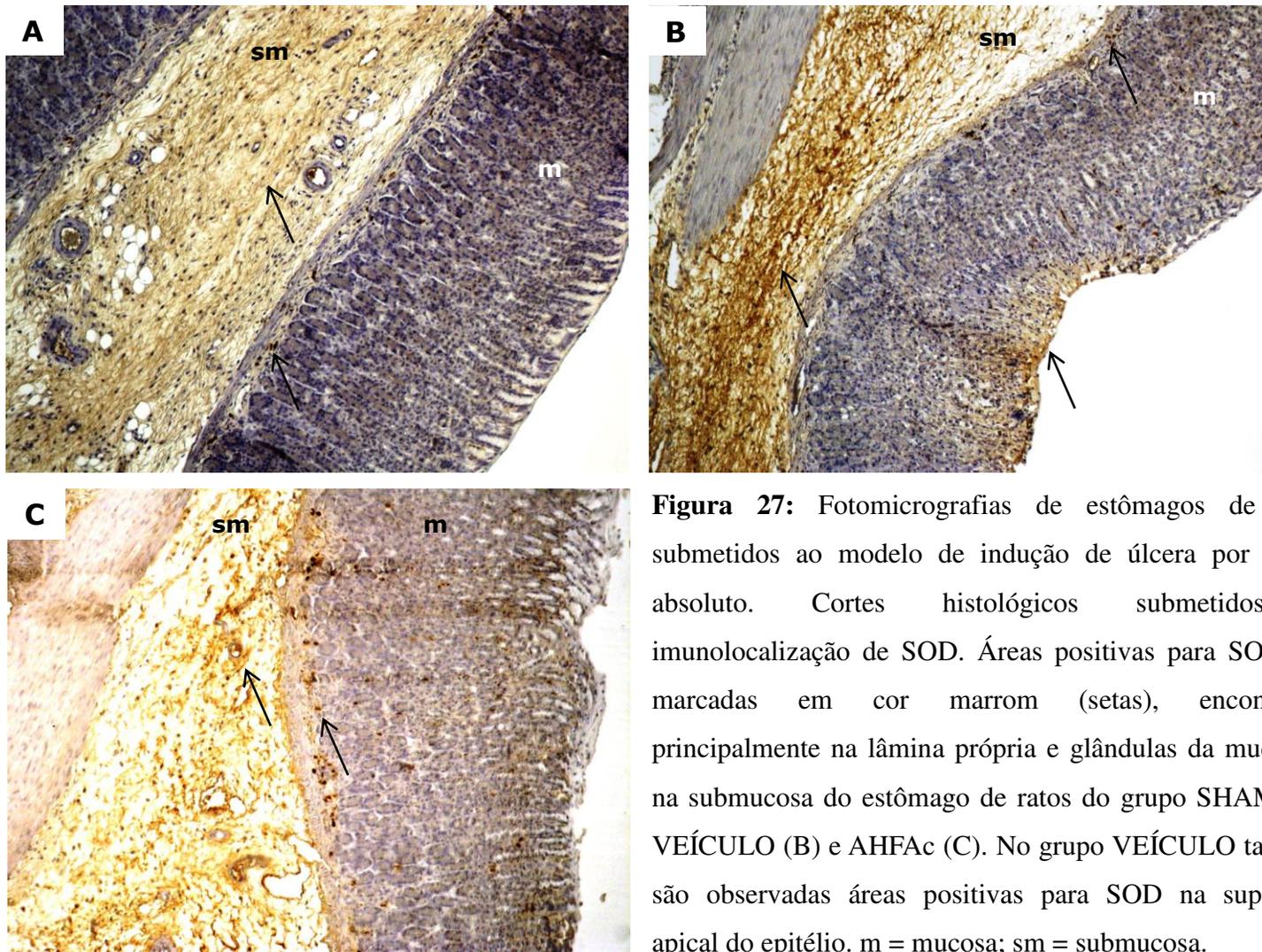


Figura 27: Fotomicrografias de estômagos de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por etanol absoluto. Cortes histológicos submetidos à imunolocalização de SOD. Áreas positivas para SOD são marcadas em cor marrom (setas), encontradas principalmente na lâmina própria e glândulas da mucosa e na submucosa do estômago de ratos do grupo SHAM (A), VEÍCULO (B) e AHFAC (C). No grupo VEÍCULO também são observadas áreas positivas para SOD na superfície apical do epitélio. m = mucosa; sm = submucosa.

Em ambos os modelos de indução de úlcera gástrica, observou-se áreas de reação positiva para SOD na submucosa, lâmina própria e glândulas da mucosa gástrica de animais dos grupos SHAM (Figuras 26A e 27A), VEÍCULO (Figuras 26B e 27B) e AHFAc (Figuras 26C e 27C). No grupo VEÍCULO são observadas áreas de marcação para SOD na superfície apical do epitélio, nos locais de lesão, principalmente no estômago de animal expostos ao agente lesivo etanol (Figura 27B).

Compostos fenólicos apresentam atividade antioxidante por agirem como agentes redutores, doadores de hidrogênio, “varredores” de oxigênio “singlet” ou por ação quelante de metais (Kumarasamy *et al.*, 2004 apud Nazemiyeh *et al.*, 2008). AHFAc é uma fração rica em compostos fenólicos (cerca de 34 % de seus constituintes). Entre as moléculas presentes nessa fração estão ácido gálico e derivados, quercetina, kaempferol e amentoflavona.

A amentoflavona, um biflavonóide, é capaz de inibir peroxidação lipídica não-enzimática e atuar como sequestrador de ânions superóxido (Woo *et al.*, 2005). Também apresenta atividade antiinflamatória, inibindo a expressão de iNOS, a partir da inibição da ativação de NF- κ B em macrófagos, além de reduzir a expressão de COX-2 e iNOS em células de adenocarcinoma (Banerjee *et al.*, 2002; Woo *et al.*, 2005).

O ácido gálico, constituinte de AHFAc, apresenta atividade antioxidante em diversas doenças. Li e colaboradores (2005) observaram que a administração de ácido gálico diminuiu a concentração de malondialdeído (um índice de peroxidação lipídica) e evitou a redução da atividade de CAT e GPx no fígado, rins e cérebro de ratos expostos à aceleração da senescência.

AHFAc apresenta atividade redutora em ensaio com DPPH. Esse ensaio é baseado na reação de transferência de elétrons ao radical peroxil DPPH e a atividade antioxidante da amostra testada é definida em termos de concentração mínima para reduzir 50 % do DPPH – EC₅₀ (Aruoma, 2003; Magalhães *et al.*, 2008). De forma geral, quanto menor o valor de EC₅₀, maior a capacidade antioxidante, sendo compostos com EC₅₀ \leq 50 μ g/ml considerados significativos antioxidantes nesse ensaio (Omisore *et al.*, 2005). Dessa forma,

AHFAC, devido aos seus constituintes, apresentou considerável ação antioxidante ($EC_{50} = 28,171 \mu\text{g/ml}$), com capacidade de sequestrar radicais. AHFAC é rica em compostos fenólicos e vários trabalhos tem demonstrado significativa atividade antioxidante desse grupo de metabólitos secundários vegetais em ensaio de redução do DPPH (Prior *et al.*, 2005; Beara *et al.*, 2009; Patil *et al.*, 2009; Olszewska & Michel, 2009; Tosun *et al.*, 2009).

Nesse trabalho, observaram-se danos em grande parte da porção glandular do estômago após isquemia e reperfusão, o que foi efetivamente reduzido com a administração de AHFAC. A análise histológica de estômagos submetidos a este processo revelou alterações celulares no epitélio e redução do muco, que se mostraram mais amenas no tratamento com AHFAC. A atividade gastroprotetora nesse modelo pode indicar atividade antioxidante ou sequestradora de ERO já que a lesão, no modelo de isquemia e reperfusão, é derivada da liberação de radicais livres, principalmente devido à ação da xantina oxidase (Itoh & Guth, 1985; Wadhwa *et al.*, 1987; Yoshikawa *et al.*, 1989; Andrews *et al.*, 1992; Sakurai *et al.*, 1994; Brzozowski *et al.*, 1999; Naito *et al.*, 1999; Derin *et al.*, 2005; El Eter *et al.*, 2007).

A administração de AHFAC foi eficaz na gastroproteção em modelo de indução de úlcera por etanol absoluto. Nesse modelo, entre os danos ao estômago estão a formação de edema no tecido, hemorragia sub-epitelial, esfoliação celular e aumento da permeabilidade da mucosa (Hiraishi *et al.*, 1999; Kountouras *et al.*, 2001; Szabo *et al.*, 1985). As lâminas histológicas evidenciaram lesão e áreas de hemorragia no epitélio provocadas pelo etanol. O tratamento com AHFAC minimizou esses efeitos, contribuindo para manutenção da integridade da mucosa gástrica.

O epitélio do estômago é coberto por uma camada de muco, que contém glicoproteínas e apresenta um importante papel na proteção da mucosa gástrica (Kemper &

Specian, 1991, Johansson *et al.*, 2000; Mojzis *et al.*, 2000). Além de ser uma barreira à ação lesiva do ácido luminal, o muco apresenta atividade antioxidante (Garner *et al.*, 1984; Repetto & Llesuy, 2002). Trabalho realizado por Hiraishi e colaboradores (1993) demonstrou efeito protetor de glicoproteínas constituintes do muco contra radicais livres liberados pela xantina oxidase em cultura de células do epitélio gástrico.

O tratamento com etanol provoca redução no muco aderido ao epitélio do estômago (Lee *et al.*, 2006), o que intensifica o processo lesivo. No modelo de indução de úlcera gástrica por etanol absoluto, observou-se uma tendência de aumento na camada de muco no estômago de ratos pré-tratados com AHFAc, o que figura entre seus mecanismos de gastroproteção. Estudo realizado por Luiz-Ferreira (2005) mostra significativo aumento no muco aderido, após administração dessa fração. Considerando que agentes nocivos exógenos, como o etanol, penetram a barreira de muco causando esfoliação epitelial e necrose, essa fração torna-se promissora por sua capacidade de aumentar a concentração de muco que, conseqüentemente, minimiza as lesões epiteliais.

Entre as fontes biológicas de ERO está a infiltração de células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos no tecido (Koch, *et al.*, 2004; La Casa *et al.*, 2000). A infiltração de neutrófilos é relatada como um dos processos envolvidos na geração de úlcera gástrica, derivada de vários fatores (Bayir *et al.*, 2006). A enzima NADPH oxidase, presente na membrana de neutrófilos, reduz O_2 a $O_2^{\bullet-}$, que é convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Além disso, neutrófilos liberam outras substâncias citotóxicas, como proteases e lactoferrinas (Derin *et al.*, 2006). A atividade da MPO é relatada como indicador da infiltração de neutrófilos; aumento de MPO é observado em diversas enfermidades e inflamações como aterosclerose, tumores e doenças degenerativas do sistema nervoso

(Nauseef, 2001). A enzima MPO está presente em altas concentrações nos grânulos citoplasmáticos de neutrófilos e catalisa a reação de N-cloroaminas ou íons cloreto e H₂O₂, formando hipoclorito ou ácido hipocloroso, ambos com ação antimicrobiana nos fagossomos, além de serem agentes lesivos a tecidos e células (Segal, 2005; Hansson *et al.*, 2006).

Vários trabalhos apresentam aumento na atividade da MPO associado à úlcera gástrica (Smith *et al.*, 1987; Andrews *et al.*, 1994; De la Lastra, *et al.*, 1997; Murakami *et al.*, 1997; Derin *et al.*, 2006). Observou-se aumento na atividade de MPO, além de maior intensidade de reação positiva para MPO em análise imunohistoquímica, no estômago de ratos expostos à indução de úlcera gástrica por etanol absoluto e por isquemia e reperfusão, nas condições experimentais desse trabalho. Nos animais tratados com AHFAc, esse aumento foi evitado, o que indica menor infiltração de neutrófilos e, conseqüentemente, menor liberação de radicais livres e substâncias lesivas no tecido, o que contribui para a gastroproteção desse tratamento.

A menor infiltração de neutrófilos observada no tratamento com AHFAc pode estar relacionada à regulação da liberação de certas citocinas e outros mediadores inflamatórios. Zhang e colaboradores (2008) encontraram aumento na concentração de IL-8, TNF α e IL-1 β na mucosa gástrica de ratos, após a indução de úlcera por indometacina. Esse aumento está atrelado a lesões na mucosa gástrica e aumento de atividade da MPO, indicando a participação dessas citocinas na infiltração de neutrófilos e no surgimento de danos no tecido.

Diversos trabalhos evidenciaram a geração de ERO na úlcera gástrica induzida por etanol, com aumento da peroxidação lipídica na mucosa gástrica e diminuição na

quantidade de grupamentos sulfidríla (Mizui *et al.*, 1986; Melchiorri *et al.*, 1997; Bagchi *et al.*, 1998; Kahraman *et al.*, 2003; Arafa & Sayed-Ahmed, 2003). Diante disto, o presente estudo avaliou o papel destes compostos na proteção gástrica promovida pela AHFAc. A administração do álcool apresentou redução nos níveis de G-SH, enquanto AHFAc foi capaz de os conservar em níveis normais, demonstrando que as medidas de proteção dessas substâncias estão relacionadas à elevada capacidade antioxidante. O decréscimo na quantidade de G-SH pode estar ligado a sua oxidação por metabólitos tóxicos do etanol ou por sua ligação ao acetaldeído, sintetizado pela enzima álcool desidrogenase (Bilici *et al.*, 2002) ou, ainda, por uma diminuição na síntese de glutathiona (GSH).

Loguercio e colaboradores (1993) relataram que o etanol pode reduzir drasticamente os níveis de cisteína, um importante aminoácido para a síntese de GSH, a qual é o mais abundante elemento não-protéico com grupamento sulfidríla. GSH participa de vários processos metabólicos, atua em reações de óxido-redução, sendo importante seqüestrador de radicais livres (Franco *et al.*, 2007). Assim, a redução dos níveis de GSH torna o tecido mais suscetível a lesões. A menor taxa de danos no estômago de ratos tratados com AHFAc, associada a um menor índice de estresse oxidativo, permitiu a manutenção dos níveis normais de G-SH nesse grupo.

O estresse oxidativo produz aumento nos níveis de apoptose, o que é observado em células da mucosa gástrica após exposição ao etanol (Mizushima *et al.*, 1999). A apoptose é processo ativo de morte celular, controlado através de uma complexa rede de sinalização, caracterizado morfológicamente por condensação da cromatina, redução dos componentes celulares e formação dos corpos apoptóticos. Apoptose tem como marcador bioquímico a fragmentação de DNA (von Herbay & Rudi, 2000). Há um balanço entre a proliferação e a morte celular nos tecidos, em condições fisiológicas; alterações neste equilíbrio são

relacionadas a diversos estados patológicos na mucosa gástrica (Tsutsumi *et al.*, 2002). Um dos estímulos ao aumento de apoptose é o estresse oxidativo, com liberação de ERO superando as defesas antioxidantes (Bandyopadhyay *et al.*, 2001). No modelo de indução de úlcera por etanol, o grupo VEÍCULO apresentou aumento na fragmentação de DNA, enquanto o grupo AHFAc manteve a fragmentação em níveis próximos ao grupo SHAM. Dessa forma, a administração de AHFAc minimizou os efeitos lesivos do etanol sobre o DNA, devido ao menor estresse oxidativo.

As lesões induzidas por etanol estão diretamente relacionadas à produção de ERO e, além disso, a administração de etanol resulta na depleção dos níveis de glutathiona e na diminuição da atividade antioxidante, formando assim um ambiente favorável para o estresse oxidativo. (Das e Vasudevan, 2007). O organismo possui sistema de defesa antioxidante, que abrange um complexo sistema de enzimas e moléculas capazes de “capturar” os radicais livres. Dentre essas enzimas, GPx converte H_2O_2 em H_2O , a partir da oxidação da glutathiona (GSH) a sua forma dissulfídica (GSSG), a qual pode novamente ser convertida a GSH pela ação da GR utilizando como co-fator NADPH (Imai & Nakagawa, 2003; Zabłocka e Janusz, 2008).

Após indução de úlcera por etanol absoluto, houve aumento na atividade da GPx (controle negativo), o que não foi observado no grupo tratado com AHFAc. Ao contrário, diversos trabalhos reportam diminuição na atividade da enzima GPx após exposição de tecidos ao etanol (Puntarulo *et al.*, 1999; Molina *et al.*, 2003; Luczaj & Skrzydlewska, 2004). Esta enzima pode ser inativada através de modificações nos resíduos de selenocisteína em seu sítio ativo, por 4-hidroxinonenal (HNE), um produto da peroxidação lipídica (Miyamoto *et al.*, 2003; Luczaj & Skrzydlewska, 2004). Além disso, a atividade da GPx pode ser reduzida devido à depleção da glutathiona pelo etanol (Loguercio *et al.*, 1993;

Bilici *et al.*, 2002). Repetto e colaboradores (2003) analisaram a atividade da GPx em modelo de úlcera induzida por etanol e não observaram diferenças entre os grupos experimentais. Em outros tipos de lesão, como colite ulcerativa, é relatado aumento na atividade da GPx em modelos experimentais, provavelmente como efeito do acúmulo de peróxidos (Nieto *et al.*, 2000; Tham *et al.*, 2002).

Na determinação da atividade da GR não foram observadas diferenças entre os grupos, diferente do observado por alguns autores, cujos trabalhos demonstram diminuição na atividade da GR em lesão ulcerativa causada por etanol (Moghadasian & Godin, 1996; Bilici *et al.*, 2002). O ciclo “redox” da glutathiona desempenha importante papel para garantir a integridade da mucosa em exposição ao etanol. Hiraishi e colaboradores (1999) demonstraram que a diminuição na síntese de GSH e inibição da GR implicaram em maior suscetibilidade à lesão das células epiteliais do estômago, *in vitro*.

Diversos trabalhos mostram redução da atividade das enzimas SOD e GPx na mucosa gástrica lesada pela oclusão da artéria celíaca, seguida de reoxigenação do estômago (Kwiecien *et al.*, 2002; El-Abhar *et al.*, 2003; Derin *et al.*, 2004). Entretanto, neste trabalho não foram observadas alterações na atividade destas enzimas e nem na atividade da GR.

A enzima SOD apresentou aumento de atividade no estômago, após indução de úlcera por etanol, nas condições experimentais deste trabalho. Repetto *et al.* (2003) atribuem o aumento na atividade da SOD ao estresse oxidativo e maior liberação de $O_2^{\cdot-}$. Assim, menor atividade da SOD no grupo não-ulcerado (SHAM) e no tratado com AHFAc pode indicar menor exposição do tecido à geração de ERO. SOD forma um grupo de enzimas conjugadas com metal, de papel antioxidante vital na saúde humana conferida pela ação seqüestradora do ânion superóxido (Johnson e Giulivi, 2005). Além dessa ação

seqüestradora, esta enzima também é componente essencial de vias de sinalização que regulam a fisiologia celular (Oberley, 2005). Existem três formas conhecidas de SOD em células de mamíferos, a SOD contendo cobre e zinco (CuZnSOD), encontrada principalmente no citoplasma e núcleo, a SOD contendo manganês (MnSOD), encontrada nas mitocôndrias e a SOD extracelular (ECSOD), encontrada primariamente nos compartimentos extracelulares (Oberley, 2005). A observação de áreas de reação imunohistoquímica positiva para SOD na região de alteração celular do epitélio gástrico indica participação dessa enzima em resposta à lesão ulcerativa. Ganguly e Swarnakar (2009) observaram aumento na expressão de mRNA da enzima SOD associado ao aumento de estresse oxidativo e liberação de mediadores inflamatórios em modelo de indução de úlcera gástrica por indometacina (DAINE). Konturek *et al.* (2008) também observaram aumento da expressão de mRNA de SOD na mucosa gástrica ulcerada, nesse caso, em úlcera crônica induzida por ácido acético. Assim, maior atividade e expressão da enzima SOD na mucosa gástrica podem indicar maior exposição do tecido à geração de ERO e a menor atividade da SOD no grupo pré-tratado com AHFAc (50 mg.kg⁻¹), em comparação ao controle negativo, evidencia menores danos à mucosa gástrica dos animais desse grupo, com menor exposição a estresse oxidativo.

Entre seus constituintes, AHFAc apresenta amentoflavona, ácido gálico, quercetina e kaempferol. Estes compostos fenólicos apresentam grande potencial de captura de ânion superóxido e de inibição de enzimas envolvidas na liberação de radicais livres, além de poderem atuar como quelantes de certos metais (Robak & Gryglewski, 1988; Cholbi *et al.*, 1991; Harbone & Williams, 2000; Pietta, 2000; Iwai *et al.*, 2001; Luczaj & Skrzydlewska, 2004). Dessa forma, a atividade gastroprotetora da fração, nos modelos de indução de úlcera gástrica avaliados deve envolver atividade antioxidante de seus compostos, já que

são evidenciados menores índices de estresse oxidativo após tratamento com AHFAc, através da manutenção dos níveis de G-SH, taxa de fragmentação de DNA e atividade de GPx e SOD semelhantes ao controle não ulcerado, além de outros mecanismos de ação, como aumento de prostaglandinas e muco.

6. CONCLUSÃO

A fração acetato de etila das folhas de *A. humile* (AHFAC) apresentou atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*. AHFAC apresentou atividade gastroprotetora em modelo de indução de úlcera por isquemia e reperfusão e por etanol absoluto, com manutenção de níveis normais de G-SH, fragmentação de DNA e atividade das enzimas GPx e SOD, além da inibição da infiltração de neutrófilos. A ação gastroprotetora de AHFAC envolveu atividade antioxidante, provavelmente com sequestro de radicais livres, devido a sua composição fenólica.

Extratos e frações das folhas de *Anacardium humile* apresentam significativa atividade antiulcerogênica. Dessa forma, a elucidação de mecanismos de ação, aliada à determinação da composição química das frações, pode abrir espaço para o desenvolvimento de um novo produto para o tratamento de úlceras. Assim, entre as possíveis abordagens de estudo para melhor compreensão dos mecanismos de ação da fração AHFAc estão:

- ✓ Analisar a razão de glutatona reduzida e glutatona oxidada na mucosa gástrica, a atividade da xantina oxidase, uma importante fonte de geração de ERO nos dois modelos de indução de úlcera investigados nesse trabalho, além da dosagem de mediadores inflamatórios associados ao estresse oxidativo.
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante com o uso de ensaios *in vitro* que englobam outros mecanismos de reação (transferência de prótons, por exemplo).
- ✓ Isolar os constituintes majoritários da fração para identificação química, através do uso de diferentes técnicas, como espectrometria de massas sequencial e espectroscopia de ressonância magnética nuclear.
- ✓ Avaliar a atividade biológica dos constituintes isolados.

Considerando que a atividade antiulcerogênica de AHFAc envolve atividade antioxidante e redução da infiltração de neutrófilos, essa fração pode ser avaliada para tratamento de outras enfermidades que envolvem geração de radicais livres ou resposta inflamatória.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Salam,O.M., Czimmer,J., Debreceni,A., Szolcsanyi,J., & Mozsik,G. (2001) Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. *J. Physiol Paris* **95**, 105-127.
- Amarowicz,R., Estrella,I., Hernandez,T., Duenas,M., Troszynska,A., Agnieszka,K., & Pegg,R.B. (2009) Antioxidant activity of a red lentil extract and its fractions. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 5513-5527.
- Andreo,M.A., Ballesteros,K.V., Hiruma-Lima,C.A., hado da Rocha,L.R., Souza Brito,A.R., & Vilegas,W. (2006) Effect of *Mouriri pusa* extracts on experimentally induced gastric lesions in rodents: role of endogenous sulfhydryls compounds and nitric oxide in gastroprotection. *J. Ethnopharmacol.* **107**, 431-441.
- Andrews,F.J., Malcontenti,C., & O'Brien,P.E. (1992) Sequence of gastric mucosal injury following ischemia and reperfusion. Role of reactive oxygen metabolites. *Dig. Dis. Sci.* **37**, 1356-1361.
- Andrews,F.J., Malcontenti-Wilson,C., & O'Brien,P.E. (1994) Polymorphonuclear leukocyte infiltration into gastric mucosa after ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol* **266**, G48-G54.
- Arafa,H.M. & Sayed-Ahmed,M.M. (2003) Protective role of carnitine esters against alcohol-induced gastric lesions in rats. *Pharmacol. Res.* **48**, 285-290.
- Aruoma,O.I. (2003) Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutat. Res.* **523-524**, 9-20.
- Asl,M.N. & Hosseinzadeh,H. (2008) Review of pharmacological effects of Glycyrrhiza sp. and its bioactive compounds. *Phytother. Res.* **22**, 709-724.
- Bagchi,D., Carryl,O.R., Tran,M.X., Krohn,R.L., Bagchi,D.J., Garg,A., Bagchi,M., Mitra,S., & Stohs,S.J. (1998) Stress, diet and alcohol-induced oxidative gastrointestinal mucosal injury in rats and protection by bismuth subsalicylate. *J. Appl. Toxicol.* **18**, 3-13.
- Baker,R.D., Cook,C.O., & Goodwin,D.C. (2004) Properties of catalase-peroxidase lacking its C-terminal domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 833-839.

- Bandyopadhyay,D., Biswas,K., Bhattacharyya,M., Reiter,R.J., & Banerjee,R.K. (2001) Gastric toxicity and mucosal ulceration induced by oxygen-derived reactive species: protection by melatonin. *Curr. Mol. Med.* **1**, 501-513.
- Banerjee,T., Van der Vliet,A., & Ziboh,V.A. (2002) Downregulation of COX-2 and iNOS by amentoflavone and quercetin in A549 human lung adenocarcinoma cell line. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **66**, 485-492.
- Barbastefano,B. (2007) Atividade antiulcerogenica de extratos brutos, frações semi-purificadas e substancia ativa de duas espécies do gênero *Vernonia*: *Vernonia polyanthes* e *Vernonia ferruginea*. Orientadora: Dr^a Alba Regina Monteiro Souza Brito. Tese (Doutorado), Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas/SP.
- Barreiros,A.L.B.S., David,J.M., & David,J.P. (2006) Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Quimica Nova* **29**, 113-123.
- Barrowman,J.A., Pfeiffer,C.J. (1982) Carbenoxolone: a critical analysis of its clinical value in peptic ulcer. *In: Drugs and peptic ulcer*. Pfeiffer, C.J. Boca Raton, Fla: CRC Press, p. 123-132.
- Bayir,Y., Odabasoglu,F., Cakir,A., Aslan,A., Suleyman,H., Halici,M., & Kazaz,C. (2006) The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. *Phytomedicine*. **13**, 584-590.
- Beara,I.N., Lesjak,M.M., Jovin,E.D., Balog,K.J., Anackov,G.T., Orcic,D.Z., & Mimica-Dukic,N.M. (2009) Plantain (*Plantago* L.) species as novel sources of flavonoid antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 9268-9273.
- Behmer,O.A., Tolosa,E.M.C., & Freitas-Neto,A.G. (1976) *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. São Paulo/SP: EDART, Editora da Universidade de São Paulo.
- Berstad,K. & Berstad,A. (1993) *Helicobacter pylori* infection in peptic ulcer disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **28**, 561-567.
- Bilici,D., Suleyman,H., Banoglu,Z.N., Kiziltunc,A., Avci,B., Ciftcioglu,A., & Bilici,S. (2002) Melatonin prevents ethanol-induced gastric mucosal damage possibly due to its antioxidant effect. *Dig. Dis. Sci.* **47**, 856-861.

- Biswas,K., Bandyopadhyay,U., Chattopadhyay,I., Varadaraj,A., Ali,E., & Banerjee,R.K. (2003) A novel antioxidant and antiapoptotic role of omeprazole to block gastric ulcer through scavenging of hydroxyl radical. *J. Biol. Chem.* **278**, 10993-11001.
- Blake,D.R., Allen,R.E., & Lunec,J. (1987) Free radicals in biological systems--a review orientated to inflammatory processes. *Br. Med. Bull.* **43**, 371-385.
- Borelli,F. & Izzo,A.A. (2000) Review article: the plant kingdom as a sources of antiulcer remedies. *Phytotherapy Res.* **14**, 581-591.
- Bradford,M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brzozowski,T., Konturek,P.C., Konturek,S.J., Brzozowska,I., & Pawlik,T. (2005) Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. *J. Physiol Pharmacol.* **56 Suppl 5**, 33-55.
- Brzozowski,T., Konturek,P.C., Konturek,S.J., Sliwowski,Z., Drozdowicz,D., Stachura,J., Pajdo,R., & Hahn,E.G. (1999) Role of prostaglandins generated by cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in healing of ischemia-reperfusion-induced gastric lesions. *Eur. J. Pharmacol.* **385**, 47-61.
- Brzozowski,T., Kwiecien,S., Konturek,P.C., Konturek,S.J., Mitis-Musiol,M., Duda,A., Bielanski,W., & Hahn,E.G. (2001) Comparison of nitric oxide-releasing NSAID and vitamin C with classic NSAID in healing of chronic gastric ulcers; involvement of reactive oxygen species. *Med. Sci. Monit.* **7**, 592-599.
- Butte,J.M., Dagnino,B., Tapia,A., Llanos,J. (2007) Estado actual del tratamiento quirúrgico de la úlcera péptica perforada en el Hospital Regional de Talca - Emergency surgical treatment of perforated peptic ulcer. *Rev. Chilena de Cirugía* **56**, 16-21.
- Calvo,T.R., Lima,Z.P., Silva,J.S., Ballesteros,K.V., Pellizzon,C.H., Hiruma-Lima,C.A., Tamashiro,J., Brito,A.R., Takahira,R.K., & Vilegas,W. (2007) Constituents and antiulcer effect of *Alchornea glandulosa*: activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 451-459.
- Carlberg,I. & Mannervik,B. (1985) Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* **113**, 484-490.

- Castro,L.P.; Coelho,L.G.V.; Vieira,W.L.S.V. & Rodrigues,M.A.G. (2009) Úlcera Péptica Gastroduodenal. *In: Tratado de Clínica Médica, 2ªed.* Org.: Lopes,A.C. São Paulo/SP: Ed. Roca.
- Chan,F.K. & Leung,W.K. (2002) Peptic-ulcer disease. *Lancet* **360**, 933-941.
- Chandrasekharan,N.V., Dai,H., Roos,K.L., Evanson,N.K., Tomsik,J., Elton,T.S., & Simmons,D.L. (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 13926-13931.
- Cheeseman,K.H. & Slater,T.F. (1993) An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.* **49**, 481-493.
- Cho,C.H. (2001) Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders. *J. Physiol Paris* **95**, 253-256.
- Cholbi,M.R., Paya,M., & Alcaraz,M.J. (1991) Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl4-induced microsomal lipid peroxidation. *Experientia* **47**, 195-199.
- Chow,D.K. & Sung,J.J. (2007) Is the prevalence of idiopathic ulcers really on the increase? *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* **4**, 176-177.
- Conner,E.M. & Grisham,M.B. (1996) Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* **12**, 274-277.
- Cross,C.E., Halliwell,B., & Allen,A. (1984) Antioxidant Protection - A Function of Tracheobronchial and Gastrointestinal Mucus. *Lancet* **1**, 1328-1330.
- Crozier,A., Jaganath,I.B., & Clifford,M.N. (2009) Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports* **26**, 1001-1043.
- Cuendet,M., Hostettmann,K., Potterat,O., & Dyatmiko,W. (1997) Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta* **80**, 1144-1152.
- D'Acampora, J.A., Lima,D.A.N., Sousa,M.V., Aquino,A.C., Russi,R.F., Vieira,J., Lopes,A. (2008) Perfil epidemiológico dos pacientes portadores de úlcera péptica perforada atendidos no centro cirúrgico do Hospital Florianópolis. *Rev Med Res* **10**, 141-146.
- Das,D. & Banerjee,R.K. (1993) Effect of stress on the antioxidant enzymes and gastric ulceration. *Mol. Cell Biochem.* **125**, 115-125.

- Das,D., Bandyopadhyay,D., Bhattacharjee,M., & Banerjee,R.K. (1997) Hydroxyl radical is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration. *Free Radical Biology and Medicine* **23**, 8-18.
- Das,D.K. & Maulik,N. (2004) Conversion of death signal into survival signal by redox signaling. *Biochemistry-Moscow* **69**, 10-17.
- Das,S.K. & Vasudevan,D.M. (2007) Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sciences* **81**, 177-187.
- De La Lastra,C.A., Cabeza,J., Motilva,V., & Martin,M.J. (1997) Melatonin protects against gastric ischemia-reperfusion injury in rats. *J. Pineal Res.* **23**, 47-52.
- de Zwart,L.L., Meerman,J.H., Commandeur,J.N., & Vermeulen,N.P. (1999) Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 202-226.
- Derin,N., Agac,A., Bayram,Z., Asar,M., & Izgut-Uysal,V.N. (2006) Effects of L-carnitine on neutrophil-mediated ischemia-reperfusion injury in rat stomach. *Cell Biochemistry and Function* **24**, 437-442.
- Derin,N., Izgut-Uysal,V.N., Agac,A., Aliciguzel,Y., & Demir,N. (2004) L-carnitine protects gastric mucosa by decreasing ischemia-reperfusion induced lipid peroxidation. *Journal of Physiology and Pharmacology* **55**, 595-606.
- Di Carlo,G., Mascolo,N., Izzo,A.A., & Capasso,F. (1999) Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences* **65**, 337-353.
- Dohadwalla,A.N. (1985) Natural Product Pharmacology - Strategies in Search of Leads for New Drug Designs. *Trends in Pharmacological Sciences* **6**, 49-53.
- El Eter,E., Al Tuwaijiri,A., Hagar,H., & Arafa,M. (2007) In vivo and in vitro antioxidant activity of ghrelin: Attenuation of gastric ischemic injury in the rat. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **22**, 1791-1799.
- El-Abhar,H.S., Abdallah,D.M., & Saleh,S. (2003) Gastroprotective activity of *Nigella sativa* oil and its constituent, thymoquinone, against gastric mucosal injury induced by ischaemia/reperfusion in rats. *J. Ethnopharmacol.* **84**, 251-258.
- Elliott,S.N. & Wallace,J.L. (1998) Nitric oxide: A regulator of mucosal defense and injury. *Journal of Gastroenterology* **33**, 792-803.

- El-Moselhy,M., bdel-Hamid,N., & bdel-Raheim,S. (2009) Gastroprotective Effect of Nicorandil in Indomethacin and Alcohol-Induced Acute Ulcers. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **152**, 449-459.
- Erkasap,N., Uzuner,K., Serteser,M., Koken,T., & Aydin,Y. (2003) Gastroprotective effect of leptin on gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion is related to gastric histamine content in rats. *Peptides* **24**, 1181-1187.
- Faure,P. & Lafond,J.L. (1995) Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. *In: Analysis of free radicals in biological systems*. Favier,A.E. *et al.* Eds. Verla Bostonp, p. 237-248.
- Fialkow,L., Wang,Y.C., & Downey,G.P. (2007) Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radical Biology and Medicine* **42**, 153-164.
- Franco,R., Schoneveld,O.J., Pappa,A., & Panayiotidis,M.I. (2007) The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. *Arch. Physiol Biochem.* **113**, 234-258.
- Ganguly,K. & Swarnakar,S. (2009) Induction of matrix metalloproteinase-9 and-3 in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced acute gastric ulcers in mice: regulation by melatonin. *Journal of Pineal Research* **47**, 43-55.
- Ganguly,K., Kundu,P., Banerjee,A., Reiter,R.J., & Swarnakar,S. (2006) Hydrogen peroxide-mediated downregulation of matrix metalloprotease-2 in indomethacin-induced acute gastric ulceration is blocked by melatonin and other antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* **41**, 911-925.
- Garner,A., Flemstrom,G., & Heylings,J.R. (1979) Effects of Anti-Inflammatory Agents and Prostaglandins on Acid and Bicarbonate Secretions in the Amphibian-Isolated Gastric-Mucosa. *Gastroenterology* **77**, 451-457.
- Garner,A., Flemstrom,G., Allen,A., Heylings,J.R., & Mcqueen,S. (1984) Gastric-Mucosal Protective Mechanisms - Roles of Epithelial Bicarbonate and Mucus Secretions. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **19**, 79-86.
- Gotlieb,O. (1981) New and underutilized plants in the Americas: solution to problems of inventory through systematics. *Interciencia* **6**, 22-29.

- Grisham,M.B., Hernandez,L.A., & Granger,D.N. (1986) Xanthine-Oxidase and Neutrophil Infiltration in Intestinal Ischemia. *American Journal of Physiology* **251**, G567-G574.
- Guarim-Neto,G. & Morais,R.G. (2003) Recursos medicinais de espécies do Mato Grosso: um estudo bibliográfico. *Acta Bot. Bras.* **17**, 561-584.
- Gudis,K. & Sakamoto,C. (2005) The role of cyclooxygenase in gastric mucosal protection. *Digestive Diseases and Sciences* **50**, S16-S23.
- Guerra,M.P. & Nodari,R.O. (2007) Biodiversidade: Aspectos Biológicos, Geográficos, Legais e Éticos, *In: Farmacognosia – da Planta ao Medicamento*. Org.: Simões, C.M.O., Schenkel,E.P., Gosmann,G, Mello,J.C.P., Mentz,L.A. & Petrovick,P.R. Porto Alegre/RS e Florianópolis/SC: Ed. UFRGS e UFSC.
- Gurib-Fakim,A. (2006) Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol. Aspects Med.* **27**, 1-93.
- Gustavsson,S. & Nyren,O. (1989) Time Trends in Peptic-Ulcer Surgery, 1956 to 1986 - A Nation-Wide Survey in Sweden. *Annals of Surgery* **210**, 704-709.
- Hagg,U., Andersson,I., Naylor,A.S., Gronros,J., Jonsdottir,I.H., Bergstrom,G, & Gan,L.M. (2004) Voluntary physical exercise-induced vascular effects in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Sci. (Lond)* **107**, 571-581.
- Halliwell,B. & Gutteridge,J.M.C. (1990) Role of Free-Radicals and Catalytic Metal-Ions in Human-Disease - An Overview. *Methods in Enzymology* **186**, 1-85.
- Halliwell,B. & Gutteridge,J.M.C. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed. Oxford Univerity Press Inc., New York.
- Halliwell,B. (1994) Free-Radicals, Antioxidants, and Human-Disease - Curiosity, Cause, Or Consequence. *Lancet* **344**, 721-724.
- Halliwell,B. (1997) Antioxidants and human disease: A general introduction. *Nutrition Reviews* **55**, S44-S49.
- Hamaguchi,M., Watanabe,T., Higuchi,K., Tominaga,K., Fujiwara,Y., & Arakawa,T. (2001) Mechanisms and roles of neutrophil infiltration in stress-induced gastric injury in rats. *Digestive Diseases and Sciences* **46**, 2708-2715.
- Hansson,M., Olsson,I., & Nauseef,W.M. (2006) Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **445**, 214-224.

- Harborne, J.B. & Williams, C.A. (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**, 481-504.
- Havsteen, B.H. (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* **96**, 67-202.
- Hiraishi, H., Shimada, T., Ivey, K.J., & Terano, A. (1999) Role of antioxidant defenses against ethanol-induced damage in cultured rat gastric epithelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **289**, 103-109.
- Hiraishi, H., Terano, A., Ota, S., Mutoh, H., Sugimoto, T., Harada, T., Razandi, M., & Ivey, K.J. (1993) Role for Mucous Glycoprotein in Protecting Cultured Rat Gastric-Mucosal Cells Against Toxic Oxygen Metabolites. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **121**, 570-578.
- Huang, D.J., Ou, B.X., & Prior, R.L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 1841-1856.
- Hvattum, E. (2002) Determination of phenolic compounds in rose hip (*Rosa canina*) using liquid chromatography coupled to electrospray ionisation tandem mass spectrometry and diode-array detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **16**, 655-662.
- Imai, H. & Nakagawa, Y. (2003) Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine* **34**, 145-169.
- Itoh, M. & Guth, P.H. (1985) Role of oxygen-derived free radicals in hemorrhagic shock-induced gastric lesions in the rat. *Gastroenterology* **88**, 1162-1167.
- Iwai, K., Onodera, A., & Matsue, H. (2001) Antioxidant activity and inhibitory effect of Gamazumi (*Viburnum dilatatum* THUNB.) on oxidative damage induced by water immersion restraint stress in rats. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **52**, 443-451.
- Johansson, M., Synnerstad, I., & Holm, L. (2000) Acid transport through channels in the mucous layer of rat stomach. *Gastroenterology* **119**, 1297-1304.
- Johnson, F. & Giulivi, C. (2005) Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol. Aspects Med.* **26**, 340-352.
- Jones, M.K., Tomikawa, M., Mohajer, B., & Tarnawski, A.S. (1999) Gastrointestinal mucosal regeneration: role of growth factors. *Front Biosci.* **4**, D303-D309.

- Kahraman,A., Erkasap,N., Koken,T., Serteser,M., Aktepe,F., & Erkasap,S. (2003) The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. *Toxicology* **183**, 133-142.
- Karakaya,S. (2004) Bioavailability of phenolic compounds. *Crit Rev. Food Sci. Nutr.* **44**, 453-464.
- Kawano,S. & Tsuji,S. (2000) Role of mucosal blood flow: a conceptional review in gastric mucosal injury and protection. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **15 Suppl**, D1-D6.
- Kemper,A.C. & Specian,R.D. (1991) Rat small intestinal mucins: a quantitative analysis. *Anat. Rec.* **229**, 219-226.
- Kitano,M., Bernsand,M., Kishimoto,Y., Norlen,P., Hakanson,R., Haenuki,Y., Kudo,M., & Hasegawa,J. (2005) Ischemia of rat stomach mobilizes ECL cell histamine. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **288**, G1084-G1090.
- Koch,O.R., Pani,G., Borrello,S., Colavitti,R., Cravero,A., Farre,S., & Galeotti,T. (2004) Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. *Mol. Aspects Med.* **25**, 191-198.
- Konturek,P.C., Burnat,G., Brzozowski,T., Zopf,Y., & Konturek,S.J. (2008) Tryptophan Free Diet Delays Healing of Chronic Gastric Ulcers in Rat. *Journal of Physiology and Pharmacology* **59**, 53-65.
- Konturek,P.C., Duda,A., Brzozowski,T., Konturek,S.J., Kwiecien,S., Drozdowicz,D., Pajdo,R., Meixner,H., & Hahn,E.G. (2000) Activation of genes for superoxide dismutase, interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha, and intercellular adhesion molecule-1 during healing of ischemia-reperfusion-induced gastric injury. *Scand. J. Gastroenterol.* **35**, 452-463.
- Konturek,P.K., Brzozowski,T., Konturek,S.J., & Dembinski,A. (1990) Role of Epidermal Growth-Factor, Prostaglandin, and Sulfhydryls in Stress-Induced Gastric-Lesions. *Gastroenterology* **99**, 1607-1615.
- Konturek,S.J. (1985) Gastric Cytoprotection - Review. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **20**, 543-553.
- Kountouras,J., Chatzopoulos,D., & Zavos,C. (2001) Reactive oxygen metabolites and upper gastrointestinal diseases. *Hepatogastroenterology* **48**, 743-751.

- Krawisz,J.E., Sharon,P., & Stenson,W.F. (1984) Quantitative Assay for Acute Intestinal Inflammation Based on Myeloperoxidase Activity - Assessment of Inflammation in Rat and Hamster Models. *Gastroenterology* **87**, 1344-1350.
- Kumarasamy,Y., Cox,P.J., Jaspars,M., Nahar,L., & Sarker,S.D. (2004) Comparative studies on biological activities of *Prunus padus* and *P. spinosa*. *Fitoterapia* **75**, 77-80.
- Kwiecien,S., Brzozowski,T., Konturek,P.C., & Konturek,S.J. (2002) The role of reactive oxygen species in action of nitric oxide-donors on stress-induced gastric mucosal lesions. *J. Physiol Pharmacol.* **53**, 761-773.
- Kyoi,T., Kitazawa,S., Tajima,K., Zhang,X., & Ukai,Y. (2004) Phosphodiesterase type IV inhibitors prevent ischemia-reperfusion-induced gastric injury in rats. *Journal of Pharmacological Sciences* **95**, 321-328.
- La Casa,C., Villegas,I., arcon de la,L.C., Motilva,V., & Martin Calero,M.J. (2000) Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *J. Ethnopharmacol.* **71**, 45-53.
- Laine,L., Takeuchi,K., & Tarnawski,A. (2008) Gastric mucosal defense and cytoprotection: Bench to bedside. *Gastroenterology* **135**, 41-60.
- Lazar, M.; Rychly, J.; Klimo, V.; Pelikán, P.; Valko, L. (1989) *Free radicals in chemistry and biology*. CRC Press. Florida. p.283-291.
- Lee,J.H., Lee,S.J., Choi,Y.H., Chung,K.T., Jeong,Y.K., & Choi,B.T. (2006) Effects of mycelial culture of *Phellinus linteus* on ethanol-induced gastric ulcer in rats. *Phytotherapy Research* **20**, 396-402.
- Lee,J.S., Oh,T.Y., Kim,Y.K., Baik,J.H., So,S., Hahm,K.B., & Surh,Y.J. (2005) Protective effects of green tea polyphenol extracts against ethanol-induced gastric mucosal damages in rats: Stress-responsive transcription factors and MAP kinases as potential targets. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **579**, 214-224.
- Leong,R.W. (2009) Differences in Peptic Ulcer Between the East and the West. *Gastroenterology Clinics of North America* **38**, 363-379.
- Leong,R.W., Chan,F.K.L. (2004) Duodenal ulcer. In: *Encyclopedia of gastroenterology*, 1st ed. Johnson,L.R. Memphis/USA: Academic Press, pp. 645-652.

- Li,L., Ng,T.B., Gao,W., Li,W., Fu,M., Niu,S.M., Zhao,L., Chen,R.R., & Liu,F. (2005) Antioxidant activity of gallic acid from rose flowers in senescence accelerated mice. *Life Sciences* **77**, 230-240.
- Lima,Z.P., Severi,J.A., Pellizzon,C.H., Brito,A.R.M.S., Solis,P.N., Caceres,A., Giron,L.M., Vilegas,W., & Hiruma-Lima,C.A. (2006) Can the aqueous decoction of mango flowers be used as an antiulcer agent? *Journal of Ethnopharmacology* **106**, 29-37.
- Lin,L.Z. & Harnly,J.N. (2008) Phenolic compounds and chromatographic profiles of pear skins (*Pyrus spp.*). *J. Agric. Food Chem.* **56**, 9094-9101.
- Liu,A.H., Guo,H., Ye,M., Lin,Y.H., Sun,H.H., Xu,M., & Guo,D.A. (2007) Detection, characterization and identification of phenolic acids in Danshen using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1161**, 170-182.
- Loguercio,C., Taranto,D., Beneduce,F., Del Vecchio,B.C., de,V.A., Nardi,G., & Romano,M. (1993) Glutathione prevents ethanol induced gastric mucosal damage and depletion of sulfhydryl compounds in humans. *Gut* **34**, 161-165.
- Lorenzi,H., & Matos, F.J.A. (2002) *Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas*. São Paulo/SP: Instituto Plantarum.
- Luczaj,W. & Skrzydlewska,E. (2004) Antioxidant properties of black tea in alcohol intoxication. *Food Chem. Toxicol.* **42**, 2045-2051.
- Luiz-Ferreira, A. (2005) Atividade antiulcerogênica da espécie *Anacardium humile* St. Hil. (Anacardiaceae). Orientadora: Dr^a Alba Regina Monteiro Souza Brito. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Médicas, Unicamp, Campinas/SP.
- Luiz-Ferreira,A., Cola-Miranda,M., Barbastefano,V., Hiruma-Lima,C.A., Vilegas,W., & Brito,A.R.M.S. (2008) Should *Anacardium humile* St. Hil be used as an antiulcer agent? A scientific approach to the traditional knowledge. *Fitoterapia* **79**, 207-209.
- Magalhães,L.M., Segundo,M.A., Reis,S., & Lima,J.L.F.C. (2008) Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Anal. Chimica Acta* **613**, 1-19.
- Malafa,M., Margenthaler,J., Webb,B., Neitzel,L., & Christophersen,M. (2000) MnSOD expression is increased in metastatic gastric cancer. *Journal of Surgical Research* **88**, 130-134.

- Marshall,B.J. & Warren,J.R. (1984) Unidentified Curved Bacilli in the Stomach of Patients with Gastritis and Peptic-Ulceration. *Lancet* **1**, 1311-1315.
- Mccord,J.M. & Fridovich,I. (1969) The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J. Biol. Chem.* **244**, 6056-6063.
- Mccord,J.M. (1985) Oxygen-Derived Free-Radicals in Postischemic Tissue-Injury. *New England Journal of Medicine* **312**, 159-163.
- Melchiorri,D., Sewerynek,E., Reiter,R.J., Ortiz,G.G., Poeggeler,B., & Nistico,G. (1997) Suppressive effect of melatonin administration on ethanol-induced gastroduodenal injury in rats in vivo. *Br. J. Pharmacol.* **121**, 264-270.
- Menguy,R., DESBAILL,L., & Masters,Y.F. (1974) Mechanism of Stress Ulcer - Influence of Hypovolemic Shock on Energy Metabolism in Gastric-Mucosa. *Gastroenterology* **66**, 46-55.
- Mittermeier,R.A., Da Fonseca,G.A.B., Rylands,A.B., & Brandon,K. (2005) A brief history of biodiversity conservation in Brazil. *Conservation Biology* **19**, 601-607.
- Miyamoto,Y., Koh,Y.H., Park,Y.S., Fujiwara,N., Sakiyama,H., Misonou,Y., Ookawara,T., Suzuki,K., Honke,K., & Taniguchi,N. (2003) Oxidative stress caused by inactivation of glutathione peroxidase and adaptive responses. *Biological Chemistry* **384**, 567-574.
- Mizui,T. & Doteuchi,M. (1986) Lipid peroxidation: a possible role in gastric damage induced by ethanol in rats. *Life Sci.* **38**, 2163-2167.
- Mizui,T., Sato,H., Hirose,F., & Doteuchi,M. (1987) Effect of antiperoxidative drugs on gastric damage induced by ethanol in rats. *Life Sci.* **41**, 755-763.
- Mizushima,T., Tsutsumi,S., Rokutan,K., & Tsuchiya,T. (1999) Suppression of ethanol-induced apoptotic DNA fragmentation by geranylgeranylacetone in cultured guinea pig gastric mucosal cells. *Dig. Dis. Sci.* **44**, 510-514.
- Moghadasian,M.H. & Godin,D.V. (1996) Ethanol-induced gastrointestinal damage - Influence of endogenous antioxidant components and gender. *Digestive Diseases and Sciences* **41**, 791-797.
- Mojzis,J., Hegedusova,R., & Mirossay,L. (2000) Role of mucus in ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal injury in rats. *Physiological Research* **49**, 441-446.

- Molina,M.F., Sanchez-Reus,I., Iglesias,I., & Benedi,J. (2003) Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **26**, 1398-1402.
- Morimoto,Y., Shimohara,K., Oshima,S., & Sukamoto,T. (1991) Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. *Jpn. J. Pharmacol.* **57**, 495-505.
- Mota,K.S.D., Dias,G.E.N., Pinto,M.E.F., Luiz-Ferreira,A., Souza-Brito,A.R.M., Hiruma-Lima,C.A., Barbosa,J.M., & Batista,L.M. (2009) Flavonoids with Gastroprotective Activity. *Molecules* **14**, 979-1012.
- Murakami,K., Okajima,K., Uchiba,M., Harada,N., Johno,M., Okabe,H., & Takatsuki,K. (1997) Rebamipide attenuates indomethacin-induced gastric mucosal lesion formation by inhibiting activation of leukocytes in rats. *Digestive Diseases and Sciences* **42**, 319-325.
- Naito,Y. & Yoshikawa,T. (2002) Molecular and cellular mechanisms involved in Helicobacter pylori-induced inflammation and oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 323-336.
- Naito,Y., Yoshikawa,T., Matsuyama,K., Yagi,N., Arai,M., Nakamura,Y., Kaneko,T., Yoshida,N., & Kondo,M. (1998) Neutrophils, lipid peroxidation, and nitric oxide in gastric reperfusion injury in rats. *Free Radical Biology and Medicine* **24**, 494-502.
- Naito,Y., Yoshikawa,T., Matsuyama,K., Yagi,N., Kasai,K., Sugimoto,N., Masui,Y., Yoshida,N., & Kondo,M. (1999) Effect of vitamin E in gastric mucosal injury induced by ischaemia-reperfusion in nitric oxide-depleted rats. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **13**, 553-559.
- Napolitano,L. (2009) Refractory Peptic Ulcer Disease. *Gastroenterology Clinics of North America* **38**, 267-+.
- Nardini,M., Leonardi,F., Scaccini,C., & Virgili,F. (2001) Modulation of ceramide-induced NFκB binding activity and apoptotic response by caffeic acid in U937 cells: Comparison with other antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* **30**, 722-733.

- Nauseef,W.M. (2001) Contributions of myeloperoxidase to proinflammatory events: More than an antimicrobial system. *International Journal of Hematology* **74**, 125-133.
- Nazemiyeh,H., Bahadori,F., Delazar,A., Ay,M., Topcu,G., Nahar,L., Majinda,R.R.T., & Sarker,S.D. (2008) Antioxidant phenolic compounds from the leaves of *Erica arborea* (Ericaceae). *Natural Product Research* **22**, 1385-1392.
- Nieto,N., Torres,M.I., Fernandez,M.I., Giron,M.D., Rios,A., Suarez,M.D., & Gil,A. (2000) Experimental ulcerative colitis impairs antioxidant defense system in rat intestine. *Digestive Diseases and Sciences* **45**, 1820-1827.
- Nwafor,P.A. & Bassey,A.I.L. (2007) Evaluation of anti-diarrhoeal and anti-ulcerogenic potential of ethanol extract of *Carpolobia lutea* leaves in rodents. *J. Ethnopharmacology* **111**, 619-624.
- Oberley,L.W. (2005) Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **59**, 143-148.
- Olszewska,M.A. & Michel,P. (2009) Antioxidant activity of inflorescences, leaves and fruits of three Sorbus species in relation to their polyphenolic composition. *Nat. Prod. Res.* **23**, 1507-1521.
- Omisore,N.O.A., Adewunmi,C.O., Iwalewa,E.O., Ngadjui,B.T., Adenowo,T.K., Abegaz,B.M., Ojewole,J.A., & Watchueng,J. (2005) Antitrichomonal and antioxidant activities of *Dorstenia barteri* and *Dorstenia convexa*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **38**, 1087-1094.
- Ou,B.X., Hampsch-Woodill,M., & Prior,R.L. (2001) Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 4619-4626.
- Parks,D.A. & Granger,D.N. (1988) Ischemia-Reperfusion Injury - A Radical View. *Hepatology* **8**, 680-682.
- Patil,J.R., Chidambara Murthy,K.N., Jayaprakasha,G.K., Chetti,M.B., & Patil,B.S. (2009) Bioactive compounds from Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) juice induce apoptosis in human pancreatic cells. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 10933-10942.
- Piccinelli,A.L., Veneziano,A., Passi,S., *et al.* (2007) Flavonol glycosides from whole cottonseed by-product. *Food Chemistry* **100**, 1, 344-349.
- Pietta,P.G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **63**, 1035-1042.

- Pott, A. & Pott, V.J. (1994) *Plantas do Pantanal*. Brasília/ DF: Embrapa, p.29.
- Prior,R.L., Hoang,H., Gu,L.W., Wu,X.L., Bacchiocca,M., Howard,L., Hampsch-Woodill,M., Huang,D.J., Ou,B.X., & Jacob,R. (2003) Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. *J. Agr. Food Chem.* **51**, 3273-3279.
- Prior,R.L., Wu,X.L., & Schaich,K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 4290-4302.
- Puntarulo,S., Stoyanovsky,D.A., & Cederbaum,A.I. (1999) Interaction of 1-hydroxyethyl radical with antioxidant enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **372**, 355-359.
- Rao,C. & Vijayakumar,M. (2007) Protective effect of (+)-catechin against gastric mucosal injury induced by ischaemia-reperfusion in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **59**, 1103-1107.
- Repetto,M., Maria,A., Guzman,J., Giordano,O., & Llesuy,S. (2003) Protective effect of *Artemisia douglasiana* Besser extracts in gastric mucosal injury. *J. Pharm. Pharmacol.* **55**, 551-557.
- Repetto,M.G. & Llesuy,S.F. (2002) Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **35**, 523-534.
- Robak,J. & Gryglewski,R.J. (1988) Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* **37**, 837-841.
- Rukkumani,R., Aruna,K., Varma,P.S., & Menon,V.P. (2004) Influence of ferulic acid on circulatory prooxidant antioxidant status during alcohol and PUFA induced toxicity. *Journal of Physiology and Pharmacology* **55**, 551-561.
- Sachs,G. (1997) Proton pump inhibitors and acid-related diseases. *Pharmacotherapy* **17**, 22-37.
- Sakurai,T., Sugawara,H., Saito,K., & Kano,Y. (1994) Effects of the Acetylene Compound from *Atractylodes* Rhizome on Experimental Gastric-Ulcers Induced by Active Oxygen Species. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **17**, 1364-1368.
- Sanchez-Rabameda,F., Jauregui,O., Casals,I., ndres-Lacueva,C., Izquierdo-Pulido,M., & Lamuela-Raventos,R.M. (2003) Liquid chromatographic/electrospray ionization

- tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Mass Spectrometry* **38**, 35-42.
- Segal,A.W. (2005) How neutrophils kill microbes. *Annual Review of Immunology* **23**, 197-223.
- Shimamura,N., Matchett,G., Yatsushige,H., Calvert,J.W., Okuma,H., & Zhang,J. (2006) Inhibition of integrin alpha v beta 3 ameliorates focal cerebral ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Stroke* **37**, 1902-1909.
- Silva Jr.,O.C., Centurion,S., Pacheco,E.G., Brisotti,J.L., Oliveira,A.F. & Dal Sasso,K. (2002) Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico. *Acta Cir. Bras.* **17**, suppl.3, 96-100.
- Singh,L.P., Kundu,P., Ganguly,K., Mishra,A., & Swarnakar,S. (2007) Novel role of famotidine in downregulation of matrix metalloproteinase-9 during protection of ethanol-induced acute gastric ulcer. *Free Radical Biology and Medicine* **43**, 289-299.
- Smith,R.J., Sam,L.M., Justen,J.M., Leach,K.L., & Epps,D.E. (1987) Human Polymorphonuclear Neutrophil Activation with Arachidonic-Acid. *British Journal of Pharmacology* **91**, 641-649.
- Soobrattee,M.A., Neergheen,V.S., Luximon-Ramma,A., Aruoma,O.I., & Bahorun,T. (2005) Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **579**, 200-213.
- Souza-Brito,A.R.M., Cota,R.H.S., & Nunes,D.S. (1997) Gastric antiulcerogenic effects of *Dalbergia monetaria* L in rats. *Phytotherapy Research* **11**, 314-316.
- Steinbeck,M.J., Khan,A.U., & Karnovsky,M.J. (1993) Extracellular production of singlet oxygen by stimulated macrophages quantified using 9,10-diphenylanthracene and perylene in a polystyrene film. *J. Biol. Chem.* **268**, 15649-15654.
- Szabo,S., Trier,J.S., Brown,A., & Schnoor,J. (1985) Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. *Gastroenterology* **88**, 228-236.
- Szelenyi,I. & Brune,K. (1988) Possible Role of Oxygen Free-Radicals in Ethanol-Induced Gastric-Mucosal Damage in Rats. *Digestive Diseases and Sciences* **33**, 865-871.

- Tarnawski,A.S. (2005) Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. *Digestive Diseases and Sciences* **50**, S24-S33.
- Tatemichi,M., Ogura,T., Sakurazawa,N., Nagata,H., Sugita,M., & Esumi,H. (2003) Roles of inducible nitric oxide synthase in the development and healing of experimentally induced gastric ulcers. *International Journal of Experimental Pathology* **84**, 213-220.
- Tham,D.M., Whitin,J.C., & Cohen,H.J. (2002) Increased expression of extracellular glutathione peroxidase in mice with dextran sodium sulfate-induced experimental colitis. *Pediatric Research* **51**, 641-646.
- Tilly,J.L. & Hsueh,A.J. (1993) Microscale autoradiographic method for the qualitative and quantitative analysis of apoptotic DNA fragmentation. *J. Cell Physiol* **154**, 519-526.
- Tosun,M., Ercisli,S., Sengul,M., Ozer,H., Polat,T., & Ozturk,E. (2009) Antioxidant properties and total phenolic content of eight *Salvia* species from Turkey. *Biol. Res.* **42**, 175-181.
- Tourino,S., Fuguet,E., Jauregui,O., Saura-Calixto,F., Cascante,M., & Torres,J.L. (2008) High-resolution liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry combined with liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry to identify polyphenols from grape antioxidant dietary fiber. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **22**, 3489-3500.
- Tsutsumi,S., Haruna,R., Tomisato,W., Takano,T., Hoshino,T., Tsuchiya,T., & Mizushima,T. (2002) Effects of prostaglandins on spontaneous apoptosis in gastric mucosal cells. *Digestive Diseases and Sciences* **47**, 84-89.
- Ueda,S., Yoshikawa,T., Takahashi,S., Ichikawa,H., Yasuda,M., Oyamada,H., Tanigawa,T., Sugino,S., & Kondo,M. (1989) Role of Free-Radicals and Lipid-Peroxidation in Gastric-Mucosal Injury Induced by Ischemia-Reperfusion in Rats. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **24**, 55-58.
- Vacca, L.L. (1985) *Laboratory manual of histochemistry*. New York: Raven Press.
- Vasconcelos,P.C.P., Kushima,H., Andreo,M., Hiruma-Lima,C.A., Vilegas,W., Takahira,R.K., & Pellizzon,C.H. (2008) Studies of gastric mucosa regeneration and safety promoted by *Mouriri pusa* treatment in acetic acid ulcer model. *Journal of Ethnopharmacology* **115**, 293-301.

- Von Herbay,A. & Rudi,J. (2000) Role of apoptosis in gastric epithelial turnover. *Microscopy Research and Technique* **48**, 303-311.
- Vonkeman,H.E. & van de Laar,M.A. (2010) Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Adverse Effects and Their Prevention. *Semin. Arthritis Rheum.* **39**, 294-312.
- Wadhwa,S.S. & Perry,M.A. (1987) Gastric Injury Induced by Hemorrhage, Local Ischemia, and Oxygen Radical Generation. *American Journal of Physiology* **253**, G129-G133.
- Wallace,J.L. & Ma,L. (2001) Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. *Exp. Biol. Med. (Maywood.)* **226**, 1003-1015.
- Watanabe,T., Arakawa,T., Tominaga,K., Fujiwara,Y., Higuchi,K., & Kuroki,T. (2000) Neutrophil accumulation in development of gastric ulcer induced by submucosal injection of endothelin-1 in rats. *Digestive Diseases and Sciences* **45**, 880-888.
- Whittle,B.J.R., Kauffman,G.L., & Moncada,S. (1981) Vasoconstriction with Thromboxane-A₂ Induces Ulceration of the Gastric-Mucosa. *Nature* **292**, 472-474.
- Whittle,B.J.R., Lopezbelmonte,J., & Moncada,S. (1990) Regulation of Gastric-Mucosal Integrity by Endogenous Nitric-Oxide - Interactions with Prostanoids and Sensory Neuropeptides in the Rat. *British Journal of Pharmacology* **99**, 607-611.
- Winterbourn,C.C., Hawkins,R.E., Brian,M., & Carrell,R.W. (1975) The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J. Lab Clin. Med.* **85**, 337-341.
- Wojdylo,A., Oszmianski,J., & Laskowski,P. (2008) Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 6520-6530.
- Woo,E.R., Lee,J.Y., Cho,I.J., Kim,S.G., & Kang,K.W. (2005) Amentoflavone inhibits the induction of nitric oxide synthase by inhibiting NFκB activation in macrophages. *Pharmacological Research* **51**, 539-546.
- Wu,X., Beecher,G.R., Holden,J.M., Haytowitz,D.B., Gebhardt,S.E., & Prior,R.L. (2004) Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 4026-4037.
- Xu,X.Y., Xie,B.J., Pan,S.Y., Liu,L., Wang,Y.D., & Chen,C.D. (2007) Effects of sea buckthorn procyanidins on healing of acetic acid-induced lesions in the rat stomach. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* **16**, 234-238.

- Yeh,C.T. & Yen,G.C. (2006) Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance-associated protein 3 mRNA expression. *Journal of Nutrition* **136**, 11-15.
- Yoshikawa,T., Naito,Y., Kishi,A., Tomii,T., Kaneko,T., Iinuma,S., Ichikawa,H., Yasuda,M., Takahashi,S., & Kondo,M. (1993) Role of Active Oxygen, Lipid-Peroxidation, and Antioxidants in the Pathogenesis of Gastric-Mucosal Injury-Induced by Indomethacin in Rats. *Gut* **34**, 732-737.
- Yoshikawa,T., Ueda,S., Naito,Y., Takahashi,S., Oyamada,H., Morita,Y., Yoneta,T., & Kondo,M. (1989) Role of Oxygen-Derived Free-Radicals in Gastric-Mucosal Injury Induced by Ischemia Or Ischemia-Reperfusion in Rats. *Free Radical Research Communications* **7**, 285-291.
- Yuan,Y.H., Padol,I.T., & Hunt,R.H. (2006) Peptic ulcer disease today. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology* **3**, 80-89.
- Zablocka,A. & Janusz,M. (2008) The two faces of reactive oxygen species. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **62**, 118-124.
- Zhang,X., Tajima,K., Kageyama,K., & Kyoji,T. (2008) Irsogladine maleate suppresses indomethacin-induced elevation of proinflammatory cytokines and gastric injury in rats. *World J. Gastroenterol.* **14**, 4784-4790.
- Zhang,Y.M., Wei,E.Q., Hu,X., Qiao,W.L., Shi,Y., Xu,M., & Zhang,J.F. (2008) The role of nuclear factor-kappaB in the effect of angiotensin II in the paraventricular nucleus in protecting the gastric mucosa from ischemia-reperfusion injury in rats. *J. Gastroenterol.* **43**, 687-698.
- Zittel,T.T., Jehle,E.C., & Becker,H.D. (2000) Surgical management of peptic ulcer disease today - indication, technique and outcome. *Langenbecks Archives of Surgery* **385**, 84-96.

Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA – IB)



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia

CEEA-IB-UNICAMP

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP**

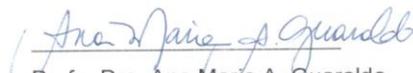
CERTIFICADO

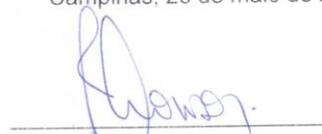
Certificamos que o Protocolo nº 1279-1, sobre "Mecanismos de ação envolvidos na atividade antiulcerogênica de *Anacardium humile* St. Hil. (*Anacardiaceae*)", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito / Ana Cristina Alves de Almeida, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 28 de maio de 2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1279-1, entitled "Mechanisms of action in antiulcerogenic activity of *Anacardium humile* St. Hil. (*Anacardiaceae*)", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on May 28, 2007.

Campinas, 28 de maio de 2007.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva