

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-ÚLCERA
GÁSTRICA E DE VIAS ENVOLVIDAS NO MODO
DE AÇÃO DA FRAÇÃO P1G10, OBTIDA DO
LÁTEX DE *Carica candamarcensis***

Ana Cândida Araújo e Silva

**Belo Horizonte
2009**

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-ÚLCERA GÁSTRICA E DE VIAS ENVOLVIDAS NO MODO DE AÇÃO DA FRAÇÃO P1G10, OBTIDA DO LÁTEX DE *Carica candamarcensis*

Ana Cândida Araújo e Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof. Dra. Miriam T. Paz Lopes

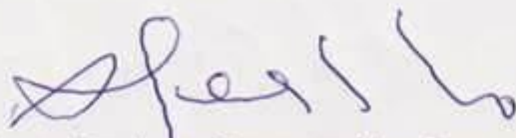
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos E. Salas Bravo

**Belo Horizonte
2009**


**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-ÚLCERA GÁSTRICA E DE VIAS
ENVOLVIDAS NO MODO DE AÇÃO DA FRAÇÃO P1G10, OBTIDA DO
LÁTEX DE *Carica candamarcensis***

ANA CÂNDIDA ARAUJO E SILVA

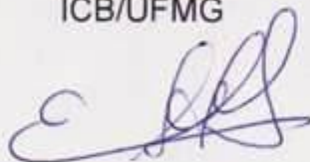
Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 16 de abril de 2009, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



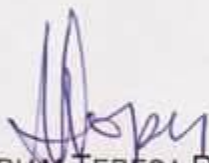
PROF. DR. LUIZ GONZAGA VAZ COELHO
FM/UFMG



PROFA. DRA. MARIA APARECIDA RIBEIRO VIEIRA
ICB/UFMG



PROF. DR. CARLOS EDMUNDO SALAS BRAVO
ICB/UFMG, CO-ORIENTADOR



PROFA. DRA. MIRIAM TERESA PAZ LOPES
ICB/UFMG, ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 16 de abril de 2009.

COLABORADOR

Prof. Dr. Giovanni Dantas Cassali, Departamento de Patologia Geral –
ICB/UFMG.

Trabalho realizado no Laboratório de Substâncias Antitumorais do Departamento de Farmacologia e no Laboratório de Biologia Molecular de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica e Imunologia. Ambos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

*“O que quer que possa fazer ou sonhe em fazer,
comece-o. Existe algo de genialidade,
de poder e de magia na coragem”
(Goethe)*

***Dedico este trabalho aos meus pais,
Antonio e Isabel, pelo amor e
confiança incondicionais.***

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar a vida e me guiar sempre nos caminhos certos.

À Profa. Dra. Miriam Teresa Paz Lopes pela orientação, profissionalismo, amizade e confiança durante esses anos.

Ao Prof. Dr. Carlos Edmundo Salas Bravo pela orientação e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali pela colaboração neste trabalho e ensinamentos em patologia.

Aos meus pais por serem meu porto seguro, nesta caminhada. Pelo apoio, amor, puxões de orelha... Por serem meus exemplos de sensibilidade, garra e fé. Obrigada por acreditarem em mim! Amo muito vocês!

Aos meus irmãos, Marisa e Toninho, que eu amo tanto, pela companhia, mesmo à distância, incentivo, apoio e amizade incondicionais!

Ao meu anjo e alma gêmea Neilor, por compartilhar este sonho comigo, pela compreensão e amor. Acredito que, com você ao meu lado tudo é possível.

À Luci e família pelo apoio e amizade, sempre presentes.

Às minhas irmãs de república, Vanessa e Rayane, pela amizade, apoio e aconchego familiar.

Aos meus primos, Rico e Dudu, pela acolhida e apoio imprescindíveis para a minha adaptação em BH.

Às queridas amigas, Lu e Ju, pelas conversas e risadas intermináveis.

Aos queridos LSATs: Cris, Cássia, Celso, Cinthia, Dalton, Heveline, Sandrinha, Luiz Felipe, Flávia, Fernanda, Rogério, Kátia e Imaculada, pela amizade, momentos de alegria e ajuda nos experimentos; e principalmente por serem meu exemplo de união e presteza. Obrigada por tudo! Sem vocês seria impossível.

À Lulu por ser a Lulu. Obrigada pela dedicação, carinho e amizade. Você é muito especial.

Aos amigos do laboratório de Patologia, Ênio, Angélica e em especial, Cristina, pela grande ajuda nas análises imunohistoquímicas e momentos de descontração.

Aos colegas do Laboratório de Produtos Naturais, Marco Túlio, Raphael, Henrique, Raquel, Natássia, Gabi, Isabela, Clarice, Andréia pela ajuda nos experimentos e alegre convivência.

Aos funcionários do CEBIO, à Celinha e, em especial, aos técnicos Jorge e Rinaldo, pela disponibilidade e boa vontade em me ajudar sempre.

Aos colegas do GIDE e em especial, ao Prof. Dr. Alan Lane de Melo, pela ajuda no tratamento dos animais e por disponibilizar a lupa para as análises.

Aos amigos da farmacologia, Luciana, Renato, Dani, Celso, Rafa, Pedro e, em especial, Paty, pela agradável convivência.

Aos amigos e parentes de Ipatinga, Governador Valadares, Belo Horizonte e Ouro preto, pelo carinho e torcida. Valeu demais, Tia Jaci!

À Capes, FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

A espécie *Carica candamarcensis* é uma planta originária da costa oeste da América do Sul, que produz como fruto um mamão, do qual o látex vem sendo caracterizado bioquímica e farmacologicamente por nosso grupo de pesquisa. A partir de separação cromatográfica em coluna de gel filtração Sephadex G10, é obtida a fração P1G10, rica em cisteíno proteases, que em estudos prévios apresentou efeito mitogênico sobre células de mamíferos, angiogênico e cicatrizante cutâneo, em modelos animais. Diante desses resultados, a lesão gástrica foi alvo de estudo, onde demonstramos as atividades protetora e cicatrizante, evidenciadas nos modelos de induções de lesões gástricas por indometacina e ácido acético, respectivamente. Como consequência, este trabalho teve como objetivo ampliar o estudo pré-clínico da atividade anti-úlceras da fração P1G10, assim como as possíveis vias envolvidas neste efeito. Em lesões agudas produzidas por etanol, estresse e ligadura pilórica, P1G10 apresentou significativa (ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls) atividade gastroprotetora, sendo a dose de melhor efeito a de 10 mg/kg, com reduções no I.L.U. de 40 % ($118,33 \pm 6,96$ $p < 0,01$), 88% ($5,67 \pm 1,04$ – $p < 0,001$) e 64% ($6,25 \pm 2,56$ – $p < 0,05$), respectivamente. Na análise dos parâmetros bioquímicos da secreção gástrica, demonstrou-se que a administração de P1G10 (0,1 a 10,0 mg/kg) promove um aumento significativo do pH do suco gástrico de 2,5 para em torno de 3,3 ($p < 0,05$) e reduz a acidez total em 50% ($p < 0,05$), assim como a atividade péptica, que foi reduzida em 56 % ($10,17 \pm 1,92$ $\mu\text{gTyr/mL/4h}$ – $p < 0,05$) e 69% ($6,99 \pm 1,31$ $\mu\text{gTyr/mL/4h}$ – $p < 0,05$), com o tratamento nas doses de 1,0 e 10,0 mg/kg, respectivamente. Os níveis de glutathiona reduzida na mucosa gástrica também foram mensurados, mostrando que P1G10, 10,0 mg/kg, promove um aumento desses níveis de 42% ($397,92 \pm 20,31$ $\mu\text{g/g}$ de tecido – $p < 0,05$). Verificamos, também, que a atividade protetora de P1G10 independe da participação de NO e de sua atividade proteolítica. Observamos que a proliferação celular e, possivelmente, a angiogênese são estimuladas pelo tratamento com a fração P1G10, como demonstrado nos ensaios de imunolocalização de PCNA ($22,62 \pm 3,89$ % – $p <$

0,05) e PECAM-1/CD31 ($5,26 \pm 0,45$ vasos/campo – $p > 0,05$), respectivamente. Entretanto não se observou diferenças significativas na proliferação celular e na angiogênese promovidas por P1G10 ($5,26 \pm 0,45$ vasos/campo; $22,62 \pm 3,89\%$ – $p < 0,05$) e P1G10 com atividade proteolítica inibida (P1G10 IAA) ($24,20 \pm 5,62\%$; $5,04 \pm 0,38$ vasos/campo – $p > 0,05$, respectivamente), mostrando que estas atividades não são dependentes da atividade proteolítica da fração. Sugere-se que a atividade proteolítica seja importante no debridamento das lesões, uma vez que mostrou ser relevante no efeito cicatrizante. Em adição, P1G10 não promoveu efeito sobre o tônus muscular do TGI, uma vez que a motilidade gastrointestinal não é alterada na sua presença. A atividade gastroprotetora acrescida da capacidade de estimular a proliferação fazem da fração P1G10 um produto com as características esperadas para um fármaco anti-úlceras ideal, quanto ao modo de ação.

Palavras-chave: *Caricaceae*, cisteíno protease, atividade anti-úlceras.

ABSTRACT

Carica candamarcensis is a plant from the West coast of South America, which produces a kind of papaya, which latex has been biochemically and pharmacologically characterized in our lab. From chromatographic separation on gel filtration column of Sephadex G10, is obtained P1G10 fraction, rich in cysteine proteases, which in previous studies showed mitogenic effect on mammalian cells, angiogenic and healing skin properties in animal models. From these results, the gastric lesion was targeted for study, which demonstrated the protective and healing activities, shown in models of induction of gastric lesions by indomethacin and acetic acid, respectively. Thus, this study aimed to extend the pre-clinical study of anti-ulcer activity of P1G10 fraction, as well as some pathways involved in this effect. In acute lesions produced by ethanol, stress and pyloric ligation, P1G10 showed significant (ANOVA, post-test student Newman Keuls) gastroprotective activity. The better dose was 10 mg / kg, with reductions in I.L.U. by 40% (118.33 ± 6.96 $p < 0.01$), 88% (5.67 ± 1.04 - $p < 0.0001$) and 64% (6.25 ± 2.56 - $p < 0.05$), respectively. In the biochemical parameters analysis of gastric secretion, P1G10 treatment (0.1 to 10.0 mg / kg) promoted a significant increase in the pH of gastric juice from 2.5 to around 3.3 ($p < 0.05$) and reduced the total acidity by 50% ($p < 0.05$). The peptic activity also was decreased, with reductions by 56% (10.17 ± 1.92 $\mu\text{gTyr/mL/4h}$ - $p < 0.05$) and 69% (6.99 ± 1.31 $\mu\text{gTyr/mL/4h}$ - $p < 0.05$), with treatment at doses of 1.0 and 10 mg / kg, respectively. The levels of reduced glutathione in gastric mucosa were also measured, showing that P1G10, 10 mg/kg, promotes an increase in the levels of 42% (397.92 ± 20.31 mg / g tissue - $p < 0.05$). We also found that the protective activity of P1G10 is independent of the participation of NO and its proteolytic activity. We observed that cell proliferation, and probably angiogenesis are stimulated by treatment with the fraction P1G10, as demonstrated in tests of immunolocalization of PCNA ($22.62 \pm 3.89\%$ - $p < 0.05$) and PECAM-1/CD31 (5.26 ± 0.45 vessels/field - $p > 0.05$), respectively. However, there was no significant difference in cell proliferation and angiogenesis promoted by P1G10 ($22.62 \pm 3.89\%$ - $p < 0.05$; 5.26 ± 0.45

vessels/field) and P1G10 with proteolytic activity inhibited (P1G10 IAA) ($24.20 \pm 5.62\%$, 5.04 ± 0.38 vessels/field – $p > 0.05$, respectively), showing that these activities are not dependent on proteolytic activity of the fraction. It is suggested that the proteolytic activity is important in the debridement of the lesions, since shown to be relevant in the healing effect. In addition, P1G10 not promoted effect on muscle tone of TGI, as the gastrointestinal motility is not altered in its presence. The gastroprotective activity plus the ability to stimulate the proliferation fraction P1G10 make a product with the characteristics expected for an anti-ulcer drug ideal, as to the mode of action.

Keywords: *Caricaceae*, cystein protease, antiulcer activity.

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1	<i>Carica candamarcensis</i> .	5
Figura 2	Regulação neuro-endócrina-parácrina da secreção gástrica de ácido.	13
Figura 3	Perfil cromatográfico da solução de látex após filtração em coluna "Sephadex G10".	54
Figura 4	Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em condições desnaturantes de diferentes estoques de P1G10.	55
Figura 5	Inibição da atividade proteolítica de P1G10 com IAA.	56
Figura 6	Avaliação da atividade gastroprotetora da fração P1G10 em modelo de úlcera induzida por etanol	58
Figura 7	Avaliação da atividade gastroprotetora da fração P1G10 em modelo de úlcera induzida por estresse (imobilização e frio).	60
Figura 8	Avaliação da atividade gastroprotetora da fração P1G10 em modelo de úlcera induzida por ligadura pilórica.	62
Tabela 1	Efeito da administração oral de P1G10 e omeprazol nos parâmetros bioquímicos da secreção gástrica de ratas submetidas à ligadura pilórica.	64
Figura 9	Determinação da atividade péptica no suco gástrico de ratas submetidas à ligadura pilórica e tratadas com P1G10.	65
Tabela 2	Avaliação da participação de NO no efeito gastroprotetor de P1G10.	66
Figura 10	Dosagem de glutathiona reduzida na mucosa gástrica de ratas tratadas com P1G10.	67
Figura 11	Efeito de P1G10 sobre o esvaziamento gástrico de semi-sólidos de camundongos	68
Figura 12	Efeito de P1G10 sobre o trânsito intestinal de semi-sólidos de camundongos	69
Figura 13	Avaliação da importância da atividade proteolítica no efeito gastroprotetor de P1G10.	70
Figura 14	Avaliação da importância da atividade proteolítica no efeito cicatrizante gástrico de P1G10.	71
Figura 15	Variação de peso de ratas submetidas à indução de úlceras por ácido acético e tratadas com P1G10 e P1G10 IAA	72

Tabela 3	Área das lesões gástricas induzidas por ácido acético em ratas tratadas com P1G10, P1G10 IAA e Tripsina.	74
Figura 16.1	Fotomicrografias de cortes histológicos de estômago de ratas Wistar com úlcera induzida por ácido acético e tratadas com P1G10 e P1G10 IAA, corados com hematoxilina e eosina (HE) (Aumento de 100X).	75
Figura 16.2	Fotomicrografias de cortes histológicos de estômago de ratas Wistar com úlcera induzida por ácido acético e tratadas com P1G10 e P1G10 IAA, corados com hematoxilina e eosina (HE) (Aumento de 200X).	76
Figura 17	Fotomicrografias de cortes histológicos de estômago de ratas Wistar com úlcera induzida por ácido acético e tratadas com P1G10 e P1G10 IAA, submetidos à imunolocalização de <i>Proliferation cell nuclear antigen</i> (PCNA).	78
Figura 18	Análise quantitativa da proliferação celular na mucosa gástrica de ratas tratadas com P1G10 e P1G10 IAA.	79
Figura 19	Fotomicrografias de cortes histológicos de estômago de ratas Wistar com úlcera induzida por ácido acético e tratadas com P1G10 e P1G10 IAA, submetidos à imunolocalização de PECAM-1/CD31.	80
Figura 20	Análise quantitativa da angiogênese na mucosa gástrica de ratas tratadas com P1G10 e P1G10 IAA.	81

Lista de abreviaturas mais utilizadas

ach = Acetilcolina

AINEs = Antiinflamatórios não-esteroidais

AMPc = Adenosina 3',5'monofosfato cíclico

ANOVA = Análise de variância

ATP = Adenosina 5-trifosfato

bFGF = Fator de crescimento básico de fibroblastos

CCK2 = Receptor de colecistocinina do tipo 2

CEBIO = Centro de Bioterismo

Célula D = Célula secretora de somatostatina

Célula G = Célula secretora de gastrina

COX = Cicloxigenase

COX-1 = Ciclooxygenase do tipo 1

COX-2 = Ciclooxygenase do tipo 2

DTNB = 5,5'-ditiobis 2-ácido nitrobenzóico

DTT = Ditioneitol

e.p.m. = Erro padrão da média

ECL = Células enterocromafins like

EDTA = ácido etilenodiaminotetracético

EGF = Fator de crescimento epidermal

EROs = Espécies reativas de oxigênio

FGF = Fator de crescimento do fibroblasto

GSH = Glutathione na forma reduzida

H⁺ = Íon hidrogênio

H⁺/K⁺-ATPase = H⁺/K⁺-adenosina trifosfatase (bomba de prótons)

H₂ = Receptor de histamina do tipo 2

H₃ = Receptor de histamina do tipo 3

H₂O₂ = Peróxido de hidrogênio

HE = Corante hematoxilina/eosina

HGF = Fator de crescimento do hepatócito

I.L.U = Índice de Lesão Ulcerativa

i.p. = Administração intraperitonal

IAA = Iodoacetamida
ICB = Instituto de Ciências Biológicas
IL-1 β = Interleucina 1 β
IL-6 = Interleucina 6
L-NAME = éster metílico da L γ -nitro-L-arginina
M1 = Receptor muscarínico do tipo 1
M3 = Receptor muscarínico do tipo 3
NO = Óxido nítrico
NOS = óxido nítrico sintase
p.o. = administração *per oros*
PARs = Receptores ativados por proteases
PCNA = Antígeno nuclear de proliferação celular
PDGF = Fator de crescimento derivado de plaquetas
PECAM-CD31 = Molécula de adesão plaqueta-célula endotelial
PGE₁ = Prostaglandina do tipo E₁
PGE₂ = Prostaglandina do tipo E₂
PKC = Proteína quinase C
s.c. = Administração subcutânea
SHs = Grupos sulfidríla
SNC = Sistema nervoso central
SNE = Sistema nervoso entérico
SST2 = Receptor de somatostatina do tipo 2
TCA = Ácido tricloroacético
TNF α = Fator de necrose tumoral α
UFMG = Universidade Federal de Minas Gerais
VCAM = Molécula de adesão celular vascular
VEGF = Fator de crescimento endotelial vascular
VLA-4 = *Very late antigen 4*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O látex de Caricaceae: composição e funções fisiológicas na planta	2
1.2. <i>Carica candamarcensis</i>	4
1.3. Aspectos anatômicos e fisiológicos do estômago	9
1.4. Úlcera péptica	18
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	29
3.1. Objetivo geral	29
3.2. Objetivos específicos	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1. Material	30
4.1.1. Reagentes e solventes	30
4.1.2. Soluções	31
4.1.3. Biológicos	35
4.1.4. Equipamentos	35
4.1.5. Diversos	36
4.1.6. Kits e anticorpos	38
4.2. Métodos	38
4.2.1. Obtenção e caracterização da fração P1G10	38
4.2.1.1. Determinação da atividade amidásica	39
4.2.1.2. Estimativa da concentração de proteína	39
4.2.1.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante	40
4.2.1.4. Coloração do gel por coomassie	41
4.2.1.5. Determinação da massa molecular	41
4.2.2. Inibição da atividade proteolítica de P1G10 com iodoacetamida (IAA)	41
4.2.3. Avaliação das atividades farmacológicas	42
4.2.3.1. Atividade gastroprotetora	42

4.2.3.1.1. Lesões gástricas agudas induzidas por etanol	43
4.2.3.1.2. Lesões gástricas agudas induzidas por estresse – imobilização e hipotermia	43
4.2.3.1.3. Lesões gástricas agudas induzidas por ligadura pilórica	43
4.2.3.2. Estudo de vias envolvidas no efeito gastroprotetor de P1G10	44
4.2.3.2.1. Análise de parâmetros bioquímicos do conteúdo gástrico de ratos submetidos à ligadura pilórica	44
A. Medida do volume, pH e acidez da secreção gástrica	44
B. Determinação da atividade péptica	45
4.2.3.2.2. Avaliação da participação do NO no efeito gastroprotetor	45
4.2.3.2.3. Quantificação da glutathiona reduzida (GSH) gástrica	46
4.2.3.3. Avaliação do efeito de P1G10 sobre a motilidade gastrointestinal	46
4.2.3.3.1. Esvaziamento gástrico de semi-sólidos	47
4.2.3.3.2. Trânsito intestinal	47
4.2.3.4. Avaliação da importância da atividade proteolítica de P1G10 em seu efeito anti-úlceras	48
4.2.3.4.1. Gastroproteção – lesões gástricas agudas induzidas por indometacina	48
4.2.3.4.2. Cicatrização gástrica – lesões gástricas crônicas induzidas por ácido acético	48
4.2.3.5. Estudo de eventos envolvidos na atividade cicatrizante gástrica	49
4.2.3.5.1. Análise histológica	49
4.2.3.5.2. Análises imunohistoquímica e morfométrica da proliferação celular e angiogênese	49
4.2.3.6. Avaliação das lesões gástricas	50
4.2.4. Análise Estatística	51
5. RESULTADOS	52
5.1. Obtenção e caracterização da fração P1G10	52
5.2. Inibição da atividade proteolítica de P1G10 com iodoacetamida (IAA)	54
5.3. Avaliação da atividade gastroprotetora de P1G10	55
5.3.1. Avaliação do efeito de P1G10 sobre lesões promovidas por etanol	55
5.3.2. Avaliação do efeito de P1G10 sobre lesões promovidas por estresse	57
5.3.3. Avaliação do efeito de P1G10 sobre lesões promovidas pela ligadura pilórica	69
5.4. Estudo de vias envolvidas no efeito gastroprotetor de P1G10	61

5.4.1. Análise de parâmetros bioquímicos do conteúdo gástrico de ratas tratadas com P1G10	61
5.4.1.1. Medida do volume, pH e acidez total da secreção ácida	61
5.4.1.2. Determinação da atividade péptica	61
5.4.2. Avaliação da participação de NO no efeito gastroprotetor	63
5.4.3. Quantificação da glutathiona reduzida (GSH) gástrica	63
5.5. Avaliação do efeito de P1G10 sobre a motilidade gastrointestinal	65
5.5.1. Esvaziamento gástrico de semi-sólidos	65
5.5.2. Trânsito intestinal	66
5.6. Avaliação da importância da atividade proteolítica de P1G10 em seu efeito anti-úlceras	67
5.6.1. Gastroproteção	67
5.6.2. Cicatrização gástrica	68
5.6.2.1. Variação de massa corporal	69
5.7. Estudo de eventos envolvidos na atividade cicatrizante gástrica de P1G10	70
5.7.1. Análise macroscópica	70
5.7.2. Análise histológica	71
5.7.3. Avaliação imunohistoquímica e morfométrica	74
5.7.3.1. Proliferação celular	74
5.7.3.2. Angiogênese	76
6. DISCUSSÃO	79
7. CONCLUSÃO	95
8. REFERÊNCIAS	96
9. APÊNDICE	115
ANEXOS	118

1. INTRODUÇÃO

As plantas têm sido de grande relevância na área farmacêutica, tendo em vista a utilização das substâncias ativas isoladas como protótipos para a obtenção de fármacos ou de adjuvantes, ou ainda, de medicamentos elaborados exclusivamente à base de plantas: os fitoterápicos (SCHENKEL et al. 2001). Os exemplos de medicamentos que foram desenvolvidos, direta ou indiretamente, de plantas, são inúmeros, incluindo dentre outros a morfina, a pilocarpina, os digitálicos, os curares, a quinina, a artemisina, a atropina, escopolamina e o cromolin. Além disso, cerca de 60% a 75% dos medicamentos para tratamento do câncer e de doenças infecciosas que estão disponíveis no mercado ou em fase clínica de desenvolvimento, são derivados de produtos naturais (NEWMAN et al., 2003; BOLDI, 2004).

Nos últimos anos, se observa um interesse crescente da população e classe médica, nas terapias alternativas e no uso terapêutico de produtos naturais, especialmente os derivados de plantas. Interesse este devido a várias razões, como: ineficácia da terapia convencional, efeitos colaterais e outros problemas e a falta de acesso ao tratamento farmacológico convencional por grande parte da população (RATES, 2001). Aliado a isto, em contraste aos muitos milhões de dólares e vários anos de pesquisa necessários para o desenvolvimento de novos fármacos sintéticos, ou até mesmo de um protótipo de fonte natural, o desenvolvimento de fitoterápicos padronizados demanda consideravelmente menos dinheiro e mostra ser perfeitamente possível em países em desenvolvimento (CALIXTO, 2000).

Assim, reconhecendo a importância da pesquisa dos potenciais terapêuticos das plantas medicinais, nosso grupo de pesquisa vem caracterizando bioquímica e farmacologicamente frações obtidas do látex da espécie *Carica candamarcensis*, planta nativa da região andina, nos Laboratórios de Substâncias Antitumorais do Departamento de Farmacologia e de Biologia Molecular de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica e Imunologia, ambos do ICB, UFMG.

1.1. O látex de *Caricaceae*: composição e funções fisiológicas na planta

As plantas são capazes de produzir e estocar uma variedade de substâncias fluidas, de composição variada, incluindo látex, resinas e mucilagens (FARREL et al., 1991). Existem aproximadamente 12.500 espécies produtoras de látex e, algumas possuem grande importância econômica (KETWICK, 2001). Dentre essas, se destaca a *Carica papaya*, pertencente à família *Caricaceae*, de cujo látex é produzida a papaína, a protease com maior emprego industrial. Essa protease é utilizada em diversos processos, como amaciante de carne, no curtimento de couros, clarificação de cervejas e solubilização de proteínas insolúveis (CASTRO, 1981; POULTER et al., 1985). A papaína é utilizada clinicamente como adjuvante digestivo nas deficiências da digestão de proteínas e nas dispepsias por putrefação de alimentos no aparelho digestivo (BAKER et al., 2007). Também é usada como substância antiulcerosa estimulando o processo de cicatrização no tratamento de feridas cutâneas e como agente antihelmíntico (CHEN et al., 1981; STEPEK et al., 2005). Uma mistura comercial de papaína com uréia tem sido amplamente empregada no processo de debridamento enzimático de feridas (AYELLO & CUDDIGAN, 2004). A atividade antitumoral da papaína também foi observada. Em um estudo com camundongos observou-se que um grupo de proteases, do qual fazia parte a papaína, foi capaz de reduzir a disseminação de metástases de carcinoma de pulmão (WALD et al., 1998). BEUTH et al. (2001) mostraram que o tratamento oral com uma mistura enzimática contendo papaína, melhorou a qualidade de vida de pacientes submetidos à cirurgia de remoção de câncer de mama, por reduzir sinais/sintomas da doença e os efeitos colaterais da quimioterapia. Além disso, diminuiu a recorrência do tumor, o aparecimento de metástase e aumentou o tempo de sobrevida.

O látex das plantas da família *Caricaceae* apresenta uma coloração de branco à transparente com consistência pegajosa e é sintetizado e armazenado por células especiais denominadas laticíferas. Estas células apresentam núcleo e organelas localizados periféricamente devido ao acúmulo do látex em seu citoplasma (KETWICK, 2001). No momento de uma injúria,

ocorre o rompimento das mesmas, extravasando o conteúdo de seu citoplasma em tubos ou canais laticíferos, que são os vasos nos quais passa o látex antes de ser extrusado da planta. Esses canais são encontrados praticamente em toda a planta, exceto na raiz (MOUSSAOUI et al., 2001). No fruto, onde o látex da planta é coletado, os canais laticíferos são numerosos e concentram-se nas camadas mais externas do endocarpo, principalmente em frutos mais verdes (LEON, 1987).

Dentre os componentes identificados no látex de *Caricaceae*, se destacam as quitinases, inibidores de serino proteases e cisteíno proteases. Acredita-se que estes componentes estejam relacionados com determinadas funções fisiológicas no vegetal, como na defesa contra patógenos. A presença de quitinases no látex de *Caricaceae* funcionaria como defesa contra fungos e os inibidores de serino proteases, protegeriam a planta contra herbívoros. A inibição das enzimas digestivas desses predadores causaria uma disfunção e diminuiria a chance de um ataque recorrente dos mesmos (AZARKAN et al., 2004). Além desses mecanismos, também foi demonstrado que as cisteíno proteases presentes no látex de *Carica papaya* são tóxicas para larvas de insetos herbívoros. Larvas de lepidópteros acusaram os efeitos tóxicos das proteases, os quais eram abolidos após tratamento das enzimas com inibidores da atividade proteolítica. Estes experimentos demonstraram que a atividade enzimática é essencial para o efeito tóxico (HIRAYAMA et al., 2004).

A hipótese do envolvimento do látex em mecanismos de defesa da planta é corroborada por outro dado importante. Após injúrias consecutivas no fruto imaturo de *Carica papaya*, a composição bioquímica do látex sofre modificações. A papaína presente nesse passa a ser liberada com uma maior atividade proteolítica, provavelmente para aumentar a defesa contra larvas de insetos. Em adição uma proteína inibidora de tripsina, uma quitinase classe II e uma enzima denominada glutaminil ciclase têm sua concentração aumentada (AZARKAN et al., 2004). Esta última promove a ciclização da glutamina presente em cadeias polipeptídicas liberando como subproduto a amônia, uma substância volátil que possui efeitos inibitórios sobre alguns microorganismos (BAÑUELOS et al., 2000).

Outro papel fisiológico proposto para as enzimas proteolíticas do látex de *Caricaceae* está relacionado com o mecanismo de coagulação do látex após um processo de injúria. Foi descrito haver modificações na composição de peptídeos presentes no látex de *Carica papaya* quando este é coletado em intervalos de tempos diversos após a incisão do fruto imaturo do vegetal. Os dados mostraram que durante a coagulação do látex, vários peptídeos são processados de uma maneira ordenada (SILVA et al., 1997). A ativação e processamento de proteases em seqüência, bem como, a formação de coágulo no local da ferida sugerem um mecanismo de defesa similar ao encontrado em tecidos animais (MOUTIM et al., 1999).

1.2. *Carica candamarcensis*

A espécie *C. candamarcensis* (*Vasconcellea cundinamarcensis*) trata-se de uma planta nativa da América do Sul, localizada principalmente na região Andina, a qual se estende do Panamá até o Chile, sendo encontrada predominantemente em altitudes superiores a 1000 metros. É popularmente conhecida como “mountain papaya” ou “mamão da montanha” e alguns sinônimos científicos também podem ser encontrados, como *Carica pubescens*, *Carica cundinamarcensis*, *Carica chiriquensis* e *Vasconcellea cestriflora* (WALRAEVENS et al., 1999).

Na Figura 1 estão mostradas algumas partes da planta, que se caracteriza por apresentar um tronco grosso geralmente ramificado (Figura 1A), medindo até 10 m de altura e contém uma coroa compacta de folhas na sua parte terminal ou nas extremidades das ramificações. O fruto é elipsóide, de coloração amarelada quando madura (Figura 1B), com cinco depressões largas e longitudinais (Figura 1C), mede de 5 a 15 cm de comprimento, sendo sua polpa delgada, aquosa, aromática e comestível somente após o cozimento (LEON, 1987).



Figura 1: *Carica candamarcensis*. A – Inflorescências; B – Fruto maduro; C – Frutos imaturos. Fontes: Ecocrop e Flickr.

Caracterização bioquímica e atividade biológica do látex de *C. candamarcensis*

O látex extraído de *C. candamarcensis* é rico em carboidratos, vitaminas, sais minerais e peptídeos de baixo peso molecular, além de cisteíno proteases de alta atividade proteolítica, algumas das quais estão ausentes no látex de *C. papaya* (BAEZA et al., 1990; BRAVO et al., 1994).

A partir de observações quanto aos mecanismos envolvidos na regeneração do tecido vegetal de plantas da família Caricaceae, onde a ativação e processamento de proteases ocorrem em seqüência, de maneira bem similar ao processo da coagulação sanguínea e cicatrização em animais, vimos a possibilidade de o látex apresentar atividade semelhante a um fator de crescimento em sistemas animais. Assim, foram propostos a caracterização bioquímica e o estudo da atividade mitogênica de frações e proteases purificadas do látex de *C. candamarcensis*.

Através de separação cromatográfica em coluna Sephadex G10, são obtidos 2 picos bem definidos, denominados P1G10 e P2G10, sendo o primeiro rico em cisteíno proteases. Algumas destas enzimas apresentam características diferentes das descritas para a papaína, tais como: pH ótimo,

ponto isoelétrico, atividade catalítica e reatividade imunológica (GRAVINA et al., 1994; BRAVO et al., 1994; SILVA et al., 2003).

A fração P1G10 foi submetida a duas etapas de purificação cromatográfica em colunas CM-Sephadex e Mono S. Dessa última cromatografia, dentre cinco, resultaram duas proteases com atividade mitogênica (CMS2MS2 e CMS2MS3) em fibroblastos. Essas proteases foram capazes de estimular a via das MAP quinases, determinado pelo aumento da expressão de ERK-2 (GOMES et al., 2005). Não obstante, a inibição da atividade proteolítica das amostras não teve efeito sobre o estímulo mitogênico e ativação de ERK-2 (GOMES, 2008).

A importância das cisteíno proteases em vegetais e animais está relatada no Apêndice.

Propriedades farmacológicas do látex de *C. candamarcensis*

A partir do conhecimento do uso da papaína como agente debridante na cicatrização das lesões, percebemos que as proteases que compõem a fração P1G10 poderiam apresentar tal ação, uma vez que possuem alta atividade proteolítica. Além disso, a ação mitogênica de proteases isoladas da fração, verificada *in vitro* demonstrou que a mesma poderia estimular a cicatrização através de mais de um mecanismo. Assim, foi proposta a avaliação para uma possível atividade cicatrizante cutânea da fração P1G10.

Atividade cicatrizante e toxicidade tópica

A fração P1G10 incorporada em creme Polawax[®] apresentou efeito cicatrizante sobre escoriações promovidas em camundongos Hairless com aumento da taxa de cicatrização de até 600% em comparação aos animais controles, sendo também mais eficaz que a papaína em creme Polawax[®], a qual promoveu uma melhora de 66% na taxa de cicatrização (MELLO et al., 2006).

A neoformação vascular (angiogênese), etapa imprescindível da cicatrização, foi avaliada para a fração P1G10. Neste intuito, implantes de polietileno previamente afixados na região subcutânea dorsal de camundongos Swiss receberam soluções de P1G10 nas concentrações de 0,1 e 1%, durante 8 dias. O conteúdo de hemoglobina presente nos implantes foi determinado e verificou-se que P1G10 a 0,1% promoveu um aumento de 57% na concentração de hemoglobina em relação ao controle. Por outro lado, a concentração de 1% provocou uma redução de 35%, o que pode ser explicado pela sobreposição da atividade proteolítica em relação à atividade mitogênica (MELLO et al., 2008).

Em estudos recentes do nosso grupo, foi evidenciado o efeito cicatrizante de P1G10 em queimaduras. Camundongos Hairless foram submetidos à indução de lesões por escaldadura da pele e tratados com concentrações da fração, incorporada em Polawax[®], variando entre 0,01 e 1%. Os resultados demonstraram que animais tratados com a fração nas doses de 0,01 e 0,1% tiveram a cicatrização das queimaduras aceleradas, com período de retração da lesão, significativamente menor quando comparado ao controle. A análise microscópica mostrou que o infiltrado inflamatório foi mais discreto e até mesmo ausente nos animais tratados com P1G10 0,1% (GOMES et al., 2009, in press).

Em estudos de toxicidade tópica, verificou-se que exposição repetida à fração protéica P1G10 (0,1 e 1%) em pele íntegra e escarificada de camundongos Hairless não promoveu qualquer alteração que pudesse ser caracterizada como efeito tóxico (irritação e corrosão). Já a concentração de P1G10 a 10% apresentou um potencial irritante moderado (índice 2). No entanto, a irritação revelada pela exposição a essa concentração foi reversível após 5 dias da última aplicação (MELLO et al., 2006).

Na avaliação da toxicidade tópica sub-crônica/crônica, a fração foi administrada durante três e seis meses, na concentração de 0,1% (maior efeito cicatrizante) em camundongos Swiss, previamente depilados. Os resultados da análise histopatológica e da variação de peso dos órgãos selecionados demonstraram que não houve diferenças entre o grupo controle (Polawax[®]) e o

tratado com P1G10, indicando uma ausência de toxicidade no modelo estudado (LEMOS et al., 2006).

Atividade anti-úlcerica e toxicidade sistêmica

A partir dos resultados obtidos sobre a cicatrização cutânea, a fração P1G10 foi submetida à avaliação da atividade cicatrizante gástrica – através do modelo de indução de úlcera crônica com ácido acético – e também protetora gástrica – através dos modelos de indução de lesões agudas por indometacina ou etanol.

No modelo de indução de úlcera crônica, a administração oral de P1G10 na dose de 10 mg/kg, estimulou a cicatrização das lesões induzidas, de maneira similar ao grupo tratado com omeprazol 10 mg/kg (63%) e superior ao apresentado pela ranitidina 100 mg/kg (52%). Já nas lesões induzidas por indometacina, P1G10 (*p.o.*) nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg reduziu significativamente o número e a intensidade das lesões, de maneira dose dependente, atingindo em sua maior dose um efeito similar aos dos medicamentos controle. Em lesões produzidas por etanol 70%, P1G10 quando aplicada 30 min antes da exposição do agente, não foi eficaz em proteger o estômago (MELLO, et al., 2008).

Estudos toxicológicos sistêmicos demonstraram que as atividades de enzimas do citocromo P450, o consumo alimentar, o ganho de peso corporal, o peso do fígado e os valores de proteínas totais microssomais não foram alterados pela administração oral de P1G10 em doses até 30 vezes maiores (334 mg/kg/dia durante 6 dias consecutivos, totalizando nesse período, 2 g/kg, *p.o.*) com relação às utilizadas na avaliação da atividade antiúlcerica (10 mg/kg) (VILLALBA et al., 2007).

A avaliação da atividade mutagênica foi realizada pelo teste de Ames (MARON & AMES, 1983) e dos Micronúcleos. O primeiro foi realizado com um painel de cepas de *Salmonella typhimurium* (TA 97, 98, 100 e 102), na presença e ausência de extrato S9 (extrato hepático de ratos tratados com fenobarbital). Os resultados mostraram que P1G10 não apresenta efeito

mutagênico nas concentrações estudadas, uma vez que o número de colônias que sofreram reversão pelo tratamento com a fração nas concentrações de 0,1 e 1% p/v foi semelhante ao número de reversões espontâneas (controle negativo) e 10 vezes menores que o obtido após a exposição à azida sódica (controle positivo) (VILLALBA et al., 2007). No teste de Micronúcleos, P1G10 foi administrada via *i.p.* a camundongos Swiss, nas doses de 5 e 10 mg/kg. A avaliação de células de medula óssea destes animais, após 36 h da administração, mostrou que P1G10 não provocou micronucleação significativamente maior que o controle, sugerindo ausência de genotoxicidade da fração (VILLALBA et al., 2008).

Diante desses resultados, reconhecemos ser necessário o estudo mais detalhado dos efeitos cicatrizante e protetor gástricos promovidos pela fração P1G10, bem como, das possíveis vias envolvidas nos mesmos. Para isso, conhecimentos teóricos sobre fisiologia estomacal e os mecanismos de gênese e cicatrização de úlceras gástricas são fundamentais. A seguir, serão feitas considerações nesse sentido.

1.3. Aspectos anatômicos e fisiológicos do estômago

De acordo com KUTCHAI (1996), o estômago pode ser anatomicamente e funcionalmente dividido em quatro regiões revestidas por mucosa: cárdia, fundo, corpo e antro. Funcionalmente, a mucosa gástrica pode ser dividida em duas regiões glandulares: a mucosa oxíntica e a mucosa antral. A mucosa oxíntica é mais extensa, ocupando o corpo e o fundo, e é o sítio da secreção de ácido clorídrico. A mucosa oxíntica é formada por glândulas oxínticas, que são constituídas por células parietais, secretoras de ácido clorídrico; células principais, secretoras de pepsinogênio; células D, produtoras de somatostatina e células enterocromafins “like” (ECL), secretoras de histamina. Na superfície glandular, predominam as células produtoras de muco, que protegem a mucosa gástrica da ação corrosiva das secreções originadas pela glândula (LUCEY & YAMADA, 1989; CHUANG et al., 1991). As glândulas da mucosa

antral apresentam os mesmos tipos celulares que as glândulas oxínticas, exceto as células parietais (HOGBEN et al., 1974).

A inervação do estômago compreende fibras extrínsecas e intrínsecas. A inervação intrínseca é constituída por dois plexos principais, o plexo mioentérico que inerva as camadas musculares e regula a função motora, e o plexo submucoso que inerva a mucosa e regula a absorção e as secreções gastrointestinais (SCHUBERT & SHAMBUK, 1990). Neurônios de ambos os plexos recebem aferências do sistema nervoso central (SNC) através de fibras do sistema nervoso parassimpático e simpático (inervação extrínseca) e de outros neurônios entéricos, incluindo neurônios sensoriais e interneurônios. Estes circuitos neuronais permitem regular a função motora e secretora do tubo digestivo (COSTA, 1994). A inervação simpática do trato gastrointestinal é realizada, principalmente, por fibras pós-ganglionares que inervam diretamente os vasos sanguíneos e o músculo liso, inibindo a motilidade e a atividade secretora do sistema gastrointestinal, porém estimula a contração da camada muscular da mucosa e de alguns esfíncteres. Em geral, as fibras do parassimpático terminam nos gânglios do plexo mioentérico. As fibras aferentes do vago inervam diretamente a célula parietal e realizam sinapses com as células ganglionares do sistema nervoso entérico (SNE), estimulando a atividade motora e secretora do TGI (LONGHURST et al., 1984-a; LONGHURST et al., 1984-b).

Secreção ácida: papel e regulação

Uma das mais importantes funções do estômago é a produção de ácido hidrocloreídrico, que facilita a digestão de proteínas pela pepsina, a absorção de ferro, cálcio, vitamina B12, e previne o crescimento bacteriano e a infecção entérica. Entretanto, quando os níveis de ácido e pepsina sobrepõem os mecanismos de defesa da mucosa, há a formação de úlceras. Para prevenir estas lesões, a secreção ácida gástrica precisa ser precisamente regulada. A regulação envolve vias aferentes e eferentes do sistema nervoso central e

entérico, assim como a atuação de células neuroendócrinas e imunes pelas vias autócrina, parácrina e hormonal (SCHUBERT, 2008).

A secreção ácida gástrica é controlada por mecanismos complexos e interativos que atuam no SNC e também nos âmbitos periférico e celular. No SNC, algumas regiões como o núcleo motor dorsal do nervo vago, o hipotálamo e o núcleo do trato solitário, são responsáveis por este processo. As fibras eferentes originadas no núcleo motor dorsal do nervo vago descem até o estômago e realizam sinapses com as células ganglionares do SNC. Assim, o vago modula a atividade do sistema nervoso entérico, sendo a acetilcolina o seu principal neurotransmissor. Este sistema é considerado como o principal contribuinte para o início da secreção ácida, desencadeado pela denominada fase cefálica, que ocorre em resposta a estímulos visuais, olfatórios e gustativos, relacionados à antecipação e ao contato propriamente dito com os alimentos (HOOGERWEFF & PASRISHA, 2003).

Os principais agentes estimulantes periféricos da secreção ácida gástrica são a histamina, a gastrina e a acetilcolina (ach). Os dois primeiros funcionam como agentes parácrinos e endócrinos e o último, como neurotransmissor. O principal agente inibidor corresponde à somatostatina (LEHMANN et al., 2003). As ações dos estimulantes e inibidores da secreção ácida, descritas abaixo, são sumarizadas na Figura 2.

Dentre os estimulantes da secreção ácida, a histamina é considerada como o principal secretagogo. É estocada nas células ECL, na vizinhança das células parietais, e promove uma estimulação direta da célula parietal por meio da interação com receptores do tipo H_2 , que utilizam o AMP cíclico (AMPC) como segundo mensageiro intracelular e indiretamente, por meio do receptor do tipo H_3 , presente nas células D, cuja ativação, promove inibição da secreção de somatostatina (SCHUBERT, 2000).

Já a gastrina é liberada na corrente circulatória pelas células G, presentes no antro gástrico, a partir de estímulos fisiológicos relacionados à ingestão de alimentos. Pode também estimular a secreção ácida por agir diretamente na célula parietal e, ainda, por estimular a liberação de histamina das células ECL. Esta última ação é decorrente da ação da gastrina, através de

receptores do tipo CCK2, na estimulação da enzima histidina decarboxilase, responsável pela síntese de histamina e, também, pelo aumento do mRNA para a síntese desta enzima (SCHUBERT, 2000).

Por sua vez, a Ach é liberada via estimulação vagal e age em receptores muscarínicos M_3 , presentes nas células parietais, estimulando diretamente a secreção ácida. Este neurotransmissor atua também sobre receptores do tipo M_1 localizados nas células ECL, promovendo a secreção de histamina e estimulando de forma indireta, a secreção ácida. Há evidências de que a acetilcolina também inibe a secreção de somatostatina, um dos principais agentes inibitórios da secreção ácida gástrica (BAROCELLI & BALLABENI, 2003; LEHMANN et al., 2003).

Além da gastrina, outros peptídeos podem influenciar a secreção ácida gástrica. A somatostatina e a galanina possuem ação inibitória, agindo, sobretudo, sobre as células ECL, inibindo a liberação de histamina e assim, a secreção ácida. A somatostatina, também, atua de forma direta sobre a célula parietal, sendo suas ações mediadas por receptores do tipo SST2 (SCHUBERT, 2000; SACHS et al., 2002).

Outras substâncias com efeito inibitório sobre a secreção ácida são as prostaglandinas, que, atuando sobre a célula parietal, através de seu receptor ativam uma proteína G inibitória (G_i), que inibe a enzima adenilato ciclase. As prostaglandinas endógenas diminuem a secreção ácida pelo bloqueio da síntese de AMPc, estimulado por histamina dentro da célula parietal (ATAY et al., 2000).

O controle intracelular da secreção ácida é dado pela atividade da H^+K^+ ATPase, presente nas células parietais. Esta enzima promove a troca de íons H^+ e K^+ , resultando no maior gradiente iônico conhecido dentre os vertebrados, com pH intracelular de aproximadamente 7,3 e um pH intracanalicular de cerca de 0,8 (HIRSCHOWITZ et al., 1995). Nas células parietais em repouso, esta enzima é estocada em tubovesículas, que na ocorrência de estímulo por diferentes secretagogos, fundem com a membrana apical dos canálculos da célula parietal, iniciando a liberação do ácido clorídrico. Quando o estímulo é

cessado, as enzimas são recicladas novamente para o compartimento citoplasmático (SCHUBERT, 2003).

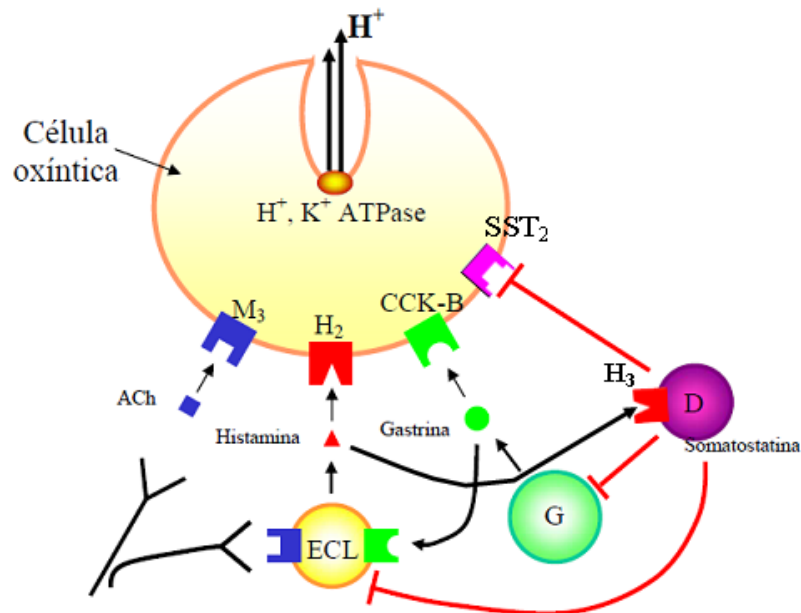


Figura 2: Regulação neuro-endócrina-parácrina da secreção gástrica de ácido. Ach: Acetilcolina; ECL: Células enterocromafins like; G: Célula G; D: Célula D; Sst: Somatostatina. Ativação (—) e inibição (—). (Adaptado de COLLARES-BUZATO & ARANA, 2005, Ed: Manole).

Ainda em relação ao processo secretório, é importante ressaltar a função das células principais. Estas células, presentes no corpo e fundo do estômago, secretam os pepsinogênios, proteínas classificadas como endopeptidases, pertencentes ao grupo das proteinases aspárticas. Nas células em repouso os pepsinogênios são armazenados em grânulos e após estímulos fisiológicos ou químicos externos são secretados no lúmen estomacal. Nesta situação, em valores de pH abaixo de 5, são convertidos pela ação do ácido clorídrico na enzima pepsina, relacionada com a digestão de proteínas no estômago e também na fisiopatologia da úlcera péptica. Os mecanismos estimuladores da secreção de pepsinogênio parecem incluir principalmente duas grandes vias, uma delas considerada mais eficiente, envolvendo o aumento de AMPc e a outra, modificações nas concentrações intracelulares do íon cálcio. A ativação da proteína quinase C (PKC) também parece estar envolvida no processo regulatório (GRITTI et al., 2000).

Fatores protetores da mucosa gástrica

A mucosa gástrica possui uma barreira dinâmica, permitindo a passagem de certos íons e moléculas para o corpo e restringindo a entrada de outros. Esta proteção não é realizada apenas por uma barreira anatômica, mas por uma série de mecanismos de defesa consecutivos que mantêm a integridade da mucosa. Estes mecanismos podem ser classificados, pelo local de ação, em fatores pré-epitelial, epitelial e sub-epitelial. Esta divisão é arbitrária, pois as funções epiteliais funcionam, como um todo, em conjunto para prevenir as lesões (FLEMSTRÖM & ISENBERG, 2001).

A proteção pré-epitelial é a primeira linha de defesa contra o ácido, sendo realizada pela barreira muco-bicarbonato. O epitélio gástrico é recoberto por uma contínua camada de muco, o qual adere na superfície da mucosa, e juntamente com o bicarbonato secretado, serve como uma barreira física entre o lúmen gástrico e a superfície das células apicais, protegendo contra a digestão causada pelo ácido, uma vez que cria um gradiente de pH, que é muito maior na superfície das células apicais do que no lúmen (FLEMSTRÖM et al., 1999; ALLEN & FLEMSTRÖM, 2005). O muco se apresenta de forma viscosa, elástica e aderente na forma de um gel transparente composto por 95% de água e 5% de glicoproteína, que recobre a superfície da mucosa gastrointestinal (REPETTO & LLESUY, 2002). Na sua composição há, também, uma grande quantidade de fosfolipídios ativos de superfície que deixam a mucosa gástrica altamente hidrofóbica, reduzindo assim, a permeabilidade do muco aos íons H^+ e a difusão de macromoléculas do lúmen para a superfície epitelial, incluindo as pepsinas (HILLS, 1996; ALLEN & FLEMSTRÖM, 2005). O muco gástrico possui também atividade antioxidante, protegendo a mucosa gástrica, devido às glicoproteínas, por serem os açúcares potentes seqüestradores de espécies reativas do oxigênio (EROs) (MOJZIS et al., 2000). Sua secreção é controlada por vários fatores em diferentes vias, destacando-se as prostaglandinas, em especial a do tipo E_2 (PGE_2) (TANI et al., 1997) e os grupos sulfidrila (SHs) (AVILA et al., 1996), como será discutido mais adiante.

Por sua vez, a proteção epitelial é dada tanto pela disposição anatômica, quanto pela constituição bioquímica das células gástricas (SZABO, 1991). As junções fechadas e outras barreiras intercelulares controlam a passagem de agentes lesivos do lúmen para a mucosa gástrica, para espaços intersticiais e submucosos. Agentes que conseguem atravessar estas junções ainda são restritos pela membrana celular das células gástricas, que são compostas por elevada concentração de fosfolípidios, que aumentam a hidrofobicidade das membranas biológicas, restringindo a difusão de moléculas hidrofílicas, como o íon H^+ (SZABO, 1991; FLEMSTRÖM & ISENBERG, 2001).

Juntamente com os fosfolípidos, os SHs constituem fatores importantes da proteção epitelial contra radicais livres, funcionando como um sistema antioxidante. A glutatona reduzida (GSH), uma espécie de SH, atua como uma varredora de radicais livres e substâncias tóxicas ingeridas com a comida ou produzidas diretamente no trato gastrointestinal (SHIRIN et al., 2001; REPETTO & LLESUY, 2002). Os SHs ligam-se aos radicais livres formados durante o processo inflamatório ou produzidos após exposição a agentes nocivos, protegendo assim a mucosa gástrica (TARIQ et al., 2006). Além disso, são importantes na produção e manutenção do muco gástrico, uma vez que suas subunidades glicoprotéicas são unidas entre si por pontes dissulfeto que, uma vez reduzidas, tornam o muco hidrossolúvel (AVILA et al., 1996).

A proteção epitelial gástrica ainda conta com as prostaglandinas, em especial PGE_2 , que desempenham um importante papel na modulação da integridade da mucosa gástrica. Seus efeitos gastroprotetores são devidos a vários mecanismos indiretos, como o aumento da produção de muco e bicarbonato que recobrem as células epiteliais, a inibição da motilidade gástrica, a inibição da secreção ácida gástrica, a manutenção do fluxo sanguíneo gástrico, a inibição da apoptose, a inibição da ativação de mastócitos, e a diminuição da aderência leucocitária ao endotélio vascular (ATAY et al., 2000).

Outro mediador considerado fundamental nos mecanismos de defesa gástrica é o NO. Em vários estudos foram demonstrados que as lesões na mucosa gástrica induzidas por agentes químicos são reduzidas pela

administração de NO e agravadas com a sua remoção (CALATAYUD, 1999). O efeito protetor pode ocorrer devido ao aumento do fluxo sanguíneo da mucosa promovido pelo NO (WALLACE & GRANGER, 1996), por promover um aumento na liberação de muco gástrico através do estímulo da síntese de prostaglandinas (ATAY et al., 2000). Também foi demonstrado que a administração de L-NAME (inibidor da NOS) acentua as lesões gástricas induzidas por etanol e aumenta a atividade da bomba de prótons ($H^+, K^+ATPase$), enquanto doadores de NO (nitroprussiato) reparam as lesões induzidas por etanol e inibem a atividade ATPásica em ratos (BULUT et al., 1999).

No caso da proteção sub-epitelial é dada pelo fluxo sangüíneo, o qual protege a mucosa por assegurar a chegada de uma quantidade ótima de oxigênio, nutrientes e bicarbonato. Quando o ácido gástrico ou outro agente irritante invade o compartimento sub-epitelial, neurônios sensoriais aferentes são capazes de disparar um rápido aumento no fluxo sangüíneo da mucosa que permite o tamponamento do ácido e uma rápida remoção de substâncias tóxicas, limitando sua penetração em camadas mais profundas da mucosa (WALLACE & MA, 2001). Assim, o fluxo sanguíneo contribui substancialmente para a manutenção fisiológica da integridade da mucosa e já é descrito que a sua redução está envolvida na formação das lesões da mucosa gástrica causadas por estresse, etanol e antiinflamatórios não esteroidais (AINES) (KAWANO & TSUJI, 2000).

Os vasos sanguíneos gástricos atravessam a região muscular da mucosa tanto perpendicularmente quanto obliquamente. Assim, a contração do músculo liso da parede gástrica comprime os pequenos vasos, favorecendo a lesão endotelial e o desenvolvimento de congestão e estase local por drogas como o etanol. Desta maneira, a modulação farmacológica dos mecanismos que controlam o fluxo sanguíneo gástrico, como no esvaziamento gástrico, da motilidade duodenal e da mistura ácido-base pode representar um mecanismo de defesa gástrica (WALLACE & MA, 2001).

Outros fatores que vem sendo estudados na proteção gástrica são os receptores ativados por proteases (PAR, "Protease Activated Receptor").

Serino proteases como a tripsina e a trombina, medeiam várias funções, como a proliferação celular e a secreção em vários tecidos, através da ativação desses receptores (KAWABATA, 2003). Até o momento, quatro PARs foram identificados (PAR-1 a -4) e todos são ativados através da clivagem proteolítica do domínio amino-terminal após ligação com o receptor (OSSOVSKAYA & BUNNETT, 2004). O trato gastrointestinal é particularmente abundante em PAR-1 e PAR-2, onde a ativação desses receptores está relacionada com diversos mecanismos, sendo primariamente de proteção (KAWABATA, 2003). Em um estudo realizado em 2001, Kawabata et al. mostrou que o pré-tratamento de animais com um agonista para PAR-2 protegeu os mesmos da ação lesiva da indometacina, etanol e ácido, através do aumento dos níveis de muco gástrico e do fluxo sanguíneo. A ativação de PAR-1, por sua vez, mostrou que além de aumentar o fluxo sanguíneo, inibe a secreção de ácido por um mecanismo dependente da produção de prostanóides (NAKAYA et al., 2003, NISHIKAWA et al., 2003).

Reconstituição

Como já descrito, o estômago possui várias maneiras de se proteger de danos, sendo o epitélio gástrico uma das estruturas mais importantes, principalmente contra a ação constante e lesiva do ácido. Esta estrutura possui a habilidade de se renovar rapidamente, permitindo que as células velhas sejam repostas por células mais jovens, sem quebra significativa da barreira. Esta função é atribuída a um processo de extensão celular, em que as células vizinhas gradualmente “apertam” as células envelhecidas na base, expulsando-as (WALLACE & GRANGER, 1996).

O termo “reconstituição” refere-se ao processo de reparo epitelial da mucosa, que envolve migração rápida de células proliferantes aos locais lesionados na base da membrana desprotegida. As células gástricas estão ligadas à membrana basal da célula epitelial e este local é bastante sensível aos danos induzidos por ácido (PAIMELA et al., 1995).

Tendo ocorrido dano na mucosa, forma-se uma “capa mucóide” sobre o local lesionado, que consiste de fragmentos celulares, muco e plasma (incluindo proteínas tais como fibrina e albumina). A capa mucóide provém um microambiente que conduz à reconstituição epitelial, sendo o pH da capa mucóide é mantido em torno de 5. A manutenção desse pH relativamente alto, nesse microambiente, é dependente de um suprimento contínuo de sangue na região. É comum que o plasma proveniente dos vasos sangüíneos seja responsável por tamponar algum ácido que se difunda de dentro da capa mucóide; mantendo assim o pH nesse microambiente. A capa mucóide serve para “capturar” o plasma e para interromper, ainda que brevemente, o fluxo sangüíneo. Assim, a progressão dos danos do epitélio superficial acabará por abranger também a mucosa, causando uma lesão hemorrágica grave (WALLACE & GRANGER, 1996).

1.4. Úlcera gástrica

Definição e epidemiologia

A úlcera é uma lesão profunda da mucosa, onde os componentes do tecido epitelial e conectivo, incluindo miofibroblastos subepiteliais, células do músculo liso, vasos e nervos, podem ser destruídos (MILANI & CALABRÒ, 2001).

Tanto as úlceras localizadas no estômago quanto as do duodeno são referidas como úlceras pépticas, sendo mais comuns as que ocorrem no duodeno (90%), próximas a junção do piloro com a mucosa duodenal. Dentre as úlceras localizadas no estômago, 60% se localizam no antro e 25 % na junção do antro com o corpo na pequena curvatura. A incidência é ligeiramente maior nos homens em relação às mulheres (1,3:1) e, apesar de ocorrerem em qualquer idade, a úlcera duodenal ocorre com mais freqüência na faixa de 30 – 55 anos, enquanto a úlcera gástrica na faixa de 50 – 70 anos (ABITBOL, 2007).

Etiologia

De acordo com GLAVIN & SZABO (1992), acreditava-se que a secreção de ácido gástrico era o principal fator envolvido na ulceração da mucosa gástrica. Contudo, ISENBERG et al. (1997) demonstraram que pacientes com úlcera duodenal apresentavam, também, diminuição da secreção de bicarbonato. Assim, percebeu-se que não só o excesso de um fator agressivo, mas também, a deficiência de um mecanismo de defesa estava contribuindo com a ulceração da mucosa.

Desse modo, nos dias atuais, está bem estabelecido que independentemente da etiologia da úlcera, esta é formada quando ocorre um desequilíbrio entre os fatores agressivos luminiais endógenos (ácido clorídrico e pepsina) ou exógenos (etanol, AINES e fumo) e fatores de defesa da mucosa (secreção de muco e bicarbonato, prostaglandinas, fluxo sangüíneo e NO), ocasionando irritação, ulceração da mucosa e sangramento (WALLACE, 2001(a); DEMBINSKI et al., 2005).

Segundo SZABO (1991), a lesão celular ou tecidual da mucosa gástrica pode ocorrer por causas adquiridas ou inatas. As cinco causas mais comuns são: (1) hipóxia e isquemia, resultante da diminuição do fluxo sangüíneo ou do decréscimo da hemoglobina, ou ainda, da diminuição das enzimas antioxidantes dos tecidos; (2) por agentes químicos, como monoaminas, eicosanóides, endotelinas, fármacos sintéticos, e principalmente substâncias químicas ingeridas propositadamente, como o etanol; (3) por agentes biológicos como vírus, fungos, parasitas e bactérias, como *Helicobacter pylori*, levando a reações imunológicas que, geralmente, são desenvolvidas para a defesa do organismo, entretanto produzem radicais livres tóxicos que contribuem para a injúria tecidual; (4) por fatores físicos (estresse, temperaturas extremas e força mecânica); e (5) por defeitos genéticos.

As EROs têm sido reportadas como mediadoras dos distúrbios microvasculares que precedem as lesões da mucosa gástrica induzidas por estresse, AINEs e etanol (REPETTO & LLESUY, 2002). Moléculas, como por exemplo o ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila ($\cdot OH$) e peróxido de

hidrogênio (H_2O_2), são constantemente geradas nas células através de processos como a fosforilação oxidativa/transporte de elétron mitocondrial, o metabolismo de xenobióticos e a inflamação. O aumento dos níveis intracelulares de EROs, tais como quando as defesas antioxidantes celulares são insuficientes para manter abaixo do limiar tóxico, é comumente referido como estresse oxidativo. Essas moléculas são altamente reativas e interagem indiscriminadamente com macromoléculas essenciais como o DNA, proteínas e lipídios (CNUBBEN et al., 2001).

Como visto, em todos os tipos de lesões, a difusão do ácido luminal para a mucosa é crucial na patogênese da lesão. A ação tópica de muitos agentes endógenos e exógenos pode alterar os mecanismos de defesa, aumentando a permeabilidade da mucosa ao ácido (TWEDT & MAGNE, 1992). Com o aumento da entrada de ácido, ocorre lesão direta da mucosa, seguida da destruição da submucosa (LIPTAK et al., 2001). Neste local, os mastócitos, quando em contato com o ácido liberam histamina, que estimula a secreção celular parietal de ácido clorídrico, assim como inflamação local e edema agudo. O ácido pode ainda lesionar vasos sanguíneos e estimular nervos da parede gástrica, provocando contrações musculares exacerbadas (TWEDT & MAGNE, 1992).

Sob condições de estresse, ocorre estimulação do hipotálamo e do centro medular causando aumento da motilidade gastrointestinal, aumento da secreção ácida e de pepsina, alteração da liberação de substâncias endógenas como glicocorticóides, catecolaminas e histamina; e também alterações da microcirculação causando isquemia, que provocam diminuição da vitalidade das células gástricas e de capilares, levando a necrose e ao desenvolvimento de úlceras (PACHALY et al., 1993; OVERMIER & MURISON, 2000).

Os AINES permanecem entre os agentes farmacológicos mais utilizados e a sua habilidade de causar ulceração gastrointestinal foi demonstrada há mais de 60 anos (DOUTHWAITE & LINTOTT, 1938; WALLACE, 2001(b)). As lesões tópicas iniciam as erosões da mucosa gástrica induzidas pelos AINES, mas a depleção de prostaglandinas é essencial para o desenvolvimento de úlceras gástricas clinicamente significativas (ATAY et al., 2000). Os AINES

interrompem a barreira de muco e bicarbonato da mucosa gástrica normal por dois mecanismos. O principal mecanismo, independente da via de administração, resulta do distúrbio da síntese de prostaglandinas pela inibição da isoenzima ciclooxigenase 1 (COX-1). No estômago, as prostaglandinas têm um papel vital na proteção, mantendo o fluxo sangüíneo da mucosa, estimulando a secreção de muco e bicarbonato e regulando a renovação celular e reparo da mucosa. Alguns AINEs podem danificar a mucosa gástrica por um segundo efeito direto. Os AINEs ácidos, incluindo a aspirina, tornam-se lipossolúveis em pH baixos e se tomados oralmente, podem atravessar a barreira lipídica das células da mucosa gástrica. No pH intracelular, perdem a solubilidade lipídica e ficam presos, interrompendo funções celulares, talvez por inibir a fosforilação oxidativa mitocondrial, reduzindo a produção de muco (HAWKINS & HANKS, 2000). A interrupção do fluxo sangüíneo da mucosa é um dos eventos na lesão por AINEs, pois induzem isquemia microvascular, em parte causada pela aderência dos neutrófilos ao endotélio da microcirculação. A toxicidade indireta dos AINEs pode ser devida à produção de radicais livres, oxidação mitocondrial diminuída e produção reduzida de NO (ATAY et al., 2000).

As lesões gástricas causadas pelo uso do etanol são de grande importância na gastroenterologia clínica e são devidas à diminuição de função da barreira de muco. Altas concentrações de etanol levam a um aumento da permeabilidade epitelial, como consequência de mudanças da diferença de potencial celular que é causado pela difusão de íons H^+ através da mucosa lesada, e danos da mucosa principalmente devido aos distúrbios vasculares e diminuição do fluxo sangüíneo local (SIEGMUND et al., 2003). O etanol também induz estresse oxidativo, com produção de radicais livres que promovem a peroxidação lipídica, danos na membrana celular através da coagulação de proteínas, e nos ácidos nucléicos (AL-SHABANAH et al., 2000). Além disso, provoca a diminuição de SHs das células, um dos mais importantes fatores de proteção da mucosa gástrica (REPETTO & LLESUY, 2002). Com a oxidação dos lipídios há formação de compostos, que recrutam por quimiotaxia as células polimorfonucleadas para o local intensificando o

processo inflamatório (LA CASA, 2000). As lesões histopatológicas mais evidenciadas são congestão, edema, hemorragia, erosão e necrose (AL-SHABANAH et al., 2000).

Cisteíno proteases e úlcera

Cisteíno proteases de mamíferos, como as caspases e catepsinas, possuem atividades destrutivas de órgãos, células e tecidos, através do estímulo apoptótico ou degradação de componentes da matriz extracelular, sendo, portanto, importantes na patogênese de doenças agudas e crônicas (CHUNG & KAWAY, 1990; LÁSZLÓ et al., 1990; NAGY et al., 2007). Várias cisteíno proteases foram encontradas na mucosa gástrica, e estudos demonstram que essas proteases e seus inibidores podem agir diretamente ou indiretamente como mediadores na patogênese ou prevenção de úlceras gástricas. NAGY et al. (1996) demonstraram que em lesões promovidas pelo etanol e pela amônia ocorre ativação e liberação das catepsinas B, H e L., e inativação de seus inibidores endógenos. Essa ativação ocorreu de maneira extremamente rápida após a administração dos agentes lesivos e foi inibida pela administração de agentes alquilantes de grupos tióis, como a N-etilamina e o iodoacetato. POTTHOFF et al. (2002) verificaram que no mecanismo de produção de ulcerações pelo *H. pylori*, ocorre a ativação de caspases e do mecanismo apoptótico mitocondrial.

Cicatrização de úlceras

A cicatrização na mucosa requer reconstituição da estrutura glandular epitelial (reepitelização), restauração da lâmina própria incluindo uma rede microvascular na mucosa, nervos e células de tecidos conectivos (JONES et al., 1999). É acompanhada de um aumento do fluxo sanguíneo gástrico na área da úlcera e por um significativo aumento de gastrina plasmática e citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β . Com o progresso da cicatrização da úlcera ocorre declínio gradual do fluxo sanguíneo, da gastrina plasmática e citocinas

pró-inflamatórias. Foi concluído que a hipergastrinemia durante o período anterior à cicatrização da úlcera pode ser atribuída à supressão da acidez gástrica e expressão de fatores de crescimento como: o fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento transformador α (TGF- α) e o fator de crescimento de hepatócito (HGF), os quais controlam a proliferação celular (BRZOZOWSKI et al., 2001).

Esses fatores de crescimento promovem a proliferação e migração de células epiteliais para a cratera da úlcera, levando a reepitelização dessa cratera e maturação das glândulas. Na base da úlcera ocorre granulação de tecido sofrendo contínua remodelação. A reparação do dano causado a mucosa gástrica requer angiogênese – formação de novos microvasos. Isso facilita a entrada de nutrientes e oxigênio na área, permitindo a proliferação celular e migração. Angiogênese é importante para o reparo tanto de dano agudo da mucosa ou crônico durante a cicatrização de úlcera gastroduodenal. O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e fator de crescimento do fibroblasto básico (bFGF) são fortes fatores angiogênicos em células endoteliais vascular (JONES et al., 1999). A angiogênese na granulação de tecido facilita a remodelação por liberar oxigênio e nutrientes. Células inflamatórias são substituídas por fibroblastos e microvasos na fase final da cicatrização (CHAN et al, 2001).

Evidências têm sugerido que certos fatores de crescimento podem contribuir para esse processo; por exemplo: o fator de crescimento fibroblástico (FGF) tem sido demonstrado comportar-se como uma influência positiva na reconstituição. PAIMELA (1995) demonstrou que a aplicação luminal de protamina ou suramina, as quais interferem com a ação de bFGF endógeno, inibiu significativamente a recuperação funcional da célula epitelial após danos da mucosa induzidos por salina hipertônica. Por outro lado, sucralfato aplicado luminalmente, pode se ligar ao bFGF e, desse modo, prevenir essa degradação pelo ácido, permitindo a reconstituição epitelial que pode ocorrer no pH luminal de 3.

Tratamento das úlceras

O tratamento das úlceras pépticas passou por grandes modificações e progressos, a partir da segunda metade do século XX. Em tempos remotos, os indivíduos acometidos por essa doença, ingeriam conchas marinhas moídas para o alívio dos sintomas. A presença do carbonato de cálcio neutraliza o ácido, justificando a utilização popular. Os antiácidos, como o bicarbonato de sódio, hidróxidos de alumínio e magnésio, foram desenvolvidos na sequência. São ainda usados, porém apesar de aliviar os sintomas, a duração de seu efeito é baixa. Assim, para aumentar esta duração, foram administrados juntamente com os antiácidos, alguns agentes anticolinérgicos, que além de inibirem a secreção ácida, são capazes de diminuir o peristaltismo, aumentando conseqüentemente o tempo de retenção destes antiácidos no estômago. Esta utilização possui limitações devido aos efeitos colaterais que surgem devidos à atividade parassimpática geral. Antagonistas seletivos dos receptores M1, como a pirenzepina, e a terenzepina, possuem ainda uma pequena utilização clínica, devido à diminuição das ocorrências destes efeitos colaterais (AIHARA et al., 2003).

A descoberta do envolvimento da atividade estimulatória da secreção ácida pela histamina, impulsionou o desenvolvimento de antagonistas dos receptores H₂, resultando no desenvolvimento da burinamida (BLACK et al., 1972). A partir de modificações estruturais deste fármaco surgiu a cimetidina (BRIMBLECOMBE et al., 1975), ainda muito utilizada, que por sua vez levou ao desenvolvimento de fármacos como a ranitidina, famotidina e a nizatidina, que apresentam melhorias em relação à eficácia e redução da inibição das enzimas do citocromo P450. Os antagonistas dos receptores H₂ inibem a produção ácida por competirem de modo reversível com a histamina pela ligação aos receptores H₂ na membrana basolateral das células parietais, sendo seus efeitos proeminentes sobre a secreção ácida basal. São particularmente eficazes na supressão da secreção ácida noturna, o que é clinicamente relevante no processo de cura de úlceras duodenais, que é determinado pelos níveis de acidez noturna (HOOGERWERF & PANKAJ, 2003). Os antagonistas

H₂ são fármacos de primeira linha no tratamento dos distúrbios ácido-pépticos, representando um grande avanço neste sentido, uma vez que seu uso praticamente aboliu os procedimentos cirúrgicos anteriormente utilizados (SACHS et al., 2002; HOOGERWERF & PANKAJ, 2003).

Os inibidores da bomba de prótons, como o omeprazol, o lansoprazol e o pantoprazol são os fármacos anti-úlceras mais utilizados. Funcionam como pró-fármacos, sendo convertidos na forma ativa, como cátions tiofílicos, no ambiente ácido presente nos canalículos das células parietais. Estes cátions efetuam uma ligação covalente com os resíduos de cisteína presentes na subunidade α da H⁺K⁺ ATPase, inibindo irreversivelmente sua atividade. Assim, os inibidores da bomba de prótons são os mais eficazes na inibição da secreção ácida, uma vez que a fazem independentemente do secretagogo envolvido (SACHS, et al., 2002; AIHARA, 2003). De fato, a inibição da secreção é marcante: a redução pode atingir mais de 95%. Entretanto, atualmente, isso não se apresenta como uma vantagem. Estudos recentes mostram que a inibição profunda da secreção ácida pode ter efeitos indesejados. CENTANNI et al. (2006) mostraram que pacientes com bócio multinodular, com secreção ácida prejudicada requerem uma dose 3 vezes maior de tiroxina, implicando que a secreção ácida normal é necessária para a efetiva absorção desta.

Além dos anti-secretores, as úlceras pépticas podem ser tratadas com outra classe de fármacos, que apresenta uma ação mais relacionada como os fatores protetores da mucosa gástrica, podendo reduzir ou não, a secreção ácida. O misoprostol, análogo sintético da prostaglandina E1 (PGE₁), é utilizado na prevenção e tratamento de úlceras pépticas, principalmente associadas ao uso de AINES. O misoprostol possui ações idênticas às prostaglandinas, podendo além de estimular a produção do muco, inibir a secreção ácida, porém de maneira menos drástica que a provocada pelos inibidores da bomba de prótons e antagonistas H₂. Devido às suas ações sobre o tônus uterino, foi disseminado o seu uso como abortivo, o que limitou sua comercialização (ATAY et al., 2000; CHONG et al., 2004).

Outro fármaco, o sucralfato também age estimulando os fatores protetores da mucosa. É um sal complexo de sulfato de sucrose e hidróxido de alumínio, que na presença de ácido libera alumínio, adquirindo uma forte carga negativa, e se liga eletrostaticamente a qualquer grupo químico carregado positivamente no ambiente, tais como a pepsina, diminuindo sua atividade, peptídeos, fármacos, metais e grandes moléculas como a mucina (NYSÆTER & BERSTAD, 2006). Assim, adere ao epitélio injuriado, sendo capaz de formar uma barreira mecânica contra os fatores luminiais. Além disso, aumenta os níveis de prostaglandinas na mucosa, o que ocorre via NO e neurônios sensoriais, sendo eficazes na prevenção de úlceras por estresse (ARISAWA et al., 2006; LAINE et al., 2008).

A erradicação da bactéria *Helicobacter pylori*, é outro importante alvo na terapia das úlceras pépticas. Os esquemas terapêuticos propostos preconizam o uso de inibidores da bomba de prótons associado a antibióticos, como a amoxicilina, ou associando o subcitrato de bismuto, metronidazol e um antibiótico, que pode ser a tetraciclina ou a amoxicilina. Esta terapia tripla alcança uma erradicação em 60 a 80%, entretanto um dos problemas que justificam o insucesso deste esquema em cerca de 20% dos casos é a resistência adquirida ao metronidazol (PAKODI et al., 2000).

Em relação à contribuição do reino vegetal para o tratamento das úlceras pépticas, vários princípios ativos tiveram sua atividade anti-úlceras comprovada. Um dos mais importantes, pertencentes à classe das saponinas é a carbenoxolona, obtida principalmente dos rizomas de *Glycyrrhiza glabra* L., o “alcaçus” e estando presente também, em várias espécies do gênero *Abrus*. Seu mecanismo de ação foi muito estudado e além de inibir a secreção de pepsina, está relacionado ao aumento do conteúdo de prostaglandinas na mucosa gástrica, por inibir as enzimas que promovem o seu catabolismo, denominadas 15-hidroxi-PG-dehidrogenase e Δ 13-PG-redutase (LEWIS et al., 1991).

2. JUSTIFICATIVA

A estratégia terapêutica atual para o tratamento de úlceras gástricas preconiza o uso de inibidores da secreção ácida, que atuam diminuindo a agressão sobre a mucosa promovida pelo ácido, ou de fármacos que aumentam a proteção do estômago. Entretanto, os agentes utilizados não atuam diretamente sobre a cicatrização, uma vez que não são capazes de estimular eventos chaves nesse processo. Assim, observa-se muitas vezes uma cicatrização rápida, mas com menor qualidade, favorecendo o reaparecimento das lesões (YOMANS, 2005). Na cicatrização é exigida a angiogênese no tecido de granulação, juntamente com a proliferação de células epiteliais, para o subsequente restabelecimento da arquitetura glandular (TARNAWSKI, 2005). Sendo a proliferação celular endotelial e epitelial dirigidas por fatores de crescimento, substâncias que possam atuar como tais podem representar uma alternativa no tratamento das úlceras gástricas (WALLACE, 2005). Portanto, um fármaco anti-úlceras ideal seria aquele que contemplasse as ações de proteção da mucosa gástrica e de promoção da cicatrização de lesões (YOMANS, 2005).

Nosso grupo de pesquisa vem se dedicando ao estudo bioquímico e farmacológico da fração P1G10 do látex de *Carica candamarcensis*. Cisteíno proteases de alta atividade proteolítica contidas nessa fração, em estudos de proliferação *in vitro*, demonstraram atividade mitogênica sobre fibroblastos (GOMES et al., 2005). Em estudos *in vivo*, foram constatadas as propriedades angiogênica, cicatrizante cutânea e protetora/cicatrizante gástrica da fração (MELLO et al., 2006). As atividades protetora e cicatrizante gástricas foram avaliadas nos modelos de indução de lesões por indometacina e pelo ácido acético, onde P1G10 obteve efeitos equivalentes à de fármacos utilizados clinicamente, como o sucralfato e o omeprazol e até mais potentes, quando comparado a ranitidina (MELLO et al., 2008). Acreditamos que a ação gastroprotetora aliada à capacidade mitogênica das proteases que compõem P1G10 possam ser responsáveis pelo efeito anti-úlceras. Entretanto, esses mecanismos ainda não foram esclarecidos. Assim, é de interesse

complementar a avaliação pré-clínica da fração P1G10 como agente anti-úlceras, buscando entender quais as vias envolvidas na sua ação cicatrizante e protetora gástrica, dando subsídio para uma futura aplicação desta fração como medicamento anti-úlceras.

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo geral*

Investigar a ação anti-úlceras gástrica da fração P1G10 obtida do látex de *C. candamarcensis*, em lesões promovidas por diferentes agentes indutores incluindo o estudo de sua ação sobre fatores que controlam a homeostase gástrica.

3.2. *Objetivos específicos*

1. Avaliar a atividade gastroprotetora de P1G10 contra lesões produzidas por ligadura pilórica, indometacina, etanol e estresse.
2. Avaliar a participação do óxido nítrico (NO), dos compostos sulfidrilas, bem como, a modulação da secreção ácida/péptica na atividade anti-úlceras de P1G10.
3. Estudar por métodos imunohistoquímicos e morfométricos a ação de P1G10 sobre a cicatrização (proliferação e angiogênese) de úlceras crônicas.
4. Avaliar o envolvimento da atividade proteolítica da fração P1G10 na atividade anti-úlceras gástrica.
5. Avaliar os efeitos da fração P1G10 sobre a motilidade gastrointestinal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. *Material*

4.1.1. *Reagentes e solventes*

Acetato de sódio P.A., etanol 96%, etileno-diamino-tetracetato dissódico (EDTA) P.A., fosfato monobásico de potássio P.A., fosfato dibásico de sódio P.A. reagente de Folin 2N (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Ácido 5,5-ditiobis(2- nitrobenzóico) (DTNB), ácido tricloroacético (TCA), albumina bovina fração V, ampicilina sódica, benzoil-arginil-p-nitro-anilida (BAPNA), carbenoxolona, dimetilsulfóxido (DMSO), ditioneitol (DTT), glutathione Reduzida (GSH), éster metílico da Lγ-nitro-L-arginina (L-NAME), hidróxido de alumínio, iodoacetamida (IAA), L-cisteína, L-tirosina, metil-metano-tiosulfonato (MMS), persulfato de amônio (APS), resina “Sephadex G-10”, sulfato de estreptomicina, Tris base, e Tween 85 (Sigma Chemical Co, St. Louis, MD, EUA).

Ácido acético glacial P.A., bicarbonato de sódio, cloreto de sódio, hidróxido de sódio, Glicina, Metanol absoluto (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil).

Ácido hidrocloreídrico P.A. (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

Acrilamida (Pharmacia LKB, Uppsala, Suécia).

Azul de bromofenol, bis-acrilamida, corante azul-brilhante de coomassie G-250, dodecil sulfato de sódio (SDS) e N',N',N',N'-tetrametil-etileno-diamina (TEMED) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

Cloridrato de Metoclopramida 4 mg/mL (Plasil, Sanofi Aventis, Suzano, São Paulo, Brasil).

Indometacina 50 mg Indocid[®] (Prodame Química e Farmacêutica Ltda, Campinas São Paulo, Brasil).

Omeprazol 10 mg (Genérico Teuto Brasileiro Ltda, Anápolis, Goiás, Brasil).

Ranitidina 200 mg (Genérico Eurofarma, São Paulo, São Paulo, Brasil).

Sucralfato 1000 mg (Sucralfilm, EMS Sigma Pharma, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil).

Sulfato de atropina (Atropina 1%, Allergan, Guarulhos, São Paulo, Brasil).

4.1.2. Soluções

Tampão acetato de sódio 1,0 M pH 5:

Acetato de sódio.....136,08 g

Água destilada q.s.p.1000,00 mL

O pH foi ajustado para 5. A partir da diluição desta solução foi obtido o tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5.

Solução de EDTA 500 mM:

EDTA.....37,22 g

Água destilada q.s.p.200,00 mL

O EDTA foi completamente dissolvido em 180 mL. Em seguida, o pH foi ajustado para 8,0 com NaOH 1,0 M e o volume completado para 200 mL.

Solução de cisteína 200 mM:

Cisteína.....12,10 g

Água destilada q.s.p.500,00 mL

Tampão de ativação (Tampão acetato de sódio 1 M, cisteína 25 mM, EDTA 10 mM e DTT 5 mM)

Cisteína 200 mM40 µL

EDTA 500 mM4,00 mL

DTT.....160,00 mg

Tampão acetato de sódio 1 M (pH 5,0) q.s.p.....200,00 mL

Solução de BAPNA 100 mM

BAPNA.....	90,00 mg
DMSO.....	2,00 mL

Esta solução foi mantida a -20° C até o momento de uso.

Solução de Ácido Acético 60% (v/v)

Ácido Acético PA.....	60,00 mL
Água destilada q.s.p.....	100,00 mL

Solução para o gel separador desnaturante 12% acrilamida

Solução aquosa de acrilamida:bis-acrilamida 29:1 (p/p) 30% (p/v)	1,20 mL
Tampão Tris-HCl 1,0 mM pH 8,8; 0,4 % SDS (p/v)	750,00 µL
Água deionizada	1,02 mL
Solução aquosa de APS 10% (p/v)	25,00 µL
TEMED	5,00 µL

Solução para o gel concentrador desnaturante 5% acrilamida

Solução aquosa de acrilamida:bis-acrilamida 29:1 (p/p) 30% (p/v).....	166,80 µL
Tampão Tris-HCl 1,0 mM pH 6,8; 0,4 % SDS (p/v)	250,00 µL
Água deionizada	571,20 µL
Solução aquosa de APS 10% (p/v).....	10,00 µL
TEMED	2,00 µL

Solução para gel separador ácido não desnaturante 7,5% pH 4,3

Solução aquosa de acrilamida:bis-acrilamida 29:1 (p/p) 30% (p/v).....	1,25 mL
Ácido acético glacial P.A.....	170,00 µL
Solução de hidróxido de potássio 1 M.....	430,00 µL
Água deionizada.....	3,05 mL
Solução aquosa de APS 10% (p/v).....	70,00 µL
TEMED.....	30,00 µL

Solução fixadora para géis

Metanol P.A.....	50,00 mL
Ácido acético glacial P.A.....	10,00 mL
Água destilada q.s.p.....	100,00 mL

Solução de azul-brilhante de coomassie para coloração de géis

Corante azul-brilhante de Coomassie G-250.....	125,00 mg
Ácido acético glacial P.A.....	10,00 mL
Água destilada q.s.p.....	100,00 mL

Solução descorante de géis

Metanol P.A.....	5,00 mL
Ácido acético glacial P.A.....	7,00 mL
Água destilada q.s.p.....	100,00 mL

Solução tampão de amostra eletroforese desnaturante

Tampão Tris-HCl 1,0 mM pH 6,8; 0,4 % SDS (p/v).....	700,00 µL
Glicerol.....	300,00 µL
SDS.....	100,00 mg
Azul de bromofenol.....	0,12 mg

Tampão de corrida eletroforese desnaturante

Tris base.....	755,00 mg
Glicina.....	3,60 g
SDS.....	250,00 mg
Água destilada q.s.p.....	250,00 mL

Solução salina 0,9%

NaCl.....	9,00 g
Água destilada q.s.p.....	1000,00 mL

Solução de Tris 0,1 M pH 8,3

Tris

Base.....5,00 g

Água destilada q.s.p.....100,00 mL

O pH foi ajustado para 8,3 com solução de NaOH 1,0 M.

Solução anestésica

Ketamina 10%.....10,00 mL

Xilasina 2%.....7,50 mL

Solução de ácido acético 10%

Ácido acético glacial PA.....10,00 mL

Água destilada q.s.p.....100,00 mL

Solução NaOH 1 M

NaOH.....40,00 g

Água destilada q.s.p.....1000,00 mL

a partir da diluição desta solução foram obtidas as soluções de NaOH 0,01M e 0,5 M.

Solução de ácido tricloroacético (TCA) 50% (p/v)

TCA.....50,00 g

Água destilada q.s.p.....100,00 mL

As soluções de TCA 5 e 10% foram obtidas a partir da diluição desta solução.

Tampão PBS pH 7,4 (Na_2HPO_4 8,1 mM, KH_2PO_4 1,84 mM, NaCl 0,14 M e KCl 2,68 mM)

Fosfato dibásico de sódio.....1,15 g

Fosfato monobásico de potássio.....250,00 mg

Cloreto de sódio.....8,20 g

Cloreto de potássio.....200,00 mg

Água destilada q.s.p.....1000,00 mL

O pH foi ajustado para 7,4 com solução de ácido fosfórico 0,1 M e, em seguida, a solução foi esterilizada por autoclavação a 120°C , 2 ATMs durante 20 min.

4.1.3. Biológicos

Látex exudado de frutos imaturos de *Carica candamarcensis* originário do Chile, fornecidos pelo Prof. Dr. Carlos Edmundo Salas Bravo do Laboratório de Biologia Molecular de Produtos Naturais (ICB, UFMG, Belo Horizonte, M.G, Brasil).

Ratos albinos fêmeas, variedade Wistar, adquiridos do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (Cebio-ICB/UFMG) e do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais da Escola Paulista de Medicina da UNIFESP (CEDEME-EPM/UNIFESP).

Camundongos machos, variedade Swiss, adquiridos do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (Cebio-ICB/UFMG).

4.1.4. Equipamentos

Agitador Magnético modelo 252 (Fizatron Equipamentos Elétricos para Laboratório, São Paulo, SP, Brasil).

Banho Maria calibrado a 37°C (Fanem, São Paulo, SP, Brasil).

Balança analítica Toledo (Gehaka Eletro-Eletrônica Ltda, São Paulo, SP, Brasil).

Bomba Peristáltica Econo-Pump (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

Bomba de Vácuo Diapump (Fanem, São Paulo, SP, Brasil).

Centrifuga refrigerada de média rotação, modelo Z252MK, equipada com rotor modelo 220.87.V01 (Hemle Labortechnik, Gosheim, Alemanha).

Cuba de Eletroforese com sistema de refrigeração modelo Z37, 240-1 (Sigma Chemical Co, St. Louis, MD, EUA).

Espectrofotômetro de duplo feixe para faixas UV (ultra-violeta) e visível, modelo UV-150-02 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão).

Fonte de energia para eletroforese e transferência em “Western Blot” modelo Xi 3000, com ajuste digital de tensão, corrente e potência elétrica (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

Liofilizador modelo LI-5 acoplado à uma centrífuga tipo “speed vac” (Incibrás Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil).

Lupa entomológica (Westover, China).

Medidor de pH modelo NT-PH2 (Novatécnica Equipamentos para Laboratórios, Piracicaba, SP, Brasil), equipado com eletrodo modelo V-620 C (Analion Aparelhos & Sensores Ind. & Com., Ribeirão Preto, SP, Brasil).

Microscópios ópticos (OLYMPUS CX4IRE e OLYMPUS BX41, FIL; Nikon, modelo Alphaphot-2 YS2-T, JAP/POL, série 07197, Studar^{Lab}, Metrimpex, Hungria).

Refrigerador ajustado à temperatura de +4°C; freezer à temperatura de – 20°C (Consul-Multibrás Eletrodomésticos S/A, São Bernardo do Campo, SP, Brasil).

Sistema FPLC (Cromatografia Líquida de Rápida Performance) equipado com programador Gp 250 Plus, coletor de frações modelo FRAC-1000, registrador modelo REC 102, unidade de detecção UV modelo UV-1 e bombas modelo P-500 (Pharmacia LKB, Uppsala, Suécia).

Sistema HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Pressão-Performance) equipado com auto-injetor modelo SIL-10Ai, unidade de detecção UV modelo SPD 10Ai, bomba modelo FCV-10 e AL software Shimadzu HPLC LC-10 para controle e análise de experimentos (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão).

Sistema de ultrafiltração Amicon modelo 8200 (Amicon Inc., MA, EUA).

Ultra-sonicador modelo FS-28H (Fisher Scientific, EUA).

4.1.5. Diversos

Barras magnéticas (Fizatron, Equipamentos Eletrônicos para Laboratórios, São Paulo, SP, Brasil).

Material cirúrgico (Pinças, tesouras e porta-agulhas), agulhas (Procare – Cirúrgica), fio de sutura SUTURIM (Biodinâmica).

Pipetadores automáticos com capacidade máxima de 2, 20, 200 e 1000 µl, acompanhados de ponteiros de polipropileno (Gilson Sas, França).

Béqueres, Ehrlenmeyers, Funis, Pipetas graduadas, Provetas, Quitassatos, Balões volumétricos (Pyrex[®], Cidade do México, México)

Agulhas e seringas descartáveis (INJEX Indústrias Cirúrgicas, LTDA., Ourinhos, Brasil)

Lâminas e lamínulas (INVICTA, São Paulo, Brasil).

Microtubos de Fechamento Seguro de 500 e 1500 µL (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA e Eppendorf, Hamburg, Alemanha)

Placas de vidro com 8,0 x 10,0 x 0,3 cm de dimensões e aparatos para eletroforese (espaçadores e pentes), saco de diálise com poro 10 kDa de diâmetro (Sigma Chemical Co, St. Louis, MD, EUA).

Software Sigma Plot versão 5.0 para análise de resultados em forma gráfica e testes estatísticos (Sytat Software Inc., Richmond, CA, EUA), software Shimadzu HPLC LC-10 para análise de cromatografias em HPLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) e Software Kodak versão 1D-3.5 acoplada à câmera digital Kodak modelo DC-40 para digitalização de imagens de géis, cálculo do peso molecular das proteínas e determinação de densitometria de bandas em “Western Blot” e eletroforese. (Kodak Company, Rochest, NY, EUA).

Transiluminador com luz fluorescente para visualização de géis (EMB, Brasil).

Tubos de ensaio com 14 X 1 cm de dimensões (Vidrolabor-Thermex Astra Brasil Ind. Vidros, F. Vasconcelos, SP, Brasil).

Tubos de polipropileno, com fundo cônico, de 15 e 50 ml de capacidade e dotados de tampa rosqueável (Quimex Corning Incorporated, New York, NY, EUA).

4.1.6. Kits e anticorpos

Kit para imunohistoquímica - Estreptavidina-biotina-peroxidase (Ultra vision large volume detection system anti-polyvalent, HRP – pronto para uso – Lab Vision) (DAKO K0690).

Anticorpo anti-PCNA: NCL-L-PCNA (Vision biosystems, Novocastra, Reino Unido).

Anticorpo anti-PECAM-1/CD31: Rat CD31 (PECAM-1) MAB, Clone TLD-3A12 (Fitzgerald, EUA).

4.2. Métodos

4.2.1. Obtenção e caracterização da fração P1G10

Todo o processamento do látex e a caracterização foram feitos conforme PEREIRA et al. (2001). A partir de incisões no epicarpo de frutos imaturos, o látex foi coletado e armazenado a 4°C. Posteriormente, o mesmo foi liofilizado e armazenado, em freezer, à -20° C. Para a separação cromatográfica, foram dissolvidos 15,0 g do látex liofilizado em 75 mL de tampão de ativação. A mistura foi, então, agitada durante 30 min e centrifugada (9.000 g) durante 10 min a 4° C. O sobrenadante foi filtrado, sendo repetido o procedimento descrito acima com o resíduo, utilizando 25 mL do tampão de ativação. Os filtrados obtidos foram recolhidos, desprezando-se os resíduos.

A amostra obtida anteriormente foi aplicada em uma coluna contendo resina Sephadex G-10, após esta ter sido equilibrada com tampão acetato de sódio 1M. As frações coletadas foram triadas mediante a determinação da absorbância a 280 nm. As primeiras frações obtidas da coluna G-10 foram reunidas, formando o primeiro pico cromatográfico (P1G10).

Com um sistema de ultrafiltração, as amostras de P1G10 foram filtradas, lavando-as três vezes com água deionizada e recolhendo a solução residual, que posteriormente foi liofilizada. A determinação da concentração protéica

total e a atividade proteolítica específica do liofilizado foram realizadas como parâmetros para a caracterização da fração.

4.2.1.1. Determinação da atividade amidásica

A atividade amidásica das frações foi determinada com o substrato sintético BAPNA (BAEZA et al., 1990). Na determinação da atividade amidásica específica, 10 µg das frações foram incubados a 37°C com 1 mL do tampão de ativação juntamente com 3 µL da solução de BAPNA. Após surgimento de uma cor amarela, a reação foi paralisada com 60 µL de solução de ácido acético 60% (v/v). A determinação da concentração molar de *para*-nitro-anilida liberada (quantidade de produto formado) foi feita através da densidade ótica em 405 nm e sua relação com o coeficiente de extinção molar desta substância, que é 8800 M⁻¹.cm⁻¹. A atividade amidásica específica foi expressa em concentração molar de produto formado por unidade de massa da enzima em um determinado tempo, mais especificamente, nM produto x min⁻¹ x µg⁻¹ enzima.

4.2.1.2. Estimativa da concentração de proteína

A concentração protéica de P1G10 foi determinada através da técnica de Lowry-Folin, como descrito por DAWSON et al. (1995). Para tanto, as seguintes soluções foram preparadas:

- Solução 1: 2% de Na₂CO₃ em 0,1 mol/L de NaOH
- Solução 2: 0,5% de CuSO₄.5H₂O em 1% de citrato de sódio
- Solução 3: mistura de 50 mL da solução 1 e 1 mL da solução 2
- Solução 4: reagente de Folin 1:2 em água deionizada

A partir de uma solução de P1G10 (10 mg/mL) foi preparada uma solução de 30 µg/mL, aliquotando, em triplicata, 3 µL dessa solução e completando para 1 mL com a solução 3. Após homogeneização, a mistura foi deixada por 10 min em temperatura ambiente. Terminado este período, 100 µL da solução 4 foi adicionada, agitada e mantida em repouso por 30 min. A

absorbância das soluções foi determinada por leitura espectrofotométrica a 750 nm e os resultados foram interpolados na curva padrão de lisozima.

Curva padrão de lisozima: A partir de uma solução padrão de lisozima (10 mg/mL), foram preparados 1 mL, em triplicata, das seguintes soluções: 10, 20 e 30 µg/mL, sendo as diluições feitas com a solução 3. Homogeneizou-se as soluções, que foram deixadas em repouso por 10 min em temperatura ambiente. Após este período, 100µl da solução 4 foi adicionado e a mistura agitada e mantida por 30 min, também em temperatura ambiente para a determinação da absorbância em comprimento de onda de 750 nm. O espectrofotômetro foi zerado com uma solução contendo 1 mL da solução 3 e 100 µL da solução 4 (solução branco).

4.2.1.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante

O sistema de gel desnaturante utilizado continha um gel separador e um concentrador. Primeiramente, a solução do gel separador foi aplicada em uma placa de vidro com 8,0 x 10,0 x 0,3 cm de dimensões, munidas de espaçadores e vedantes de borracha. Após a polimerização, o gel concentrador foi adicionado sobre o gel separador e em seguida foi adicionado um pente com 10 dentes. Após a polimerização do gel concentrador, os pentes e os vedantes foram cuidadosamente retirados, sendo a montagem colocada na cuba de eletroforese contendo o tampão de corrida. Uma corrente elétrica de 80 V de tensão, 20 mA de corrente e 2 W de potência, foi aplicada durante 30 min a 4°C (pré-corrída). Um volume do tampão de amostra foi adicionado correspondente a 1/6 do volume total da amostra. Nas amostras contendo proteases também foi adicionado 1 µL de solução MMS 50 mM. Para desnaturação das amostras estas foram fervidas por 5 min, antes que fossem aplicadas no gel. A aplicação foi feita nas canaletas localizadas no pólo negativo do gel. A eletroforese foi desenvolvida em corrente elétrica de 80 V de tensão, 20 mA de corrente e 2 W de potência, durante aproximadamente 2 h a 7°C (LAEMMLI, 1970).

4.2.1.4. Coloração do gel por coomassie

Terminada a corrida eletroforética mergulhou-se o gel na solução fixadora por 30 min. Após este período, o gel foi lavado 2 vezes com água destilada para hidratá-lo. Depois foi adicionada a solução de azul-brilhante de coomassie para coloração de géis, permanecendo nesta por 30 min ou até o aparecimento das bandas. O fundo do gel ("background") foi descorado utilizando a solução descrita no item 4.1.2.. O gel foi fotografado (câmara Kodak DC-40) sobre um transiluminador para a análise dos resultados. A intensidade das bandas foi calculada por densitometria usando o software Kodak versão 1D-3.5 (GOMES et al., 2005).

4.2.1.5. Determinação da massa molecular

A massa molecular foi estimada através da análise do gel desnaturante corrido com padrões de peso molecular com massas conhecidas, Mark 12. A relação entre o logaritmo natural dos pesos moleculares dos padrões com sua distância de migração foi relacionada com a distância de migração das amostras testadas para determinação do peso molecular destas. Isto foi realizado usando o software Kodak versão 1D-3.5 (LAMBIN et al., 1979).

4.2.2. Inibição da atividade proteolítica de P1G10 com iodoacetamida (IAA)

Primeiramente, foi determinada a concentração de IAA necessária para inibição da atividade da fração P1G10. Para isso, foram incubados 2 μ M da enzima com concentrações variadas (2, 20, 200 e 2000 μ M) deste inibidor por 5 min à temperatura ambiente. A atividade amidásica foi então medida como descrito no item 4.2.1.1.. O resultado da atividade específica para as amostras com inibidor foi elaborado considerando a média dos valores obtidos para o controle (2 μ M de enzima sem inibidor) como sendo 100%.

A seguir, foram preparados 35 mL de uma solução aquosa de P1G10 na concentração de 2 mg/mL, à qual foram adicionados 4,9 µg de DTT. A solução resultante foi incubada à 4 °C, sob agitação constante, por 30 min. Após este período, foram adicionados 2,94 g de IAA e a solução foi incubada por mais 100 min. A amostra, então, foi dialisada com leve agitação contra 2.500 mL de água deionizada a 4°C durante 48 h (trocando a água a cada 12 h), para eliminar o excesso de inibidor. Ao final da diálise, a amostra foi submetida à medida da atividade amidásica (item 4.2.1.1.) para confirmação da inibição da fração. Só foram utilizadas amostras com atividade residual menor que 2,5 % (GOMES et al., 2005).

A fim de verificar se a inibição de P1G10 pela IAA não leva a degradação da proteína, as frações ativa e inibidas (P1G10 IAA) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, como descrito no item 4.2.1.3., utilizando como marcadores de peso molecular, lisozima, quimotripsinogênio e ovoalbumina.

4.2.3. Avaliação das atividades farmacológicas

Na avaliação das atividades, descritas a seguir, foram utilizadas amostras de P1G10 de um único lote (506c). Estas foram mantidas em freezer à – 20°C, sendo as soluções aquosas preparadas sempre no mesmo dia da realização dos experimentos, com o objetivo de manter a função das enzimas proteolíticas presentes na fração.

Todos os protocolos experimentais utilizando animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, Protocolo nº 215/07 (em Anexos).

4.2.3.1. Atividade gastroprotetora

Nos experimentos a seguir, foram utilizadas ratas Wistar, de 100-120 dias de idade, com 180-220 g, mantidas em gaiolas metabólicas individuais,

submetidas jejum de sólidos, 24 h antes dos experimentos, recebendo água *ad libitum*, sendo retirada sempre 1 h antes do início dos ensaios.

4.2.3.1.1. Lesões gástricas agudas induzidas por etanol

Os animais foram divididos em grupos (n = 5) e tratados, por gavagem, com água (controle), P1G10 (1 – 100 mg/kg) ou sucralfato (250 mg/kg), no volume de 5 mL/kg. Após 1 h do tratamento, os animais receberam etanol 96% (5 ml/kg), também, por gavagem para indução das lesões. Decorrida 1 h, os animais foram sacrificados, os estômagos foram removidos e abertos ao longo da curvatura maior. A mucosa foi lavada com água destilada gelada e estendida para inspeção e quantificação das lesões gástricas (item 4.2.3.6.) (ROBERT et al., 1979).

4.2.3.1.2. Lesões gástricas agudas induzidas por estresse – imobilização e hipotermia

A indução das lesões foi realizada conforme descrito por SENAY & LEVINE (1971). Os animais foram divididos em grupos (n = 5) e receberam água (controle), P1G10 (0,1 – 10 mg/kg) ou ranitidina (100 mg/kg), no volume de 5 mL/kg, por gavagem. Após 1 h do tratamento, os animais foram imobilizados em contensores confeccionados com garrafas plásticas e colocados em câmara fria à temperatura de 4 °C durante 3 h. Após esse período, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os estômagos foram removidos para inspeção e quantificação das lesões gástricas, como descrito no item 4.2.3.6..

4.2.3.1.3. Lesões gástricas agudas induzidas por ligadura pilórica

A ligadura pilórica foi realizada conforme descrito por SHAY (1945). Os animais foram divididos em grupos (n = 5) e receberam, por gavagem, água (controle), P1G10 (0,1 – 10 mg/kg) ou omeprazol (10 mg/kg), no volume de 5

mL/kg. Após 1 h, foram anestesiados com a solução anestésica administrada *i.m.* na dose de 0,1 ml/100 g de peso corporal e fixados em decúbito dorsal em uma placa de cortiça. Através de uma incisão de cerca de 2 cm no abdômen, o estômago foi localizado, exposto e o piloro amarrado com linha cordonê. A parede abdominal e a pele foram suturadas. Após 4 h da cirurgia, os animais foram sacrificados e os estômagos removidos com o esôfago pinçado, para evitar perda do material secretado, e abertos pela maior curvatura, sobre placa de Petri em gelo. A mucosa foi lavada com 3,0 mL de água destilada e o suco gástrico (lavado) recolhido em tubos de ensaio imersos em gelo, para posterior estudo da secreção gástrica (itens 4.2.3.2.1 A e B). Os estômagos foram coletados para análise das ulcerações, que foi processada como descrito no item 4.2.3.6..

4.2.3.2. Estudo de vias envolvidas no efeito gastroprotetor

4.2.3.2.1. Análise de parâmetros bioquímicos do conteúdo gástrico de ratos submetidos à ligadura do piloro

A – Medida do volume, pH e acidez total da secreção gástrica

O lavado gástrico recolhido conforme descrito no item 4.2.3.1.3., foi centrifugado a 1.500 rpm/30 min/4 °C. O sobrenadante foi transferido para uma proveta e o volume determinado. Desse volume foram retirados 300 µL para determinação da atividade péptica, conforme item 4.2.3.1. B. O conteúdo da proveta foi então completado para um volume final de 10 mL, com água destilada, para determinação da acidez livre (pH), em pHmetro e da acidez total, por titulação com NaOH 0,01 M, utilizando solução de fenolftaleína 2% como indicador de neutralização (VISSCHER et al., 1954).

B – Determinação da atividade péptica

As amostras de 300 µL do suco gástrico coletado como descrito em 4.2.3.1.3. foram transferidas para tubos de ensaio e incubadas com 1 mL de solução de albumina bovina fração V (5 mg/mL HCl 0,06N) a 37°C por 10 min. A reação foi interrompida, adicionando-se 1 mL de TCA 10% e os tubos foram centrifugados a 1.500 g/20 min. A seguir, 1 mL do sobrenadante foi separado e alcalinizado com 5 mL de carbonato de sódio 0,55 M. Adicionou-se 500 µL de reagente de Folin 1 N aos tubos, que foram incubados por 30 min a temperatura ambiente. A absorbância das soluções foi determinada por leitura espectrofotométrica a 660 nm e os resultados foram interpolados na curva padrão de tirosina (ANSON, 1938).

Curva padrão de tirosina: A partir de uma solução padrão de tirosina (1mg/mL), foram preparados 4 mL, em triplicata, das seguintes soluções: 200; 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 µg/mL. A cada tubo foram adicionados 5 mL de carbonato de sódio 0,55 M e 0,5 mL do Reagente de Folin 1N. Após agitação as soluções foram deixadas por 30 min em repouso, à temperatura ambiente. Após esse período, foi feita a leitura espectrofotométrica a 660 nm das amostras, determinando-se a equação da curva utilizando as médias ± erro padrão.

4.2.3.2.2. Avaliação da participação do NO no efeito gastroprotetor

A participação do NO foi avaliada baseada no método descrito por ARRIETA et al. (2003), onde os animais (n = 5) foram pré-tratados com L-NAME (100 mg/kg) ou salina, i.p.. Após 30 min, os animais receberam, por gavagem, água ou P1G10 (10 mg/Kg). Decorridos outros 30 min, foi administrada s.c., indometacina (50 mg/kg) para indução de lesões gástricas (conforme item 4.2.3.4.1). O tratamento foi repetido, 3 h após o primeiro e 5 h após da administração de indometacina, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Os estômagos foram retirados e a mucosa examinada para quantificação das lesões gástricas como descrito em 4.2.3.6..

4.2.3.2.3. Quantificação de glutatona reduzida (GSH) gástrica

Os animais (n = 5) foram submetidos à indução de úlceras pela administração s.c. de indometacina 50 mg/kg (conforme item 4.2.3.4.1.). Após 5 h da administração do agente lesivo, os animais foram sacrificados, os estômagos coletados e deles retirados fragmentos da porção glandular, os quais foram imediatamente pesados e congelados a -70°C. Os fragmentos congelados foram homogeneizados com EDTA 0,02 M na proporção de 1 mL desta solução para cada 100 mg de tecido. Alíquotas de 400 µl do homogenato da mucosa gástrica em tubos eppendorf foram misturadas com 320 µl de água destilada e 80 µL de TCA 50%, para precipitar proteínas. As amostras foram centrifugadas a 3.000 g, durante 15 min. Alíquotas de 400 µl do sobrenadante foram separadas e a estas adicionados 800 µl de tampão Tris 0,4 M (pH 8,9) e a reação foi iniciada com a adição de 20 µl de DTNB 0,01 M. A solução foi agitada por 2 min e dentro de 5 min após a adição do DTNB, procedeu-se a leitura espectrofotométrica (412 nm). Todos os procedimentos foram realizados a 4°C. Os valores individuais foram interpolados numa curva padrão de GSH e expressos em µg GSH/g tecido (SEDLAK & LINDSAY, 1968).

Curva padrão de GSH: A partir de uma solução padrão de GSH (1 mg/mL), foram preparados 4 mL, em triplicata, das seguintes soluções: 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 µg/mL. A 400 µl das soluções foram adicionados 800 µl de Tampão Tris 0,4 M (pH 8,9) e em seguida, 20 µl de DTNB. Após agitação durante 2 min, foi feita a leitura espectrofotométrica a 412 nm das amostras, determinando-se a equação da curva utilizando as médias ± erro padrão.

4.2.3.3. Avaliação do efeito de P1G10 sobre a motilidade gastrointestinal

Nesta avaliação foram utilizados camundongos Swiss, com 6-8 semanas, pesando 30-35 g, submetidos à um ciclo de claro/escuro de 12/12 h, submetidos a jejum de 6 h, antes do experimento.

4.2.3.3.1. Esvaziamento gástrico de semi-sólidos

Camundongos Swiss (n = 6) receberam por gavagem, água (controle tempo 0 e 30 min), P1G10 (0,1 – 10 mg/kg), metoclopramida (30 mg/kg) ou atropina (3 mg/kg), e após 1 h foi administrado, também por gavagem, o marcador colorido semi-sólido (vermelho de fenol 0,05 % em carboximetilcelulose 1,5 %). O grupo controle tempo zero, foi sacrificado por deslocamento cervical, logo após a administração do marcador colorido, e os outros grupos após 30 min da administração. A cavidade abdominal foi aberta, o piloro e a parte distal do esôfago foram pinçados, o estômago retirado com seu conteúdo e então aberto e lavado com 7 mL de água destilada. O conteúdo gástrico coletado foi centrifugado a 1500 x g por 15 min. Foi coletado 1 mL do sobrenadante, ao qual foi adicionado 1 mL de NaOH 1 M. Os resultados foram obtidos por leitura espectrofotométrica a 560 nm, e expressos em porcentagem de esvaziamento gástrico em relação ao grupo controle tempo zero (SCARPIGNATO et al, 1980).

4.2.3.3.2. Trânsito Intestinal

Camundongos Swiss (n = 6) foram tratados por gavagem, com água (controle tempo 0 e 30 min), P1G10 (0,1 – 10 mg/kg), metoclopramida (30 mg/kg) ou atropina (3 mg/kg), e após 1 h foi administrado, também por gavagem, o marcador colorido semi-sólido (vermelho de fenol 0,05 % em carboximetilcelulose 1,5 %). O grupo controle tempo zero foi sacrificado, por deslocamento cervical, imediatamente após a administração. A cavidade abdominal foi aberta e o intestino delgado foi removido. Com auxílio de uma régua, foi determinado o comprimento do intestino delgado de cada animal (distância entre o piloro até a válvula ileocecal), e a distância percorrida pelo marcador (até a última porção que continha pelo menos 1 cm contínuo do marcador). Os resultados foram expressos em porcentagem da distância percorrida pelo marcador em relação ao comprimento total do intestino delgado (STICKNEY & NORTHUP, 1959).

4.2.3.4. Avaliação da importância da atividade proteolítica de P1G10 em seu efeito anti-úlceras

4.2.3.4.1. Gastroproteção – Lesões gástricas agudas induzidas por indometacina

A indução de lesões gástricas pela indometacina foi realizada conforme DJAHANGUIRI (1969). Os animais foram divididos em grupos (n = 5) e tratados por gavagem com água (controle), P1G10 (10 mg/kg), P1G10 inibido com IAA (P1G10 IAA – 10 mg/kg) ou tripsina (10 mg/kg), num volume de 5 mL/kg. Após 30 min do tratamento, os animais receberam s.c. indometacina 50 mg/kg, como indutor de lesões gástricas. Após 3 h da indução das lesões, o tratamento foi repetido e 5 h após a administração de indometacina, os animais foram sacrificados e o estômago destes retirados para inspeção da mucosa, como descrito no item 4.2.3.6..

4.2.3.4.2. Cicatrização – Lesões gástricas crônicas induzidas por ácido acético

A indução das ulcerações foi feita conforme o método descrito por TAKAGI et al (1969). Durante um período de 5 dias os animais tiveram restringido o fornecimento de ração sólida para 2 h diárias, entre 8 – 9 e 16 – 17 h, com acesso livre à água. Terminado este período os animais foram submetidos ao jejum de 24 h e foi efetuada uma laparotomia abdominal na região epigástrica, sob anestesia, utilizando a solução anestésica na dose de 0,1 mL/100 g de peso corporal. Após a exposição do estômago, foi injetada na região subserosa da parede externa do órgão, 50 µl de solução aquosa de ácido acético 10% nas faces anterior e posterior. O estômago foi lavado cuidadosamente com salina 0,9% e a parede abdominal suturada. Após a recuperação da anestesia os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas sob o esquema de restrição alimentar de 2 h diárias, descrito anteriormente. Os tratamentos foram iniciados 24 h após o procedimento cirúrgico e repetido uma

vez ao dia, durante um período de 8 dias. Os animais receberam água (controle), P1G10 (10 mg/kg), P1G10 IAA (10 mg/kg) ou tripsina (10 mg/kg), num volume de 5 mL/kg. Ao final deste período, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e seus estômagos retirados para avaliação macroscópica (item 4.2.3.6.), histológica e imunohistoquímica (itens 4.2.3.5.1. e 4.2.3.5.2.). Foi realizado acompanhamento do peso dos animais durante todo o procedimento, para adequado ajuste da dose, e avaliação da variação da massa corporal.

4.2.3.5. Estudo de eventos envolvidos na atividade cicatrizante gástrica

4.2.3.5.1. Análise histológica

Os estômagos dos ratos submetidos à indução de úlceras gástricas por ácido acético e tratados com P1G10, P1G10 IAA e veículo (item 4.2.3.4.2) foram isolados, abertos e as lesões localizadas. As mesmas foram seccionadas e fixadas em solução tamponada de formol a 10% por 24 h. As amostras foram processadas como de rotina para inclusão em parafina, e cortadas em secções de 4 µm de espessura. As lâminas obtidas foram submetidas à coloração por HE ou hematoxilina-eosina (BEHMER et al., 1976) para análises morfológicas em microscopia de luz. Foram preparados cortes em lâminas cobertas com gelatina para a realização de técnica de imunohistoquímica para o estudo da proliferação celular e angiogênese.

4.2.3.5.2. Análises imunohistoquímica e morfométrica da proliferação celular e angiogênese

Na análise imunohistoquímica, foi utilizada a técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase, usando o Kit Ultra vision large volume detection system anti-polyvalent, HRP (Lab Vision - DAKO), sendo empregada recuperação antigênica usando solução de Retrieval pH 6 em calor úmido durante 20 min. As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 1 h com o anticorpo

primário (anti-PCNA – diluição de 1:200; anti-CD31 – diluição de 1:20), por 25 min na etapa de bloqueio da peroxidase endógena e por 15 min na aplicação do soro de bloqueio, anticorpo secundário, e da estreptavidina peroxidase. O cromógeno utilizado foi o DAB, em incubação durante 10 min e foi feita a contra-coloração com hematoxilina de Meyer por mais 10 min.

A taxa de proliferação celular foi determinada utilizando o marcador anti-PCNA, sendo analisadas as áreas de maior número de células marcadas positivamente na borda da úlcera. Foram selecionados 5 campos, no aumento de 600x onde foram contabilizadas um total de 500 células entre marcadas negativa e positivamente. O índice de proliferação foi dado como porcentagem de células marcadas positivamente em relação ao total de células. Como controle positivo interno foi considerado a marcação nuclear das células da camada basal da epiderme, os controles negativos foram obtidos pela substituição do anticorpo primário pelo soro normal.

O índice angiogênico foi determinado utilizando o marcador anti-PECAM-1/CD31, através da técnica de contagem microvascular (MVC) segundo MAEDA (1995), sendo analisadas as áreas de tecido de granulação com maior número de vasos por campo. As áreas de maior vascularização foram identificadas utilizando-se um aumento de 600x. Qualquer célula ou grupo celular endotelial, corado positivamente separado dos microvasos adjacentes e de outros elementos do tecido conjuntivo, foi considerado como um vaso unitário, assim como, também, os vasos contendo lúmen. Estruturas ramificadas foram contadas como vasos, mesmo com descontinuidade na sua estrutura. A contagem dos vasos procedeu-se em cinco campos, selecionados previamente como de elevada densidade vascular.

4.2.3.6. Avaliação das Lesões Gástricas

Em todos os protocolos descritos acima, os estômagos foram estendidos com auxílio de alfinetes sobre uma plataforma de parafina e realizada a quantificação das lesões gástricas presentes na mucosa da área do corpo estomacal, a qual foi realizada com auxílio de uma lupa entomológica, sendo

os resultados expressos como índice de lesões, número de úlceras e índice de ulceração, calculados como se segue (MESIA-VELA, 1998) (em Anexos):

Índice de lesões (I.L.): Para o cálculo do índice de lesões, foram avaliados alguns parâmetros, que compreendem: perda de pregas, descoloração da mucosa ou hiperemia, presença de edema, petéquias e hemorragia. De acordo com a intensidade com que ocorrem foram avaliados em: leve (1 ponto), moderado (2 pontos) ou intenso (3 pontos). Com as pontuações aplicadas a cada situação, através do somatório de todos os parâmetros avaliados foi calculado o I.L..

Número de úlceras: O número de lesões foi determinado através da contagem das ulcerações.

Índice de úlceras (I.U.): Cada úlcera identificada teve seu comprimento medido e o valor obtido foi multiplicado um fator, de acordo como o que se segue: quando o comprimento das lesões foram menores ou iguais a 1mm, seu valor foi multiplicado por 1; quando estas eram maiores que 1 mm, o valor do comprimento foi multiplicado por 1,5. Através do somatório de todos os valores encontrados, para cada animal, foi obtido o I.U..

Índice de Lesão Ulcerativa (I.L.U.): Somatório do I.L. e do I.U..

Na avaliação das lesões gástricas induzidas por ácido acético, o I.L.U. foi calculado, considerando os mesmos parâmetros descritos anteriormente. Entretanto, no cálculo do I.U. foi considerada a medida da área da lesão (expressa em mm²), calculada pelo produto da medida do comprimento e pela largura da mesma, observando-se os dois maiores eixos em ângulo de 90°.

4.2.4. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como médias \pm erro padrão das médias e as análises estatísticas foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA), seguidas pelo teste de múltipla comparação, utilizando-se o método de Student Newman-Keuls. Quando foram realizadas comparações somente com o grupo controle, foi utilizado o método de Dunnet. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como significativos.

5. RESULTADOS

Resultados prévios do nosso grupo têm mostrado que a fração P1G10 apresenta atividade antiúlcera gástrica em modelos animais (MELLO et al., 2008). No entanto, esse estudo esteve limitado quanto aos aspectos analisados, tendo sido avaliado o efeito sobre lesões induzidas por indometacina e ácido acético. Em vista das atividades protetoras e cicatrizantes gástricas observadas, necessário se faz ampliar essa avaliação pré-clínica e buscar esclarecer o modo de ação dessa fração proteolítica. Assim, a seguir são descritos os resultados referentes ao estudo da atividade antiúlcera gástrica de P1G10 em diferentes modelos de ulcerogênese e de modulação de mediadores da homeostase gástrica.

5.1. *Obtenção e caracterização da fração P1G10*

O látex liofilizado foi dissolvido em tampão de ativação e aplicado a uma coluna cromatográfica Sephadex G-10. A separação em dois picos bem definidos, P1G10 e P2G10 se fez a partir do perfil protéico (absorbância a 280 nm) (Figura 3). O pico P1G10 corresponde às frações 25 a 42 e o P2G10 às frações 48 a 66. As frações que compõem o pico P1G10 foram reunidas e submetidas à concentração e liofilização como descrito no item 4.2.1.. De 15 g de látex aplicados na coluna, foram obtidos 4,23 g de P1G10, representando um rendimento de 28%. A atividade amidásica específica foi de $29,09 \text{ nM} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (item 4.2.1.1.) e a quantidade de proteína total de $84,6 \pm 1,60 \%$ (medido conforme item 4.2.1.2.).

Para avaliação da composição protéica, foi realizada uma eletroforese em condições desnaturantes, onde a análise do gel mostrou a presença de um perfil protéico compatível com os obtidos de preparações prévias de P1G10 (Figura 4). A análise densitométrica do gel, usando o software Kodak versão 1D35, mostrou que o grupo mais abundante de proteínas continha massa relativa ao redor de 23 kDa, concordando com resultados prévios do nosso

grupo. Em todos os experimentos realizados neste trabalho, foi utilizado o mesmo estoque de P1G10, cujo perfil é mostrado na canaleta 4.

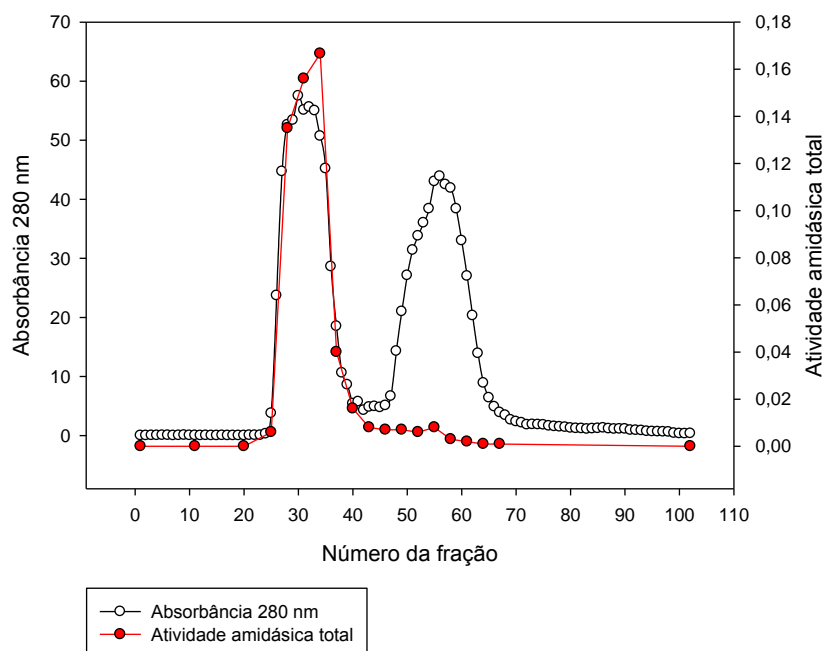


Figura 3: Perfil cromatográfico da solução de látex após filtração em coluna “Sephadex G-10”. A solução do látex foi aplicada sobre a coluna Sephadex G10, sendo o perfil protéico e atividade amidásica determinados conforme descrito na metodologia (item 4.2.1).

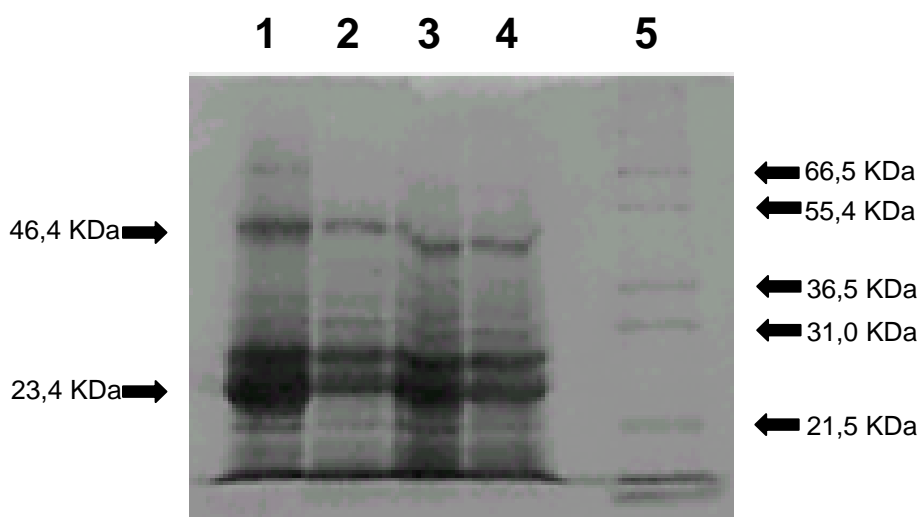


Figura 4: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em condições desnaturantes de diferentes estoques de P1G10. Canaleta 1-3: P1G10; Canaleta 4: P1G10 utilizada nos experimentos deste trabalho. Canaleta 5: Padrão de peso molecular (Mark 12). Uma alíquota contendo 30 µg de cada amostra foi aplicada. Detalhes experimentais descritos no item 4.2.1.3.. O gel foi corado por coomassie blue como descrito em 4.2.1.4. e a determinação da massa molecular foi realizada como descrito no item 4.2.1.5..

5.2. Inibição da atividade proteolítica de P1G10 com iodoacetamida (IAA)

A fim de verificar se os efeitos farmacológicos de P1G10 dependem da sua atividade proteolítica, obtivemos P1G10 inibida com IAA, um bloqueador covalente irreversível de grupamentos tióis, os quais estão presentes nos sítios-ativos de cisteína proteases.

Na Figura 5A é apresentado o perfil de inibição da fração, através da medida da atividade amidásica específica, residual, expressa como porcentagem da atividade original. Com o aumento da concentração molar de IAA, houve um decréscimo da atividade amidásica de P1G10. A concentração do inibidor, 2000 μM , que proporcionou uma atividade residual de 1,9%, foi escolhida para as inibições seguintes.

Posteriormente, no intuito de se avaliar a integridade da amostra após o procedimento de inibição, foi realizada uma eletroforese em condições desnaturantes. A Figura 5B mostra o perfil eletroforético obtido tanto para a fração ativa (P1G10) quanto para a inibida (P1G10 IAA), de diferentes estoques. A análise do gel mostrou que a inibição da fração não promoveu sua degradação, obtendo-se um perfil protéico reproduzível a partir de todas as preparações testadas.

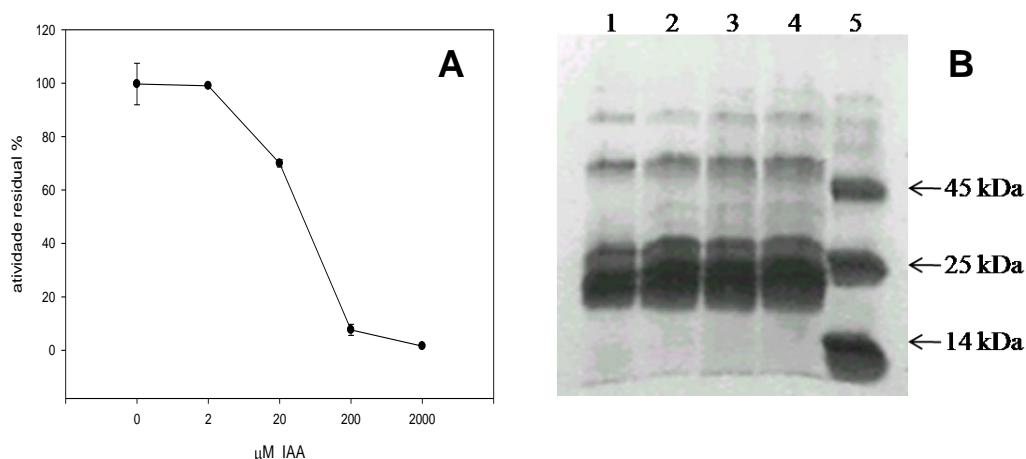


Figura 5: Inibição da atividade proteolítica de P1G10 com IAA. A- Curva de Inibição: P1G10, na concentração de 2 μM foi incubada com concentrações crescentes do bloqueador irreversível de grupos tiólicos, IAA, para inibição de sua atividade proteolítica, como descrito no item 4.2.2.. A maior concentração testada do inibidor foi escolhida para as inibições subsequentes. B- Eletroforese em gel desnaturante. Uma amostra de 30 μg foi aplicada em cada canaleta (item 4.2.2.). Canaleta 1: P1G10; Canaletas 2-4: P1G10-IAA de diferentes estoques; Canaleta 5: Padrões de peso molecular (lisozima, quimotripsinogênio e ovalbumina).

5.3. Avaliação da atividade gastroprotetora de P1G10

A seguir são apresentados os resultados obtidos com a fração proteolítica P1G10 em modelos experimentais de lesões gástricas agudas.

5.3.1. Avaliação do efeito de P1G10 sobre lesões promovidas por etanol

A indução de úlceras por etanol é um dos modelos mais utilizados no estudo da atividade antiúlcera de novas substâncias, e foi feita conforme descrito no item 4.2.3.1.1.. A administração de etanol 96% induziu a produção de lesões profundas na mucosa gástrica, acompanhada pela perda de pregas, aparecimento de edema e hemorragia características, analisadas com o auxílio de uma lupa entomológica.

A perda das pregas gástricas e o aparecimento de edema e hemorragia, quantificados pelo I.L., foram 30% menores no grupo pré-tratado com P1G10 10 mg/kg ($5,67 \pm 2,19$), mas não significativamente diferente do observado no grupo controle ($8,25 \pm 1,11$ – $p > 0,05$, ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). No grupo tratado com sucralfato 250 mg/kg (controle positivo) observou-se uma redução significativa de 73% ($2,25 \pm 0,75$ – $p < 0,01$) nesse índice (Figura 6A). Já as ulcerações na mucosa gástrica induzidas pela administração do etanol foram menores (em tamanho e quantidade) nos grupos pré-tratados com o P1G10 10 mg/kg ($14,67 \pm 2,61$) e sucralfato ($8,00 \pm 1,16$), reduzindo o número de úlceras em 43% ($p < 0,05$) e 68% ($p < 0,01$), respectivamente, comparando-se ao controle ($25,00 \pm 1,87$ – ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls) (Figura 6B).

A partir dos parâmetros analisados foi determinado o I.L.U. (Figura 6C), o qual foi reduzido em 40% no grupo pré-tratado com o P1G10 10 mg/kg ($118,33 \pm 6,96$ $p < 0,01$) e em 79% no grupo tratado com Sucralfato ($36,88 \pm 10,94$ – $p < 0,001$), em relação ao grupo controle ($194,63 \pm 9,04$ – ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

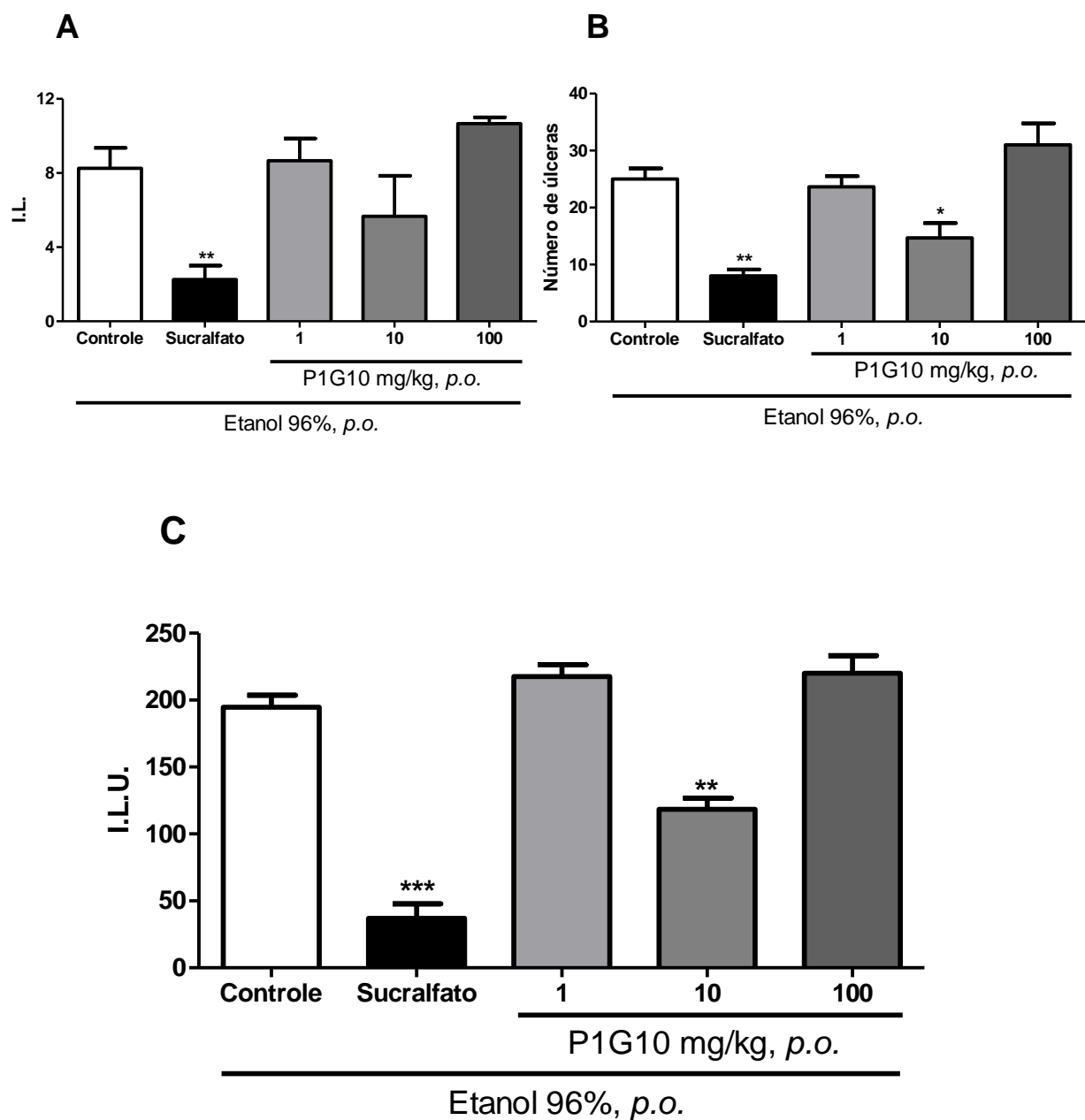


Figura 6: Avaliação da atividade gastroprotetora da fração P1G10 em modelo de úlcera induzida por etanol. Ratas Wistar (n=5) foram pré-tratadas *p.o.* com P1G10 (1-100 mg/kg) ou sucralfato (250 mg/kg). Após 60 min, receberam por gavagem, etanol 96% para indução das lesões. Decorridos outros 60 min, foram sacrificadas, seus estômagos retirados para inspeção da mucosa (ROBERT et al., 1974). A - Índice de lesão (IL); B - Número de úlceras; C - Índice de lesão ulcerativa (ILU). * diferente estatisticamente do Controle, $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA seguida de pós-teste Student Newman-Keuls)

5.3.2. Avaliação do efeito de P1G10 sobre lesões promovidas por estresse

As lesões por estresse foram induzidas utilizando contensão e frio, como descrito no item 4.2.3.1.2. O estresse induziu a produção de lesões na mucosa gástrica acompanhada por perda de pregas, edema e hemorragia, porém, menos intensas que as observadas com o etanol.

Como se pode observar na Figura 7A, o pré-tratamento com P1G10 (0,1, 1 e 10 mg/kg) protegeu a mucosa gástrica contra a perda das pregas, o aparecimento de edema e hemorragia promovidos pelo estresse, reduzindo o I.L. em 44% ($3,20 \pm 0,59$, $p < 0,001$), 35% ($3,75 \pm 0,22$, $p < 0,01$) e 35% ($3,75 \pm 0,22$, $p < 0,01$), respectivamente, em relação ao controle ($5,75 \pm 0,22$ – ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). A ranitidina (100 mg/kg) foi utilizada como controle positivo e reduziu em 51% o I.L. ($2,80 \pm 0,18$ – $p < 0,001$), produzido pelo estresse.

As ulcerações na mucosa gástrica induzidas pelo estímulo estressante foram menores (em quantidade) nos grupos pré-tratados com P1G10 em doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg, reduzindo o número de úlceras em 82, 78 e 86% ($3,25 \pm 0,75$; $4,00 \pm 0,41$ e $2,5 \pm 1,32$ – $p < 0,001$), respectivamente, e em 98% no grupo da ranitidina ($0,40 \pm 0,24$ – $p < 0,001$), quando comparados ao grupo controle ($18,25 \pm 3,06$ – ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls) (Figura 7B).

Todos os parâmetros analisados na mucosa gástrica se resumem no I.L.U., que foi reduzido em 88, 84 e 88% ($6,12 \pm 0,43$; $7,75 \pm 0,25$ e $5,67 \pm 1,04$ – $p < 0,001$) nos grupos pré-tratados com P1G10 nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg, respectivamente, e em 94% no grupo tratado com ranitidina ($3,00 \pm 0,32$ – $p < 0,001$) em relação ao controle ($49,33 \pm 5,37$ – ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls) (Figura 7C).

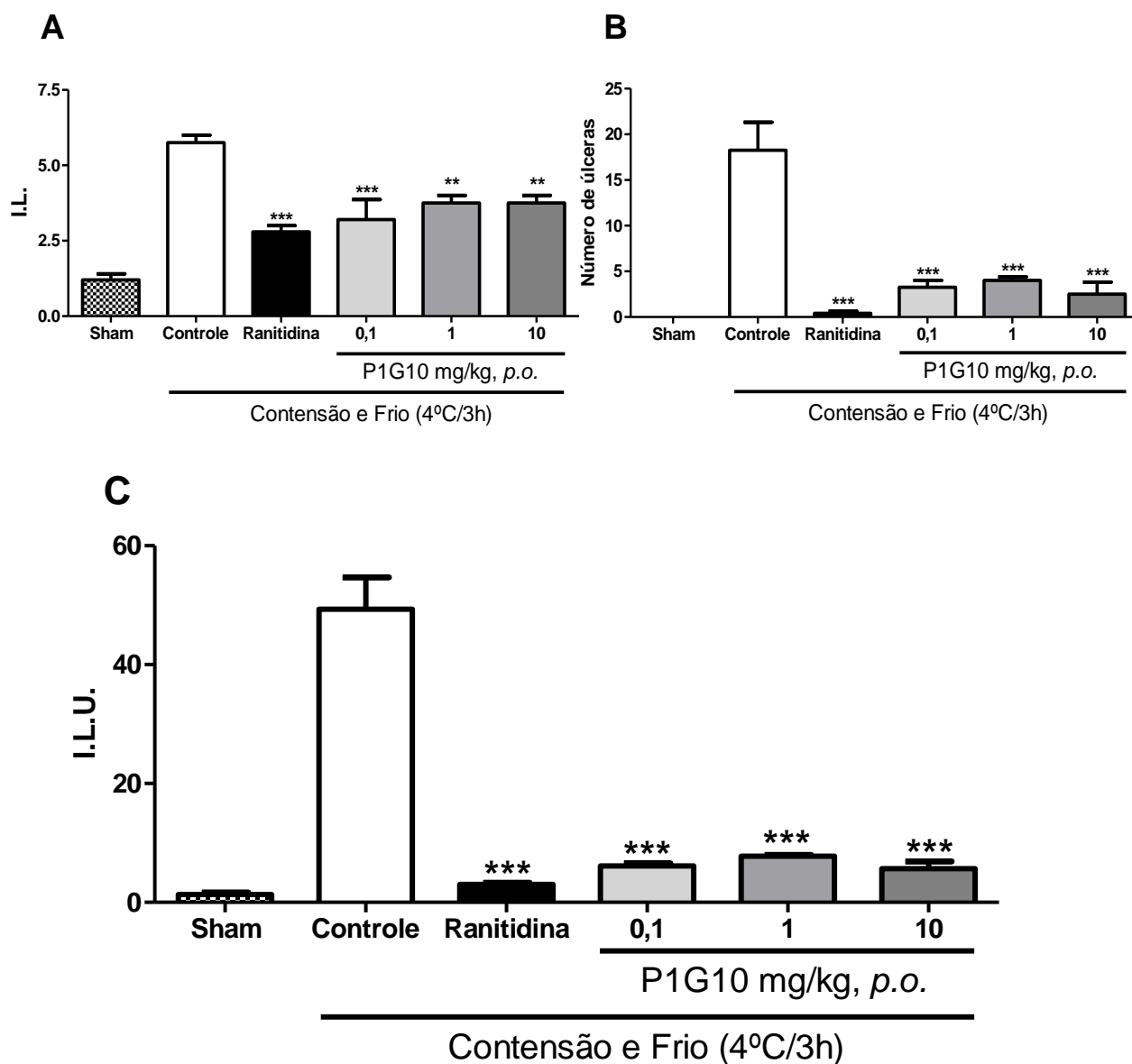


Figura 7: Avaliação da atividade gastroprotetora da fração P1G10 em modelo de úlcera induzida por estresse (imobilização e frio). Ratas Wistar (n=5) receberam P1G10 (0,1-10 mg/kg) ou ranitidina (100 mg/kg) e após 60 min foram imobilizadas e colocadas em geladeira à 4°C por 3 h). A - Índice de lesão (IL); B - Número de úlceras; C - Índice de lesão ulcerativa (ILU). ** diferente estatisticamente do Controle, $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (ANOVA seguida de pós-teste Student Newman Keuls).

5.3.3. Avaliação do efeito de P1G10 sobre lesões promovidas pela ligadura pilórica

Com a ligação pilórica, descrita no item 4.2.3.1.3., ocorre o acúmulo de ácido estomacal, o qual promove lesões necrotizantes na mucosa gástrica. O pré-tratamento com P1G10 em qualquer das doses (0,1 mg/kg, $3,25 \pm 1,11$; 1 mg/kg, $3,25 \pm 0,48$; 10 mg/kg, $2,50 \pm 0,64$ – $p > 0,05$) não impediu o aparecimento de petéquias, edema e hemorragia, como ilustrado pelo I.L. (Figura 8A). Este índice apareceu diminuído no grupo tratado com Omeprazol 10 mg/kg ($1,50 \pm 0,50$ – $p > 0,05$), mas não diferiu estatisticamente do grupo controle ($3,75 \pm 1,11$ – ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

Já em relação à ocorrência de ulcerações, P1G10 na dose de 10 mg/kg protegeu significativamente a mucosa gástrica, reduzindo em 71% ($0,25 \pm 0,25$ – $p < 0,05$) o número de ulcerações, em relação ao controle ($3,33 \pm 0,88$ ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). O omeprazol (controle positivo) também foi eficaz em reduzir o número de úlceras, sendo a redução de 66% ($0,50 \pm 0,25$ – $p < 0,05$,) como mostrado na Figura 8B.

O I.L.U. foi reduzido no grupo tratado por P1G10 10 mg/kg, sendo a redução de 64% ($6,25 \pm 2,56$ – $p < 0,05$) em relação ao grupo controle ($17,62 \pm 2,57$ – ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls) (Figura 8C). Já no grupo tratado com omeprazol, a redução foi de 74% ($4,50 \pm 1,14$ – $p < 0,01$) (Figura 8C).

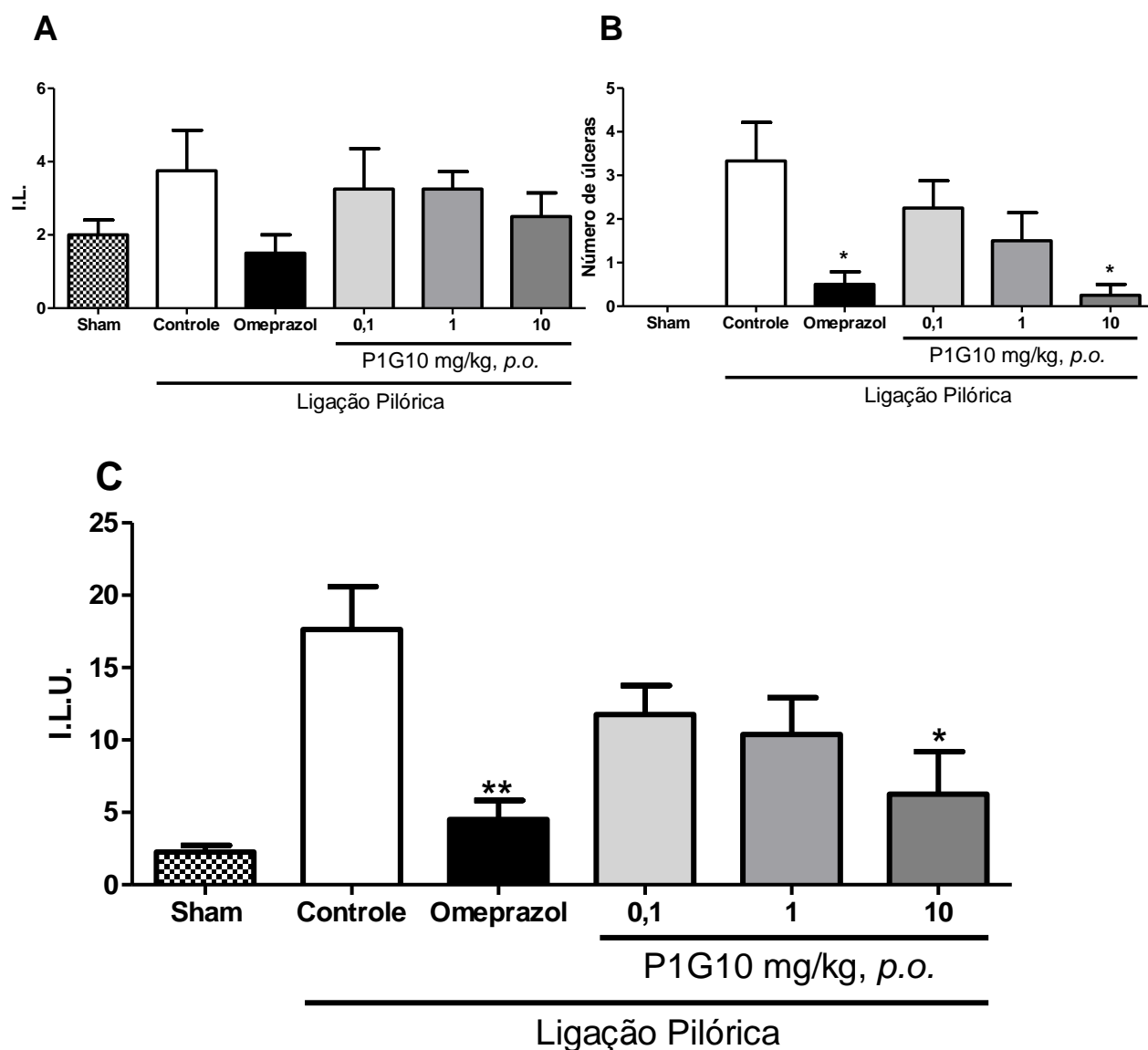


Figura 8: Avaliação da atividade gastroprotetora da fração P1G10 em modelo de úlcera induzida por ligadura pilórica. Ratas Wistar (n=5) receberam P1G10 (0,1-10 mg/kg) ou omeprazol (10 mg/kg) e após 60 min foram submetidas a ligadura do piloro. Após 4 h, os animais foram sacrificados e os estômagos analisados. A - Índice de lesão (IL); B - Número de úlceras; C - Índice de lesão ulcerativa (ILU). * diferente estatisticamente do Controle, $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (ANOVA seguida de pós-teste Student Newman Keuls).

5.4. Estudo de vias envolvidas no efeito gastroprotetor de P1G10

Nessa etapa de estudo, a fração P1G10 foi utilizada na dose de 10 mg/kg, por termos verificado ser essa a dose mais eficaz em proteger o estômago das lesões promovidas pelos diferentes agentes testados.

5.4.1. Análise dos parâmetros bioquímicos do conteúdo gástrico de ratas tratadas com P1G10

5.4.1.1. Medida do volume, pH e acidez total da secreção gástrica

Os resultados obtidos na análise dos parâmetros bioquímicos do conteúdo gástrico estão expressos na Tabela 1. A fração P1G10 foi eficaz em aumentar significativamente o pH gástrico em todas as doses testadas, mas não alcançando níveis tão significativos como os vistos com o omeprazol (10 mg/kg), que elevou o pH de $2,71 \pm 0,14$ para $4,98 \pm 0,68$. Com relação ao volume gástrico secretado, qualquer das substâncias testadas foi incapaz de reduzi-lo, quando comparadas ao grupo controle ($4,40 \pm 0,21$ mL). Quanto à acidez total, observou-se que a fração P1G10 em todas as doses e o omeprazol foram eficazes em reduzi-la ($p < 0,05$). As reduções foram de 55% ($1,15 \pm 0,10$ mEq/mL/4h), 42% ($1,48 \pm 0,27$ mEq/mL/4h), 42% ($1,50 \pm 0,20$ mEq/mL/4h) e 71% ($0,74 \pm 0,24$ mEq/mL/4h, $p < 0,05$), respectivamente, em relação ao controle ($2,58 \pm 0,09$ mEq/mL/4h – ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

5.4.1.2. Determinação da atividade péptica

O efeito de P1G10 sobre a atividade péptica foi avaliado em animais submetidos à ligadura pilórica. Como mostrado na Figura 9, este procedimento promoveu o aumento da atividade péptica em 58% (Controle: $22,94 \pm 5,09$ – $p < 0,05$), em relação ao grupo não lesado (Sham – $9,53 \pm 1,28$ µgTyr/mL/4h – ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). O tratamento com a fração P1G10

nas doses de 1 e 10 mg/kg foi capaz de reduzir significativamente a atividade péptica em 56% ($10,17 \pm 1,92 \mu\text{Tyr/mL/4h}$ – $p < 0,05$), e 69% ($6,99 \pm 1,31 \mu\text{Tyr/mL/4h}$ – $p < 0,05$), respectivamente em relação ao controle ($22,94 \pm 5,09$ – ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). Já o controle positivo omeprazol (10 mg/kg) ($23,11 \pm 2,85 \mu\text{Tyr/mL/4h}$ – $p > 0,05$), não apresentou tal eficácia.

Tabela 1: Efeito da administração oral de P1G10 e omeprazol nos parâmetros bioquímicos da secreção gástrica de ratas submetidas à ligadura pilórica.

Tratamento	Dose (mg/kg)	pH (unidades)	Volume (mL)	Acidez total ([H+] mEq/mL/4h)
Controle	-	$2,71 \pm 0,14$	$4,40 \pm 0,21$	$2,58 \pm 0,09$
Sham	-	$3,96 \pm 0,54^*$	$3,65 \pm 0,05^*$	$0,50 \pm 0,20^*$
P1G10	0,1	$3,37 \pm 0,08^*$	$4,08 \pm 0,06$	$1,15 \pm 0,10^*$
P1G10	1	$3,26 \pm 0,11^*$	$4,00 \pm 0,11$	$1,48 \pm 0,27^*$
P1G10	10	$3,11 \pm 0,15^*$	$4,05 \pm 0,09$	$1,50 \pm 0,20^*$
Omeprazol	10	$4,98 \pm 0,68^*$	$4,05 \pm 0,16$	$0,74 \pm 0,24^*$

Os dados são: média \pm erro padrão da média, analisados por ANOVA, seguido do teste de Dunnett, sendo considerados significativos quando $p < 0,05$. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.

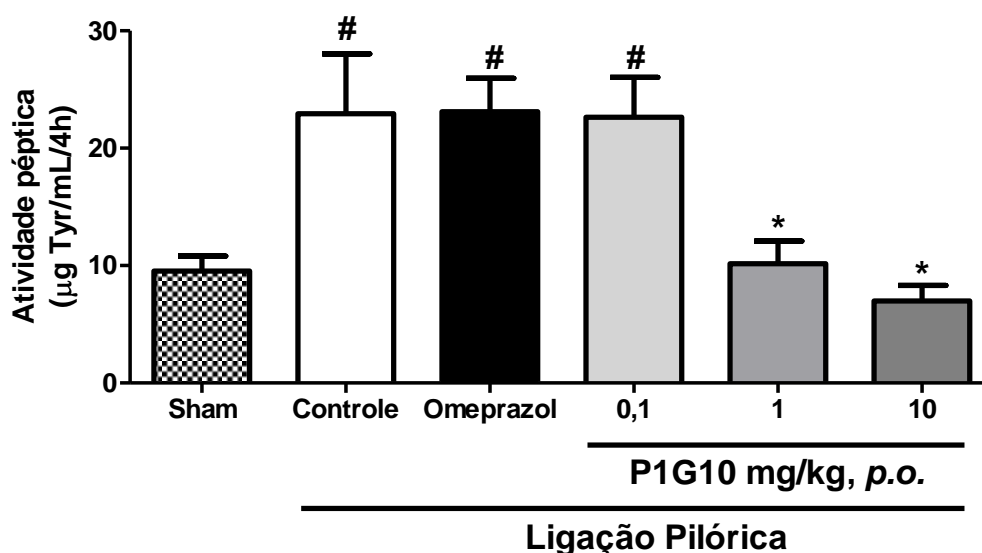


Figura 9: Determinação da atividade péptica no suco gástrico de animais submetidos à ligadura pilórica e tratados com P1G10. Ratas Wistar (n=5) receberam P1G10 (0,1-10 mg/kg) ou omeprazol (10 mg/kg) e após 60 min foram submetidas a laparotomia e ligadura do piloro. Após 4 h, os animais foram sacrificados, os estômagos removidos e o suco gástrico coletado. O resultado é expresso como média \pm e.p.m da atividade péptica em $\mu\text{g Tyr/mL/4h}$ para cada grupo. # indica resultado estatisticamente diferente do grupo Sham; * em relação ao Controle, $p < 0,05$ (ANOVA seguida do pós-teste Student Newman-Keuls).

5.4.2. Avaliação da participação do NO no efeito gastroprotetor de P1G10

Para avaliar a participação do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor de P1G10, utilizou-se o modelo de indução de ulcerações por indometacina, com pré-tratamento dos animais com o inibidor da síntese de óxido nítrico L-NAME. Os resultados mostraram que a administração de L-NAME intensificou as lesões promovidas por indometacina, aumentando o I.L.U. em 44% ($34,42 \pm 1,04 - p < 0,001$) em relação ao grupo que recebeu apenas indometacina ($23,90 \pm 1,05 - ANOVA$, pós-teste Student-Newman-Keuls). Nos animais tratados com P1G10 observou-se uma redução de 72% ($6,70 \pm 0,37 - p < 0,001$) das lesões produzidas pela indometacina, confirmando o efeito protetor das proteases. Esta proteção não foi significativamente alterada pela administração prévia de L-NAME ($6,69 \pm 0,98 - p > 0,05$), mantendo-se em nível similar a encontrada para o grupo tratado apenas com P1G10 (Tabela 2).

Tabela 2: Avaliação da participação de NO no efeito gastroprotetor de P1G10.

Pré-tratamento (i.p.)	Tratamento (p.o.)	Dose (mg/kg)	I.L.U.
Salina (5 mL/kg)	Veículo	-	$23,90 \pm 1,05$
	P1G10	10	$6,70 \pm 0,37^{***}$
L-NAME (100 mg/kg)	Veículo	-	$34,42 \pm 1,04^{***}$
	P1G10	10	$6,69 \pm 0,98^{...}$

Os dados são: média \pm e.p.m. de 5 animais, analisados por ANOVA, seguido do teste de Student Newman-Keuls, sendo considerados significativos quando $p < 0,05$. * indica diferença estatisticamente significativa.

5.4.3. Quantificação de glutathiona reduzida (GSH) gástrica

A quantificação de glutathiona reduzida gástrica foi feita em estômago de animais submetidos à indução de lesões pela indometacina. A administração de indometacina provocou a redução dos níveis de GSH gástricos em 31% (Controle: $279,74 \pm 5,03 \mu\text{g/g}$ de tecido – $p < 0,05$), em relação ao grupo não

lesado (Sham – $368,04 \pm 27,04$ $\mu\text{g/g}$ de tecido – ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). Já a fração P1G10 ($397,92 \pm 20,31$ $\mu\text{g/g}$ de tecido – $p < 0,05$) e a Carbenoxolona 200 mg/kg ($405,69 \pm 25,87$ – $p < 0,05$) foram capazes de aumentar significativamente os níveis de GSH gástricos, em 42% e 45%, respectivamente, em relação ao grupo controle (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls), restabelecendo os níveis próximos ao do grupo Sham (Figura 10).

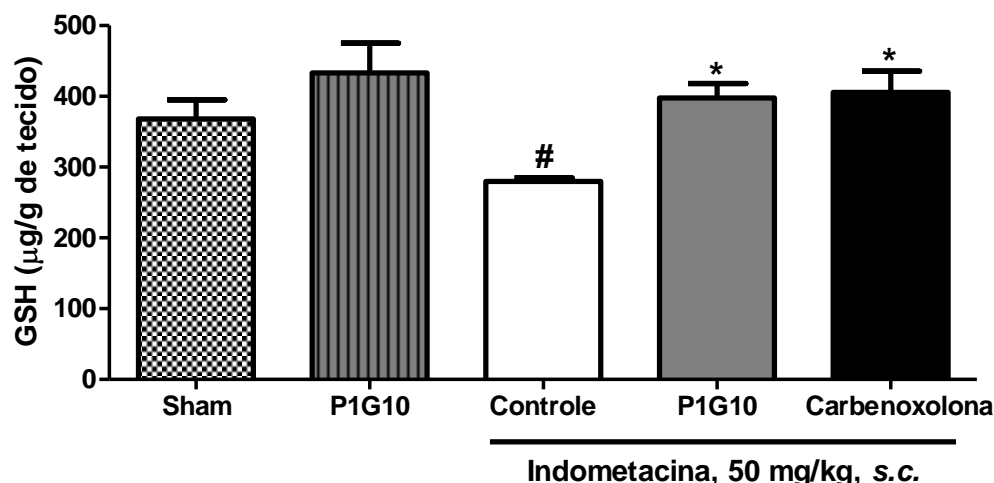


Figura 10: Dosagem de glutathiona reduzida na mucosa gástrica de ratas tratadas com P1G10. Ratas Wistar ($n = 5$) foram pré-tratadas com água (5 mL/kg), P1G10 (10 mg/kg) ou Carbenoxolona (200 mg/kg). Após 30 min, as lesões gástricas foram induzidas pela administração de indometacina como descrito no item 4.2.3.4.1. Os estômagos foram retirados e congelados à -70°C até a dosagem de GSH, que foi realizada em homogenatos desses, como descrito em 4.2.3.2.3.. O resultado é expresso como média \pm e.p.m da concentração de GSH em $\mu\text{g/g}$ de tecido para cada grupo. # indica resultado estatisticamente diferente do grupo Sham; * em relação ao Controle, $p < 0,05$ (ANOVA seguida do pós-teste Student Newman-Keuls).

5.5. Avaliação do efeito de P1G10 sobre a motilidade gastrointestinal

5.5.1. Esvaziamento gástrico

Na avaliação do efeito de P1G10 sobre o esvaziamento gástrico observamos que nenhuma das doses testadas (0,1-10 mg/kg) apresentou alteração significativa da taxa de esvaziamento gástrico. Os animais tratados com atropina (3 mg/kg) apresentaram esvaziamento gástrico significativamente diminuído ($42,23 \pm 5,87 \%$ – $p < 0,01$) em relação ao grupo controle ($69,67 \pm 4,36 \%$ – ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). Já o tratamento com metoclopramida (30 mg/kg) ($91,94 \pm 2,50 \%$ – $p < 0,05$) promoveu um aumento significativo do esvaziamento gástrico em relação a esse grupo, como mostrado na Figura 11.

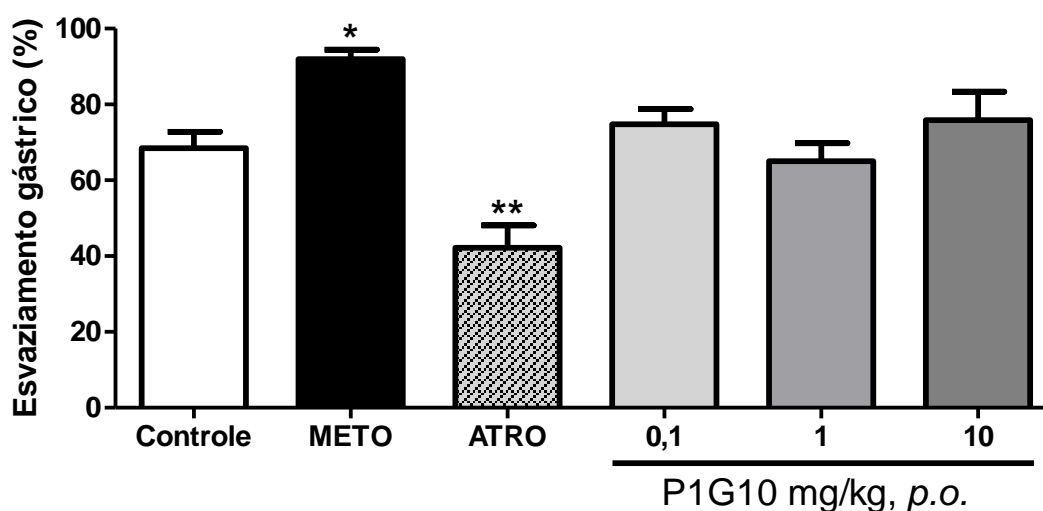


Figura 11: Efeito de P1G10 sobre o esvaziamento gástrico de semi-sólidos de camundongos. Camundongos Swiss (n = 6) foram pré-tratados *p.o.* com água (5 mL/kg), P1G10 (0,1-10 mg/kg), atropina (3 mg/kg) ou metoclopramida (30 mg/kg). Após 1 h, os animais receberam o marcador colorido e 30 min após foram mortos por deslocamento cervical. O conteúdo estomacal foi removido e processado como descrito no item 4.2.3.3.1., para determinação do conteúdo gástrico. Os resultados são expressos como média ± e.p.m da porcentagem de esvaziamento gástrico em relação ao grupo controle tempo zero. * e ** indicam resultados estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle, com $p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente (ANOVA seguida do pós-teste Student Newman-Keuls).

5.4.4.2. Trânsito intestinal

A porcentagem da distância percorrida pelo marcador colorido no intestino delgado de camundongos foi de $67,24 \pm 2,69$, $64,31 \pm 2,78$ e $69,11 \pm 1,81\%$; após tratamento prévio com P1G10 nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg, respectivamente. Esses resultados não foram significativamente diferentes do grupo de animais controle, onde o marcador percorreu $59,28 \pm 1,35\%$ do comprimento total do intestino. Os animais que receberam tratamento com atropina (3 mg/kg) apresentaram trânsito intestinal significativamente diminuído ($45,24 \pm 2,69 - p < 0,05$, ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls) e os que foram tratados com metoclopramida (30 mg/kg), apresentaram trânsito intestinal aumentado ($74,80 \pm 23,81 - p < 0,05$, ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls), em relação ao grupo controle. Esses resultados podem ser observados na Figura 12.

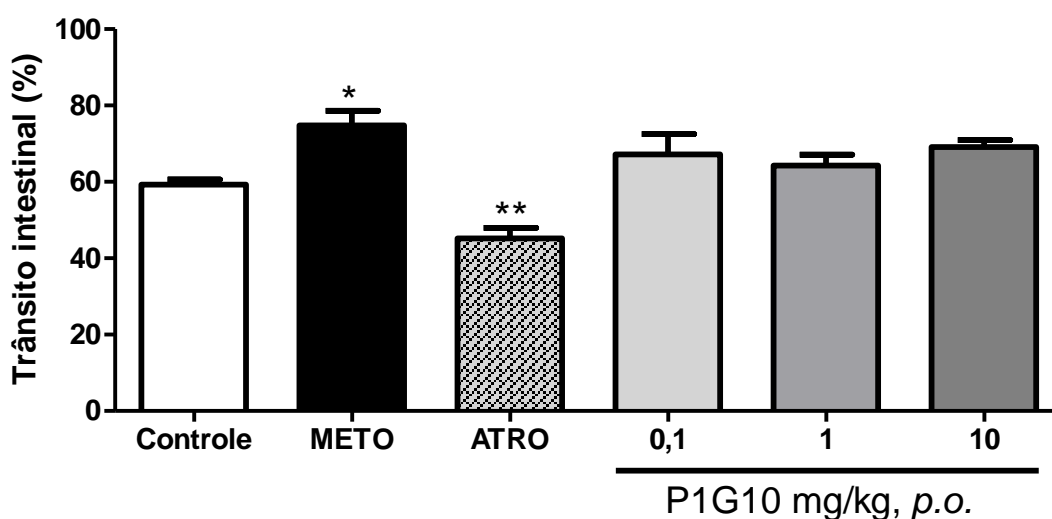


Figura 12: Efeito de P1G10 sobre o trânsito intestinal de semi-sólidos de camundongos. Camundongos Swiss ($n = 6$) foram pré-tratados *p.o.* com água (5 mL/kg), P1G10 (0,1-10 mg/kg), atropina (3 mg/kg) ou metoclopramida (30 mg/kg). Após 1 h, os animais receberam o marcador colorido e 30 min após foram mortos por deslocamento. O intestino delgado foi removido, seu comprimento total e a distância percorrida pelo marcador mensurados. Os resultados são expressos como média \pm e.p.m das porcentagens da distância percorrida pelo marcador em relação ao comprimento total do intestino delgado. * e ** indicam resultados estatisticamente diferentes em relação ao Controle, com $p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente. (Anova seguida do pós-teste Student Newman-Keuls).

5.6. Avaliação da importância da atividade proteolítica de P1G10 em seu efeito anti-úlceras

5.6.1. Gastroproteção

Na avaliação da importância da atividade proteolítica no efeito gastroprotetor P1G10, testamos a fração inibida com iodoacetamida (P1G10 IAA) quanto à sua atividade no modelo de indução de lesões agudas pela indometacina. Os resultados são mostrados na Figura 13, onde podemos observar que tanto P1G10 quanto P1G10 IAA, ambas na dose de 10 mg/kg, foram eficazes em proteger o estômago, reduzindo o I.L.U. em 83 % ($4,83 \pm 2,84 - p < 0,01$) e 81% ($5,38 \pm 0,75 - p < 0,01$), respectivamente, em relação ao grupo controle ($27,83 \pm 2,75 -$, ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). Já o grupo tratado com tripsina 10 mg/kg ($23,5 \pm 5,76 - p > 0,05$) não diferiu estatisticamente do grupo controle.

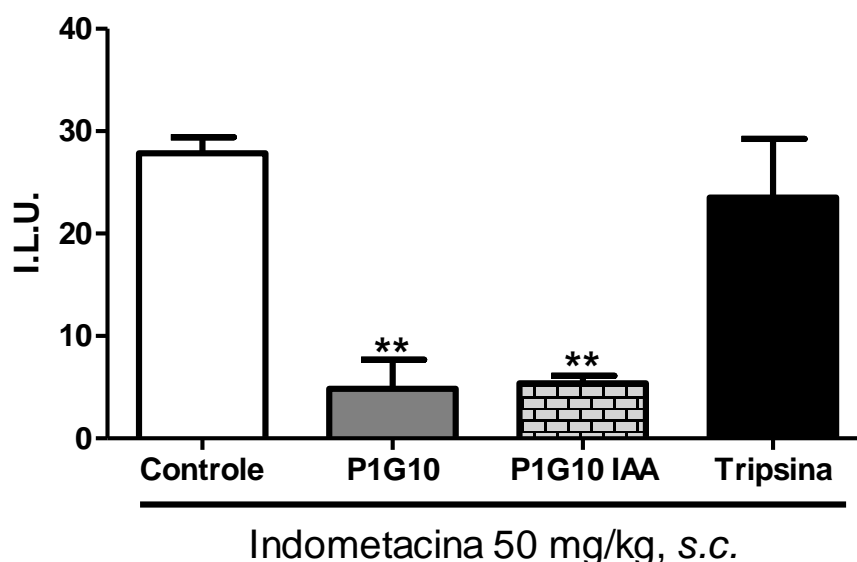


Figura 13: Avaliação da importância da atividade proteolítica no efeito gastroprotetor de P1G10. Ratas Wistar foram pré-tratadas *p.o.* com P1G10, P1G10 IAA ou tripsina, todos na dose de 10 mg/kg e submetidas a indução de lesões gástricas pela indometacina, como descrito em 4.2.3.4.1. Após 5 h da administração do agente lesivo, os animais foram sacrificados e o estômago destes removido para avaliação das ulcerações. O resultado é expresso como média \pm e.p.m do Índice de lesão ulcerativa (ILU) para cada grupo. ** diferente estatisticamente do Controle, $p < 0,01$ (ANOVA seguida de pós-teste Student Newman Keuls).

5.6.2. Cicatrização gástrica

A atividade cicatrizante de P1G10 foi confirmada utilizando o modelo de indução de úlceras crônicas pelo ácido acético. A fração (10 mg/kg) foi capaz de reduzir em 50 % o I.L.U. ($10,42 \pm 1,76 - p < 0,01$) em relação ao grupo controle ($20,75 \pm 1,55 - \text{ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls}$). Entretanto, a fração inibida (P1G10 IAA) na dose de 10 mg/kg não apresentou atividade cicatrizante de úlcera, uma vez que não foi eficaz em reduzir o I.L.U.. Este mesmo resultado foi observado no grupo tratado com tripsina (10 mg/kg) (Figura 14).

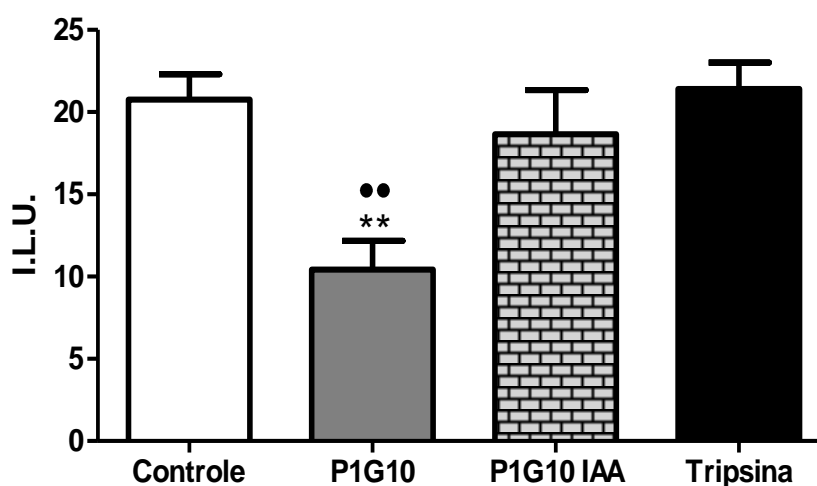


Figura 14: Avaliação da importância da atividade proteolítica no efeito cicatrizante gástrico de P1G10. Ratas Wistar foram submetidas à indução de úlceras gástricas com ácido acético a 10% e tratadas com P1G10, P1G10 IAA e Tripsina, todos na dose de 10 mg/kg por 8 dias após a indução. No 9º dia, os animais foram sacrificados para avaliação das ulcerações. O resultado é expresso como média \pm e.p.m do Índice de lesão ulcerativa (ILU) para cada grupo. ** diferente estatisticamente do Controle ($p < 0,01$); •• do grupo P1G10 IAA, $p < 0,01$ (ANOVA seguida de pós-teste Student Newman Keuls).

5.6.2.1. Variação de massa corporal

A variação de massa dos animais submetidos a ulcerações pelo ácido acético foi acompanhada durante todo o tratamento. Na Figura 15, é mostrada a variação entre o dia do procedimento cirúrgico e o último dia de experimento (9º dia). Os resultados mostram que os animais que receberam P1G10 apresentaram variação média de massa corporal positiva ($2,83 \text{ g} \pm 1,81 \text{ g} - p < 0,05$), com significativo ganho de peso, de aproximadamente 9,00 g, em relação ao controle, que apresentou variação negativa ($-6,17 \text{ g} \pm 3,24 \text{ g} - \text{ANOVA}$, pós-teste Student-Newman-Keuls). No grupo tratado com P1G10 IAA, a variação, embora positiva ($0,17 \text{ g} \pm 1,66 - p > 0,05$), se deu em menor amplitude e não diferiu em relação ao grupo controle. Já o grupo tratado com tripsina, apresentou perda de peso ($-5,17 \text{ g} \pm 1,56 - p < 0,05$), semelhante à observada no grupo controle.

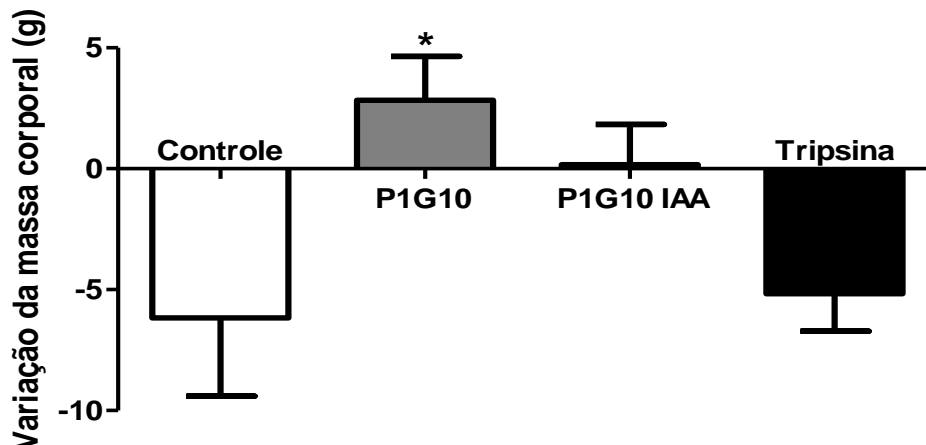


Figura 15: Variação de peso de ratas submetidas à indução de úlceras por ácido acético e tratados com P1G10 e P1G10 IAA. Ratas Wistar (n=5-6) foram submetidas a indução de úlceras gástricas com ácido acético a 10% e tratadas com P1G10, P1G10 IAA ou Tripsina, todos na dose de 10 mg/kg por 8 dias. Os animais foram pesados no 1º e no último dia de tratamento. O resultado é expresso como média \pm e.p.m da variação da massa corporal para cada grupo.* indica resultado diferente estatisticamente do grupo Controle, $p < 0,05$ (Anova seguido do pós-teste Student Newman-Keuls).

5.7. Estudo de eventos envolvidos na atividade cicatrizante gástrica de P1G10

Buscando entender quais os mecanismos através dos quais a fração P1G10 exerce seu efeito cicatrizante de úlceras gástrica, avaliamos por histologia e imunohistoquímica as lesões dos animais tratados com a fração. Uma vez que a atividade proteolítica de P1G10 foi importante para a cicatrização de úlceras, avaliamos também os efeitos de P1G10 IAA sobre os mesmos parâmetros.

5.7.1. Análise macroscópica

Na análise macroscópica, observamos que o ácido acético induziu a formação de úlceras gástricas caracterizadas por lesão escavada, com exsudato fibrino-necrótico em sua superfície. A mucosa estomacal como um todo se apresentou edemaciada e hiperemiada, com regiões descoradas próximas às lesões. Como mostrado na Tabela 3, animais tratados com P1G10 apresentaram extensão das lesões ($2,50 \pm 0,79 \text{ mm}^2 - p < 0,05$) (medidas como descrito no item 4.2.3.6.) significativamente menores que às apresentadas pelo grupo controle ($5,98 \pm 0,85 \text{ mm}^2 - \text{ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls}$). Os tratamentos com P1G10 IAA ($5,90 \pm 1,09 \text{ mm}^2 - p > 0,05$) e Tripsina ($6,95 \pm 0,60 \text{ mm}^2 - p > 0,05$) não foram capazes de reduzir significativamente o tamanho das lesões.

Tabela 3: Área das lesões gástricas induzidas por ácido acético em ratas tratadas com P1G10, P1G10 IAA e Tripsina

Tratamento	Área da úlcera (mm ²)	Redução da lesão (%)
Controle	5,98 ± 0,85	-
P1G10	2,50 ± 0,79*	58*
P1G10 IAA	5,90 ± 1,09	1
Tripsina	6,95 ± 0,60	-

Os dados são: média ± e.p.m das áreas das lesões de 6 ratas * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle, $p < 0,05$ (ANOVA, seguido do teste de Student Newman-Keuls).

5.7.2. Análise histológica

As Figuras 16.1. e 16.2. mostram fotomicrografias de cortes de estômago, corados por HE, de ratas Wistar ulceradas pela injeção de ácido acético, tratados ou não com P1G10 ou P1G10 IAA, e também de animais não ulcerados. Em 16.1A e 16.2E é mostrado o aspecto da mucosa gástrica não-lesada, onde se observa a integridade das camadas que compõem a parede estomacal: mucosa (m), submucosa (sm) e muscular da mucosa (mm). Já nos estômagos ulcerados (Fig. 16.1-B-D e 16.2-F-H) observa-se que o ácido acético induziu a formação de lesões escavadas (*), com destruição da mucosa, submucosa e por vezes, parte da muscular. A superfície da lesão ulcerada apresentou exsudato fibrino-necrótico-leucocitário (cabeças de seta – Figuras 16.1-B-D e 16.2-F-H) e no fundo, proliferação conjuntivo vascular (tecido de granulação – setas amarelas, Figura 16.2-F-H) associada a infiltrado inflamatório de mono e polimorfonucleares (setas verdes – Figura 16.2-F-H). Os animais tratados com P1G10 (Figuras 16.1-C e 16.2-G) apresentaram uma menor extensão da lesão com início de reepitelização a partir dos bordos da úlcera, tecido de granulação mais organizado e menor quantidade de material fibrino-necrótico em relação ao controle (Figuras 16.1-B e 16.2-F), o que não foi observado com o tratamento com P1G10 IAA (Figuras 16.1-D e 16.2-H).

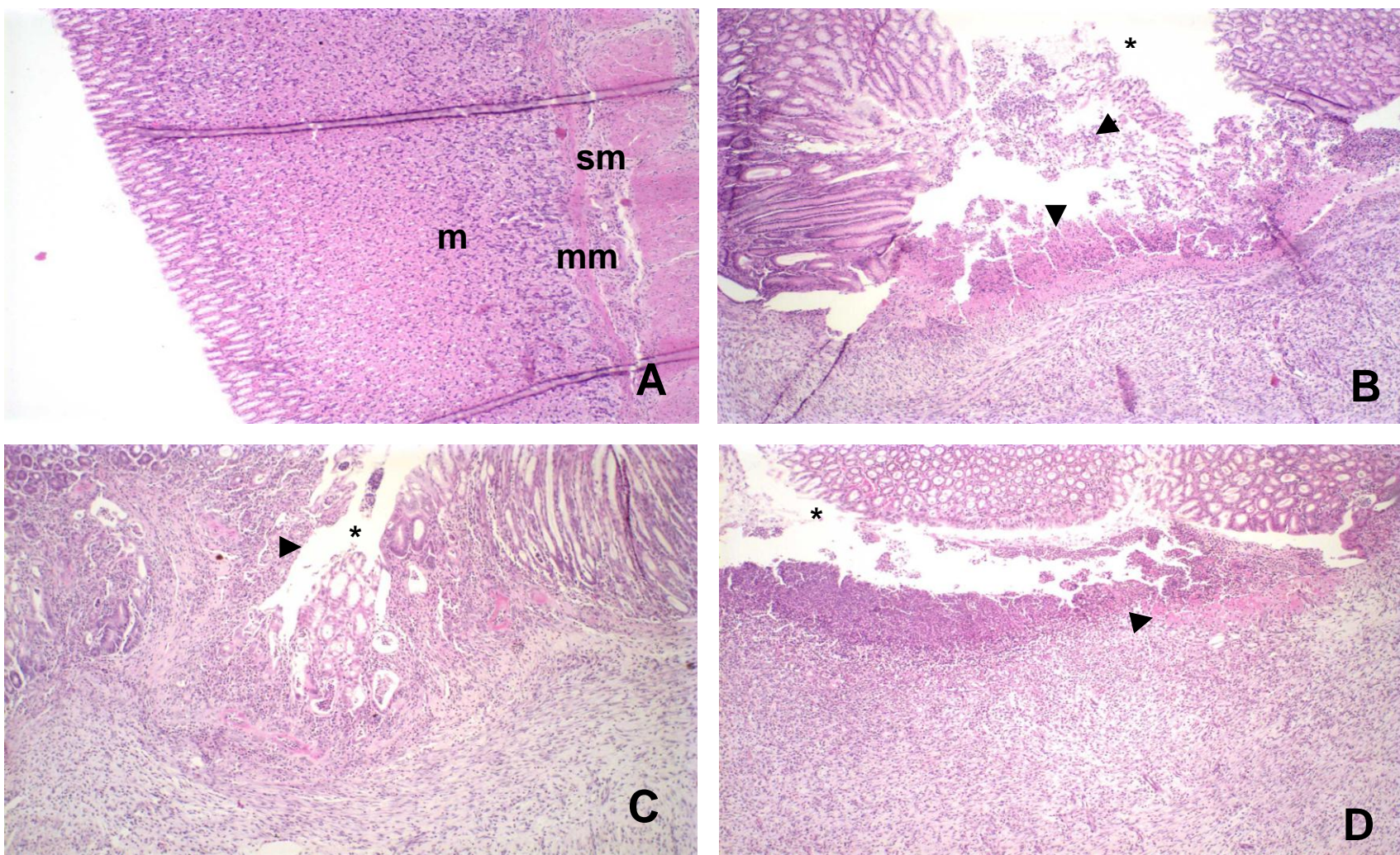


Figura 16.1: Fotomicrografias de cortes histológicos de estômago de ratas Wistar com úlcera induzida por ácido acético e tratadas com P1G10 e P1G10 IAA, corados com hematoxilina e eosina (Aumento de 100X). A - animal normal, sem lesão da mucosa; B – grupo controle; C – P1G10 (10 mg/kg); D – P1G10 IAA (10 mg/kg). m – mucosa; mm – muscular da mucosa; sm – submucosa. * Lesão; cabeças de seta: material fibrinonecrótico.

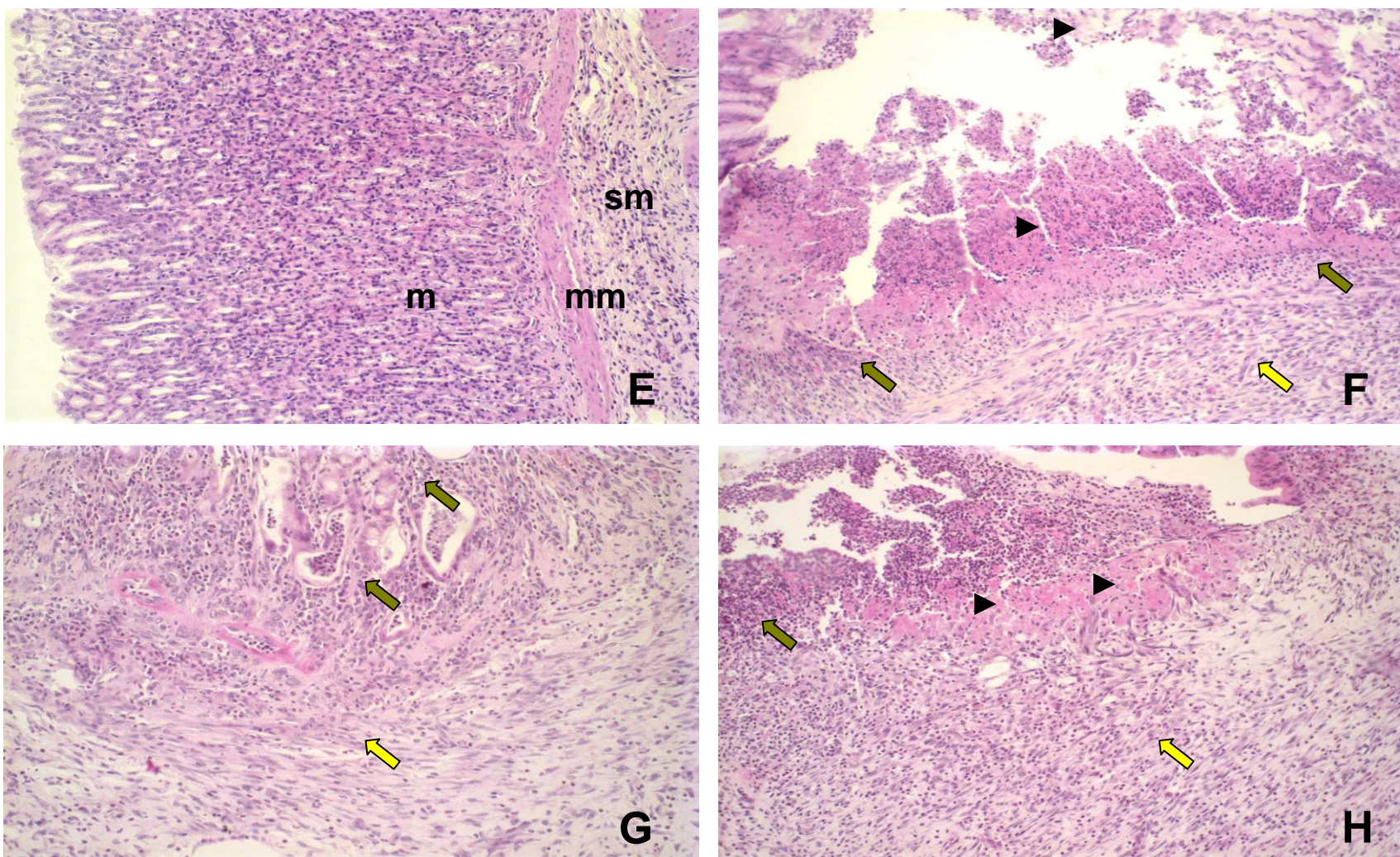


Figura 16.2: Fotomicrografias de cortes histológicos de estômago de ratas Wistar com úlcera induzida por ácido acético e tratadas com P1G10 e P1G10 IAA, corados com hematoxilina e eosina (Aumento de 200X). E - animal normal, sem lesão da mucosa; F – grupo controle; G –P1G10 (10 mg/kg); H – P1G10 IAA (10 mg/kg). m – mucosa; mm – muscular da mucosa; sm – submucosa. Cabeças de seta: material fibrinonecrotico; setas verdes: infiltrado inflamatório; setas amarelas: tecido de granulação.

5.7.3. Análise imunohistoquímica e morfométrica

5.7.3.1. Proliferação Celular

As fotomicrografias mostradas na Figura 17 são de cortes submetidos à imunolocalização do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), que mostra os locais onde a proliferação celular se encontra ativa. Nota-se nos grupos tratados com P1G10 (C) e P1G10 IAA (D) a presença de células em proliferação nos bordos da lesão, em grau maior do que o visto no grupo controle (B) (seta). No grupo normal (A), as células PCNA positivas são observadas predominantemente na região central das glândulas.

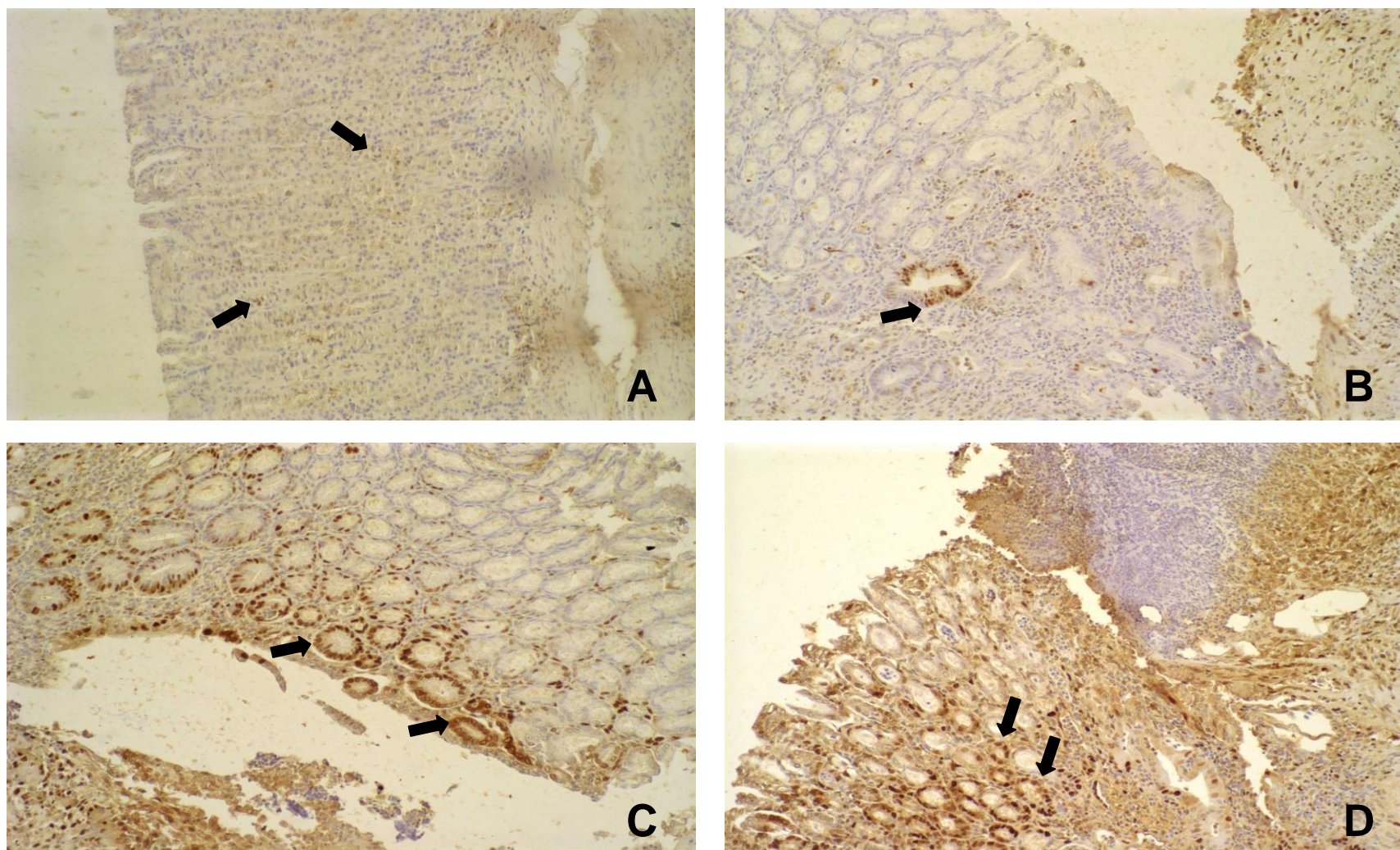


Figura 17: Fotomicrografias de cortes histológicos de estômago de ratas Wistar com úlcera induzida por ácido acético e tratadas com P1G10 e P1G10 IAA, submetidos à imunolocalização de *Proliferation cell nuclear antigen* (PCNA). A presença de PCNA é revelada pelo cromógeno 3'3 diaminobenzindina (DAB) e peroxidase, os quais promovem a cor marrom como resposta positiva de reação. Esse experimento foi realizado para a verificação do processo de divisão celular, onde se observa em A - animal normal, sem lesão da mucosa; B - grupo controle; C - P1G10 (10 mg/kg); D - P1G10 IAA (10 mg/kg). Setas: células em proliferação. Aumento de 200x.

Na Figura 18, observa-se que as taxas de proliferação celular (calculada conforme descrito no item 4.2.3.5.2.) na mucosa gástrica de animais tratados tanto com P1G10 ($22,62 \pm 3,89 \% - p < 0,05$), como com P1G10 IAA ($24,20 \pm 5,62 \% - p < 0,05$) foram quase 4 vezes superiores a encontrada para o grupo controle ($6,22 \pm 1,10 \%$, ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

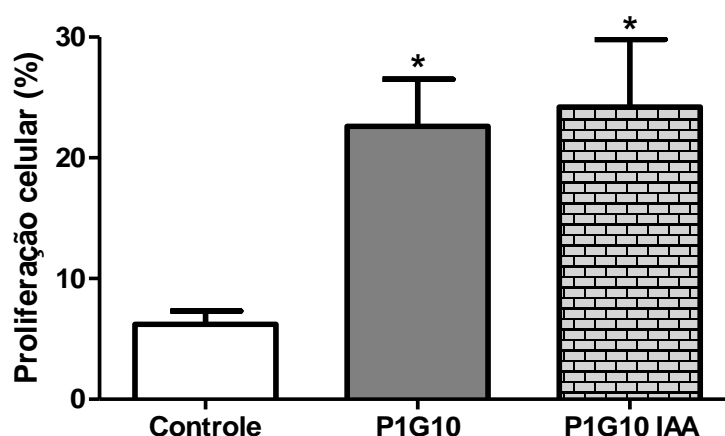


Figura 18: Análise quantitativa da proliferação celular na mucosa gástrica de ratas tratadas com P1G10 e P1G10 IAA. Cortes histológicos obtidos a partir de estômagos ulcerados pelo ácido acético de ratas Wistar tratadas *p.o.* com P1G10 e P1G10 IAA (ambos 10 mg/kg) ($n = 5-6$), foram submetidos a imunolocalização de células em proliferação utilizando o anticorpo anti-PCNA. A taxa de proliferação foi obtida através da contagem do número de células marcadas num total de 500 células contabilizadas nas margens das lesões. O resultado é expresso como média \pm e.p.m da porcentagem de proliferação celular. * diferente estatisticamente do Controle $p < 0,05$ (ANOVA seguida de pós-teste Student-Newman-Keuls).

5.7.3.2. Angiogênese

A angiogênese foi avaliada nos cortes histológicos submetidos à imunolocalização pelo marcador PECAM-1/CD31, que é expresso em células endoteliais. Na Figura 19, são mostradas as fotomicrografias dos cortes marcados para PECAM-1/CD31, onde são identificados vasos presentes no tecido de granulação, dos grupos controle, P1G10 e P1G10 IAA, respectivamente, onde se observam um aumento do número de vasos (setas) em relação ao grupo não lesionado, mas sem diferenças aparentes na densidade dos mesmos.

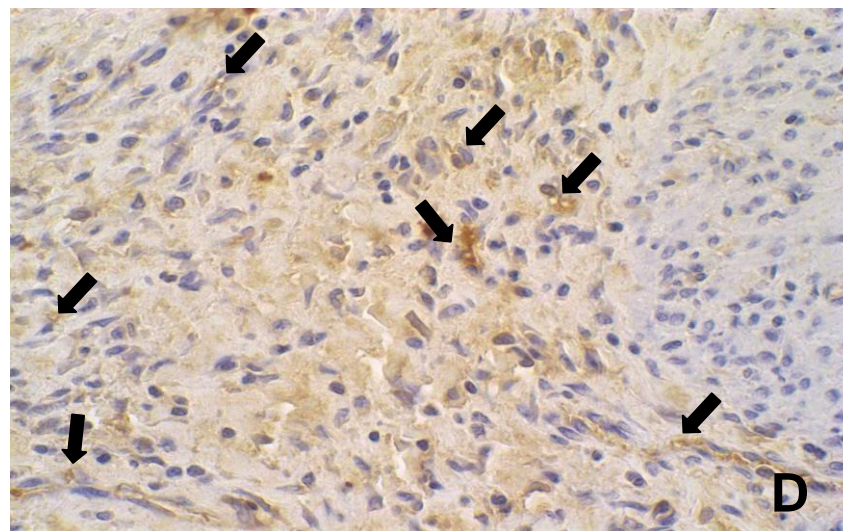
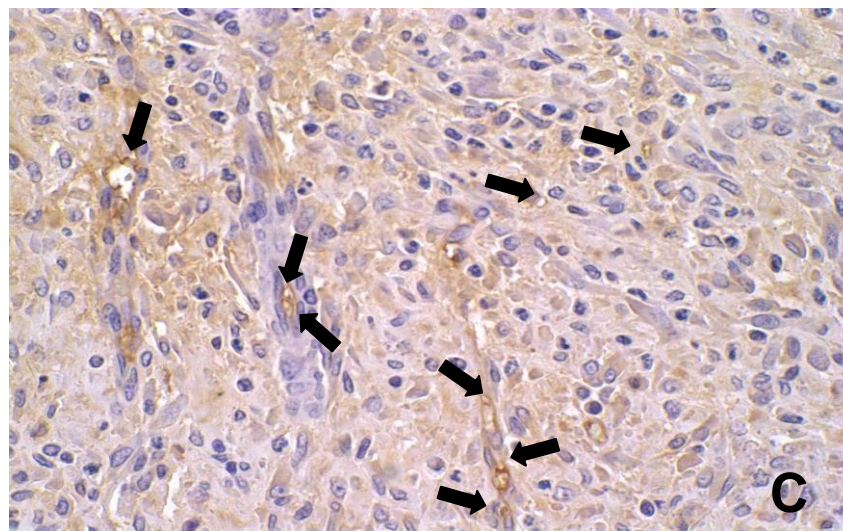
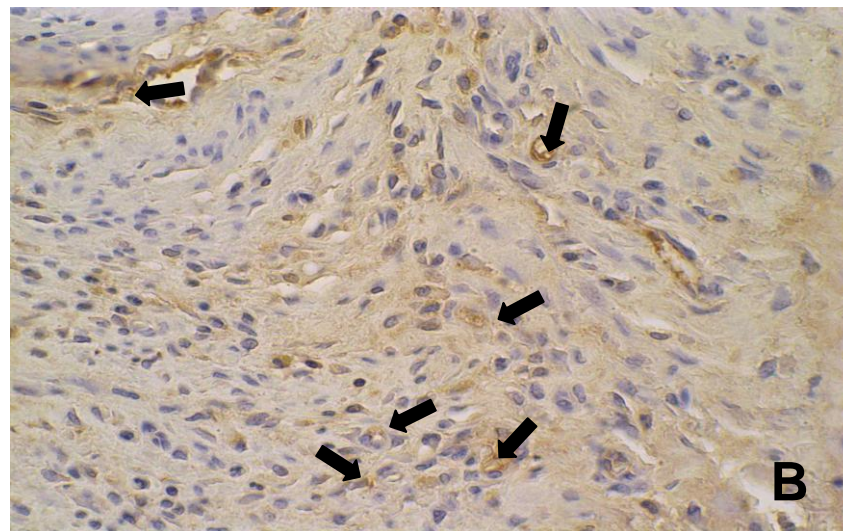
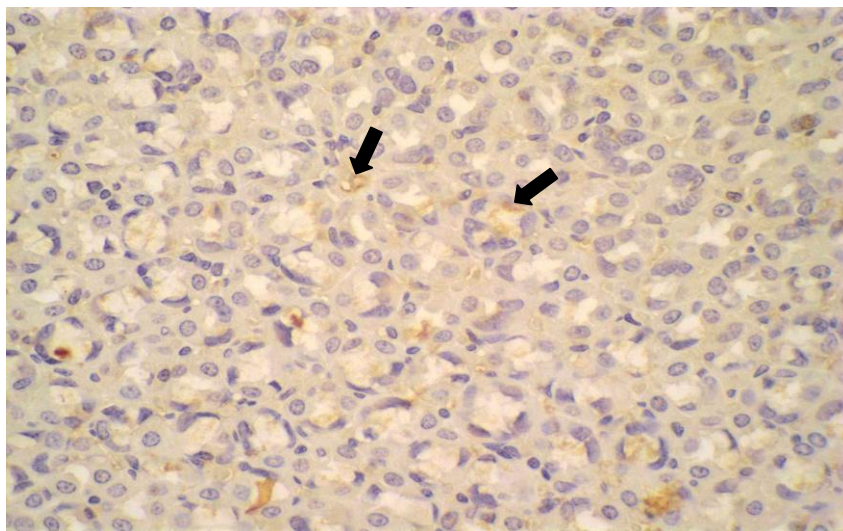


Figura 19: Fotomicrografias de cortes histológicos de estômago de ratas Wistar com úlcera induzida por ácido acético, tratadas com P1G10 e P1G10 IAA, submetidos à imunolocalização de PECAM-1/CD31. A presença de PECAM-1/CD31 é revelada pelo cromógeno 3'3 diaminobenzindina (DAB) e peroxidase, os quais promovem a cor marrom como resposta positiva de reação. Esse experimento foi realizado para a verificação do processo de divisão celular, onde se observa em A - animal normal, sem lesão da mucosa; B - grupo controle; C - P1G10 (10 mg/kg); D - P1G10 IAA (10 mg/kg). Setas: células em proliferação. Aumento de 600x.

A densidade de vasos foi quantificada como descrito em 4.2.3.5.2.. Como se pode observar na Figura 20, ocorreu um aumento de 34% na quantidade de vasos nos animais tratados com P1G10 ($5,26 \pm 0,45$ vasos/campo – $p > 0,05$) e de 29% no grupo tratado com P1G10 IAA ($5,04 \pm 0,38$ vasos/campo– $p > 0,05$), não sendo, entretanto, estes resultados diferentes estatisticamente do controle ($3,91 \pm 0,86$ vasos/campo, ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

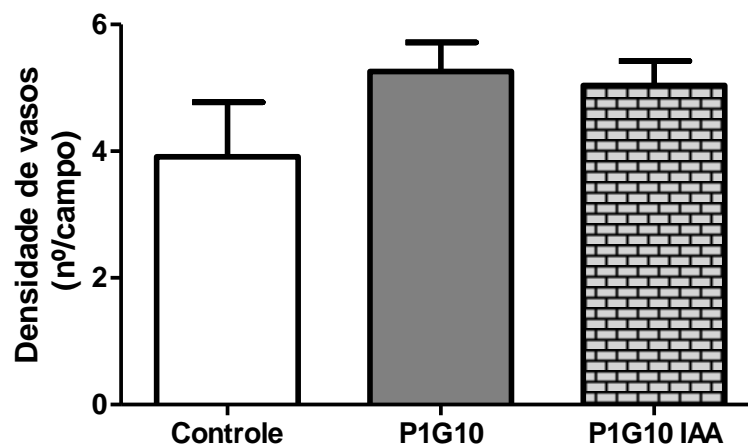


Figura 20: Análise quantitativa da angiogênese na mucosa gástrica de animais tratados com P1G10 e P1G10 IAA. Cortes histológicos obtidos a partir de estômagos ulcerados pelo ácido acético de ratas Wistar tratadas com P1G10 e P1G10 IAA (ambos 10 mg/kg) ($n= 5-6$), foram submetidos à imunolocalização de vasos neoformados utilizando o anticorpo anti-PECAM-1/CD31. As áreas de maior densidade vascular foram identificadas no tecido de granulação e o número de vasos contabilizado. O resultado é expresso como média \pm e.p.m do número de vasos por campo (ANOVA seguida de pós-teste Student-Newman- Keuls).

6. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa vem se dedicando ao estudo das atividades biológicas e farmacológicas do látex de *Carica candamarcensis*. A partir de separação cromatográfica em coluna Sephadex G10 foi obtida a fração P1G10, rica em cisteíno proteases de alta atividade proteolítica, para a qual foram identificadas diversas ações, destacando-se as atividades angiogênica, mitogênica e cicatrizante cutânea (MELLO et al., 2006). Considerando a atividade cicatrizante cutânea em lesões por dermoabrasão, passamos ao estudo da ação de P1G10 sobre lesões de diferentes etiologias, dentre estas, as úlceras gástricas. Assim, no estudo de MELLO et al. (2008) foram evidenciadas as atividades protetora e cicatrizante, avaliadas sobre lesões agudas induzidas por indometacina e úlceras crônicas por ácido acético. Diante da constatação dessas últimas atividades, neste trabalho expandimos o estudo da ação antiúlcera de P1G10, avaliando seus efeitos contra lesões causadas por diferentes agentes agressores. Além disso, buscamos identificar vias envolvidas no seu modo de ação, responsáveis por seu efeito protetor e cicatrizante gástrico.

Atividade gastroprotetora

Na avaliação da potencial atividade anti-úlcera de novos agentes são utilizados modelos clássicos de lesões gástricas, destacando-se indometacina, etanol e estresse. No entanto, esses modelos não representam integralmente a patologia humana, uma vez que as lesões obtidas em roedores são superficiais, múltiplas e temporalmente agudas. Apesar disso, estes modelos experimentais fornecem importantes indicativos da ação de produtos sobre o trato gastrointestinal, já que o uso abusivo de álcool, o estresse e o uso crônico de antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) são as causas mais freqüentemente envolvidas na etiologia das patologias gástricas no homem (LEVENSTEIN et al, 1998; SCHMASSMANN, 1998).

Nossos resultados mostraram que as lesões gástricas causadas pela administração de etanol 96% foram caracterizadas por edema e ulcerações hemorrágicas na mucosa. SZABO & NAGY (1992) relatam que a administração de etanol absoluto em ratos produz lesões necróticas na mucosa gástrica, principalmente devido à ação lesiva desse agente sobre a camada protetora de muco e à exacerbação da secreção ácido-péptica. Além disso, o etanol desestabiliza mastócitos e induz a liberação de histamina, que reduz o fluxo sanguíneo dos tecidos injuriados, diminuindo a proteção gástrica e provocando danos à mucosa (SZABO & BROWN, 1987; LAINE e WEINSTEIN, 1988; KINOSHITA et al., 1995). Esses danos podem ser ainda devido à ação direta desse agente lesivo sobre o epitélio gástrico, levando ao estresse oxidativo, e conseqüentemente, à peroxidação lipídica e apoptose (AL-SHABANAH et al., 2000). A administração da fração P1G10 na dose de 10 mg/kg protegeu significativamente a mucosa gástrica contra a ação lesiva do etanol 96% reduzindo, em 40%, o I.L.U. (Figura 6C). Este resultado confronta com o apresentado em um estudo anterior, onde P1G10, administrada 30 min antes, não foi capaz de proteger o estômago de lesões promovidas por etanol 70% (MELLO et al., 2008). Sabendo-se que o etanol produz lesões por ser capaz de dissolver as glicoproteínas do muco gástrico, este agente pode atuar da mesma maneira sobre a fração protéica, promovendo sua dissolução e diminuindo seu efeito sobre a mucosa. Acreditamos que o maior tempo (1 h) de exposição do estômago à fração, antes da administração do agente lesivo, permitiu uma melhor ação da mesma.

A proteção promovida por P1G10 pode envolver a inibição da secreção ácida gástrica ou aumento na liberação ou manutenção de substâncias protetoras da mucosa, como feito pelo sucralfato (NYSÆTER & BERSTAD, 2006). Este último foi utilizado como controle positivo no modelo do etanol, onde protegeu a mucosa gástrica, reduzindo em 79% o I.L.U.. Sua ação se dá através da produção de uma espécie de filme sobre a mucosa, protegendo a camada de muco e conseqüentemente, a mucosa gástrica da ação lesiva do ácido, sendo muito eficaz no tratamento de ulcerações pelo etanol e pelo estresse (NYSÆTER & BERSTAD, 2006; SPIRT & STANLEY, 2006). Nesse

sentido, a ação gastroprotetora da fração P1G10 contra lesões produzidas pelo etanol está, provavelmente, relacionada a fatores protetores da mucosa, como prostaglandinas e grupos sulfidrila, que atuam na produção do muco gástrico ou na manutenção do mesmo, como descrito para o sucralfato. Corroborando essa hipótese, em estudos anteriores, verificamos que animais tratados com a fração apresentaram uma quantidade de muco 25% maior que os animais não tratados (MELLO et al., 2008).

Além do estímulo da produção/manutenção do muco gástrico, a fração P1G10 pode promover proteção através da modulação da atividade de cisteíno proteases endógenas. NAGY et al. (1996) verificaram que em lesões promovidas pelo etanol ocorre ativação e liberação das catepsinas B, H e L, cisteíno proteases envolvidas principalmente no processo apoptótico, e a inativação de seus inibidores endógenos. Isso mostrou que essas proteases e seus inibidores podem agir diretamente ou indiretamente como mediadores na patogênese ou prevenção de úlceras gástricas. As catepsinas e as cisteíno proteases da fração P1G10 pertencem à mesma família de proteases (família da papaína) e isto nos leva a questionar como enzimas com alto grau de homologia possuem atividades opostas. Acreditamos que pequenas diferenças estruturais possam contribuir para esta aparente contradição.

Além do consumo abusivo do etanol, o estresse é um dos principais fatores causadores de lesões gástricas em humanos (BELAICHE et al., 2002). Os mecanismos através dos quais o estímulo estressante pode promover o aparecimento de lesões gástricas são vários, sendo mediados pelo hiperfuncionamento gástrico dependente do nervo vago e pela liberação do hormônio liberador de tireotropina (TRH) (TAKEUCHI et al., 1999). O estresse aumenta a motilidade gástrica, a secreção ácida através do aumento da histamina, diminui os níveis de bicarbonato e prostaglandinas da mucosa, reduz o fluxo sanguíneo gástrico, provocando a diminuição da vitalidade celular e capilar gástrica, levando à necrose e ao desenvolvimento de úlceras (PACHALY et al., 1993; OVERMIER & MURISON, 2000).

O pré-tratamento com P1G10 dos animais submetidos ao estresse por imobilização e frio promoveu uma significativa proteção em todas as doses

testadas (0,1, 1 e 10 mg/Kg), com reduções maiores de 80% no I.L.U. (Figura 7C). Os resultados obtidos sugerem que a fração P1G10 pode atuar regulando a produção excessiva de ácido causada pelo estresse, por interferir na ação dos mediadores responsáveis por essa secreção, como a histamina, através da inibição de sua liberação ou bloqueando seus receptores específicos. A ação protetora de P1G10 foi semelhante à encontrada para a ranitidina, um antagonista do receptor H₂, utilizada clinicamente no tratamento e prevenção de lesões por estresse (DALEY et al., 2004) e que, em nosso estudo serviu como controle positivo, reduzindo em 92 % o I.L.U.. A hipótese da redução da secreção ácida por P1G10 pode ser apoiada pelo estudo realizado por CHEN et al. (1981), no qual se verificou que a papaína, uma cisteíno protease obtida do látex de *Carica papaya*, reduziu as ulcerações e o aumento da secreção ácida promovidos pela administração de histamina. Uma vez que as proteases que compõem a fração P1G10 são semelhantes estruturalmente à papaína, pode-se esperar que apresentem efeitos semelhantes nesse modelo.

Além do estímulo da produção de muco, nossa fração também pode auxiliar na proteção da mucosa gástrica, promovendo o restabelecimento da integridade vascular que mantém o fluxo sanguíneo local (EVANS, 1996; PANDOLFINO et al., 2000). A atividade mitogênica de P1G10, constatada *in vitro*, nos fornece indícios de que nossa fração funcione como um fator de crescimento (GOMES et al., 2005; GOMES, 2008). Poucos minutos após a indução de uma lesão gástrica, ocorre a produção de fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidermal (EGF), que atuam reduzindo a secreção ácida e estimulando a produção de prostaglandinas. Estas últimas aumentam o fluxo sanguíneo, melhorando a oxigenação local e o *clearance* do ácido, limitando a formação das lesões (TARNAWSKI, 2005). Apesar de não termos dados que comprovem a participação das prostaglandinas na ação gastroprotetora de P1G10, a produção/manutenção de muco e atividade mitogênica promovidas pela fração, nos permitem inferir que estas atividades estão relacionadas às prostaglandinas.

Como próximo passo, avaliamos os parâmetros bioquímicos do suco gástrico (pH, volume e concentração total de ácido) de animais submetidos a

ligação pilórica e tratados com P1G10. Além disso, avaliamos seu efeito contra lesões produzidas pelo acúmulo de ácido e pepsina.

Analisando as Figuras 8B e C, observa-se uma diminuição do número de ulcerações e do I.L.U., em animais submetidos à ligadura do piloro, com o aumento da dose de P1G10. Entretanto, apenas a dose de 10 mg/kg apresentou redução significativa desse índice (64%) em relação ao controle, o que está de acordo com os resultados obtidos em outros modelos experimentais, onde esta dose foi também a mais eficaz. Nos animais tratados com omeprazol (10 mg/kg), observou-se uma redução de 74% do I.L.U., que não foi estatisticamente diferente da observada com o tratamento com P1G10. Em relação à parâmetros da secreção gástrica, observou-se que apesar do volume não ter sofrido alterações, a quantidade total de ácido foi menor nos grupos tratados com P1G10, quando comparado ao grupo controle. Já o pH sofreu um aumento significativo em todas as doses testadas, entretanto, de maneira dose-independente (Tabela 1). O aumento no pH observado foi menor em relação ao promovido pelo omeprazol, o que, contudo, é uma vantagem, uma vez que a inibição total da secreção ácida não é interessante por diminuir a proteção do estômago contra o crescimento bacteriano excessivo e até mesmo por afetar a absorção de outros medicamentos (ESPLUGUES et al., 2006; CENTANNI et al., 2006; SCHUBERT & PEURA, 2008). A regulação ácida promovida pela fração P1G10 pode também justificar o aumento/manutenção da quantidade de muco observado. De forma semelhante ao EGF, as proteínas que compõem P1G10 podem também, ser capazes de diminuir a secreção ácida, independentemente de seus efeitos mitogênicos, o que diminuiria a agressão à camada de muco, que seria preservada (BASTAKI et al., 2002).

Com relação à atividade péptica, verificamos que esta também foi diminuída pelo tratamento com P1G10, com reduções de 56 e 69% nas doses de 1 e 10 mg/kg, respectivamente (Figura 9). Sendo a pepsina bem estabelecida como produtora de lesões gástricas, a redução de sua atividade é de importância no tratamento das úlceras gástricas (GRITTI et al., 2000). Assim, a ação inibitória de P1G10 sobre a atividade péptica certamente

contribui para sua ação gastroprotetora. No mercado, são poucos os exemplos de fármacos com conhecida ação inibitória da atividade péptica. O ecabet sódico, um fármaco antiúlcera mais recente, é empregado no tratamento da úlcera péptica e esofagite de refluxo, sendo seu efeito antiulceroso atribuído à redução da atividade péptica, que foi observada, entretanto apenas *in vitro* (KENJI NAGAHAMA et al., 2006). Assim, verificamos que, além do estímulo da produção do muco, a ação gastroprotetora de P1G10, ao menos em parte, pode ser explicada por uma ação anti-secretória ácida e redutora da atividade péptica. Em nosso estudo, o omeprazol não foi eficaz em reduzir a atividade péptica, concordando com o descrito na literatura, onde é relatado que o tratamento com esse fármaco não reduz ou reduz muito pouco esta atividade. Sua ação inibitória sobre a secreção ácida reduz a ativação do pepsinogênio em pepsina, mas não atua sobre a pepsina já formada, promovendo, quando ocorre, um pequeno decréscimo na atividade péptica do suco gástrico (GRITTI et al., 2000). É possível que a fração P1G10 possa atuar tanto inibindo a liberação da pepsina, quanto inativando-a através de clivagem, já que a fração é dotada de alta atividade proteolítica, que não é totalmente inativada em pH ácido, apresentando atividade residual de cerca de 40% (dados não mostrados).

Além do controle da secreção ácida, o efeito protetor de agentes antiúlcera pode ser promovido através do estímulo de fatores protetores da mucosa. Desta maneira, a fim de identificar outras vias de ação onde a fração P1G10 poderia atuar, avaliamos a participação do NO e dos SH no seu efeito gastroprotetor.

Os efeitos gastroprotetores de muitos fármacos anti-úlcera, como omeprazol (LE et al., 2001), sucralfato (KONTUREK et al., 2005) e carbenoxolona (BATISTA et al., 2004) são reduzidos quando ocorre inibição da síntese de NO, pela administração do éster metílico da L γ -nitro-L-arginina (L-NAME). Esse composto é um inibidor da NO sintetase, que impede a síntese de NO, acentuando as lesões da mucosa gástrica induzidas pela indometacina e outros agentes ulcerogênicos (ALY, 1995; KAWANO et al., 2000). Como esperado, nossos resultados mostraram um aumento significativo do I.L.U. no

grupo de animais pré-tratados com L-NAME comparado ao grupo controle (tratado com salina), mostrando um agravamento das lesões induzidas pela indometacina, devido à redução dos mecanismos de proteção da mucosa gástrica, promovidos pelo NO (LAINE et al., 2008). Entretanto, nos animais pré-tratados com P1G10 e que receberam L-NAME, não se observou a intensificação das lesões, sugerindo que a ação gastroprotetora de nossa fração independe da liberação/produção de NO pela mucosa gástrica (Tabela 2).

Outro fator de grande importância para a integridade da mucosa são os compostos sulfidrílica (SH), os quais atuam reduzindo a formação de espécies reativas do oxigênio (EROs), promovendo proteção celular (TARIQ et al., 2006). Além disso, mantêm o fluxo sanguíneo possibilitando a redução da lesão tecidual e formam pontes dissulfeto entre as glicoproteínas do muco, de maneira a impedir a sua dissociação (AVILA et al., 1996). A depleção de SHs da mucosa gástrica é um mecanismo comum nas lesões induzidas por etanol, indometacina e estresse, sendo o aumento dos níveis destes redutores uma possibilidade de ação farmacológica, para promover gastroproteção (SZABO et al., 1992).

Em animais lesados pela indometacina, P1G10 promoveu um aumento nos níveis de SHs na mucosa gástrica, revertendo a redução de sua concentração (Figura 10). Uma vez que a fração é rica em cisteína proteases, que possuem em seus sítios ativos, grande número grupos tióis, pode participar diretamente da produção de SHs. Dados da literatura corroboram esta observação. UESHIMA et al. (1992), demonstraram que glutathiona exógena (GSH), um composto sulfidrílico, inibe o dano gástrico induzido pela indometacina. SZABO et al (1981), mostrou que substâncias contendo radicais sulfidrílica tais como dimercaprol, cisteamina, e o ácido demercaptosuccínico atuam como gastroprotetores de maneira semelhante às prostaglandinas, e que os bloqueadores e grupos sulfidrílica, tais como dietilmaleato e a iodoacetamida revertem o efeito protetor de $\text{PGF2}\alpha$. SZABO et al. (1992) demonstraram que o GSH inibe o dano gástrico induzido pelo etanol, através da inativação de EROs e produtos de peroxidação lipídica. Assim, podemos

inferir que P1G10, pelo aumento do conteúdo de SHs, poderia também inativar radicais livres que são importantes na patogênese da lesão gástrica, ocasionada por diferentes agentes e manter o fluxo sanguíneo adequado para reduzir a lesão tecidual.

Outro aspecto avaliado no efeito gastroprotetor da fração P1G10, foi a relevância da sua atividade proteolítica sobre o mesmo. Através de clivagem os receptores ativados por proteases (PAR, “Protease Activated Receptor”) são ativados por serino proteases como a tripsina e a trombina, mediando funções, como a proliferação celular e a secreção em vários tecidos (KAWABATA, 2003). O trato gastrointestinal é abundante em PAR-1 e PAR-2 e a ativação desses receptores está relacionada com a proteção da mucosa gástrica, através do aumento dos níveis de muco gástrico e do fluxo sanguíneo, inibição da secreção de ácidos por mecanismos dependentes e independentes de prostanóides (NAKAYA et al., 2003, NISHIKAWA et al., 2003). Frente à possível participação da ativação de PARs no efeito gastroprotetor de P1G10, avaliamos o efeito da fração com a atividade proteolítica inibida (P1G10 IAA). Na Figura 13, são mostrados os resultados obtidos com o tratamento de animais submetidos à indução de lesões gástricas pela indometacina e tratados com P1G10, P1G10-IAA e tripsina, que foi utilizada como controle positivo. Observamos que tanto a fração ativa como a inibida foram eficazes em proteger a mucosa gástrica da ação lesiva da indometacina, não havendo diferença significativa entre os grupos, mostrando que a atividade gastroprotetora da fração não é dependente de sua atividade proteolítica. A tripsina, uma serino protease, é o agonista endógeno do receptor PAR-2 e foi utilizada como controle positivo. Entretanto, observamos que a administração de tripsina exógena não foi capaz de proteger o estômago dos animais contra as lesões promovidas pela indometacina, provavelmente devido a sua desnaturação pelo ácido estomacal. Com estes resultados, sugerimos que a atividade gastroprotetora da fração não é dependente da clivagem de PARs, mas não descartamos a hipótese de que algum determinante peptídico possa agir como agonista, uma vez que é descrita a ativação de PAR-1 e PAR-2 por peptídeos sintéticos (KAWABATA, 2003).

A alteração da motilidade gastrointestinal também está envolvida na etiologia de lesões gástricas por agentes como os AINES e pelo estresse, pelo aumento da motilidade mediada pela inibição da síntese de prostaglandinas e pelo estímulo vagal, respectivamente (ATAY et al., 2000; OVERMIER & MURISON, 2000). Nas Figuras 11 e 12, são mostrados os resultados da avaliação da ação de P1G10 sobre as taxas de esvaziamento gástrico e trânsito intestinal. Constatamos que a fração não alterou significativamente estes parâmetros, evidenciando seu não envolvimento no tônus muscular, e, portanto a não participação do sistema colinérgico na atividade gastroprotetora mediada pela fração. A via colinérgica, que inerva a camada de músculo circular do TGI, atuando nos receptores M1 e M3, é a principal responsável pela motilidade gastrointestinal, e a alteração dessa função está relacionada com distúrbios gastroesofágicos (HANSEN, 2003).

Com base nos resultados obtidos sugerimos que P1G10 é eficaz em proteger o estômago contra lesões promovidas por diferentes agentes, sendo necessárias doses mais baixas que as preconizadas para medicamentos utilizados clinicamente, como ranitidina (100 mg/kg) e sucralfato (250 mg/kg). Esta atividade gastroprotetora parece ser devido à inibição da secreção ácida, à redução da atividade péptica, e ao aumento de fatores protetores da mucosa, como muco e grupos sulfidrilas, mas independente de sua atividade proteolítica e da participação de óxido nítrico.

Atividade cicatrizante gástrica

A cicatrização de úlceras é um processo complexo e altamente regulado de preenchimento do defeito na mucosa por células epiteliais em proliferação/migração e por tecido conjuntivo. Esse processo inclui o restabelecimento da continuidade da camada epitelial, estruturas glandulares epiteliais, microvasos e tecido conjuntivo dentro da lesão (TARNAWSKI et al., 2001), obedecendo temporalmente a seguinte ordem: 1) de 0 a 3 dias, formação da úlcera com necrose do tecido, infiltração inflamatória e formação da margem da úlcera; 2) de 3 a 10 dias, fase rápida de cicatrização envolvendo migração rápida de

células epiteliais e contração da base da úlcera; 3) de 10 a 20 dias, fase lenta da cicatrização que compreende angiogênese, remodelação dos tecidos de granulação e completa reepitelização da cratera da úlcera (SCHMASSMANN, 1998). Todas as etapas são controladas por fatores de crescimento e citocinas, sendo a expressão destes ordenada de maneira espacial e temporal (TARNAWSKI, 2005).

É bem conhecido que em muitos modelos de ulcerogênese são produzidas erosões menores e diferentes histologicamente da úlcera péptica crônica humana, com relação à patomorfologia e características de cura. Um dos modelos que mais se assemelha à úlcera gástrica em humanos, é o de indução de úlcera por ácido acético em ratos, introduzido por TAKAGI et al. (1969). A instilação do ácido na mucosa gástrica produz uma lesão delimitada e profunda e que responde bem a vários tipos de agentes anti-úlcera. Devido a essa característica, esse modelo vem sendo muito utilizado na determinação do potencial de substâncias capazes de minimizar o agravamento das lesões gástricas crônicas e/ou de acelerar processos envolvidos na cicatrização (BRZOZOWSKI, 2003; OKABE & AMAGASE 2005).

O tratamento convencional de lesões gástricas baseia-se no princípio de equilíbrio entre os compostos que promovem proteção e degradação da mucosa gástrica. Medicamentos que promovam maior síntese da barreira muco-bicarbonato ou que atuem na diminuição de secreção ácido-péptica têm sido muito utilizados na clínica. No entanto a utilização de mitógenos tem sido uma promissora alternativa no tratamento desta patologia. Inicialmente estudos avaliando a atividade antiúlcera de fatores de crescimento como EGF demonstraram resultados superiores ao expressados por animais tratados com cimetidina nas mesmas condições experimentais (SZABO, et al., 1994), bem como PDGF apresentou evidenciada eficácia no tratamento de úlceras de duodeno e gastrites crônicas (VATTARY et al., 1991; KUSSTATSCHER & SZABO, 1993). Esses fatores de crescimento aumentaram a taxa de reepitelização, o número de microvasos na região da lesão, acelerando assim a cicatrização (SATO, et al., 1997).

A partir da constatação da atividade cicatrizante cutânea da fração P1G10 e do efeito mitogênico de frações purificadas a partir desta, inferimos que essa fração poderia atuar, também, como um agente cicatrizante de úlceras gástricas já estabelecidas. Assim, em estudos prévios, demonstrou-se tal atividade para P1G10 utilizando o modelo de indução de úlceras por ácido acético (MELLO et al., 2008). A fração administrada durante 8 dias foi capaz de reduzir em 63% o tamanho das lesões, sendo o efeito semelhante ao observado para o omeprazol (52%) e melhor quando comparado ao apresentado pela ranitidina (40%). Entretanto, apesar do efeito semelhante, a fração apresentou vantagens sobre esses fármacos. Em estudos toxicológicos, a administração crônica de P1G10 não promoveu a inibição das enzimas do citocromo P450 (VILLALBA et al., 2007), ocorrência comum com a utilização dos inibidores de bomba H⁺/K⁺ ATPase (MASUBUCHI et al., 1997), nem alterou a síntese de esteróides endógenos, fortemente aumentada pela ranitidina (RENDIC, 1999). Além disso, a dose que produziu o melhor efeito foi a mesma utilizada para o omeprazol (10 mg/kg) e 10 vezes menor que a utilizada de ranitidina (100 mg/kg) (MELLO et al., 2008). Diante desse resultado, buscamos avaliar mecanismos envolvidos no efeito cicatrizante da fração P1G10, no modelo de úlceras por ácido acético.

Como podemos observar na Figura 14, a inibição da atividade proteolítica de P1G10 reduziu significativamente seu efeito cicatrizante, sugerindo ser essa atividade importante para esse efeito. A atividade proteolítica da fração provavelmente está associada a um efeito debridante da mesma, uma vez que se encontra na literatura o relato de agentes dotados de atividade proteolítica acelerando a cicatrização de lesões através do debridamento das mesmas (AYELLO & CUDDIGAN, 2004). Na cicatrização de úlceras gástricas, este processo ocorre naturalmente, onde fibroblastos são ativados e estimulam a formação de um tecido de granulação e a síntese de colágeno, elastina e a liberação de proteases endógenas, que atuam na remoção do tecido necrótico formado na base da lesão e no remodelamento fisiológicos (TARNAWSKI, 2005). O debridamento, ao impedir o acúmulo de tecido necrótico na base da lesão, dificulta o crescimento de microrganismos e

a instalação de uma infecção, além de proporcionar um suprimento vascular adequado à cicatrização (WALDROM & TREVOR, 1993). Como já aqui descrito anteriormente, mesmo em pH ácido, a fração P1G10 ainda apresenta uma atividade proteolítica substancial, sugerindo que esta fração poderia exercer um leve debridamento na ulceração estabelecida, facilitando, assim, o processo de cicatrização (dados não apresentados).

O uso de cisteíno proteinases no tratamento de ulcerações crônicas cutâneas vem sendo estudado, devido ao uso de proteases com ação debridante ser cada vez mais evidenciado na terapêutica (HEWITT et al., 2000). ROSENBERG et al. (2004) demonstraram a aplicação da bromelina (uma cisteíno protease obtida de *Ananas comosus*) como agente debridante em queimaduras, acelerando o processo de cura. Na clínica, o debridamento enzimático cutâneo tem sido efetuado com o uso de papaína 2 a 10% (KLASEN, 2000, PIEPER & CALIRI, 2003). Como as cisteíno proteases presentes no látex de *C. candamarcensis* possuem características estruturais similares às encontradas na papaína, contudo, apresentando atividades proteolíticas até 5 vezes maiores (BRAVO et al., 1994), pode-se esperar que um efeito debridante de P1G10 possa estar envolvido na sua atividade cicatrizante. Esta hipótese é apoiada pela análise microscópica de cortes de estômagos de animais submetidos à indução de úlceras crônicas e tratados com a fração ativa ou inibida, como mostrado nas Figuras 16.1 e 16.2. Nesse material é possível observar, além da redução do tamanho da lesão (com as medidas mostradas na Tabela 3), a redução do material fibrino-necrótico-leucocitário e a maior organização do tecido de granulação no grupo tratado com P1G10 em relação ao grupo controle e ao grupo P1G10 IAA. Essas observações evidenciam uma melhoria na qualidade de cicatrização tecidual, promovida por P1G10, à qual está ligada sua atividade proteolítica.

Prosseguimos o estudo buscando entender os mecanismos envolvidos no efeito cicatrizante de nossa fração e de que maneira estaria envolvida a atividade proteolítica na mesma. Assim, avaliamos as ações da fração ativa e inibida em duas etapas imprescindíveis do processo de cicatrização: a proliferação celular e a angiogênese.

Como já descrito, a proliferação celular é necessária para reconstituição da mucosa gástrica. Na margem da úlcera, células epiteliais proliferam e migram para o tecido de granulação, de modo a promover tanto a reepitelização como a reconstrução das estruturas glandulares. Deste processo participam citocinas liberadas pelas células em proliferação e vários fatores de crescimento, como: EGF, HGF, bFGF e PDGF, os quais podem ser utilizados como marcadores da proliferação celular (TARNAWSKI, 2000). Além dos fatores de crescimento, um dos marcadores mais utilizados é o antígeno de proliferação celular (PCNA – “*proliferating cell nuclear antigen*”), que atua como co-fator para a DNA polimerase delta (NANJI & TAHAN, 1996), sendo essencial para a síntese de DNA. Assim, é considerado um agente associado à replicação celular, sendo a sua expressão um indicativo de proliferação celular ativa (MARTINEZ-LARA et al., 1996).

Neste trabalho, a atividade proliferativa de P1G10 em úlceras gástricas foi avaliada através da imunolocalização do PCNA. Na Figura 17 é possível observar que tanto nos cortes de animais tratados com a fração P1G10 quanto com P1G10 IAA ocorreu marcação para PCNA aumentada nos bordos das lesões quando comparado ao grupo controle, indicando atividade proliferativa. Na quantificação da mesma (Figura 18), esta observação foi comprovada, mostrando que o estímulo da proliferação nos animais tratados com P1G10 ou com a fração inibida foi cerca de 4 vezes maior que o observado para o grupo controle. Estes resultados demonstram que o estímulo da proliferação celular constitui um dos mecanismos através dos quais P1G10 exerce sua atividade cicatrizante gástrica, entretanto, este efeito não está relacionado à sua atividade proteolítica. Essa observação é corroborada por estudos anteriores do nosso grupo, onde se verificou que a atividade mitogênica *in vitro* de frações obtidas a partir de purificações sequenciais de P1G10 sobre fibroblastos não é dependente da atividade proteolítica (GOMES et al., 2008).

Ainda sobre estudos anteriores do grupo, proteases purificadas a partir da fração P1G10, apresentaram atividade mitogênica sobre fibroblastos L929 através da ativação de ERK-2, mostrando a participação da via das MAP-quinases neste efeito (GOMES et al., 2005). O estímulo desta via por cisteíno

proteases não pertencentes a mamíferos, já foi descrito, sendo a ativação das MAP-quinases feita através da clivagem e ativação de PARs. A gingipaína, uma cisteíno protease sintetizada pela bactéria *Porphyromonas gingivalis* – considerada como uma das principais causadoras de periodontite – é capaz de induzir as células epiteliais locais a liberarem a interleucina pró-inflamatória IL-6, num processo dependente da clivagem de PAR-1 e PAR-2 com a ativação de MAP-quinases (LOURBAKOS et al., 2001). Diante da observação da irrelevância da atividade proteolítica de P1G10 para a proliferação celular *in vivo*, visto neste trabalho e de suas frações *in vitro* (GOMES, 2008; MELLO, 2005), acreditamos que a ativação de tais receptores não ocorre via clivagem, como também visto na atividade gastroprotetora, mas, não descartamos a possibilidade de ação de algum determinante peptídico agir como agonista de receptores PAR. Outra possibilidade seria a atuação direta das proteases em receptores de fatores de crescimento, tais como os de EGF e de PDGF. Estes receptores também podem ser ativados via MAP-quinases e exercer assim a modulação de genes ligados à proliferação celular. A presença de EGF em plantas não foi documentada, porém em um trabalho foi descrita a presença de receptor transmembrânico para EGF em *Rabidopsis thaliana* (KOHORN et al., 1992), abrindo precedentes para a presença de fatores de crescimento similares ao EGF em plantas.

Outra etapa importante no processo de cicatrização gástrica é a angiogênese, que permite a formação de novos vasos na área lesada, garantindo o suprimento de oxigênio e nutrientes essenciais para o reparo tecidual. A angiogênese ocorre a partir do tecido de granulação desenvolvido na base da úlcera, que é composto de fibroblastos, macrófagos e células endoteliais em proliferação, sob o controle de fatores de crescimento angiogênicos (bFGF, VEGF, PDGF e angiopoietinas) e citocinas. O estímulo para a expressão destes fatores e seus receptores parece ser a hipóxia, causada pela lesão vascular e microvascular no tecido (TARNAWSKI, 2005). Juntamente, com a estimulação-ativação de fatores de crescimento são induzidas determinadas proteases e inibidores de proteases, as quais permanecem durante todo o processo de angiogênese (PEPPER &

MONTESANO, 1990). A proteólise da membrana basal é o processo inicial da angiogênese, sendo necessária para induzir a invasão de células endoteliais microvasculares e a formação do tubo, que dará origem ao vaso. É mediada pelas metaloproteases, que são secretadas por células endoteliais, linfócitos e monócitos, que devem estar ativados para tal função. Esta ativação é dependente da interação, na superfície celular, de moléculas de adesão, que participam desde a proteólise até a formação do vaso propriamente dito. Durante a inflamação, células endoteliais são expostas a várias citocinas que induzem uma série de moléculas de adesão. Uma destas é a VCAM-1 (molécula de adesão celular vascular-1), que se liga a uma integrina presente na superfície de linfócitos e monócitos, denominada VLA-4 (“*very late antigen-4*”). A interação VCAM-1/VLA-4 estimula a secreção de proteases por essas células, que degradam a matriz e permitem as células endoteliais de se ancorarem e aí proliferarem. Após a proteólise, a formação do tubo ocorre. Os eventos iniciais da formação dos vasos são mediados pela interação de moléculas de adesão do tipo PECAM-1 (molécula de adesão plaqueta-célula endotelial-1), que atuam promovendo a interação célula-célula, levando a estruturação das mesmas no tubo (CHOW et al., 1998). Esse é um evento essencial no processo de angiogênese, e a importância de PECAM-1 neste processo já foi evidenciada em estudos *in vitro* onde a aplicação de anticorpos anti-PECAM-1 inibiram a formação do tubo (HARSCH et al., 2003).

A atividade angiogênica de P1G10 já foi constatada por nosso grupo, utilizando o modelo de implante de esponja em dorso de camundongos. A administração da fração durante 8 dias foi capaz de aumentar a concentração de hemoglobina e de células que participam do processo (MELLO et al., 2008). No presente estudo, a angiogênese foi avaliada através da imunolocalização de PECAM-1/CD31 em cortes de estômagos de animais submetidos à indução de úlceras pelo ácido acético. Analisando os cortes, mostrados na Figura 19 observamos que não houve diferença na densidade de vasos entre os grupos testados, o que foi comprovado pela análise quantitativa, apresentada na Figura 20. Entretanto, observamos uma tendência de aumento da densidade de vasos nas lesões dos animais tratados com a fração ativa ou inibida, que

pode ser explicada pelo fato de que a angiogênese é a última fase de proliferação, sendo mais evidente do 10º ao 20º dia a partir da formação da úlcera (SCHMASSMANN, 1998) e nossa análise ter ocorrido no 9º dia. Assim, acreditamos que o aumento da densidade de vasos observada poderia ter sido significativa, com a extensão do tratamento.

Uma observação feita em relação ao tratamento dos animais com P1G10 é que o tratamento com a fração ativa, além de acelerar a cicatrização das úlceras, estimulou o ganho de peso dos animais (Figura 15). Pacientes com úlceras gástricas, freqüentemente apresentam desconforto epigástrico, com dor, perda de apetite e de peso, o que contribui ainda mais para a piora do estado de saúde (RAMAKRISHNAN & SALINAS, 2007). O ganho de peso dos animais observado mostra que o tratamento com a fração melhorou a condição física dos mesmos, o que representa mais um ponto positivo da fração P1G10 no tratamento das ulcerações gástricas.

Em suma, a cicatrização de úlceras é acelerada pela administração de P1G10 e dependente de sua atividade proteolítica, sugerindo que uma possível ação debridante da fração contribua para o reparo tecidual. Neste processo também está envolvida a ação proliferativa da fração, apontando para um sinergismo entre esse estímulo e a atividade proteolítica.

7. CONCLUSÃO

Neste estudo evidenciamos a atividade anti-úlceras da fração P1G10 que, além de proteger a mucosa gástrica contra a ação lesiva dos principais agentes envolvidos na gênese da úlcera, possui interessante atividade cicatrizante nesse tipo de lesão. Esses efeitos parecem ser devidos à inibição da secreção ácido-péptica, ao aumento dos níveis de fatores protetores da mucosa e ao estímulo da proliferação celular. A atividade proteolítica da fração se mostrou importante para o processo de cicatrização de úlceras, porém, não influencia a proliferação celular e a angiogênese. Diante disso, concluímos que a atividade gastroprotetora acrescida da capacidade de estimular a proliferação celular fazem da fração P1G10 um produto de grande potencial como agente anti-úlceras.

8. REFERÊNCIAS

ABITBOL, R.A. Doença ulcerosa péptica. In: Medstudents: Rotinas de Clínica Médica. Disponível em: <http://www.medstudents.com.br/rotinas/clinmed/dup.htm>. Acesso em: 20 maio 2007.

AIHARA T.; NAKAMURA, E.; AMAGASE, K. ET AL. Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: past, present, and future. *Pharmacol Ther*, 98:109-27, 2003.

ALLEN, A. & FLEMSTROM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am J Physiol Cell Physiol*, 288(1):C1-19, 2005.

AL-SHABANAH, O. A.; RAZA, M.; AL-HARBI, M. M et al. Effect of ninhydrin on the biochemical and histopathological changes induced by ethanol in gastric mucosa of rats. *Life Sci*. 67(5):559-566, 2000.

ANSON, M. L. The estimation of pepsin, trypsin, papain and catepsin with hemoglobin. *J Gen Physiol*, 22:78-89, 1938.

ARISAWA, T.; SHIBATA, T.; KAMIYA, Y. Effects of sucralfate, cimetidine and rabeprazole on mucosal hydroxyproline content in healing of Ethanol-Hcl-induced gastric lesions. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 33:628-632, 2006.

ARRIETA, J.; BENITEZ, J.; FLORES, E.; CASTILLO, C.; NAVARRETE, A. Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. *Planta Med*, 69(10):905-909, 2003.

ATAY, S.; TARNAWSKI, A. S.; DuBOIS, A. Eicosanoids and the stomach. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 61(4):105-124, 2000.

AVILA, J. R.; LASTRA, A. D. L.; MARTÍN, M. J. et al. Role of endogenous sulphhydryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. *Inflamm Res*, 45:83-88, 1996.

AYELLO, E. A. & CUDDIGAN, J. E. Debridement: controlling the necrotic/cellular burden. *Adv Skin Wound Care*, 17(2):66-75, 2004.

AZARKAN, M.; WINTJENS, R.; LOOZE, Y. & VOLANT, D.B. Detection of three wound-induced proteins in papaya latex. *Phytochem*, 65(5):525-534, 2004.

BAEZA, G.; CORREA, D.; SALAS, C. E. Proteolytic enzymes in *Carica candamarcensis*. *J Sci Food Agric*, 51:1-9, 1990.

BAKER, E. L.; BAKER, W. L. & CLONEY, D. J. Resolution of a phytobezoar with Aldoph's Meat Tenderizer. *Pharmacotherapy*, 27:299-302, 2007.

BAÑUELOS, O.; CASQUEIRO, J.; GUTIERREZ, S.; RIANO, J. & MARTIN, J. F. The specific transport system for lysine is fully inhibited by ammonium in *Penicillium chrysogenum*: an ammonium-insensitive system allows uptake in carbon-starved cells. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 77:91-100, 2000.

BAROCELLI, E. & BALLABENI, V. Histamine in the control of gastric acid secretion. *Pharmacol Res*, 47:299-304, 2003.

BARRETT, A. J. & RAWLINGS, N.D. Evolutionary lines of cysteine peptidases. *Biol. Chem.*, 382(5): 727-733, 2001.

BASTAKI, S. M.; CHANDRANATH, S. I.; SINGH, J. Comparison of the antisecretory and antiulcer activity of epidermal growth factor, urogastrone and transforming growth factor alpha and its derivative in rodents in vivo. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 236:83-94, 2002.

BATISTA, L. M.; ALMEIDA, A. B. A.; PIETRO MAGRI, L. Gastric Antiulcer Activity of *Syngonanthus arthrotrichus* SILVEIRA *Biol. Pharm. Bull.* 27(3):328-332, 2004.

BAZAN, J.F. & FLETTERICK, R.J. (1988). Viral cysteine proteinases are homologous to the trypsin-like family of serine proteases: structural and functional implication. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*, 85: 7872-7876.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo/SP: EDART, Editora da Universidade de São Paulo, 1976.

BELAICHE, J.; BURETTE, A.; DE, V. M.; LOUIS, E.; HUYBRECHTS, M.; DELTENRE, M. Observational survey of NSAID-related upper gastro-intestinal adverse events in Belgium. *Acta Gastroenterol. Belg.*, 65(2):65-73, 2002.

BEUTH, J.; OST, B.; PAKDAMAN, A.; RETHFELDT, E. et al. Impact of complementary oral enzyme application on the postoperative treatment results of breast cancer patients- results of an epidemiological multicentre retrospective cohort study. *Cancer Chemother Pharmacol*, 47: 45-54, 2001.

BLACK, J. W.; DUNCAN, W. A. M.; DURANT, C. J. et al. Definition and antagonism of histamine H₂ receptors. *Nature*, 236:385-390, 1972.

BOLDI, A. Libraries from natural products-like scaffolds. *Curr Opin Chem Biol*, 8:281-286, 2004.

BRAVO, L. M.; HERMOSILLA, J.; SALAS, C. A biochemical comparison between latex from *C. candamarcensis* and *C. papaya*. *Braz J Med Biol Res*, 27:2831-2862, 1994.

BRIMBLECOMBE, R. W.; DUNCAN, W. A. M.; DURANT, D. J. et al. The pharmacology of cimetidine, a new histamine H₂-receptor antagonist. *Br J Pharmacol*, 53(3):435P-436P, 1975.

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

BRZOZOWSKI, T.; KWIECIEN, S.; KONTUREK, P. C. H. et al. 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 Monitor*, 7:592-599, 2001.

BULUT, R.; UNLUCERCI, Y.; BEKPINAR, S.; KUNTSAL, L. Nitric oxide-mediated regulation of gastric H⁺, K⁺-ATPase and alcohol dehydrogenase following ethanol induced injury in rats. *Dig Dis Sci*, 7:1417-1422, 1999.

CALATAYUD, S.; SANZ, M. J.; CANET, A.; BELLO, R. et al. Mechanisms of gastroprotection by transdermal nitroglycerin in the rat. *Br J Pharmacol*, 127:1111-1118, 1999.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res*, 33:179-189, 2000.

CASTRO, I.R. Studies on papain production. *Natural Sci Depart Bureau Tech J*, 233:81-88, 1981.

CENTANNI, M.; GARGANO, L.; CANETTIERI, G et al. Thyroxine in goiter, *Helicobacter pylori* infection, and chronic gastritis. *N Engl J Med*, 354(17):1787-1795, 2006.

CHAN, F. K.; SUNG, J. J. Role of acid suppressants in prophylaxis of NSAID damage. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 15: 433-45, 2001.

CHAPMAN, H. A. Endosomal proteolysis and MHC class II function. *Curr Opin Immunol*. 10(1):93-102, 1998.

CHEN, C. F.; CHEN, S. M.; CHOW, S. Y.; HAN, P. W. Protective effects of *Carica papaya* Linn on the exogenous gastric ulcer in rats. *Am J Chin Med*, 9:205-212, 1981.

CHONG, Y. S.; SU, L. L.; ARULKUMARAN, S. Misoprostol: a quarter century of use, abuse and creative misuse. *Obstet Gynecol Surv*, 59(2): 128-140, 2004.

CHOW, J. Y. C.; MA, L. & CHO, C. H. The role of adhesion molecules in gastric ulcer healing *World J Gastroenterol*, 4(6):467-468, 1998.

CHUANG, C.N.; CHEN, M. C. Y.; SOLL, A. H. Gastrin-Histamine interactions: direct and paracrine elements. *Scand J Gastroenterol*, 26:95-103, 1991.

CHUNG, S. M. & KAWAI, K. Protease activities in gastric cancer tissues. *Clin Chim Acta*. 189(2):205-210, 1990.

CNUBBEN, N. H. P.; RIETJENS, I. M. C. M.; NORTELBOER, H. et al. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10:141-52, 2001.

COLLARES-BUZATO, C. B. & ARANA, S. Células: uma abordagem multidisciplinar. Células Oxíntica. In: Carvalho, H.F.; Collares-Buzato, C.B. (org). Ed: Manole, Barueri, 1ª edição, 2005; 112-125.

COSTA, M. & BROOKES, S. J. H. The enteric nervous system. *Am J Gastroenterol*, 89:S129-S137, 1994.

DALEY, R.; REBUCK, J. A. WELAGE, L. S.; ROGERS, F. B. Prevention of stress ulceration: Current trends in critical care. *Crit Care Med*, 32(10):2008-2013.

DAWSON, R. M. C.; ELLIOTT, D. C.; ELLIOTT, W. H.; JONES, K. M., Data for Biochemical Research. Oxford Science Publications - Third Edition, 1995.

DEMBINSKI, A.; WARZECHA, Z.; CERANOWICZ, P. et al. Role of capsaicin sensitive nerve and histamine, H₁, H₂ and H₃ receptors in the gastroprotective effect of histamine against stress ulcer in rats. *Eur J Pharmacol*, 508:211-222, 2005.

DJAHANGUIRI, B. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. *Scand J Gastroenterol*, 4:265-267, 1969.

DOUTHWAITE, A. H; LINTOTT, S. A. M. Gastroscopic observation of the effect of aspirin and certain other substances on the stomach. *Lancet*, 2:1222-1225, 1938.

ENGEL, J. C.; TORRES, C.; HSIEH, I. et al. Upregulation of the secretory pathway in cysteine protease inhibitor-resistant *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci*, 113(Pt 8):1345-1354, 2000.

ESPLUGUES, J. V.; MART-CABRERA, M. & PONCE, J. Seguridad de la utilización de los inhibidores de la bomba de protones. *Med Clin (Barc)*, 127(20):790-5, 2006.

EVANS, F. The gastrointestinal Tract. *Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of plant Material*. 25-45, 1996.

EVERTS, V.; VAN DER ZEE, E.; CREEMERS, L.; BEERTSEN, W. Phagocytosis and intracellular digestion of collagen, its role in turnover and remodeling. *Histochem J*, 28(4):229-245, 1996.

FADÝLOĞLU, S. Immobilization and characterization of ficin. *Nahrung*. 45(2):143-146, 2001.

FARREL, B. D.; DUSSOURD, D. E. & MITTER, C. Escalation of plant defense: do latex and resin canals spur plant diversification? *Am Nat*, 138:881-990, 1991.

FLEMSTRÖM, G. & ISENBERG, J. I. Gastroduodenal mucosal alkaline secretion and mucosal protection. *News Physiol Sci*, 16:23-28, 2001.

FLEMSTRÖM, G.; HÄLLGREN, A.; NYLANDER, O et al. Adherent surface mucus gel restrict diffusion of macromolecules in rat duodenum in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 277:G375-G382, 1999.

GLAVIN, G. B. & SZABO, S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. *Faseb J*, 6:825-831, 1992.

GOMES, M. T. R. Caracterização bioquímica e farmacológica de proteases do látex de *Carica candamarcensis* com atividade mitogênica. 2008. 146 f. Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GOMES, M. T. R.; MELLO, V. J.; RODRIGUES, K. C. et al. Isolation of two plant proteinases in latex from *Carica candamarcensis* acting as mitogenic for mammalian cells. *Planta Med*, 71:244-248, 2005.

GRAVINA, M.; TERMIGNONI, C.; SALAS, C. E. Biochemical characterization of a new cysteine endopeptidase from *Carica candamarcensis* L. *Plant Sci*, 102:11-18, 1994.

GRITTI, I.; BANFI, G.; ROI, G. S. Pepsinogens: physiology, pharmacology, pathophysiology and exercise. *Pharmacol Res*, 41(3):265-281, 2000.

HANSEN, M.B. Neurohumoral Control of Gastrointestinal Motility. *Physiological research*, 52:1-30, 2003.

HARSCH, I. A.; BRZOZOWSKI, T.; BAZELA, K. et al. Impaired gastric ulcer healing in diabetic rats: role of heat shock protein, growth factors, prostaglandins and proinflammatory cytokines. *Eur J Pharmacol*, 481:249-260, 2003.

HAWKINS, C. & HANKS, G. W. The gastroduodenal toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a review of the literature. *J Pain Symptom Manage*, 20(2):140-51, 2000.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 407(6805):770-776, 2000.

HEWITT H.; WHITTLE, S.; LOPEZ, S. et al. Topical use of papaya in chronic skin ulcer therapy in Jamaica. *West Indian Medicine Journal* , 49:32-33. 2000.

HILLS, B. A. Gastric surfactant and the hydrophobic mucosal barrier. *Gut*, 39(5):621-624, 1996.

HIRAYAMA, K. K.; KONNO, K.; HIRAYMA, C. et al. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *Plant J*, 37(3):370-378, 2004.

HIRSCHOWITZ, B. I., KEELING, D., LEWIN, M. et al. Pharmacological aspects of acid secretion. *Dig Dis Sci*, 40:3S-23S, 1995.

HOGBEN, C. A.; KENT, T. H. ;WOODWARD, P. A.; SILL, A. J. Quantitative histology of gastric mucosa: Man, dog cat, guinea pig, and frog. *Gastroenterol*, 67:1143-1154, 1974.

HOOGERWERF, W. A. & PASRICHA, P. J. Agentes utilizados para o controle da acidez gástrica e no tratamento de úlceras pépticas e na doença do refluxo gastroesofágico. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.: Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 10ª Ed., São Paulo: Mc Graw Hill, 757-768, 2003.

ISENBERG, J. I.; THOMPSON J. C. Medical progress and ulcer disease: three key observations that changed the compass. *Gastroenterol*, 113(3):1031-1033, 1997.

JONES, M. K.; TOMIKAWA, M.; MOHAJER, B. & TARNAWSKI, A. S. Gastrointestinal mucosal regeneration: role of growth factors. *Frontiers in Bioscience*, 4:d303-309, 1999.

KAWABATA, A. Gastrointestinal functions of proteinase-activated receptors. *Life Science*, 74:247-254, 2003.

KAWABATA, A.; KINOSHITA, M.; NISHIKAWA, H.; et al. The protease-activated receptor-2 agonist induces gastric mucus secretion and mucosal cytoprotection. *J. Clin. Invest.*, 107:1443-1450, 2001.

KAWANO, S. & TSUJI, S. Role of mucosal blood flow: a conceptional review in gastric mucosal injury and protection. *J Gastroenterol Hepatol*, 15(Suppl):D1-D6, 2000.

KENJI NAGAHAMA, M. S.; MASANORI YAMATO, M. S.; HIKARU NISHIO, B. A. & TAKEUCHI, K. Essential Role of Pepsin in Pathogenesis of Acid Reflux Esophagitis in Rats. *Dig Dis Sci*, 51(2):303-309, 2006.

KETWICK, R. G. O. Latex and Laticifers. *Ency Life Sci, NPG*, 1-6, 2001.

KINOSHITA, M.; TSUNEHISA, N.; TAMAKI, H. Effect of a combination of Ecabet Sodium and cimetidine on experimentally induced gastric lesions and gastric mucosal resistance to ulcerogenic agents in rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 18(2):223-226, 1995.

KLASEN, H. J. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns*. 26:131-138, 2000.

KOHORN, B. D.; LANE, S. & SMITH, T. A. An *Arabidopsis* serine/threonine kinase homologue with an Epidermal Growth Factor repeat selected in yeast for its specificity for a thylakoid membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 10989-10992, 1992.

KONTUREK, S. J.; BRZOZOWSKI, T.; PYTKO-POLONCZYK, J. Nitric oxide in gastroprotective and ulcer healing effects of sucralfate. *Scand J Gastroenterol Suppl.*, 210::22-27.

KRAUSSLICH, H.C. & WIMMER, E. (1988). Viral proteinases. *Ann. Ver. Biochem.*, 57: 701-754.

KUSSTATSCHER, S.; SZABO, S. Effect of platelet-derived growth factor (PDGF) on the healing of chronic gastritis in rats. *Gastroenterology*, 104:A125, 1993.

KUTCHAI, H. C. Gastrointestinal secretions. In: principles of Physiology. Ed. By R.M. Berne and M.N. Levy, 2nd Edition, Mosby-Year Book Inc., St. Louis, Missouri, 516-589, 1996.

LA CASA, C.; VILLEGAS, I.; DE LA LASTRA, A. et al. Evidence for protective and antioxidant propepts of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *J Ethnopharmacol*, 71:45-73, 2000.

LABROU, N.E. & RIGDEN, D.J. (2004). The structure-function relationship in the clostripain family of peptidases. *Eur. J. Biochem.*, 271(5): 983-992.

LAEMMLI, U. K. Protein in electrophoresis in slab gels. *Nature*, 227: 680-683, 1970.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K. & TARNAWSKI, A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. *Gastroenterol*, 135:41-60, 2008.

LAINE, L.; WEINSTEIN, W. M. Histology of alcoholic hemorrhagic gastritis: a prospective evaluation. *Gastroenterol.*, 94:1254-1262, 1988.

LAMBIN, P. & FINE, J. M. Molecular weight estimation of proteins by electrophoresis in linear polyacrylamide gradient gels in the absence of denaturing agents. *Anal. Biochem.*, 15, 98(1):160-168, 1979.

LÁSZLÓ, A.; SOHÁR, I.; KARÁCSONYI, S, et al. Activities of serum cathepsin (B, H and L) and metalloproteinase (MMP7-ase) in patients with gastrointestinal and bronchial malignant tumours. *Acta Med Hung* 47(1-2):107-109, 1990.

GOMES, F. S.; SPÍNOLA, C. V.; RIBEIRO, H. A. et al. Wound-healing activity of a proteolytic fraction from *Carica candamarcensis* on experimentally induced burn. *Burns*, 2009. (in press)

LE, Q. L.; ZHANG, J.; XU, Q. Z.; GAO, H. V. Role of nitric oxid in omeprazole protection of the gastric mucosa in rats. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*. 21(12):926-928, 2001.

LEHMANN, F. S.; HILDEBRAND, P.; BEGLINGER, C. New molecular targets for treatment of peptic ulcer disease. *Drugs*, 63(17):1785-1797, 2003.

LEMOS, F. O., MELLO, V.J., CASSALI, G. D., SALAS, C.E., LOPES, M.T.P, Pre-clinic evaluation of proteases from *C. candamarcensis* as termal healing principles. First Internacional Symposia about Pharmacology of Natural products, Varadero, Cuba, 2006.

LEON, J. Botánica de Los Cultivos Tropicales. San Jose: IICA, 445, 1987.

LEVENSTEIN, S. Stress and peptic ulcer: life beyond helicobacter. *BMJ (Clinical research ed.)*. 316:538-541, 1998.

LEWIS, D.; HANSON, P.J. Anti-ulcer drugs of plant origin. *Progress in Medicinal Chemistry*, 28:201-31, 1991.

LIPTAK, G.B. HUNT, V.R.D. BARRS, S.F. FOSTER, P.L.C. Tisdall, C.R. O'brien, R. Malik. Gastroduodenal ulceration in cats: eight cases and a review of the literature. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 4, p. 27–42, 2001.

LONGHURST, J. C.; KAUFMANN, M. P.; ORDWAY, G. A.; MUSCH, T. L. Effects of bradykinin and capsaicin on endings of afferent fibers from abdominal visceral organs. *Am J Physiol – Regul Integ Compar Physiol*, 247(16):R552-R559, 1984 (a).

LONGHURST, J. C.; STTEBINS, C. L.; ORDWAY, G. A. Chemically induced cardiovascular reflexes arising from the stomach of the cat. *Am J Physiol - Heart Circul Physiol*, 247(16):459-466, 1984 (b).

LOURBAKOS, A., POTEMPA, J., TRAVIS, J., D'ANDREA, M.R., ANDRADE-GORDON, P., SANTULLI, R., MACKIE, E.J. & PIKE, R.N. (2001). Arginine-specific protease from *Porphyromonas gingivalis* activates protease-activated receptors on human oral epithelial cells and induces interleukin-6 secretion. *Infect. Immun.*, 69: 5121–5130.

LUCEY, M. R. & YAMADA, T. Biochemistry and physiology of gastrointestinal somatostatin. *Dig Dis Sci*, 34:5S-13S, 1989.

MAEDA, K.; CHUNG, Y. S.; TAKATSUKA, S. et al Tumour angiogenesis and tumour cell proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma. *Br J Cancer.*, 72(2):319-323, 1995.

MAHMOUDZADEH-NIKNAM, H. & MCKERROW, J.H. *Leishmania tropica*: cysteine proteases are essential for growth and pathogenicity. *Exp. Parasitol.*, 106: 158-163, 2004.

MARON, D. M. & AMES, B. N. Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mut Res*, 113:173-215, 1983.

MARTINEZ-LARA, I.; GONZALEZ-MOLES, M. A.; RUIZ-AVILA, I. et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as a marker of dysplasia in oral mucosa. *Acta Stomatol.Belg.*, 93(1):29-32, 1996.

MASUBUCHI, N.; HAKUSUI, H.; OKAZAKI, O. Effects of pantoprazole on xenobiotic metabolizing enzymes in rat liver microsomes: a comparison with other proton pump inhibitors. *Drug Metab Dispos*, 25:584–589, 1997.

MCKERROW, J. H.; ENGEL, J. C.; CAFFREY, C. R. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. *Bioorg Med Chem*, 7(4):639-644, 1999.

MELLO, V. J. Avaliação da atividade cicatrizante gástrica/cutânea e de parâmetros toxicológicos da fração purificada P1G10 do látex de *Carica candamarcensis*. 2005. 201f. (Tese de doutorado em Farmacologia e Fisiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

MELLO, V. J., GOMES, M. T. R., RODRIGUES, K. C. L. et al. Plant Proteinases: their potential as therapeutic drugs. In: Govil, J.N., Singh, V.K., Arunachalam, C. *Drug Develop Molec Texas Studium Press*, 211-224, 2006.

MELLO, V. J.; GOMES, M. T. R.; LEMOS, F. O. et al. The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*. *Phytomedicine*, 15(4):237-244, 2008.

MELLO, V.J. Avaliação da atividade cicatrizante gástrica/cutânea e de parâmetros toxicológicos da fração purificada P1G10 do látex de *Carica candamarcensis*. 2005. 201f. (Tese de doutorado em Farmacologia e Fisiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

MESIA-VELA S. Mecanismos das ações anti-secretora ácida e antiúlcera gástrica de princípios isolados do gervão-roxo (*Starchytarpheta cayennensis* Vahl)., São Paulo, 1998 (Doutorado em Farmacologia) – Instituto Nacional de Farmacologia (INFAR), escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.

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

MOJZIS, J.; HEGEDUSOVÁ, R.; MIROSSAY, L. Role of mucus in ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal injury in rats. *Physiol Res*, 49:441-446, 2000.

MOUSSAOUI, A.; NIJS, M.; PAUL, C. et al. Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defence mechanism. *Cell Mol Life Sci*, 58(4): 556-70, 2001.

MOUTIM, V., SILVA, L. G., LOPES, M. T. P., FERNANDES, G. W., SALAS, C. E. Spontaneous processing of peptides during coagulation of latex from *Carica papaya*. *Plant Sci*, 142:115-121, 1999.

MYNOTT, T.L., LADHAMS, A., SCARMATO, P. & ENGWERDA, C.R. (1999). Bromelain, from pineapple stems, proteolytically blocks activation of extracellular regulated kinase-2 in T cells. *J. Immunol.*, 163: 2568-2575.

NAGATA, K., MATSUNAGA, T. GILLETTE, J., GELBOIN, H. V. AND GONZALEZ, F. J. Rat testosterone 7- α hidroxylase. Isolation, sequence and expression of cDNA and its developmental regulation and induction by 3- methylcholanthrene. *J. Biol Chem*, 262:2787-2793, 1987.

NAGY, L.; KUSSTATSCHER, S.; HAUSCHKA, P. V. & SZABO, S. Role of cysteine proteases and protease inhibitors in gastric mucosal damage induced by ethanol or ammonia in the rat. *J. Clin. Invest*, 98:1047–1054, 1996.

NAGY, L; NAGATA, M. & SZABO, S. Protein and non-protein sulfhydryls and disulfides in gastric mucosa and liver after gastrotoxic chemicals and sucralfate: possible new targets of pharmacologic agents. *World J Gastroenterol.*, 13(14):2053-2060, 2007.

NAKAYA, Y; KURODA, R. & KAWABATA, A. Effects of PAR-1 or PAR-2 activation on tension oscillation in isolated gastric arteries and gastric mucosal blood flow. *J Pharmacol Sci*, 91(Supl. I):79, 2003.

NANJI, A. A.; TAHAN, S. R. Association between endothelial cell proliferation and pathologic changes in experimental alcoholic liver disease. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 140(1):101-107, 1996.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *J Natural Products*, 66:1022-1037, 2003.

NISHIKAWA, H.; KAWABATA, A.; HIRAMATSU, K. et al. Role of protease-activated receptor-1 in modulating gastric acid secretion in rats. *J Pharmacol Sci* 91(Supl. I):259, 2003.

NYSÆTER, G. & BERSTAD, A. Sucralfate protects blood clots from peptic digestion by gastric juice in vitro. *Digestion*, 73:198-203, 2006.

OKABE, S. & AMAGASE, K. An Overview of Acetic Acid Ulcer Models – The History and State of the Art of Peptic Ulcer Research. *Biol. Pharm. Bull.*, 28:1321-1341, 2005.

OSSOVSKAYA, V.S. & BUNNETT, N.W. (2004). Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol. Rev.*, 84(2): 579-621.

OVERMIER, J. B. & MURISON, R. Anxiety and helplessness in the face of stress predisposes, precipitates, and sustains gastric ulceration. *Behav Brain Res*, 110(1-2):161-174, 2000.

PACHALY, J. R.; WERNER, P. R.; SCHIMANSKI, J. C.; CIFFONI, E. M. G. Estresse por captura e contenção em animais selvagens. *A Hora Veterinária*, 74:47-52, 1993.

PAIMELA, H.; GODDARD, P. J.; SILEN, W. Present views on restitution of gastrointestinal epithelium. *Dig Dis Sci*, 40:2495-2496, 1995.

PAKODI, F.; ABDEL-SALAM, M. E.; DEBRECENI, A.; MÓZSIK, G. Helicobacter pylori. One bacterium and a broad spectrum of human disease! An overview. *J Physiol*, 94:139-152, 2000.

PANDOLFINO, J. E.; HOWDEN, C. W.; KAHRILAS, J. P. Motility-modifying agents and management of disorders of gastrointestinal motility, *Gastroenterol.*, 118:s2-s47, 2000.

PEPPER, M. S.; MONTESANO, R. Proteolytic balance and capillary morphogenesis. *Cell Differ Dev.*, 32(3):319-327, 1990.

PEREIRA, M.T.; LOPES, M. T. P.; MEIRA, W. O. & SALAS, C. E. Purification of a cysteine ptoteinase from *Carica candamarcensis* L. & cloning of a genomic putative fragment coding for this enzyme. *Prot. Express. Purificat.*, 22: 249-257, 2001.

PHAM, C. T. & LEY, T. J. Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(15):8627-8632, 1999.

PHILCHENKOV, A. A. Caspases as regulators of apoptosis and other cell functions. *Biochem (Mosc)*, 68:365-376, 2003.

PIEPER, B & CALIRI, M. H. Nontraditional wound care: A review of the evidence for the use of sugar, papaya/papain, and fatty acids. *J Wound Ostomy Continence Nurs*. 30(4):175-183, 2003.

POTEMPA, J.; SROKA, A.; IMAMURA, T. & TRAVIS, J. Gingipains, the major cysteine proteinases and virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*: structure, function and assembly of multidomain protein complexes. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 4(6): 397-407, 2003.

POTTHOFF, A.; LEDIG, S.; MARTIN, J. et al. Significance of the caspase family in *Helicobacter pylori* induced gastric epithelial apoptosis. *Helicobacter*, 7(6):367-77, 2002.

POULTER, N. H. & CAYGILL, J. C. Production and utilization of papain, a proteolytic enzyme from *Carica papaya* L. *Tropical Sci*, 25:123-137, 1985.

RAIHA, I.; KEMPPAINEN, H.; KAPRIO, J et al. Lifestyle, stress, and genes in peptic ulcer disease: a nationwide twin cohort study. *Arch. Intern. Med.*, 158(7):698-704, 1998.

RAMAKRISHNAN, K. & SALINAS, R. C. Peptic ulcer disease. *Am Fam Physician*, 76(7):1005-12, 2007.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39:603-613, 2001.

REGE, A. A.; HERRERA, P. R.; LOPEZ, M.; DRESDEN, M. H. Isolation and characterization of a cysteine proteinase from *Fasciola hepatica* adult worms. *Mol Biochem Parasitol*, 35(1):89-95, 1989.

RENDIC, S. Drug interactions of H₂-receptor antagonists involving cytochrome P450 (CYPs) enzymes: from the laboratory to the clinic. *Croat Med J*, 40:357-367, 1999.

REPETTO, M. G. & LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers Natural antiulcerogenic antioxidant compounds. *Braz J Med Biol Res*, 35:523-534, 2002.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J. E.; LANCASTER, C.; HAUCHAR, A. J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. *Gastroenterol*, 77:433-443, 1979.

ROSENBERG, L.; LAPID, O.; BOGDANOV-BEREZOVSKY, A. et al. Safety and efficacy of a proteolytic enzyme for enzymatic burn debridement: a preliminary report. *Burns*, Burns 30:843-850, 2004.

SACHS, G.; SHIN, J. M.; VAGIN, O. et al. Current trends in the treatment of upper gastrointestinal disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 16(6):835-849, 2002.

SAJID, M. & MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 120(1): 1-21, 2002.

SALAS, C.E.; GOMES, M. T. R.; HERNANDEZ, M.; LOPES, M. T. P. Plant cysteine proteinases: evaluation of the pharmacological activity. *Phytochemistry*, 69:2263-2269, 2008.

SATOH, H. SKINO, A., SATOI, F. ASANO, S. MURAKAMI, I., INATOMI, N., NAGAYA, H., KATO, K., SZABO, S., FOLKMAN J. Role of endogenous basic fibroblast growth factor in the healing of gastric ulcers in rats. *Japanese Journal Pharmacology*, 73:59-71, 1997.

SCARPIGNATO, S.; CAPOVILLA, T; BERTACCINI, G. Action of caerulein on gastric emptying of conscious rat. *Arch Int Pharmacodyn*, 246:286-294, 1980.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G. Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC. Capítulo 15. p. 301-332, 2001.

SCHMASSMANN, A. Mechanism of ulcer healing and effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med*, 30(104):43S-51S, 1998.

SCHUBERT, M. Gastric secretion. *Curr Opin Gastroenterol*, v.21, p.636-643, 2000.

SCHUBERT, M. L. & PEURA, D. A. Control of gastric acid secretion in health and disease. *Gastroenterol.*, 134(7):1842-60, 2008.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. *Cur Op Gastroenterol*, 24:659-664, 2008.

SCHUBERT, M. L.; SHAMBUREK, R. D. Control of acid secretion. *Gastroenterology Clinics of America*, 19:1-25, 1990.

SCHUBERT, M.L. Gastric Secretion. *Curr Opin Gastroenterol*, 19:519-25, 2003.

SCHULTZ, D. R. & HARRINGTON, W. J. Jr. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin. Arthritis Rheum.*, 32:345-369.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. *Anal Biochem*, 25:192-205, 1988.

SENAY, E. C. & LEVINE, R. J. Synergism between cold and restraint for rapid production of stress ulcers in rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, 124:1221-1223, 1971.

SENGUPTA, A.; BHATTACHARYA, D.; PAL, G.; SINHA, N. K. Comparative studies on calotropins DI and DII from the latex of *Calotropis gigantea*. *Arch Biochem Biophys.* 232(1):17-25, 1984.

SHAY, H.; KOMAROV, S. A.; FELS, S. E et al. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in rat. *Gastroenterol*, 5:43-61, 1945.

SHIRIN, H.; PINTO, J. T.; LIU, L. U. et al. Helicobacter pylori decreases gastric mucosal glutathione. *Cancer Lett*, 26(2):127-133, 2001.

SIEGMUND, S. Animal models in gastrointestinal alcohol research - a short appraisal of the different models and their results. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17(4):519-542, 2003.

SILVA, C. A., MELLO, V. J., LOPES, M. T. P. et al. A mitogenic protein fraction in latex from *Carica candamarcensis*. *Plant Med*, 69: 926-932, 2003.

SILVA, L. G., LOPES, M. T. P., GARCIA, O. S., SALAS C. E. Changes in protein profile during coagulation of latex of *Carica papaya*. *Braz J Med Biol Res*, 30:615-619, 1997.

SPIRT, M. J. & STANLEY, S. Update on stress ulcer prophylaxis in critically ill patients. *Crit Care Nurse*. 26(1):18-20, 2006.

STEPEK, G.; BUTTLE, D. J.; DUCE, I. R.; et al. Assessment of the anthelmintic effect of natural plant cysteine proteinases against the gastrointestinal nematode, *Heligmosomoides polygyrus*, *in vitro*. *Parasitology*, 130: 203-211, 2005.

STICKNEY, J. C. & NORTHUP, D. W. Effect of gastric emptying upon propulsive motility of small intestine in rat. *Exp Biol Med*, 101:582, 1959.

SZABO, S. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. *Science* 214:200–202, 1981.

SZABO, S., Mechanisms of gastric mucosal injury and protection. *J Clin Gastroenterol*, 13:21S-34S, 1991.

SZABO, S.; FOLKMAN, J.; VATTARY, P. et al. Accelerated healing of duodenal ulcers by oral administration of a mutein of fibroblast growth factor in rats. *Gastroenterol*, 106:1106-1111, 1994.

SZABO, S.; NAGY, L. Pathways, mediators and mechanisms of gastroduodenal mucosal injury. *Acta Physiol Hung*. 80(1-4):9-21, 1992.

SZABO, S.; NAGY, L.; PLEBANI, M. Glutathione, protein sulfhydryls and cysteine proteases in gastric mucosal injury and protection. *Clin Chim Act*, 206:95-105, 1992.

SZABO, S; BROWN, A. Prevention of ethanol-induced vascular injury and gastric mucosal lesions by sucralfate and its components: possible role of endogenous sulfhydryls. *Proc Soc Exp Biol Med*, 185:493-497, 1987.

TAKAGI, K.; OKABE, S.; SAZIKI, R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. *Jap J Pharmacol*, 19(3):418-426, 1969.

TAKEUCHI, K.; OKADA, M.; NIIDA, H.; OKABE, S. Role of sulfhydryls in mucosal injury caused by ethanol: relation to microvascular permeability, gastric motility and cytoprotection. *J Pharmacol Exp. Ther*, 248(2):836-841, 1989.

TANI, S.; OKUDA, M.; MORISHIGE, R.; TANAKA, T. Gastric mucin secretion from cultured rat epithelial cells. *Biol Pharm Bull*, 20:482-485, 1997.

TARIQ, M.; ELFAKI, I.; KHAN, H. A. et al. Bromophenacyl bromide, a phospholipase A2 inhibitor attenuates chemically induced gastroduodenal ulcers in rats. *World Journal of Gastroenterology*, 12(36):5798-5804, 2006.

TARNAWSKI, A.; SZABO I. L.; HUSAIN, S. S.; SOREGHAN, B. Regeneration of gastric mucosa during ulcer healing is triggered by growth factors and signal transduction pathways. *J Physiol Paris*, 95(1-6):337-44, 2001.

TARNAWSKI, A. Molecular mechanisms of ulcer healing. *Drug News Perspect.*, 13(3):158-168, 2000.

TARNAWSKI, A. S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. *Dig. Dis. Sci.*, 50(Suppl 1):S24-S33, 2005.

TEIXEIRA, R. D.; RIBEIRO, H. A. L.; GOMES, M. T. R. et al. The proteolytic activities in latex from *Carica candamarcensis*. *Plant Physiol. Biochem.*, 46(11):956-961, 2008.

TURK, D. & GUNCAR, G. Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 59(Pt 2):203-13, 2003.

TWEDT, D.C. & MAGNE, M. L. Moléstia do estômago. In: Ettinger, J. S. Tratado de Medicina Interna Veterinária. 3a ed. São Paulo: Manole, 1353-1386, 1992.

UESHIMA, K.; TAKEUCHI, K.; OKABE, S. Effects of sulfhydryl-related compounds on indomethacin-induced gastric lesions in rats: role of endogenous sulfhydryls in the pathogenesis. *Jpn J Pharmacol*, 58:157-165, 1992.

VATTARY, P. GYOMBER, E., MORALES, R. E., KATO, K. Effect of orally administered platelet-derived growth factor (PDGF) on healing of chronic duodenal ulcers and gastric secretion in rats. *Gastroenterology*, 100:180, 1991.

VILLALBA, M. I. C.; LEMOS, F. O.; TAGLIATI, C. A. et al. Avaliação Toxicológica de fração proteolítica com atividade cicatrizante obtida do látex de *C. canadamarzensis*. In: Livro de resumos do XXXIX Congresso Brasileiro de farmacologia e Terapêutica Experimental, 2007, p. 529.

VILLALBA, M. I. C.; VIANA, C. T. R.; TAGLIATI, C. A. et al. Avaliação toxicológica sistêmica de fração proteolítica obtida do látex de *Carica candamarzensis*. In: Livro de Resumos do II Congresso de Fitoterápicos do Mercosul e VI Reunião da Sociedade Latino Americana de Fitoquímica, 2008.

VISSCHER, F. E.; SEAY, P. H.; TAZELAAR, A. P. JR et al. Pharmacology of Pamine Bromide. *J Pharmacol Exp Ther*, 110:188-204, 1954.

WALD, M.; OLEJAR, T.; POUCKOVA, P. & ZADINOVA, M. Proteinases reduce metastatic dissemination and increase survival time in C₅₇BL₆ mice with the Lewis lung carcinoma. *Life Sci*, 63(17):237-243, 1998.

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

WALLACE, J. L. & MA, L. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. *Exp Biol Med (Maywood)*, 226(11):1003-1015, 2001.

WALLACE, J. L. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. *Am J Med*, 110:19S-22S, 2001(a).

WALLACE, J. L. Pathogenesis of NSAID-induced gastroduodenal mucosal injury. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 15:691-703, 2001(b).

WALLACE, J. L. Recent advances in gastric ulcer therapeutics. *Curr Op Pharmacol*, 5:573-577, 2005.

WALRAEVENS, V.; VANDERMEERS-PIRET, M. C.; VANDERMEERS, A. et al. Isolation and primary structure of the CCI papain-like cysteine proteinases from the latex of *Carica candamarzensis* hook. *Biol Chem*, 380(4):485-488, 1999.

9. APÊNDICE

Cisteíno Proteases: Classificação, funções e distribuição

As enzimas que possuem uma cisteína no sítio ativo e cujo mecanismo de catálise envolve a participação do grupo tiol são agrupadas como cisteíno proteases. Estas proteases também são denominadas tiol proteases. Amplamente distribuídas na natureza, e com várias funções, são encontradas cisteíno proteases em diversos tipos de organismos. Entre eles: cisteíno proteases presente em mamíferos (PHILCHENKOV, 2003), em parasitas eucarióticos (MAHMOUDZADEH-NIKNAM & MCKERROW, 2004), em bactérias (LABROU & RIGDEN, 2004), em vírus (BAZAN & FLETTERICK, 1988) e em plantas (BAEZA et al., 1990; SALAS et al., 2008).

Os estudos sobre cisteíno proteases de diferentes organismos têm demonstrado que a maioria delas constitui um grupo de enzimas com estrutura e funções semelhantes, o que sugere que esta classe de enzimas tenha evoluído a partir de uma origem comum. De fato, os critérios evolutivos têm sido utilizados para classificar as cisteíno proteases em 7 grupos diferentes: CA, CD, CE, CF, PA, PB e CH (BARRETT & RAWLINGS, 2001).

Dentro destes grupos, as cisteíno proteases se dividem em famílias. Assim sendo, dentro do grupo CA, temos a família C1, na qual se encontram a papaína e as catepsinas. Esta família também é conhecida como a família da papaína. Neste mesmo grupo estão presentes as calpaínas (família C2), as estreptopainas (família C10) e as peptidases ubiquitina-específicas (famílias C12 e C19). Já em CD, encontramos representantes das caspases, agrupadas na família C14. A adenaína (família C5) pertence ao grupo CE, enquanto que a piroglutamil peptidase I (família C15) faz parte de CF. As cisteíno proteases virais estão agrupadas em PA e as proteases autolíticas em PB e CH (BARRETT & RAWLINGS, 2001).

Dentre as cisteíno proteases descritas em mamíferos, destacam-se as caspases e as catepsinas. As caspases são proteases envolvidas nos processos de apoptose celular (SCHULTZ & HARRINGTON, 2003), e as

catepsinas são encontradas predominantemente nos lisossomos em diversas células de mamíferos (TURK & GUNCAR, 2003).

Muitas das mudanças observadas durante o processo de apoptose celular são devido à atuação de caspases específicas. A ligação de determinados mediadores extracelulares a receptores, presentes na membrana celular e relacionados ao processo de apoptose, promovem a ativação destas enzimas, que por clivagem proteolítica, transformam-se em “caspases-8” (HENGARTNER, 2000). Essa ativação provoca uma série de eventos pró-apoptóticos, através da clivagem direta de proteínas relacionadas ao processo ou indiretamente pela clivagem e ativação da procaspase-3 em caspase-3. A ativação das caspases promove a degradação de proteínas do citoesqueleto, responsáveis pela manutenção da estrutura da célula. Outro mecanismo que ocorre, e também é dependente da caspase, é a ativação de uma DNAase, através da degradação proteolítica da subunidade regulatória desta enzima por uma caspase-3, ativando a degradação do DNA da célula (NAGATA, 2000).

As catepsinas são cisteíno proteases encontradas predominantemente dentro de lisossomos no interior das células. Estão envolvidas na apoptose (PHAM & LEY, 1999) e na apresentação de antígenos (peptídeos produzidos nos lisossomos) pelo complexo de histocompatibilidade principal tipo II (MHC-II) (CHAPMAN, 1998). Também participam da remodelação da matriz extracelular, através da degradação intracelular dos compostos da matriz, principalmente colágeno, que é degradado por enzimas intracelulares (catepsinas) e extracelulares (metaloproteinases) trabalhando em conjunto. A degradação do colágeno pelas enzimas extracelulares é incompleta, e as células como fibroblastos e osteoclastos fagocitam fragmentos de colágeno. Após a fusão do fagossomo com o lisossomo, as catepsinas, assim como outras proteases, finalizam a degradação do colágeno (EVERTS et al., 1996).

As cisteíno proteases são fatores de virulência muito importante para parasitas como *Trypanosoma cruzi* (ENGEL et al., 2000), *Schistosoma mansoni* (MCKERROW et al., 1999) e *Fasciola hepatica* (REGE et al., 1989). Elas atuam em processos de invasão de tecidos através da degradação de componentes da matriz extracelular, e na replicação e ciclo de vida dos

parasitas (SAJID et al., 2002). Em diversas parasitoses, foi demonstrado que o tratamento do indivíduo com inibidores específicos de cisteíno proteases foi importante para diminuir o parasitismo (MCKERROW et al., 1999).

Em bactérias, são descritas cisteíno proteases em *Porphyromonas gingivalis* (POTEMPA et al., 2003) e em *Clostridium histolyticum* (clostripaína) (LABROU & RIGDEN, 2004). A função proposta das proteases nestes organismos está relacionada com a degradação de proteínas dos hospedeiros e posterior assimilação dos aminoácidos liberados. Também foi encontrada uma cisteíno protease em picornavírus, cujo papel fisiológico é a clivagem de proteínas virais recém sintetizadas em pontos específicos gerando diversas proteínas funcionais (KRAUSSLICH & WIMMER, 1988).

Dentro do grupo de cisteíno proteases de plantas, a papaína tem sido bastante estudada devido a sua importância comercial (BRAVO et al., 1994). No entanto, além da papaína e das proteases descritas provenientes do látex de *C. papaya* (AZARKAN et al., 2004), outras cisteíno proteases tem sido descritas em vegetais. Como exemplos, a bromelina do abacaxi (MYNOTT et al., 1999); a ficina proveniente de *Ficus* spp. (FADYLOGLU, 2001), a calotropina do látex de *Calotropis gigantea* (SENGUPTA et al., 1984) e proteases obtidas da espécie *Carica candamarcensis* (SALAS et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2008), que são destacadas no item Introdução. A comparação da estrutura primária de uma protease proveniente do látex de *C. candamarcensis* com proteases da *C. papaya* mostrou uma significativa similaridade. A menor homologia foi obtida com a papaína (59,5%), seguida pela papaya protease IV (67,6%), papaya protease III (69,7%) e finalmente com a chimopapaína (74,3%) (PEREIRA et al., 2001).

ANEXOS

[illegible]

*As úlceras maiores que 1mm, são quantificadas e suas dimensões são somadas ao Índice de Ulceração (IU), já as que apresentam valor menos ou igual a 1mm recebem o valor de 1 somado ao IU.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- CETEA -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 215/2007**, relativo ao projeto intitulado "***Estudo de vias envolvidas nos efeitos citoprotetor e cicatrizante gástricos de fração obtida do látex de Carica candamarcensis***", que tem como responsável(is) **Miriam Teresa Paz Lopes**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **23/ 04/2008**.

Este certificado expira-se em **23/ 04/ 2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 215/2007**, related to the project entitled "***Pathways on gastroprotective and healing effects of proteases from Carica candamarcensis latex***", under the supervisors of **Miriam Teresa Paz Lopes**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **April 23, 2008**.

This certificate expires in **April 23, 2013**.

Belo Horizonte, 24 de Abril de 2008.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br