

LÍGIA MOURA BURCI

Avaliação do Potencial Gastroprotetor e Cicatrizante da Fração Diclorometano e da Piplartina obtidos dos frutos *Piper tuberculatum* Jacq. em Ratas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Fernanda de Paula Werner.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristiane Hatsuko Baggio

CURITIBA
2011

Dedico este trabalho aos meus pais, Gilberto e Lenice, pelo apoio incondicional; ao meu marido André, cujo amor e incentivo possibilitaram a realização desse trabalho e ao meu pequeno João Gabriel que chegou para alegrar o meu mestrado.

AGRADECIMENTOS

À **DEUS**, o autor da vida, por ser presença constante em meus dias apresentando-me oportunidades maravilhosas. Obrigada Senhor por guiar meus passos sustentando-me nas horas de cansaço e desânimo.

À **Prof^a. Dr^a. Maria Fernanda de Paula Werner**, e à **Prof^a. Dr^a. Cristiane Hatsuko Baggio**, pela orientação e por cada ensinamento e conselho;

Aos colegas **Luisa, Isabela, Melissa, Luiz e Thiago**, pelo auxílio na realização dos experimentos e pelo companheirismo e amizade;

Aos funcionários do **Biotério** do Setor de Ciências Biológicas da UFPR;

Aos professores, funcionários e colegas do **Departamento de Farmacologia** da Universidade Federal do Paraná;

Ao **Prof. Dr. Adair Santos** da UFSC e ao **Prof. Dr. Valdir Facundo** da UNIR, particularmente pela extração e fornecimento da fração e compostos;

Aos meus pais, **Gilberto** e **Lenice**, e à minha irmã, **Geise**, que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e acreditaram na conclusão desse trabalho;

Ao meu amado **André**, que com sua enorme paciência e muito amor, esteve sempre ao meu lado tornando menores os obstáculos encontrados. Obrigada por acreditar em mim, e me incentivar;

Ao **João Gabriel**, meu filho, que mesmo antes de nascer já participou das atividades e experimentos no laboratório;

À **FUNPAR** e a **CAPES** pelo apoio financeiro;

Obrigada!

“...tudo o que é verdadeiro, tudo o que é honesto, tudo o que é justo, tudo o que é puro, tudo o que é amável, tudo o que é de boa fama, se há alguma virtude, e se há algum louvor, **nisso pensai**”.

Filipenses 4:8

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	VIII
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Revisão Bibliográfica	3
1.1.1 A família Piperaceae	3
1.1.2 O gênero <i>Piper</i>	3
1.1.3 <i>Piper tuberculatum</i>	5
1.1.4 Anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal	8
1.1.4.1 Secreção ácida gástrica	10
1.1.4.2 Mecanismos que estimulam a secreção gástrica.....	11
1.1.4.3 Mecanismos que inibem a secreção gástrica.....	13
1.1.4.4 Fatores protetores da mucosa.....	14
1.1.5 Distúrbios do trato gastrointestinal	18
1.1.5.1 Úlcera péptica	18
1.1.5.2 Doença do refluxo gastroesofágico	22
1.1.5.3 Tratamento das úlceras pépticas e da doença do refluxo gastroesofágico	23
2. OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Material Botânico	28
3.1.1 Preparação do extrato e da fração diclorometano.....	28

3.1.1.1 Isolamento da piplartina	28
3.1.1.2 Diluição da DCM e da piplartina	29
3.2 Animais	29
3.3 Lesão gástrica aguda induzida por etanol	30
3.3.1 Verificação do ciclo estral.....	31
3.4 Quantificação do muco gástrico.....	31
3.5 Úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético	32
3.6 Quantificação de grupos sulfidrílicos não protéicos.....	33
3.7 Avaliação dos níveis de mucina	34
3.8 Avaliação da proliferação celular	35
3.9 Avaliação da secreção ácida gástrica	36
3.10 Avaliação da atividade da H⁺,K⁺-ATPase <i>in vitro</i>.....	37
3.11 Esofagite induzida por refluxo gastroesofágico	39
3.12 Determinação dos níveis de mieloperoxidase.....	40
3.13 Expressão dos dados e análise estatística.....	40
4. RESULTADOS.....	42
4.1 Efeito da DCM sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol PA em ratas.....	42
4.1.1 Relação entre o ciclo estral e a indução de lesões gástricas agudas induzidas por etanol PA em ratas.....	45
4.2 Efeito da DCM sobre a quantidade de muco gástrico e de GSH após as lesões gástricas agudas induzidas por etanol	46
4.3 Efeito da DCM sobre as úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético 80% em ratas	49
4.4 Efeito da DCM sobre a proliferação celular de úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético 80%.....	51
4.5 Efeito da DCM sobre os níveis de mucina de úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético 80%.....	53
4.6 Efeito da DCM sobre a quantidade de GSH de úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético 80%.....	55
4.7 Efeito da DCM sobre a atividade da H⁺,K⁺-ATPase <i>in vitro</i>.....	56
4.8 Efeito da DCM sobre a secreção ácida gástrica basal em ratas	57
4.9 Efeito da DCM sobre a secreção ácida gástrica estimulada por betanecol, histamina e pentagastrina em ratas.....	58

4.10 Efeito da DCM sobre a esofagite induzida por refluxo gastroesofágico em ratas.....	61
4.11 Efeito da DCM sobre os níveis da enzima mieloperoxidase na esofagite induzida por refluxo gastroesofágico.....	63
4.12 Efeito da piplartina sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol PA e a quantidade de muco e de GSH.....	64
4.13 Efeito da piplartina sobre a atividade da H⁺,K⁺-ATPase <i>in vitro</i>.....	66
4.14 Efeito da piplartina sobre a secreção ácida gástrica basal e estimulada por betanecol, histamina e pentagastrina em ratas.....	66
5. DISCUSSÃO.....	71
6. CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS.....	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Folhas e frutos de <i>Piper tuberculatum</i> em seu ambiente natural	6
Figura 2. Anatomia do estômago.....	9
Figura 3. Estrutura química da piplartina.....	29
Figura 4. Metodologia de indução de úlcera por ácido acético.....	33
Figura 5. Efeito da DCM administrada oralmente (A, 60 min antes) ou intraperitonealmente (B, 30 min antes) sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol em ratas.	43
Figura 6. Análise macroscópica de lesões agudas gástricas induzidas pela administração oral de etanol PA.....	44
Figura 7. Relação entre as fases do ciclo estral e a indução de lesões gástricas por etanol PA em animais do grupo controle (tratados com veículo).	45
Figura 8. Efeito da DCM, administrada oralmente (A, 60 min antes) ou intraperitonealmente (B, 30 min antes), sobre a quantidade de muco da mucosa gástrica após as lesões gástricas agudas induzidas por etanol.....	47
Figura 9. Efeito da DCM, administrada pela via oral (A) ou intraperitoneal (B), sobre a quantidade de GSH da mucosa gástrica após as lesões gástricas agudas induzidas por etanol.....	48
Figura 10. Efeito da DCM sobre as úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético 80% em ratas..	49
Figura 11. Análise macroscópica das úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético em ratas..	50

Figura 12. Imunorreatividade para PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) em cortes histológicos de úlceras crônicas induzidas por ácido acético 80%.....	52
Figura 13. Quantificação da imunorreatividade para PCNA em úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético 80%.	53
Figura 14. Avaliação dos níveis de mucina pelo método de coloração PAS de úlceras crônicas induzida por ácido acético 80%.	54
Figura 15. Efeito da DCM sobre a quantidade de GSH de úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético 80%.....	56
Figura 16. Efeito da DCM sobre a atividade da enzima H^+,K^+ -ATPase <i>in vitro</i> ..	57
Figura 17. Efeito da DCM sobre o volume (A) e a acidez total (B) da secreção ácida gástrica basal em ratas.....	58
Figura 18. Efeito da DCM sobre o volume (A, C, E) e a acidez total (B, D, F) da secreção ácida gástrica estimulada por betanecol, histamina e pentagastrina em ratas.	60
Figura 19. Análise macroscópica das lesões no esôfago induzidas por refluxo gastroesofágico.....	62
Figura 20. Efeito da DCM sobre a esofagite induzida por refluxo gastroesofágico em ratas..	62
Figura 21. Efeito da DCM sobre os níveis de MPO na esofagite induzida por refluxo gastroesofágico..	63
Figura 22. Efeito da piplartina sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol em ratas (A), a quantidade de muco (B) e níveis de GSH (C) da mucosa gástrica glandular dosada após a indução de lesão com etanol PA.	65

Figura 23. Efeito da piplartina sobre a atividade da enzima H^+,K^+ -ATPase <i>in vitro</i>	66
Figura 24. Efeito da piplartina sobre o volume (A) e a acidez total (B) da secreção ácida gástrica basal em ratas... ..	68
Figura 25. Efeito da piplartina sobre o volume (A, C, E) e a acidez total (B, D, F) da secreção ácida gástrica estimulada por betanecol, histamina e pentagastrina em ratas.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Quantificação dos níveis de expressão de mucina pelo método de coloração PAS (Ácido Periódico de Schiff) em úlceras crônicas induzidas por ácido acético 80% em ratas.	55
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

ACh – acetilcolina

AINES – anti-inflamatório não esteroidal

AMPC – monofosfato de adenosina cíclico

ANOVA – análise de variância

ATC – ácido tricloroacético

ATP – trifosfato de adenosina

CCK – colecistocinina

CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CO₂ – gás carbônico

DMSO – dimetil-sulfóxido

DTNB – ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)

ECL – células enterocromafins

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

EP1 – receptor de prostaglandina subtipo 1

EP2 – receptor de prostaglandina subtipo 2

EP3 – receptor de prostaglandina subtipo 3

GPx – glutaciona peroxidase

GR – glutaciona redutase

GRP – peptídeo liberador de gastrina

GSH – glutaciona reduzida

GSSH – glutaciona oxidada

GST – glutaciona-S-transferase

H₂ – receptor de histamina subtipo 2

H₃ – receptor de histamina subtipo 3

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HCl – ácido clorídrico

HCO₂⁻ – íon bicarbonato

H₂CO₃ – ácido carbônico

ICAM – molécula de adesão intercelular

i.d. – via intraduodenal

IL - interleucina

i.p. – via intraperitoneal

IP3 – inositol 1,4,5 trifosfato

KCl – cloreto de potássio

LPS – lipopolissacarídeo de membrana bacteriana

LOOH – hidroperoxidação lipídica

LTB₄ – leucotrieno do tipo B₄

LTC₄ – leucotrieno do tipo C₄

M – molar

M₁ – receptor muscarínico subtipo 1

M₃ – receptor muscarínico subtipo 3

Mg(OH)₂ – hidróxido de magnésio

MgSO₄ – sulfato de magnésio

MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno

MPO – mieloperoxidase

NADPH – nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato

NaOH – hidróxido de sódio

NaHCO₃ – bicarbonato de sódio

NaH_2PO_4 – dihidrogênio fosfato de sódio

N_2O_3 – trióxido de nitrogênio

NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase

NOSi – óxido nítrico sintase induzida

O_2^- - ânion superóxido

OH – hidroxila

PACAP – peptídeo ativador de adenilato ciclase hipofisária

PAF – fator de agregação plaquetária

pH – potencial hidrogeniônico

PYY – peptídeo YY

PG - prostaglandina

PGE2 – prostaglandina E2

PGI2 – prostaciclina

ROS – espécies reativas de oxigênio

RL – radicais livres

SNE – sistema nervoso entérico

SOD – superóxido desmutase

TBXA2 – tromboxano do tipo A2

TGF- α – fator de crescimento transformador alfa

TGI – trato gastrointestinal

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

TRIS – tris (hidroximetil) aminometano

VIP – polipeptídeo intestinal vasoativo

v.o. – via oral

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

RESUMO

A *Piper tuberculatum* Jacq. pertence a família Piperaceae e é conhecida popularmente como pimenta d'ardo, jaborandi falso ou jamburana. Embora seja utilizada popularmente como estimulante digestivo e na redução dos gases intestinais, até o momento não havia nenhum estudo científico que comprovasse seu uso popular como gastroprotetor. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a possível atividade protetora gástrica e esofágica da fração diclorometano obtida dos frutos de *Piper tuberculatum* (DCM) e de seu composto isolado a piplartina, assim como esclarecer possíveis mecanismos de ação envolvidos. A administração oral da DCM reduziu a extensão das lesões gástricas agudas induzidas por etanol e crônicas induzidas por ácido acético em ratas. Além disso, a administração da DCM pela via intraperitoneal também reduziu as lesões gástricas induzidas por etanol. Quando administrada pela via oral, a DCM foi capaz de restaurar os níveis de muco e prevenir a diminuição nos níveis de GSH, além de promover a proliferação celular. Com relação à secreção ácida gástrica, no ensaio *in vitro* a DCM inibiu a atividade da H^+,K^+ -ATPase. *In vivo*, a DCM foi capaz de diminuir o volume e a acidez total da secreção gástrica basal, bem como aquela estimulada por pentagastrina, mas não por histamina e betanecol. Experimentos com o modelo de doença do refluxo gastroesofágico revelaram que a DCM também foi capaz de diminuir a extensão da lesão provocada pelo refluxo de ácido, além de diminuir os níveis da MPO. A piplartina também diminuiu a extensão da lesão gástrica provocada por etanol, assim como restaurou os níveis de GSH. De maneira similar à DCM, a piplartina inibiu a ação da H^+,K^+ -ATPase *in vitro* e *in vivo* diminuiu a secreção e acidez do conteúdo gástrico em níveis basais, assim como quando da estimulação com pentagastrina. Em conjunto, os resultados obtidos sugerem que no efeito protetor gástrico e esofágico da DCM e da piplartina parece envolver a redução da secreção ácida gástrica, possivelmente pela inibição da via gastrinérgica, promovendo um aumento na proliferação celular e um restabelecimento de sistemas de proteção.

Palavras-chave: *Piper tuberculatum*, piplartina, gastroprotetor, anti-secretor,

gastrina, reflujo gastroesofágico.

ABSTRACT

Piper tuberculatum Jacq. belongs to Piperaceae family and is popularly known as pimenta d'ardo, false jaborandi or jamburana. Although is popularly used as a digestive stimulant and in reducing intestinal gas, until now there was no study that confirms neither this popular use as gastroprotective agent. In this way, this present study aimed to evaluate the gastric and esophagic protective effect of dichloromethane fraction obtained from fruits of *Piper tuberculatum* (DCM) and its isolated compound piplartine, as well as to clarify the possible mechanisms of action involved. Oral administration of DCM reduced the extension of acute gastric lesions induced by ethanol and chronic ulcers induced by acetic acid. Besides, intraperitoneal treatment also reduced the gastric injury caused by ethanol. When DCM was administered by oral route, it was able to restore the mucus levels and prevent the decrease of GSH levels, besides promoting cell proliferation. *In vitro*, DCM inhibited the H⁺,K⁺-ATPase activity. *In vivo*, DCM was able to decrease the volume and total acidity of basal gastric secretion, as well as that stimulated by pentagastrin, but not by histamine and bethanechol. On the model of gastroesophageal reflux disease, DCM was also able to reduce the extension of injury caused by acid reflux and the myeloperoxidase levels. Piplartine was also able to reduce the extension of gastric lesions caused by ethanol, so as to restore the levels of GSH. Similarly to DCM, piplartine inhibited the H⁺,K⁺-ATPase activity *in vitro* and *in vivo* contributed to the reduction of basal gastric secretion contents and total acidity, also when stimulated by pentagastrin. Collectively, these results suggest that in the gastric and esophagic protective effect of DCM and piplartine seem to involve the reduction of gastric acid secretion, possibly by gastrinergic pathway, promoting the increase of cellular proliferation and the restoration of protection systems.

Keywords: *Piper tuberculatum*, piplartine, gastroprotection, anti-secretory, gastrin, gastroesophageal reflux.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais é uma das mais antigas estratégias empregadas para o tratamento de diversas doenças, tanto que até o início do século XIX a maioria dos medicamentos utilizados pelo homem era basicamente de origem natural (BARROS, 2006). Atualmente, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, 80% da população mundial utilizam plantas medicinais, sendo o maior uso por pessoas de países em desenvolvimento (GURIB-FAKIM, 2006).

É sabido que a natureza oferece uma fonte inesgotável de estruturas químicas a serem descobertas e, como consequência deste fato, há uma grande possibilidade de desenvolvimento de alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças que ainda não apresentam cura ou um tratamento efetivamente adequado, justificando o grande interesse farmacológico nas pesquisas que envolvem plantas medicinais. De fato, as plantas e seus derivados são as maiores fontes de drogas, movimentando cerca de 30% do mercado farmacêutico (KIRKPATRIC, 2002). De acordo com Newman e colaboradores (2003), entre os anos de 1981 e 2002, de 877 novas moléculas introduzidas no mercado, em torno de 49% eram substâncias isoladas de produtos naturais, semi-sintéticos, derivados de produtos naturais, ou então moléculas sintetizadas tomando como modelo estruturas de origem natural. Além disso, de acordo com Calixto (2003), as pesquisas envolvendo produtos naturais auxiliaram na compreensão de muitos fenômenos complexos envolvendo estruturas biológicas como enzimas, receptores e canais iônicos.

Existem no mundo cerca de 250.000 a 300.000 espécies de plantas, sendo o Brasil detentor de cerca de 20% da flora mundial (CALIXTO, 2005). Nesse cenário o Brasil poderia se sobressair na produção de fitomedicamentos, entretanto, não se destaca no aproveitamento de seus recursos naturais para a produção de fitoterápicos, estando esse fato relacionado à falta de investimentos nos diferentes segmentos da cadeia produtiva de plantas medicinais que impulsionam a pesquisa para o desenvolvimento de novos

fármacos. Além de grandes financiamentos para a utilização de alta tecnologia, faltam também parcerias entre universidades, centros de pesquisa e as indústrias (CALIXTO, 2001; CORRÊA JÚNIOR e SCHEFFER, 2004).

Um ponto importante a ser considerado na realização de pesquisa com plantas medicinais relaciona-se ao critério de seleção das espécies vegetais para se obter sucesso na investigação farmacológica. Sendo o Brasil um país com rica biodiversidade e conhecimentos tradicionais abundantes, a escolha da espécie vegetal com base no conhecimento popular ou etnofarmacológico aumenta a possibilidade de se encontrar novos compostos (HOLETZ *et al.*, 2002). Por outro lado, a seleção com base nos constituintes químicos (potencialmente ativos) encontrados em um dado gênero ou família aumenta ainda mais a possibilidade de se encontrar grandes quantidades de compostos ativos de interesse.

O programa de Pós-Graduação do Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) contribui para a validação pré-clínica do uso de plantas medicinais por meio da pesquisa científica com metodologias internacionalmente padronizadas. Desta forma, os estudos realizados em nosso laboratório visam demonstrar a eficácia, a segurança e o mecanismo de ação de plantas medicinais com atividades sobre o trato gastrointestinal (TGI). Sendo assim, considerando informações etnofarmacológicas, foram iniciados os estudos para investigação das atividades da espécie vegetal denominada *Piper tuberculatum*, planta conhecida popularmente como “pimenta d’ardo, jaborandi-falso, ou ainda como jamburana”, concentrando as pesquisas na avaliação dos efeitos desta planta sobre o trato gastrointestinal e os possíveis mecanismos de ação envolvidos nesse efeito.

1.1 Revisão Bibliográfica

1.1.1 A família Piperaceae

A família Piperaceae é classificada entre as mais primitivas famílias de angiospermas, sendo constituída por 10 a 12 gêneros com um grande e incerto número de espécies, estimado entre 1.400 e 2.000, que habitam lugares úmidos e sombrios das regiões tropicais (CRONQUIST, 1981; JOLY, 1991). No Brasil, a família Piperaceae é encontrada praticamente em todos os estados, sendo a principal espécie, a *Piper nigrum*, popularmente conhecida como pimenta do reino, introduzida no país por volta do século XVII pelos portugueses (GUIMARÃES e GIORDIANO, 2004).

Muitas piperáceas têm sido utilizadas na alimentação e principalmente na medicina popular para o tratamento de patologias do aparelho respiratório, incluindo asma, bronquite e tosse; e do aparelho digestivo, tais como dores abdominais e diarréias. Além disso, diversas propriedades biológicas da família Piperaceae já são bem conhecidas, destacando-se as atividades anti-inflamatória, antimicrobiana (antibacteriana, antifúngica, tratamento de feridas), antileucêmica e anti-helmíntica (LEAL, 2000).

1.1.2 O gênero *Piper*

O gênero *Piper* agrega mais de 1.000 espécies que se distribuem geograficamente pelas regiões subtropicais, tropicais e temperadas de ambos os hemisférios (DYER *et al.*, 2004). Muitas plantas deste gênero crescem em florestas quentes, úmidas e com alto índice pluviométrico (GUIMARÃES e GIORDIANO, 2004). Na América Central, há ocorrência de cerca de 90 espécies na Península Osa na Costa Rica, como também em alguns países da América do Sul (DYER *et al.*, 2004). No Brasil ocorrem cerca de 266 espécies do gênero *Piper* (GUIMARÃES e GIORDIANO, 2004). Em geral apresentam-se

como sub-arbustos, arbustos ou pequenas árvores com 1 a 5 metros, podendo atingir até 10 metros de altura. Os caules são mais ou menos lignificados, nodosos e ramosos. As folhas possuem pecíolo longo e se apresentam alternas no caule. O limbo é simples e a sua margem é inteira, apresentam diferentes formas e tamanho variável, podendo atingir em algumas espécies até 40 cm de comprimento. As flores são sésseis, dispostas em espigas opostas às folhas, variando de comprimento e espessura, e os frutos são drupas globosas com pericarpo pouco espessado (MOREIRA *et al.*, 2000; REITZ, 2003; GUIMARÃES e GIORDIANO, 2004).

Investigações fitoquímicas realizadas com espécies do gênero *Piper* permitiram o isolamento de várias classes de compostos ativos, tais como: amidas, alcalóides, profenilfenóis, lignanas, neolignanas, terpenos, esteróides, chalconas, dihidrochalconas, flavonas e flavononas (PARMAR *et al.*, 1997). Quanto às suas propriedades medicinais, sabe-se que algumas plantas pertencentes a esse gênero são utilizadas no sistema indiano de medicina Ayurvédica, sendo que as raízes de *Piper syvaticum* são empregadas como antídoto para veneno de cobra (KIRTIKAR e BASU, 1933). Na Jamaica a *Piper aduncum* e *Piper hispidum* são listadas como remédios para dores de estômago e como repelentes de insetos (ASPREY e THORNTON, 1954). No México e no Brasil, as folhas de *Piper amalago* são utilizadas para aliviar dores estomacais e no combate de diversas infecções, assim também como as folhas e talos de *Piper marginatum* e *Piper tuberculatum* são utilizadas na Paraíba como antídoto contra picada de cobra e como sedativo (CHAVES *et al.*, 2006; ARAÚJO-JÚNIOR *et al.*, 1999).

As raízes e frutos de *Piper chaba* encontram inúmeras aplicações na medicina, sendo úteis na asma, bronquite, febre, dor abdominal, como estimulante, e nas aflições hemorroidárias (KIRTIKAR e BASU, 1933). *Piper brachystachyum* apresenta propriedades inseticidas (JACOBSON e CROSBY, 1975), enquanto o caule de *Piper futokadsura*, conhecido como *haifengteng*, é amplamente utilizada na medicinal tradicional chinesa,

com prescrições para o tratamento de doenças como asma e artrite (MATSUI e MUNAKATQ, 1975). Outra espécie de relevante valor comercial é a *Piper hispidinervum* por apresentar um óleo essencial rico em safrol, um fenilpropanóide, muito utilizado nas indústrias de cosméticos e inseticidas (BERGO *et al.*, 2005). Recentemente, a atividade larvicida contra o *Aedes aegypti* do óleo essencial de quatro espécies de *Piper* da região Amazônica (*Piper gaudichaudianum*, *Piper permucronatum*, *Piper humaytanum* e *Piper hostmanianum*) foi relatada por Moraes e colaboradores (2007).

Algumas espécies do gênero *Piper* já demonstraram eficácia gastroprotetora. A *Piper betel*, cujas indicações populares são como estimulante digestivo e das lipases pancreáticas (PRABHU *et al.*, 1995), demonstrou importante efeito protetor em úlceras induzidas por indometacina em ratos (BHATTACHARYA *et al.*, 2007) diminuindo a lesão e aumentando os níveis de mucina, formadora do muco protetor estomacal, assim como promovendo um aumento na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Também já foi observado que a *Piper chaba* apresentou atividade gastroprotetora em modelos de úlcera induzida tanto por etanol quanto por indometacina (MORIKAWA *et al.*, 2004). Em adição, a *Piper betel* também reduziu a úlcera induzida por indometacina, promovendo aumento na atividade da SOD e CAT e nos níveis de muco (MAJUNDAR *et al.*, 2003). Outro efeito gastroprotetor interessante foi demonstrado pela *Piper carpunya*, pela inibição da atividade da bomba H^+,K^+ -ATPase e de ação bactericida contra a *Helicobacter pylori* (QUÍLEZ *et al.*, 2010).

1.1.3 *Piper tuberculatum*

A *Piper tuberculatum* (Figura 1) conhecida popularmente como pimenta d'ardo, jaborandi-falso, ou jamburana, apresenta-se como arbustos com 2 a 2,5 m de altura e ramos pubérulos. As folhas possuem bainha alada, lâmina oblongo-elíptica ou ovado-

elíptica, base assimétrica e ápice agudo, de textura papiráceo-membranácea, brilhante, nervuras ascendentes em número de 8-10 pares, perinérveas, dispostas até o ápice da lâmina (LORENZI e MATOS, 2002; GUIMARÃES e GIORDIANO, 2004). As espigas são eretas, com 4-7 cm de comprimento, bractéolas triangular-subpeltadas, marginalmente franjadas e a drupa é tetragonal, ovada ou subovada, lateralmente comprimida (GUIMARÃES e GIORDIANO, 2004).



Figura 1. Folhas e frutos de *Piper tuberculatum* em seu ambiente natural (Cortesia Dra. Rosely Valéria Rodrigues).

Sua distribuição geográfica estende-se por todo Continente Americano e Antilhas. No Brasil, é encontrada nos estados do Amazonas, Rondônia, Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro e Mato Grosso. Cresce em altitudes aproximadas aos 550 m, em encosta úmida, em capoeira e em locais brejosos (LORENZI e MATOS, 2002).

A *Piper tuberculatum* é uma planta medicinal utilizada popularmente como estimulante digestivo e na redução dos gases intestinais, além de sedativo, antídoto para

veneno de cobra, analgésico para dor de dente (ARAÚJO-JÚNIOR *et al.*, 1999) e para tratar problemas estomacais (CHAVES *et al.*, 2006).

Vários compostos já foram isolados da *Piper tuberculatum*, entre eles podemos citar: 4,5-dihidropiperlonguiminina (BERNARD *et al.*, 1995), piplartina (FILHO *et al.*, 1981), dihidropiplartina (HADORN e JUNGKUNS, 1951), o ácido 3,4-metilenodioxicinâmico e o ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico (FILHO *et al.*, 1981). Dentre esses compostos o mais estudado, e que tem apresentado resultados interessantes em diferentes sistemas biológicos é o alcalóide piplartina. Cícero Bezerra Felipe e colaboradores (2007) demonstraram que a piplartina apresentou efeito ansiolítico e antidepressivo em camundongos. Mais recentemente, Rodrigues e colaboradores (2008), demonstraram que a piplartina foi responsável pelo efeito antinociceptivo do extrato bruto e de diversas frações de *Piper tuberculatum*. Além disso, estudos realizados por Bezerra e colaboradores (2007, 2008) demonstraram que o referido composto tem a capacidade de inibir a proliferação de células leucêmicas. Outros alcalóides de *Piper tuberculatum* também apresentaram atividade antitumoral devido à ação citotóxica em diferentes linhagens celulares (TSAI *et al.*, 2005). Estudos mais recentes demonstraram que a piplartina também apresenta efeito esquistossomicida (MORAES *et al.*, 2010), e inibidor a agregação plaquetária de maneira semelhante à aspirina (FONTENELE *et al.*, 2009).

Além disso, os óleos essenciais das partes aéreas da *Piper tuberculatum*, coletadas em diferentes localidades da região Amazônica, apresentaram grandes concentrações do fenilpropanóide dilapiol, o qual foi considerado o responsável pelo efeito inseticida relatado por Maia e colaboradores (1998).

1.1.4 Anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal

O trato gastrointestinal (TGI) é um tubo muscular, com epitélio especializado, que se estende desde a faringe posterior até o ânus. Além de serem responsáveis pela digestão, absorção e excreção das substâncias ingeridas, os órgãos pertencentes ao trato gastrointestinal também coordenam o maior número de glândulas endócrinas e células imunes do organismo (ALHMAN *et al.*, 2001).

Compondo o TGI encontra-se o esôfago, caracterizado por ser um órgão tubular que tem como função conduzir o alimento da faringe até o estômago. O esôfago se localiza posteriormente à traquéia, começando na altura da 7ª vértebra cervical. Perfura o diafragma pela abertura chamada hiato esofágico e termina na parte superior do estômago. Mede cerca de 25 centímetros de comprimento, e é formado por três porções: cervical, torácica e abdominal. É composto por três camadas: uma mucosa, uma submucosa e uma muscular. A camada mucosa é composta por um revestimento epitelial pavimentoso estratificado, e uma lâmina própria de tecido conjuntivo, além de vasos sanguíneos e glândulas mucosas. Já a camada submucosa contém pequenas glândulas que lançam suas secreções em direção à luz do esôfago, sendo essas secreções importantes no combate à agentes infecciosos do meio externo. Sua principal função é conduzir o alimento até o estômago, ao qual se liga através do esfíncter esofageano inferior, também denominado cárdia (NETTER, 2000).

Situado logo abaixo do esôfago, encontra-se o estômago, um órgão com paredes musculosas, cuja principal função é a digestão dos alimentos pela ação do suco gástrico. Anatomicamente é dividido em três porções: fundo, corpo e antro pilórico, sendo limitado por dois sistemas de esfíncteres: o esfíncter esofagiano inferior, na parte superior ou proximal do estômago; e o esfíncter pilórico ou piloro, na parte inferior ou distal do estômago (Figura 2) (HOGBEN *et al.*, 1974).

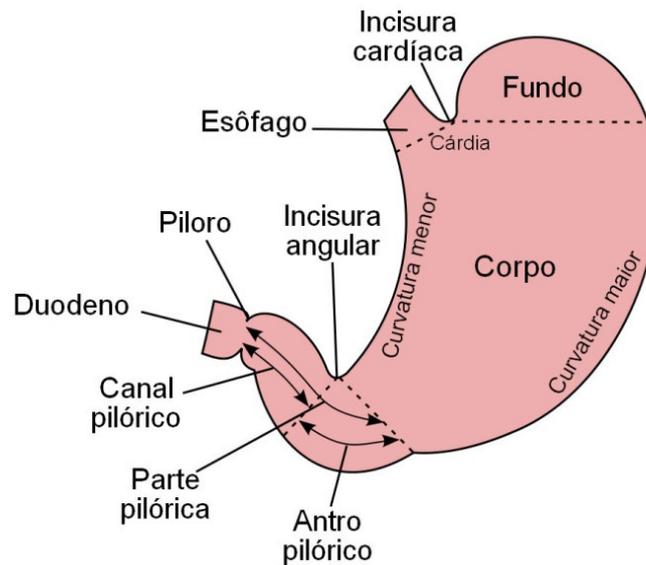


Figura 2. Anatomia do estômago

(Fonte: <http://reforcociencias.blogspot.com/2008/04/doencasrelacionadas-aoestomago.html>)

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 as regiões do corpo e do fundo, e é o sítio da secreção de ácido clorídrico. É formada por glândulas oxínticas, constituídas por diversos tipos celulares, como: células parietais (ou oxínticas) responsáveis pela regulação da secreção ácida, células principais (produtoras de pepsinogênio), células produtoras de somatostatina (células D) e células do tipo enterocromafins (ECL) que liberam histamina. No colo glandular, predominam as células produtoras de muco, que atuam protegendo a mucosa gástrica da ação corrosiva das secreções originadas pela glândula (JAIN *et al.*, 2007).

As glândulas da mucosa antral apresentam os mesmos tipos celulares que as glândulas oxínticas, exceto pela ausência das células principais, e inclusão das células G, produtoras de gastrina. (HOGBEN *et al.*, 1974).

O trato gastrointestinal é frequentemente exposto a estímulos nocivos que podem causar lesões e levar às diferentes patologias desse sistema. Estes estímulos podem ser endógenos (produção fisiológica de ácido gástrico), ou ocorrer por alterações da mucosa

provocadas por estresse, uso de anti-inflamatórios não esteroidais, ingestão de álcool ou de alimentos em temperaturas extremas, infecções por *Helicobacter pylori*, lesões relacionadas à isquemia, etc. Em contrapartida a estes estímulos nocivos, a mucosa gastrointestinal apresenta diferentes fatores de proteção (pré-epitelial, epitelial e subepitelial) (DONG e KAUNITZ, 2006).

1.1.4.1 Secreção ácida gástrica

Uma das mais importantes funções do estômago é a produção de ácido. O ácido clorídrico facilita a digestão de proteínas e a absorção de ferro, cálcio e vitamina B12, e age também impedindo a entrada de bactérias no organismo. Quando mecanismos homeostáticos estão prejudicados, tanto o volume quanto a acidez gástrica podem aumentar desproporcionalmente, superando assim as defesas da mucosa gástrica, o que leva à formação de úlcera duodenal, úlcera gástrica, gastrite e doença do refluxo gastroesofágico (SCHUBERT, 2004).

A H^+,K^+ -ATPase é a enzima responsável por bombear íons H^+ contra um gradiente de concentração, exercendo um papel fundamental na secreção ácida gástrica. Essa enzima é formada por duas subunidades: a subunidade α , que é a responsável pela troca de H^+ por K^+ com gasto energético fornecido pela catalisação do trifosfato de adenosina (ATP); e a subunidade β , que é altamente glicosilada, e atua protegendo a enzima de degradação, sendo necessária para o deslocamento da enzima entre o citoplasma e a membrana da célula. Nas células parietais em repouso, a H^+,K^+ -ATPase é armazenada em tubulovesículas citoplasmáticas. Quando os receptores das células parietais são estimulados por seus agonistas são gerados segundos mensageiros, que através de cascatas de fosforilação fazem com que as tubulovesículas contendo as enzimas se fundam com a membrana apical, permitindo que a enzima, agora transmembrânica, se

torne ativa. Na ausência do estímulo as bombas são recicladas de volta para o compartimento citoplasmático (SCHUBERT, 2004). A H^+,K^+ -ATPase promove a secreção do H^+ no lúmen gástrico, trocando-o por K^+ . O Cl^- é expelido através de canais ativado por AMPc. O íon bicarbonato (HCO_2^-), formado pela dissociação do ácido carbônico (H_2CO_3) é expelido por antiporte na membrana basolateral das células parietais que trocam o HCO_2^- pelo íon cloreto (Cl^-) (GANOG, 2003).

Estímulos originados dentro e fora do estômago convergem a neurônios gástricos eferentes que constituem a regulação primária da secreção ácida. A secreção de ácido gástrico é um processo contínuo e complexo controlado por múltiplos mecanismos centrais (neurais) e periféricos (endócrino e parácrino). Os mecanismos neuronais são regidos pela acetilcolina (ACh), os parácrinos pela histamina e os endócrinos pela gastrina e todos desempenham papéis importantes na regulação da secreção ácida (HOOGERWERF e PASRICHA, 2003).

1.1.4.2 Mecanismos que estimulam a secreção gástrica

A secreção ácida pela célula parietal envolve a elevação dos níveis intracelulares de cálcio e adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc), seguido pela translocação da H^+,K^+ -ATPase das túbulovesículas citoplasmáticas para a membrana apical da célula parietal (Revisado por HOU e SCHUBERT, 2006).

A gastrina, produzida pelas células G, é o principal hormônio estimulante de secreção ácida durante a ingestão de alimentos (SCHUBERT, 2005). Foram caracterizadas duas classes de receptores CCK para a gastrina, CCK-1 (específicos para colecistocinina) e CCK-2 (com grande afinidade para a gastrina). A gastrina atuando através dos receptores CCK-2 estimula as células parietais diretamente e indiretamente, sendo a estimulação indireta a que ocorre através de sua ação em receptores CCK-2

presentes nas células do tipo enterocromafins (ECL), resultando na liberação de histamina. A histamina liberada se difunde para as células parietais vizinhas e estimula a secreção ácida pela interação com os receptores H_2 expressos na superfície das células parietais (POMMIER *et al.*, 2003). O segundo mensageiro responsável pela ação da gastrina é o cálcio, liberado a partir da ativação da fosfolipase C (SCHUBERT e PEURA, 2008). Existem indicativos de que a principal ação da gastrina sobre as células parietais é de sensibilização para outros secretagogos agindo como *cross talk* ou como uma interação sinérgica entre as vias de sinalização (SCHUBERT e PEURA 2008).

Acetilcolina (ACh), peptídeo liberador de gastrina (GRP), secretina, agonistas de receptores β_2/β_3 adrenérgicos e cálcio, estimulam a secreção de gastrina, enquanto que somatostatina, galanina, e adenosina inibem essa secreção. No antro, neurônios colinérgicos estimulam a secreção de gastrina diretamente nas células G, e indiretamente, pela supressão de somatostatina nas células D. Além disso, proteínas ativam neurônios não colinérgicos que liberam o GRP, responsável por estimular diretamente a secreção de gastrina pelas células G (SCHUBERT e PEURA 2008).

A ACh liberada a partir de neurônios colinérgicos do sistema nervoso entérico estimula diretamente a secreção de ácido através da ativação dos receptores muscarínicos M_3 presentes nas células parietais, e que são acoplados à proteína G e induzem a ativação de fosfolipase C com geração de inositol trifosfato (IP_3) e liberação de cálcio intracelular. Atua também indiretamente pela eliminação do efeito inibitório que a somatostatina exerce, tanto nas células parietais como nas células ECL, assim como em receptores muscarínicos presentes nas células ECL, estimulando a liberação de histamina (JAIN *et al.*, 2007).

As células ECL no estômago produzem histamina, que é estocada em vesículas secretoras, sendo somente liberada após estímulos, principalmente de gastrina e acetilcolina (MÖSSNER e CACA, 2005). A histamina liberada estimula as células parietais

diretamente pela ligação em receptores H_2 . Estes receptores são acoplados à proteína G, e quando ativados, estimulam a adenilato ciclase com geração de AMPc. A histamina também estimula a secreção ácida indiretamente através da sua ligação a receptores H_3 , que inibem a secreção de somatostatina (KAZUMORI *et al.*, 2004).

1.1.4.3 Mecanismos que inibem a secreção gástrica

A somatostatina é o principal fator inibitório da secreção ácida, e consiste de um peptídeo inibitório liberado pelas células D localizadas nas áreas do antro e do fundo do estômago. Seu efeito antissecretor pode ser atribuído a dois mecanismos, sendo o primeiro devido à interação direta sobre as células parietais, e o outro devido à inibição da liberação de histamina pelas células ECL e sobre a liberação de gastrina pelas células G. Ambos os mecanismos ocorrem através da ativação de receptores de somatostatina do tipo SST_2 localizados tanto em células ECL como em células parietais (KOMASAKA *et al.*, 2002). O receptor SST_2 é acoplado à proteína G inibitória (G_i) (ATHMANN *et al.*, 2000) e também atua na inibição da secreção ácida estimulada pelos agonistas que liberam Ca^{2+} , assim como inibe a liberação de histamina pelas células ECL (KUTCHAI, 1996). A inibição da liberação de histamina por parte da somatostatina pelas células ECL tem um papel mais importante na inibição da secreção ácida gástrica do que o seu efeito inibitório direto sobre as células parietais (KOMASAKA *et al.*, 2002). A somatostatina produzida pelas células D está altamente presente nas regiões que contém a glândula pilórica, e exerce uma retenção parácrina na secreção de gastrina pelas células G (SCHUBERT e PEURA, 2008).

As prostaglandinas (PGs) atuam inibindo a secreção de ácido por ação direta nas células parietais ou de forma indireta pela inibição da secreção de gastrina. Assim, prostaglandina E_2 (PGE_2) e prostaciclina (PGI_2) ao atuarem em seus respectivos

receptores acoplados a uma proteína G_i , promovem a inibição da adenilato ciclase, resultando na inibição da secreção ácida (KUTCHAI, 1996). Além disso, PGE_2 e PGI_2 também inibem a secreção ácida através da inibição da secreção de histamina pelas células ECL (ATAY *et al.*, 2000).

1.1.4.4 Fatores protetores da mucosa

A defesa da mucosa gástrica pode ser dividida em fatores pré-epiteliais, epiteliais e sub-epiteliais, sendo essa subdivisão arbitrária, pois todos os fatores atuam em conjunto para prevenir a mucosa das lesões (FLEMSTRÖM *et al.*, 1999).

O primeiro nível de defesa consiste de fatores secretados no interior do lúmen e inclui: ácido, bicarbonato, muco, imunoglobulinas e outras substâncias bactericidas, assim como fosfolipídios ativos de superfície (WALLACE e GRANGER, 1996).

A barreira muco-bicarbonato é formada por um gel mucoso, bicarbonato e fosfolipídios surfactantes, os quais cobrem a superfície da mucosa. Esta camada retém o bicarbonato secretado pelas células epiteliais superficiais para que o microambiente permaneça neutro, prevenindo a penetração da pepsina, e a digestão proteolítica da superfície epitelial (LAINE *et al.*, 2008). O muco produzido pelas células localizadas na região do pescoço das glândulas gástricas e pelas células epiteliais é secretado em todo o trato gastrointestinal desde o estômago até o cólon, formando um gel aderente na região da mucosa e do lúmen, protegendo a mucosa contra agentes nocivos. É armazenado em grânulos no citoplasma apical dessas células e liberado por exocitose. A secreção de muco é estimulada por hormônios gastrointestinais, incluindo gastrina e secretina, bem como PGE_2 e agentes colinérgicos. Substâncias ulcerogênicas como os anti-inflamatórios não esteroidais e sais biliares causam a dissipação do muco, levando à lesão gástrica (LAINE *et al.*, 2008). Ele é constituído de 95% de água e 5% de

glicoproteínas, denominadas mucinas. Os carboidratos compõem 80% do peso das mucinas, que se constituem de quatro monômeros similares, ligados por pontes de dissulfeto. A polimerização destas unidades de mucina forma um gel viscoso que adere à superfície do estômago, mas que está sujeito à proteólise pelas pepsinas, que clivam as ligações próximas aos centros dos tetrâmeros. Esse processo libera fragmentos que não formam géis e, desta forma, a pepsina atua dissolvendo a camada mucosa de proteção. A manutenção da camada de mucina protetora demanda síntese de novas mucinas para substituir aquelas mucinas que foram clivadas pelas pepsinas (BERNE *et al.*, 2004).

O bicarbonato ajuda a manter uma zona de pH neutro na mucosa, oferecendo uma barreira protetora contra a difusão do ácido (AOI *et al.*, 2004; NAKASHIMA *et al.*, 2004). A secreção pré-epitelial de bicarbonato consiste de uma secreção estável junto à camada do gel aderente, criando um gradiente de pH perto da neutralidade na superfície das células epiteliais, o qual promove a primeira linha de defesa da mucosa do estômago e do duodeno contra o ácido secretado no lúmen. Quando o alimento é ingerido, as taxas de secreção tanto de muco quanto de bicarbonato aumentam (BERNE *et al.*, 2004; LAINE *et al.*, 2008).

As células parietais quando liberam íon H^+ , simultaneamente transportam o íon bicarbonato pela membrana basolateral através da troca de Cl^-/HCO_2^- , que resulta numa maior disponibilidade de bicarbonato. É sabido que para cada íon H^+ secretado pela célula parietal, uma molécula de dióxido de carbono (CO_2) é convertida em bicarbonato, provocando o fenômeno conhecido como maré alcalina, que ocorre após a secreção de ácido gástrico, e após as refeições (DONG e KAUNITZ, 2006).

A barreira muco-bicarbonato é uma das barreiras existentes entre o lúmen e o epitélio, e quando essa barreira é quebrada, a próxima etapa do mecanismo protetor inclui a neutralização do ácido intracelular, reparação epitelial rápida, e manutenção e distribuição do fluxo sanguíneo da mucosa (LAINE *et al.*, 2008). Um importante agente

nesta etapa de proteção são as prostaglandinas, que desempenham uma série de eventos que promovem a proteção da mucosa gástrica.

As PGs são sintetizadas a partir do ácido araquidônico, através das enzimas ciclooxigenases (COX), sendo a isoforma COX-1 (constitutiva), responsável pela produção da maior parte de PG no estômago normal e a isoforma COX-2 (induzível), a qual atua na produção de PGs quando ocorrem lesões, e constitui um fator importante na cicatrização das úlceras. A geração contínua de PGE₂ e PGI₂ é crucial para a manutenção da integridade da mucosa e proteção contra agentes ulcerogênicos e necrotizantes. Quase todos os mecanismos de defesa são estimulados e/ou facilitados pelas PGs, incluindo a inibição da secreção ácida, estimulação da secreção de muco, bicarbonato e fosfolipídeos, aumento do fluxo sanguíneo, aceleração da restituição epitelial e cicatrização da mucosa. As PGs atuam também inibindo a ativação de mastócitos, leucócitos, e a aderência plaquetária no endotélio vascular (LAINE *et al.*, 2008).

O próximo nível de defesa é o epitélio, que oferece resistência à injúria induzida pelo ácido gástrico, e forma uma barreira à difusão passiva. O epitélio é especializado de forma a manter sempre as suas funções como uma barreira ao ácido e a outros agentes agressores. A sua grande capacidade de proliferação lhe confere a habilidade de reparar o dano epitelial, o que contribui para a resistência da mucosa gástrica contra as lesões (WALLACE, 2001). O epitélio encontra-se logo abaixo da barreira formada pelo muco.

A proteção subepitelial do estômago envolve a microcirculação, e é através dela que o fluxo sanguíneo age protegendo a mucosa por assegurar a chegada de uma quantidade ótima de oxigênio, nutrientes e bicarbonato, além de remover substâncias tóxicas (WALLACE, 2001). As células endoteliais dos microvasos geram potentes vasodilatadores como o óxido nítrico (NO) e PGI₂, os quais protegem a mucosa gástrica contra fatores agressores e se opõem a ação danosa de vários agentes vasoconstritores como os leucotrienos C₄, tromboxano A₂ e endotelina. PGI₂ e NO mantêm a viabilidade

endotelial e previnem a aderência de plaquetas e leucócitos nas células endoteliais de microvasos, prevenindo assim o comprometimento da microcirculação (WALLACE, 2001; LAINE *et al.*, 2008). Quando a mucosa gástrica é exposta a agentes irritantes, ocorre um rápido aumento do fluxo sanguíneo, permitindo a remoção e/ou diluição de agentes lesivos.

Existem ainda células como macrófagos e outras células migratórias que são diretamente responsáveis pela resposta inflamatória (WALLACE e GRANGER, 1996). Elas são capazes de liberar uma grande quantidade de mediadores inflamatórios e citocinas que são responsáveis por alterar o fluxo sanguíneo da mucosa e aumentar o recrutamento de granulócitos para a região afetada (HAGABOAM *et al.*, 1993).

Outro agente importante na proteção e manutenção da integridade gástrica é o NO, que é um gás volátil formado pela oxidação da L-arginina, catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). São conhecidas três isoformas distintas de NOS, sendo duas constitutivamente expressas, a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS ou NOS-1) e a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS ou NOS-3), e uma induzível, conhecida como óxido nítrico sintase induzida (iNOS ou NOS-2). O NO quando gerado, liga-se ao grupo heme da guanilil ciclase solúvel (GCs), que catalisa a conversão de guanosina trifosfato (GTP) para guanosina monofosfato cíclico (GMPc), aumentando assim a concentração de GMPc intracelular, que poderá ligar-se a domínios específicos de proteínas, incluindo proteínas quinases, canais iônicos, e fosfodiesterases, promovendo dessa forma respostas celulares. O NO é responsável por ajudar a manter a integridade do epitélio gástrico e a barreira de muco, além de ser vasodilatador, e atuar auxiliando na regulação do fluxo sanguíneo gástrico.

Finalmente, alguns sistemas antioxidantes também desempenham um papel na proteção e integridade da mucosa. Como exemplo, podemos citar a glutathiona reduzida (GSH), que é um tripeptídeo com potente atividade antioxidante e com propriedade de co-

fator enzimático, ambos importantes para regulação da atividade celular. Sob condições de estresse oxidativo, as espécies reativas de oxigênio são reduzidas por GSH com concomitante formação de GSSH (ou glutathiona oxidada). Apesar de sua resistência à oxidação espontânea, o GSH reage rapidamente e de forma não enzimática com o radical hidroxila, com o trióxido de nitrogênio (N_2O_3) e o com peroxinitrito. Para manter o equilíbrio redox celular, o GSSH é exportado das células por proteínas de transporte dependentes de ATP, ou seja, em condições severas de estresse ocorre uma diminuição nos níveis celulares de GSH. Esta depleção de GSH está relacionada com a patofisiologia de muitas doenças, entre elas a úlcera péptica, sugerindo um importante papel do GSH na manutenção da integridade dos sistemas fisiológicos (CNUBBEN *et al.*, 2001).

1.1.5 Distúrbios do trato gastrointestinal

Nos últimos anos, distúrbios gastrointestinais como úlceras pépticas, refluxo gastroesofágico, síndrome de Zollinger-Ellison e gastrite têm assumido decididamente altas proporções nas populações, tornando-se um importante foco de investigação experimental e clínica. Nesse sentido, o estudo de produtos naturais que apresentem ação sobre o TGI assume interesse social, terapêutico, botânico, empresarial e acadêmico na tentativa de obtenção de protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos, bem como na validação da segurança, eficácia e mecanismos de ação de plantas medicinais.

1.1.5.1 Úlcera péptica

A úlcera péptica é um dos distúrbios mais comuns que afetam o sistema gastrointestinal, sendo sua incidência durante a vida superior a 10%, com um pico que

ocorre entre 65 e 74 anos (JOSHUA, 2000). A úlcera é entendida como uma lesão profunda da mucosa, na qual os componentes do tecido epitelial e conectivo, incluindo miofibroblastos subepiteliais, células do músculo liso, vasos e nervos podem estar destruídos (MILANI e CALABRO, 2001).

O termo úlcera péptica compreende tanto as úlceras gástricas (estomacais) como as duodenais. Em geral, as úlceras ocorrem mais comumente no duodeno, onde estão localizadas cerca de 90% a 3 cm da junção do piloro com a mucosa duodenal. No estômago as úlceras se localizam mais comumente no antro (60%) e na junção do antro com o corpo na pequena curvatura (25%) (OFMAM, 2000; ABITOL, 2005).

A fisiopatologia das úlceras pépticas é considerada um processo multifatorial, que pode ser atribuído ao desequilíbrio entre fatores agressores (como o ácido clorídrico, a pepsina, infecção por *Helicobacter pylori* além do uso de anti-inflamatórios não esteroidais, fumo e álcool) e defesas locais da mucosa (como a secreção de bicarbonato, muco, prostaglandinas, fluxo sanguíneo e óxido nítrico). Embora o tratamento seja frequentemente conduzido para a redução dos fatores agressores, pode também ser dirigido para o fortalecimento das defesas da mucosa do estômago e duodeno (VENKATARANGANNA *et al.*, 1998; JAIN *et al.*, 2006).

A úlcera gástrica é uma lesão que atinge a mucosa, submucosa e algumas vezes a camada muscular externa. Histologicamente consiste de duas grandes estruturas: a margem da úlcera, formada por tecido adjacente não necrosado da mucosa, denominado componente epitelial, e tecido de granulação na base da úlcera, denominado componente tecidual conectivo (TARNAWSKI, 2005).

A infecção por *H. pylori* e o uso de AINES contribuem enormemente para a formação da úlcera. A úlcera duodenal é formada em 90% pela infecção de *H. pylori* e 10% pelo uso de AINES. Já a úlcera gástrica é causada em 70% pela *H. pylori* e 30% por AINES (KUSTERS *et al.*, 2006).

Os AINES são amplamente utilizados para o tratamento da dor, febre e inflamação. Efeitos adversos dos AINES incluem dano da mucosa gastrintestinal, além de agravamento de ulcerações pré-existentes. Esses efeitos deletérios são atribuídos a sua capacidade de reduzir a produção de PG, através da inibição da enzima COX (COX-1 e COX-2), ativação de neutrófilos e diminuição da microcirculação, mecanismos esses que podem conduzir a uma oclusão de microvasos, e como consequência uma superprodução de metabólitos reativos ao oxigênio. Essas substâncias são capazes de induzir a lesão tecidual oxidativa, que parece ter papel importante na patofisiologia da ulceração na mucosa gástrica induzida por AINES (BRZOZOWSKI, 2003; FORNAI *et al.*, 2005).

A cicatrização da úlcera é um processo complexo, o qual envolve migração celular, proliferação, re-epitelização, angiogênese e deposição da matriz, (TARNAWSKI, 2005; WALLACE, 2001), sendo esses controlados por fatores de crescimento, fatores de transcrição e citocinas (TARNAWSKI, 2005). A cicatrização das úlceras requer angiogênese no tecido de granulação na base da úlcera, juntamente com a proliferação das células epiteliais na margem da úlcera e consequente restabelecimento da arquitetura glandular. O processo inicial de cicatrização das úlceras é acompanhada pelo aumento do fluxo sanguíneo na área ulcerada, dos níveis plasmáticos de gastrina e de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e IL-1 β (interleucina do tipo 1 beta), mas que têm seus níveis reduzidos ao longo do processo de cicatrização. A hipergastrinemia observada no período inicial da cicatrização pode ser atribuída à extraordinária supressão ácida gástrica e expressão de fatores de crescimento como fator de crescimento endotelial (EGF), fator de crescimento transformador α (TGF- α) e fator de crescimento de hepatócitos (HGF), que controlam a proliferação celular e são conhecidos por exibirem atividade antissecretora (BRZOZOWSKI, 2003).

Os principais fatores que estimulam a proliferação celular, divisão, migração e re-epitelização são os fatores de crescimento. Inicialmente uma quantidade desses fatores é

produzida localmente devido à própria ulceração, ou seja, linhagens de células da mucosa começam a expressar genes que produzam esses fatores de crescimento - EGF, fator de crescimento de fibroblastos básicos (bFGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Esses fatores de crescimento produzidos localmente ativam a migração de células epiteliais e proliferação via ações autócrinas e/ou parácrinas (TARNAWSKI, 2005).

Todos esses processos ocorrem com o intuito de restabelecer a integridade física da mucosa gástrica, e a cicatrização pela consequente re-epitelização é um processo fundamental, visto que, o epitélio é uma barreira contínua do tecido de granulação que protege a mucosa contra agentes irritantes químicos e contra infecções.

A descoberta da secreção ácida gástrica foi o primeiro passo para o entendimento de doenças associadas com a secreção ácida gástrica. A inibição da secreção ácida gástrica ainda é a chave terapêutica tanto para as úlceras pépticas como para a infecção por *Helicobacter pylori* além das doenças de refluxo gastro-esofágico, síndrome de Zollinger-Ellison e gastrite. As estratégias para o tratamento das úlceras pépticas são variadas, e se estendem desde os antiácidos convencionais simples ao uso de medicamentos mais complexos e eficazes como os inibidores da bomba de prótons (IBPs).

Têm sido contínua e importante a investigação de novas drogas para o tratamento de doenças relacionadas à ação do ácido gástrico sobre órgãos do trato gastrintestinal. A supressão da secreção ácida gástrica, que constitui o tratamento mais utilizado, mesmo que em doses recomendadas, às vezes pode conduzir a uma acloridria (ausência de ácido clorídrico) podendo desencadear infecções entéricas como a febre tifóide, cólera e disenteria (JAIN *et al.*, 2007).

1.1.5.2 Doença do refluxo gastroesofágico

O refluxo gastroesofágico (RGE) é um fenômeno decorrente de uma falha anatômica e/ou funcional dos mecanismos de contenção do conteúdo gástrico (GAVAZZONI *et al.*, 2002). A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) pode ser definida como uma afecção crônica decorrente do fluxo retrógrado do conteúdo gástrico ou duodenal para o esôfago e/ou órgãos adjacentes a ele, acarretando sintomas ou sinais esofagianos e/ou extraesofagianos, que podem estar ou não associados a lesões teciduais (MORAES-FILHO *et al.*, 2002).

Essa doença se estabelece quando há um desequilíbrio entre fatores agressores (refluxo gástrico ou gastroduodenal) e fatores de defesa (“barreira anti-refluxo”, depuração esofágica e resistência da mucosa) da região do esôfago (FORNARI, 2001). Apesar de a DRGE possuir uma etiopatologia multifatorial, o fluxo retrógrado de conteúdo gástrico (pepsina e ácido clorídrico) e eventualmente duodenal (sais biliares e pancreáticos) para o esôfago constitui o evento determinante no desenvolvimento da doença. Fisiologicamente, esse fluxo retrógrado não ocorre, pois é prevenido pela “barreira anti-refluxo”, que está situada na junção do esôfago com o estômago, e constitui-se de um complexo anatômico funcional que representa a somatória da pressão intrínseca do esfíncter esofágico inferior (EEI), da compressão intrínseca do EEI pelo diafragma crural, da integridade do ligamento frenoesofágico e também da manutenção do ângulo de His (ATTWOOD *et al.*, 1992; RICHTER, 1999 e KAHRILAS, 1998). Além dessa “barreira anti-refluxo”, a depuração esofágica realizada pela peristalse primária esofágica associada à deglutição de saliva possui uma capacidade relativa de neutralizar o ácido clorídrico presente no suco gástrico refluído, pois a saliva é rica em bicarbonato (BARHAM *et al.*, 1995). Adicionalmente um terceiro recurso fisiológico que previne a DRGE é a resistência da mucosa esofágica, alcançada pela presença de um epitélio escamoso estratificado

(BRETAN e TAGLIARINI, 2001).

A DRGE apresenta-se sobre uma grande variedade de manifestações clínicas, sendo os sintomas divididos em típicos e atípicos, e de acordo com a frequência. Sintomas habitualmente provocados localizam-se no TGI, e incluem pirose, dor retroesternal, regurgitação, eructação, disfagia e odinofagia (LOCKE *et al.*, 1997). Contudo, devido à ação do material refluído sobre alguns órgãos adjacentes ao esôfago, ou devido a uma exacerbação dos reflexos mediados pelo nervo vago, podem ocorrer sintomas extra esofágicos, também conhecidos como atípicos, entre eles: tosse crônica, rouquidão, disfonia (decorrente da ação crônica sobre a laringe), sensação de corpo estranho (*globus*) na garganta, halitose, otalgia, anormalidades no paladar e desgaste do esmalte dentário, além de estenose laríngea e traqueal (GAVAZZONI *et al.*, 2002; FREITAG, 2003).

A DRGE pode apresentar-se como erosões na mucosa esofágica, percebidas no exame endoscópico do esôfago. Essa forma é classificada como forma erosiva. Outra forma da doença pode ocorrer sem a presença dessas erosões, sendo designada como a forma não erosiva da doença, conhecida como doença do refluxo não erosivo, do inglês *non-erosive reflux disease* (NERD).

1.1.5.3 Tratamento das úlceras pépticas e da doença do refluxo gastroesofágico.

O tratamento das úlceras pépticas, assim como da DRGE visa à eliminação dos sintomas e correção dos fatores propiciadores.

Por mais de um século, as úlceras pépticas e as demais doenças gástricas foram controladas cirurgicamente, com altas taxas de morbidade e mortalidade. O tratamento farmacológico resumia-se em neutralizar a acidez gástrica estomacal com a utilização de antiácidos, como bicarbonato de sódio (NaHCO_3), carbonato de cálcio (CaCO_3), hidróxido

de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) e hidróxido de magnésio ($\text{Mg}(\text{OH})_2$) ou associações. Porém, por alterar o pH gástrico e urinário, os antiácidos tem a capacidade de interagir com uma variedade de fármacos através de interações farmacocinéticas de dissolução e absorção, biodisponibilidade e eliminação renal. Alguns podem também quelar outras drogas presentes no trato gastrointestinal, formando complexos insolúveis que passam pelo TGI sem serem absorvidos. Além disso, dependendo do paciente, os efeitos associados ao uso de antiácidos minerais incluem constipação ou diarreia, sendo utilizados hoje em dia principalmente para o alívio rápido dos sintomas da úlcera péptica (YUAN *et al.*, 2006; BRUNTON *et al.*, 2006).

Antagonistas muscarínicos como a pirenzepina inibem a secreção ácida bem como diminuem a motilidade intestinal, contudo o uso clínico destas drogas é baixo devido aos efeitos parassimpáticos secundários como boca seca e constipação, além da disponibilidade de medicamentos anti-secretores mais eficazes (JAIN *et al.*, 2007).

Em seguida surgiram os antagonistas do receptor de histamina (H_2), que foram utilizados extensivamente para a supressão ácida por mais de 25 anos (JAIN *et al.*, 2007), sendo o mais conhecido e utilizado atualmente a ranitidina.

Os inibidores da bomba de prótons (IBPs) são pró-fármacos, necessitando ativação em ambiente ácido. Acumulam-se em canalículos secretores de ácido das células parietais, e são ativados por um processo catalisado por prótons que resulta na formação de uma sulfonamida tiofílica ou ácido sulfênico. Esta forma ativada reage por meio de ligação covalente com o grupo sulfidríla de cisteínas presentes no domínio extracelular da H^+, K^+ -ATPase, resultando em uma inativação irreversível da bomba. A secreção do ácido só se reinicia após a síntese e inserção de novas moléculas de H^+, K^+ -ATPase na membrana luminal (YUAN *et al.*, 2006; BRUNTON *et al.*, 2006). O tratamento com IBPs para as úlceras têm sido considerado o padrão ouro, com associações com antiácidos ou antagonistas H_2 . Entretanto, no tratamento da DRGE tem sido observada falência

terapêutica em alguns pacientes tratados com IBPs, constituindo um grande desafio clínico o tratamento dessa doença (PICHE e GALMICHE, 2005).

Outros agentes terapêuticos utilizados no tratamento da DRGE são os procinéticos, como os antagonistas dopaminérgicos metoclopramida e domperidona, ou agonistas serotoninérgicos como a cisaprida. Esses medicamentos facilitam a motilidade gastrointestinal, agindo diretamente na musculatura lisa ou no plexo mioentérico e, portanto, são utilizados no tratamento da DRGE no intuito de aumentar a motilidade esofágica e gástrica. O uso desses procinéticos é muitas vezes associado ao IBPs. Entretanto, estudos já demonstraram que fármacos procinéticos são relativamente ineficazes na DRGE, ou estão associados a efeitos colaterais, como os riscos cardíacos relacionados ao uso de cisaprida (FINIZIA *et al.*, 2002).

Atualmente, quase duas décadas após a introdução do primeiro IBP, começam a ser relatados inconvenientes envolvendo o uso desses fármacos, tornando-se de extrema importância a contínua investigação e desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de doenças envolvendo as doenças ácido-pépticas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da fração diclorometano de *Piper tuberculatum* sobre o trato gastrointestinal e as possíveis vias envolvidas no mecanismo de ação gastroprotetor utilizando técnicas farmacológicas.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito gastroprotetor da fração diclorometano da *Piper tuberculatum* e da piplartina contra lesões agudas induzidas por etanol em ratas;
- Verificar a ação da fração diclorometano da *Piper tuberculatum* e da piplartina sobre a quantidade de muco e da glutathione da região glandular gástrica após a indução de lesões agudas por etanol;
- Investigar o efeito cicatrizante da fração diclorometano da *Piper tuberculatum* contra lesões crônicas induzidas por ácido acético em ratas;
- Avaliar a atividade da fração diclorometano da *Piper tuberculatum* sobre os níveis de mucina e o processo de regeneração tecidual em estômagos com lesões crônicas induzidas por ácido acético;
- Avaliar o efeito da fração diclorometano da *Piper tuberculatum* e da piplartina sobre a atividade da enzima H^+,K^+ -ATPase *in vitro*;
- Analisar o efeito da fração diclorometano da *Piper tuberculatum* e da piplartina sobre a secreção ácida gástrica basal e estimulada em ratas;
- Verificar o efeito protetor da fração diclorometano de *Piper tuberculatum* contra lesões esofágicas induzidas pelo refluxo gastroesofágico;

- Avaliar a atividade da fração diclorometano de *Piper tuberculatum* sobre a migração de neutrófilos na mucosa esofágica de ratas submetidas ao refluxo gastroesofágico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material botânico

3.1.1 Preparação do extrato e da fração diclorometano

Os frutos de *Piper tuberculatum* foram coletados em setembro de 2005. A identificação botânica das plantas foi realizada pelo Dr. José Gomes do herbário do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), onde uma exsicata encontra-se depositada sob o número 211724.

Os frutos devidamente secos e triturados (1,1 kg) foram extraídos com etanol (3 l x 3) à temperatura ambiente. O solvente foi destilado sob pressão reduzida e forneceu 36 g de uma massa de coloração marrom. Parte deste material (30 g) foi adsorvida em sílica gel (90 g) e a mistura, foi colocada em uma coluna cromatográfica e eluída com diclorometano (CH_2Cl_2) fornecendo 21,3% de fração (6,4 g) (RODRIGUES *et al.*, 2009).

3.1.1.1 Isolamento da piplartina

Uma parte da fração diclorometano (5,1 g), que denominaremos DCM, foi submetida a uma coluna cromatográfica e eluída com misturas de hexano e acetato de etila com crescentes polaridades, resultando em 15 frações. A fração de número 9 foi novamente submetida à coluna e eluída com os mesmos gradientes de hexano e acetato de etila em crescentes polaridades, resultando em 7,1 mg de um sólido branco amorfo, com um rendimento calculado de 14%, identificado como composto 1.

Através de análise espectral por ressonância magnética nuclear (RMN) ^1H e ^{13}C uni e bidimensional, espectrometria de massa e comparação com dados da literatura de ^1H e

^{13}C foi possível elucidar a estrutura do composto 1 obtido como sendo: piplartina {*N*-(3,4,5-trimethoxy cinnamoil-D3-piridina-2-um)} (Figura 3). A caracterização química do extrato de *Piper tuberculatum* foi realizada sob a responsabilidade do professor Valdir Facundo do departamento de Química da Universidade Federal de Rondônia em 2008.

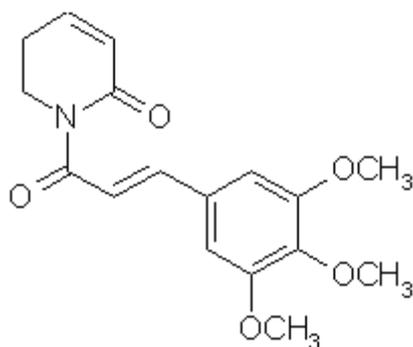


Figura 3. Estrutura química da piplartina (RODRIGUES *et al.*, 2009; FACUNDO *et al.*, 2008).

3.1.1.2 Diluição da DCM e da piplartina

A DCM foi diluída com água destilada com a adição de Tween 80[®] (0,5%) e a piplartina foi diluída com água destilada.

3.2 Animais

Foram utilizadas ratas (*Ratus norvegicus*), variedade Wistar albino, adultas, pesando de 180 a 220 g fornecidas pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Foi utilizado o estômago de coelho (*Oryctolagus cuniculuc*) albino, com peso variando entre 1 a 2 kg, oriundo do Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR).

Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura e

iluminação, tendo livre acesso a água e ração. Os protocolos experimentais que utilizaram animais estão de acordo com as normas internacionais e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, sob os números 446 e 500.

3.3 Lesão gástrica aguda induzida por etanol

As lesões gástricas induzidas por etanol foram realizadas segundo metodologia descrita por Robert e colaboradores (1979). Os animais foram mantidos em jejum de 24 horas com acesso livre a água, separados em diferentes grupos de 8 animais cada, tratados com veículo (água + Tween 80 0,5% - 0,1 ml/100 g, *v.o.*, ou solução salina 0.9% *i.p.*), omeprazol (40 mg/kg, *v.o.*), ou diferentes doses da DCM (10, 30 ou 100 mg/kg para o tratamento *v.o.* e 1, 3 e 10 mg/kg quando o tratamento foi realizado *i.p.*). Sessenta minutos após o tratamento *v.o.*, e trinta minutos após o tratamento *i.p.* foi administrado etanol PA (0,5 ml/200 g – *v.o.*), um agente necrotizante para indução da lesão gástrica.

A eficácia do composto isolado da fração, a piplartina, em realizar gastroproteção também foi avaliada através da lesão induzida por etanol. Os animais foram pré-tratados pela via oral com piplartina (4,5 mg/kg, dose calculada de acordo com o DE₅₀ da DCM nesse modelo), omeprazol (40 mg/kg) ou veículo (água), e como descrito anteriormente, após sessenta minutos receberam etanol PA (0,5 ml/200 g – *v.o.*).

Uma hora após a administração do agente necrotizante, os animais foram sacrificados, os estômagos removidos, abertos pela curvatura menor e estendidos para a análise das lesões gástricas. A avaliação dessas lesões foi realizada através do programa ImageTool® Versão 3.0, no qual foi possível mensurar a área total lesionada de cada estômago em mm². Os resultados foram expressos em mm² de área lesionada.

3.3.1 Verificação do ciclo estral

O ciclo reprodutivo das ratas é chamado de ciclo estral e é dividido em fases como: proestro, estro, metaestro (ou diestro I) e diestro (ou diestro II) (LONG e EVANS, 1922; FREEMAN, 1988).

Em estudos sobre o sistema reprodutivo, bem como estudos sobre a influência do ciclo estral em funções não reprodutivas (RODRIGUEZ *et al.*, 1995; MARCONDES, 1995), a citologia oncótica vaginal é utilizada para a determinação das fases do ciclo estral (LONG e EVANS, 1922; HOAR e HICKMAN, 1975). Com o objetivo de verificar se o ciclo estral apresenta ou não influência na formação de úlcera nas ratas realizou-se um lavado vaginal nos animais submetidos à lesão com etanol PA. Imediatamente antes do sacrifício dos animais, procedeu-se à lavagem vaginal com 50 µl de solução salina. O material obtido do lavado foi colocado em uma lâmina para microscopia e analisado em microscópio óptico, observando-se os tipos de células presentes e classificando as fases do ciclo estral em: proestro, estro, diestro, e metaestro (LONG e EVANS, 1922; FREEMAN, 1988).

3.4 Quantificação do muco gástrico

Após a avaliação das lesões induzidas por etanol, as regiões do fundo e do antro do estômago foram descartadas e a parte glandular (corpo) foi dividida em duas partes. Uma parte da mucosa gástrica glandular foi pesada e incubada em 4 ml de solução de Alcian Blue 0,1% preparada em uma solução de sacarose 0,16 mM e acetato de sódio 50 mM (pH 5), onde permaneceu corando por 2 horas em temperatura ambiente. O excesso de Alcian Blue foi removido através de duas lavagens sucessivas com sacarose 250 mM, a primeira por 15 minutos e a segunda durante 45 minutos. O corante então complexado

com o muco da parede glandular foi extraído com 4 ml de cloreto de magnésio 500 mM, agitando-se intermitentemente cada segmento por 1 minuto a cada 30 minutos durante 2 horas. Após esse período, 3 ml da solução sobrenadante azul foi misturada com 3 ml de éter dietílico e agitados vigorosamente até a formação de uma emulsão. Essa emulsão foi centrifugada por 10 minutos a 3.600 rpm para a separação da fase aquosa, descartando-se o resíduo. A partir da fase aquosa obtida procedeu-se a leitura espectrofotométrica em 598 nm. A metodologia descrita seguiu os protocolos de determinação de muco descritos por Corne e colaboradores (1974). Sendo assim, a quantidade de Alcian Blue ligado ao muco foi determinada por interpolação em uma curva padrão de Alcian Blue (6,25–100 µg), e os resultados foram expressos em µg de Alcian Blue/g de tecido.

3.5 Úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético

As lesões gástricas induzidas por ácido acético foram realizadas de acordo com a metodologia originalmente proposta por Okabe e colaboradores (1971), com poucas modificações (WALACE *et al.*, 2007).

Para indução das lesões gástricas crônicas por ácido acético, as ratas foram mantidas em jejum de 18 horas com acesso livre a água, separadas em grupos de 6 animais. Os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina e cetamina (10 e 5 mg/kg, *i.p.*, respectivamente). Após a anestesia os animais tiveram a parede abdominal aberta e o estômago exposto. A figura 4 ilustra a metodologia de indução de úlceras, na qual um cilindro de vidro de 6 mm de diâmetro foi aplicado sobre a serosa do estômago, e nesse cilindro injetados 500 µl de ácido acético 80%. Após 1 minuto, o ácido foi aspirado e substituído por salina para limpeza do local. Em seguida a solução salina foi aspirada, o local seco com o auxílio de uma haste com algodão, o cilindro retirado, o estômago

recolocado no interior da região abdominal, e em seguida a parede abdominal foi suturada.

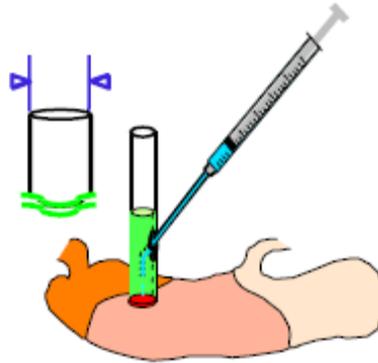


Figura 4. Metodologia de indução de úlcera por ácido acético (adaptado de KONTUREK *et al.*, 2008).

Após a recuperação da anestesia, os animais retornaram ao biotério e permaneceram sob regime de restrição alimentar com consumo livre de água até o dia seguinte. Então, seguiu-se uma dieta alimentar, na qual a ração foi oferecida aos animais duas vezes ao dia, por uma hora em cada período do dia (manhã e tarde) durante o período de tratamento, o qual teve duração de 7 dias. O tratamento consistiu na administração *v.o.* de veículo (água + Tween 80 0,5% - 0,1 ml/100 g), omeprazol (40 mg/kg) ou diferentes doses da DCM da *Piper tuberculatum* (10, 30 e 100 mg/kg).

Os tratamentos tiveram início no segundo dia após a cirurgia, sendo realizados 30 minutos após o consumo da ração. Ao final dos tratamentos, os animais foram sacrificados, o estômago removido e esticado para posterior análise da úlcera. A avaliação da área ulcerada foi feita pela medida do comprimento x altura (mm²), utilizando-se para isso uma régua graduada.

3.6 Quantificação de grupos sulfidrílicos não protéicos

Metade da região glandular do estômago submetida à lesão por etanol e metade da úlcera induzida por ácido acético foram utilizadas para verificar o efeito protetor da fração DCM na mucosa gástrica pela determinação dos níveis de glutathione (GSH). Os níveis de GSH na mucosa gástrica foram determinados pelo método de Sedlak e Lindsay (1968). As regiões de lesão foram pesadas e homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 6,5). Em 50 μ l deste homogenato foram adicionados 40 μ l de ácido tricloroacético (ATC) 12,5% e os tubos foram agitados em um agitador de tubos (Vortex) e centrifugados por 15 minutos a 3.000 rpm. Posteriormente, alíquotas de 10 μ l do sobrenadante foram adicionadas a 290 μ l de tampão TRIS 0,4 M (pH 8,9) em placa de 96 poços. A reação foi iniciada com a adição de 5 μ l de DTNB (5,5'-ditiobis 2-ácido nitrobenzólico) 1 mM, 5 minutos antes da leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 415 nm. Os procedimentos foram realizados a 4 °C e os valores individuais interpolados em uma curva padrão de GSH (0,375–3 μ g), com os valores expressos em μ g de GSH/g de tecido.

3.7 Avaliação dos níveis de mucina

O ensaio histoquímico para mucina foi realizado de acordo com o descrito por Mowry e Winkler (1956), e foi realizado a fim de verificar as alterações no conteúdo de muco da mucosa gástrica após a úlcera induzida por ácido acético. As lâminas contendo os cortes histológicos foram desparafinizadas, re-hidratadas, oxidadas em ácido periódico 0,5% por 5 minutos e lavados em água destilada. Em seguida, os cortes foram corados com reativo de Schiff por 20 minutos, e posteriormente lavados em água sulfurosa (3 vezes, 2 minutos cada) e em água corrente por 10 minutos. Finalmente, as lâminas

contendo os cortes foram contracoradas com hematoxilina por 20 segundos, desidratadas e montadas com Bálsamo do Canadá. A quantificação foi realizada de acordo com a intensidade de reação, seguindo uma pontuação de 0 a 3 (modificado de LEKNES, 2009).

3.8 Avaliação da proliferação celular

A análise imunohistoquímica da expressão de PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) foi realizada para avaliar os efeitos da DCM sobre a proliferação celular da mucosa gástrica ulcerada, e foi feita de acordo com a técnica descrita por Athar e colaboradores (2004). A área ulcerada foi emblocada em parafina e os cortes foram feitos em micrótomo. Os cortes foram desparafinizados, re-hidratados e tratados com peróxido de hidrogênio em metanol 3% por 10 minutos. Em seguida, foram incubados com tampão fosfato (PBS) com 1% de albumina sérica bovina (BSA) por 30 min para redução de marcação não específica e permeabilização celular. Procedeu-se a incubação com anticorpo primário anti-PCNA em temperatura ambiente em câmara úmida por 2 horas. Depois de lavados com PBS/BSA 1%, os cortes foram incubados com anticorpo secundário conjugado a peroxidase em temperatura ambiente em câmara úmida por 1 hora. Os sítios de ligação para peroxidase foram identificados por coloração utilizando-se para isso o cromógeno diaminobenzidina (Kit de substrato DAB) com o qual foram incubadas por 15 minutos, sendo o excesso de cromógeno removido em água corrente. Finalmente, as lâminas contendo os cortes foram contracoradas com hematoxilina por 5 minutos, desidratadas, clareadas com xilol e montadas com Bálsamo do Canadá. Para avaliação da marcação dos cortes foi utilizada lente ocular graduada e a marcação foi avaliada em áreas representativas com aumento de 400 x. A quantificação de células com marcação positiva para PCNA foi realizado em 4 cortes histológicos distintos de cada grupo, observando-se 5 campos diferentes em cada corte. Os resultados foram expressos

com o número de células marcadas positivamente utilizando o programa ImageJ[®] versão 1.41 (Instituto Nacional de Saúde, EUA).

3.9 Avaliação da secreção ácida gástrica

Esse protocolo experimental foi realizado de acordo com a técnica de Ligadura do Píloro, descrita por Shay e colaboradores em 1945. Os animais foram mantidos em jejum de 18 horas com acesso livre a água. As ratas foram anestesiadas e, através de uma incisão de cerca de 2 cm no abdômen, foi localizado o estômago para a ligadura do esfíncter pilórico com auxílio de um fio de sutura. Por via intraduodenal, os animais receberam veículo (água + Tween 80 0,5% - 0,1 ml/100 g), DCM (10, 30 ou 100 mg/kg), piplartina (4,5 ou 15 mg/kg) ou por via oral, omeprazol (40 mg/kg) 1 hora antes do início da cirurgia. A seguir, a parede abdominal foi suturada e 4 h após a cirurgia, os animais foram sacrificados sob anestesia e seus estômagos removidos após pinçamento do esôfago para evitar perda do conteúdo ácido secretado. O estômago foi lavado com água, seco com uma gaze e aberto ao longo da curvatura menor. A mucosa foi lavada com 3 ml de água destilada, recolhendo-se o suco gástrico e o conteúdo proveniente da lavagem da mucosa em tubos de ensaio para a centrifugação (1.500 rpm, durante 20 minutos). Após a centrifugação, o volume gástrico (ml) foi quantificado em proveta e a acidez total (mEq[H⁺]/ml) foi quantificada por titulação simples com NaOH 0,1 N, utilizando fenolftaleína 2% como indicador ácido-base (DOMER, 1971).

Para avaliar qual o mecanismo de ação envolvido na redução da secreção ácida gástrica, a secreção foi estimulada com betanecol, um agonista de receptores muscarínicos; histamina, um agonista dos receptores histaminérgicos; e pentagastrina, um agonista do receptor CCK-2.

Aleatoriamente, os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais: betanecol + salina; betanecol + atropina; betanecol + DCM; pentagastrina + salina; pentagastrina + DCM; histamina + salina, histamina + ranitidina; histamina + DCM; betanecol + piplartina; histamina + piplartina; pentagastrina + piplartina. No momento da ligadura, os animais receberam um dos seguintes tratamentos: veículo (água + Tween 80 0,5% - 0,1 ml/100g, *i.d.*), DCM (100 mg/kg, *i.d.*), piplartina (15 mg/kg, *i.d.*), ranitidina (50 mg/kg, *i.d.*) ou atropina (1 mg/kg, *s.c.*). A seguir, a parede abdominal foi suturada e após 1 hora da ligadura os animais receberam os secretagogos por via subcutânea: histamina (20 mg/kg), pentagastrina (0,4 mg/kg) ou betanecol (2,5 mg/kg). Quatro horas após a cirurgia, os animais foram sacrificados e procedeu-se a quantificação do volume e acidez do conteúdo estomacal conforme descrito anteriormente.

3.10 Avaliação da atividade da H⁺,K⁺-ATPase *in vitro*

Para o isolamento e verificação da atividade da H⁺,K⁺-ATPase foi utilizado o estômago de coelho (*Oryctolagus cuniculus*) albino. O animal foi sacrificado através de concussão cerebral. O estômago foi removido, colocado imediatamente em banho de gelo, aberto pela curvatura maior, lavado e teve descartadas as regiões do antro e do fundo. Realizou-se a separação da mucosa da região glandular e procedeu-se o isolamento dos microsomas gástricos através da homogeneização do tecido da mucosa em tampão de homogeneização: Tris.HCl 50 mM (pH 7,4) contendo sacarose 250 mM, MgCl₂ 10 mM, KCl 5 mM, EDTA 1 mM e coquetel de inibidores de protease 0,01%, utilizando-se 5 volumes de tampão/g de tecido. O homogenato foi centrifugado a 5.000 rpm durante 20 minutos, o precipitado descartado e o sobrenadante novamente centrifugado a 30.000 rpm durante 1 hora. Todos os procedimentos foram realizados à temperatura de 4 °C .

A próxima fase foi a de purificação da H^+,K^+ -ATPase e foi realizada por centrifugação em gradiente descontínuo de sacarose. O precipitado obtido da centrifugação de 30.000 rpm contendo as vesículas com H^+,K^+ -ATPase foi ressuspendido em 3 ml de sacarose 250 mM, cuidadosamente transferido para um tubo com sacarose 30% e centrifugado novamente a 30.000 rpm por 1 hora. Duas bandas pequenas e um precipitado foram obtidos. As membranas sedimentadas na superfície da solução de sacarose 30% foram coletadas obtendo-se, assim, os microsossomos purificados contendo a enzima H^+,K^+ -ATPase gástrica (KUBO *et al.*, 1995). O material enzimático foi, então, congelado e guardado a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ até ser utilizado.

O conteúdo de proteína presente na amostra foi determinado em placa de 96 poços com o reagente de Bradford, utilizando uma curva padrão de albumina (0,0625-1 mg/ml).

Na fase de caracterização da H^+,K^+ -ATPase, realizou-se o bloqueio específico da bomba de prótons pelo inibidor omeprazol (345 $\mu\text{g/ml}$), e a fim de descartar a presença de Na^+K^+ -ATPase utilizou-se a ouabaína (728 $\mu\text{g/ml}$) (inibidor específico de Na^+,K^+ -ATPase).

Finalmente a atividade ATPásica foi determinada mediante quantificação do fósforo inorgânico (P_i) liberado da hidrólise de ATP exógeno, na presença de K^+ , pela enzima. A reação foi iniciada pela adição de 37,5 μg de proteína enzimática a 500 μl de tampão Tris.HCl (pH 7,4) contendo cloreto de magnésio 2,5 mM, cloreto de potássio 20 mM e ATP 1 mM, na ausência e na presença das drogas a serem testadas. A reação foi encerrada após 20 minutos de incubação a $37\text{ }^\circ\text{C}$ pela adição de 50 μl de ATC 50% e esfriamento rápido em banho de gelo (MURAKAMI *et al.*, 1992). O fosfato inorgânico produzido foi determinado através da adição às amostras de 1,5 ml da solução reagente contendo de água (4,7 ml), ácido sulfúrico 10 N (0,7 ml), molibdato de amônio 2,4% (0,6 ml) e ácido ascórbico 10% (3 ml). As amostras foram incubadas por 20 minutos em banho-maria a $37\text{ }^\circ\text{C}$ e a leitura da placa realizada em espectrofotômetro a 820 nm. O reagente foi preparado no momento do uso (FISKE e SUBBAROW, 1925; TERSARIOL, 1989). A

atividade enzimática foi calculada usando o coeficiente de extinção do Pi ($\epsilon = 11.000/M/cm$). Para se verificar a ação da DCM sobre o funcionamento da enzima foram utilizadas as concentrações de 100, 300 e 1000 $\mu\text{g/ml}$, e a piplartina nas concentrações de 1, 3, 10, 30 e 100 $\mu\text{g/ml}$.

3.11 Esofagite induzida por refluxo gastroesofágico

Os animais foram mantidos em jejum de 18 horas com acesso livre a água. As ratas foram anestesiadas com xilazina e cetamina (10 e 5 mg/kg, *i.p.*, respectivamente), e colocadas em decúbito dorsal. Após assepsia da região abdominal com solução de iodo-povidine e tricotomia dos pêlos foi feita uma incisão de cerca de 2 cm no abdômen, o estômago foi localizado e procedeu-se as ligaduras para indução de esofagite. Foram realizadas duas ligaduras utilizando fio de sutura, sendo uma na região pilórica e outra na região de transição entre o fundo e o corpo do estômago, para impedir a saída do conteúdo gástrico secretado pelo duodeno e permitir o acesso do conteúdo gástrico ao esôfago, respectivamente (NAKAMURA *et al.*, 1982). Imediatamente após o procedimento cirúrgico, os animais receberam por via intraduodenal o veículo (água + Tween 80 0,5%, 0,1 ml/100 g) ou três doses da DCM (30, 100 e 300 mg/kg). A seguir, a parede abdominal foi suturada e os animais foram colocados em caixas para a recuperação da cirurgia. O tratamento com omeprazol (40 mg/kg, *v.o.*) foi realizado uma hora antes da cirurgia. Seis horas depois, os animais foram sacrificados e os esôfagos retirados. A área total das lesões desenvolvidas pela esofagite foi analisada e classificada de acordo com a seguinte escala proposta por Okabe *et al.* (1995), com poucas modificações:

- 1- sem lesões visíveis
- 2- poucas lesões
- 3- área total da lesão $\leq 30 \text{ mm}^2$

4 - área total da lesão $\geq 30 \text{ mm}^2$

5 – perfuração

3.12 Determinação dos níveis da mieloperoxidase

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada primariamente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e comumente usada como um marcador do conteúdo tecidual de leucócitos polimorfonucleares que migram para o local do estímulo inflamatório. O princípio do método baseia-se na liberação de MPO para o tecido lesado. A determinação dos níveis de MPO foi realizada de acordo com a técnica descrita por Hillegass e colaboradores (1990).

Após a análise da lesão, os esôfagos foram isolados, pesados e homogeneizados em 0,6 ml de tampão fosfato 200 mM pH 6,5. O homogenato foi centrifugado por 20 minutos a 3.000 rpm para determinação dos níveis enzimáticos da MPO.

O precipitado obtido foi ressuspenso com 1 ml de tampão fosfato de potássio 80 mM na presença de 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). Após a homogeneização as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Em placas de 96 poços foram adicionados em triplicada 30 μl do sobrenadante, acrescido de 220 μl de uma solução contendo: 100 μl de tampão fosfato 80 mM, 85 μL de tampão fosfato 22 mM e 15 μl de H_2O_2 0,017%. A reação foi iniciada com a adição de 20 μl de tetrametilbenzidina (TMB). A amostra foi então incubada por 3 minutos a 37 °C e a reação interrompida pela adição de 30 μL de acetato de sódio 1,46 M (pH = 3,0). Os níveis enzimáticos foram determinados em espectrofotômetro a 620 nm. Os resultados foram expressos como unidade de densidade óptica (D.O.)/mg de proteína.

3.13 Expressão dos dados e análise estatística

Os dados estão representados como as médias \pm erro padrão das médias. As diferenças entre as médias foram determinadas por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni, ou teste não paramétrico de Kruskal Wallis seguido pelo teste de Duns. As análises foram realizadas utilizando o Programa para *Windows*, *GraphPad Prism* versão 5.0 (*GraphPad Software*, San Diego, EUA). Um valor de P menor que 0,05 foi considerado significativo.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito da DCM sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol PA em ratas

A administração de etanol PA pela via oral produziu lesões gástricas que comprometeram $101,9 \pm 11,3 \text{ mm}^2$ da mucosa gástrica. O pré-tratamento dos animais com DCM nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, pela via oral, 1 hora antes da administração do etanol reduziu o aparecimento de lesões na mucosa gástrica de maneira dose-dependente em 35, 67 e 88%, respectivamente, com uma DE_{50} calculada de 29 mg/kg (Figura 5 A).

De maneira similar, a administração intraperitoneal de doses menores de DCM, correspondente a 1, 3 e 10 mg/kg também promoveu a redução das lesões gástricas induzidas por etanol para $58,9 \pm 9,9$; $38,8 \pm 11,4$ e $31,9 \pm 5,8 \text{ mm}^2$ respectivamente (grupo controle com $109,4 \pm 12,5 \text{ mm}^2$ de área de lesão) (Figura 5 B). O tratamento com omeprazol (40 mg/kg, v.o.), utilizado como controle positivo do teste, reduziu significativamente a área de incidência de lesão induzida pelo etanol (Figuras 5 A e 5B).

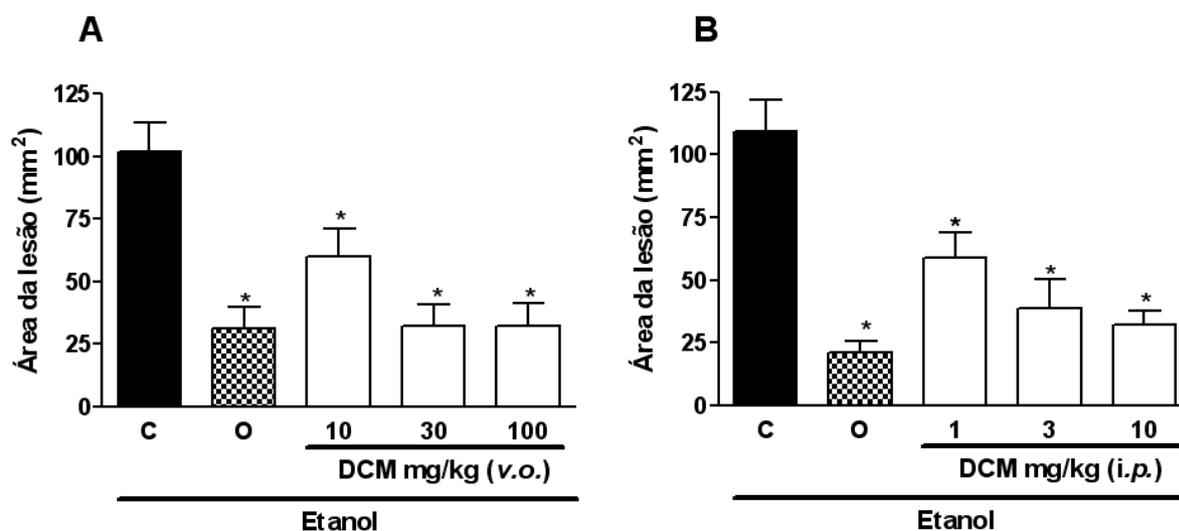


Figura 5. Efeito da DCM administrada oralmente (A, 60 min antes) ou intraperitonealmente (B, 30 min antes) sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol em ratas. Os animais receberam veículo (C: água + Tween 80 0,5% - 0,1 ml /100 g, *v.o.*), omeprazol (O: 40 mg/kg, *v.o.*) ou DCM (10, 30 e 100 mg/kg, *v.o.* ou 1, 3 e 10 mg/kg, *i.p.*) antes da administração do etanol PA (0,5 ml/200 g, *v.o.*). Cada coluna representa a média \pm EPM da área gástrica lesionada (n= 8 animais por grupo). Asteriscos denotam $*P<0,05$ quando comparado com o grupo controle (C) (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

Na figura 6, é possível observar pela avaliação macroscópica da mucosa gástrica que a administração oral de etanol PA induziu lesões gástricas hemorrágicas na mucosa gástrica dos animais controle (Figura 6, A). Contudo, houve uma redução na área da lesão em animais tratados com omeprazol (40 mg/kg; Figura 6, B) e com DCM 100 mg/kg, *v.o.* (Figura 6, C), de acordo com o resultado apresentado na Figura 5 A.

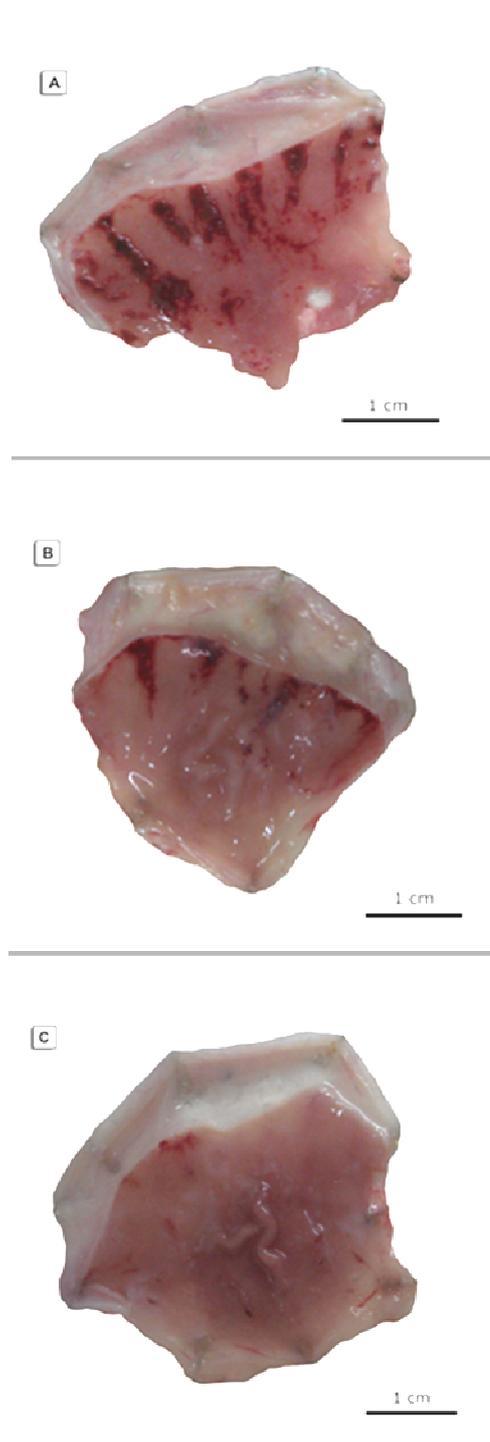


Figura 6. Análise macroscópica de lesões agudas gástricas induzidas pela administração oral de etanol PA. Os animais foram pré-tratados pela via oral com veículo (água + Tween 80 0,5% - 0,1 ml/100 g; A), omeprazol (40 mg/kg; B) ou DCM (100 mg/kg; C). Escala de 1 cm.

4.1.1 Relação entre o ciclo estral e a indução de lesões gástricas agudas induzidas por etanol PA em ratas

A administração de etanol PA pela via oral produziu lesões gástricas em animais que se encontravam em diferentes fases do ciclo estral. A análise do lavado vaginal dos animais do grupo controle, ou seja, tratados com veículo, mostrou que os animais que estavam nas fases de estro, proestro, diestro e metaestro apresentaram áreas de lesão semelhantes, correspondentes a $36,4 \pm 5,3$; $22,8 \pm 4,5$; $20,8 \pm 1,8$ e $19,3 \pm 3,7\%$ respectivamente. Embora a proporção da área ulcerada em animais na fase de estro seja maior do que a observada nas demais fases, não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 7).

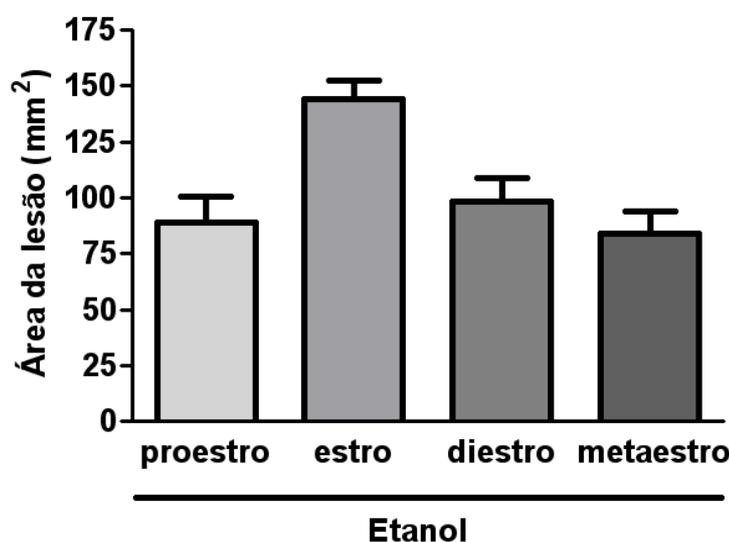


Figura 7. Relação entre as fases do ciclo estral e a indução de lesões gástricas por etanol PA em animais do grupo controle (tratados com veículo). Cada coluna representa a média \pm EPM da área gástrica lesionada ($n=5$ animais por grupo) (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.2 Efeito da DCM sobre a quantidade de muco gástrico e de GSH após as lesões gástricas agudas induzidas por etanol

A administração de etanol reduziu os níveis de muco da mucosa gástrica em 47% nos animais tratados apenas com veículo, quando comparados à mucosa de animais naive ($108,9 \pm 8,7 \mu\text{g}$ de Alcian Blue/g de tecido) (Figura 8 A). O tratamento com omeprazol (40 mg/kg, *v.o.*) preveniu o decréscimo nos níveis de muco em 35% quando comparado com animais tratados apenas com veículo ($58,1 \pm 4,2 \mu\text{g}$ de Alcian Blue/g de tecido). A administração *v.o.* de DCM nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg foi capaz de restabelecer o conteúdo de muco para $79,6 \pm 3,6$; $80,6 \pm 4,1$ e $87,5 \pm 4,1 \mu\text{g}$ de Alcian Blue/g de tecido, respectivamente.

Quando administrada por via *i.p.*, apenas a dose de 1 mg/kg da DCM foi capaz de restabelecer os níveis de muco $77,5 \pm 6,9 \mu\text{g}$ de Alcian Blue/g de tecido, reduzidos em 39% no grupo controle. O grupo tratado com omeprazol (40 mg/kg, *v.o.*) apresentou um aumento na quantidade de muco de 56% em relação ao grupo tratado apenas com o veículo (Figura 8 B).

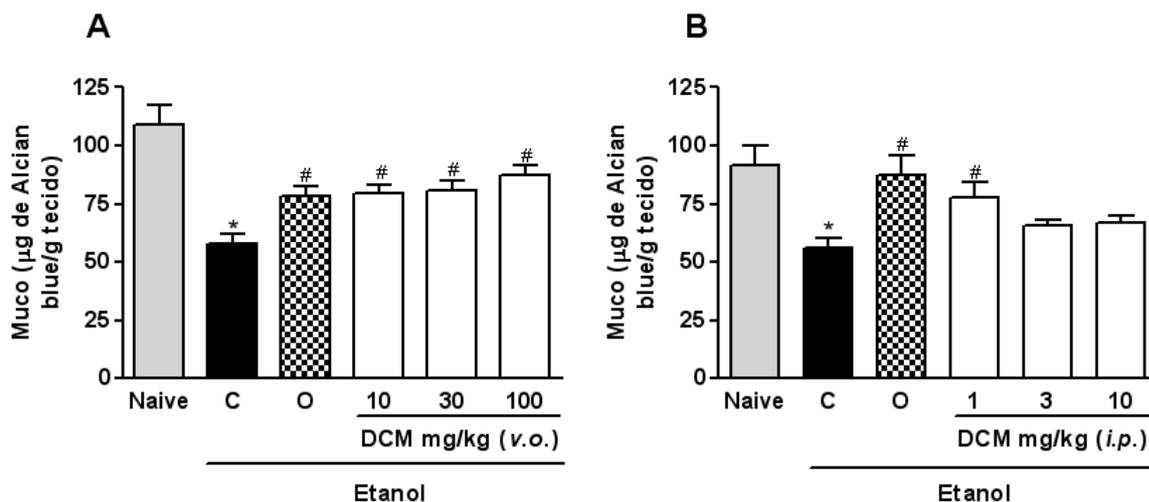


Figura 8: Efeito da DCM, administrada oralmente (A, 60 min antes) ou intraperitonealmente (B, 30 min antes), sobre a quantidade de muco da mucosa gástrica após as lesões gástricas agudas induzidas por etanol. Os animais receberam veículo (C: água + Tween 80 0,5% - 0,1 ml/100 g, *v.o.*), omeprazol (O: 40 mg/kg, *v.o.*) ou DCM (10, 30 e 100 mg/kg, *v.o.* ou 1, 3 e 10 mg/kg, *i.p.*) antes da administração do etanol (0,5 ml/200 g, *v.o.*). Cada coluna representa a média \pm EPM de μg de Alcian blue/ g de tecido ($n= 8$ animais por grupo). Asteriscos denotam $*P<0,05$ quando comparado com o grupo naive e $\#P<0,05$ quando comparado com o grupo controle (C) (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

A exposição da mucosa gástrica ao etanol PA diminuiu os níveis de GSH em aproximadamente 49% quando comparado a uma mucosa gástrica não lesada (Naive: $504,9 \pm 27,6$ μg de GSH/g de tecido). O tratamento dos animais com DCM nas doses de 30 e 100 mg/kg, *v.o.*, preveniu parcialmente a redução nos níveis de GSH induzida pelo etanol em 84 e 72%, respectivamente, quando comparados com o grupo controle ($253,0 \pm 13,7$ μg de GSH/g de tecido) (Figura 9 A). O tratamento dos animais com DCM nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg pela via intraperitoneal também preveniu a diminuição dos níveis de GSH em 74, 82 e 82%, respectivamente, quando comparados com o grupo controle

($300,7 \pm 18,5 \mu\text{g}$ de GSH/g de tecido) (Figura 9 B). Da mesma forma, o tratamento com omeprazol (40 mg/kg, *v.o.*) também restaurou os níveis de GSH ($441,2 \pm 17,8 \mu\text{g}$ de GSH/g de tecido).

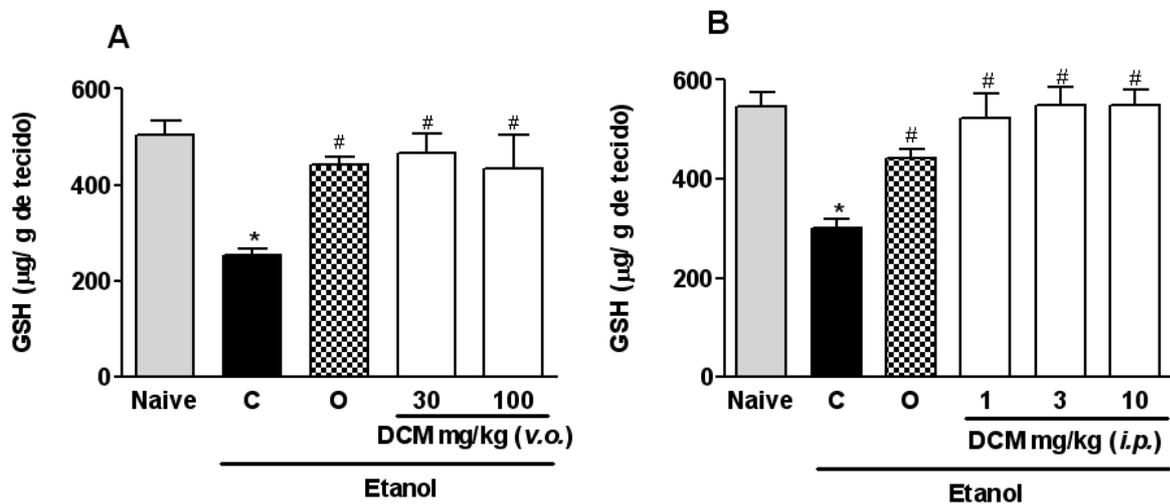


Figura 9: Efeito da DCM, administrada pela via oral (painel A) ou intraperitoneal (painel B), sobre a quantidade de GSH da mucosa gástrica após as lesões gástricas agudas induzidas por etanol. Os animais receberam veículo (C: água + Tween 80 0,5% - 0,1 ml/100 g, *v.o.*), omeprazol (O: 40 mg/kg, *v.o.*) ou DCM (30 e 100 mg/kg, *v.o.* ou 1, 3 e 10 mg/kg, *i.p.*) antes da administração do etanol. Cada coluna representa a média \pm EPM de μg de GSH/g de tecido ($n= 8$ animais por grupo). Asteriscos denotam $*P<0,05$ quando comparado com o grupo naive e $\#P<0,05$ quando comparado com o grupo controle (C) (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.3 Efeito da DCM sobre as úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético 80% em ratas

A administração oral da DCM de *Piper tuberculatum* nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, duas vezes ao dia, do segundo ao oitavo dia após a indução de úlceras por ácido acético 80%, promoveu uma cicatrização de 51, 34 e 41%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle tratado com veículo ($125,6 \pm 5,4 \text{ mm}^2$). O controle positivo deste ensaio, omeprazol (40 mg/kg, administrado duas vezes ao dia durante sete dias) também reduziu as úlceras gástricas induzidas por ácido acético em 50% (Figura 10).

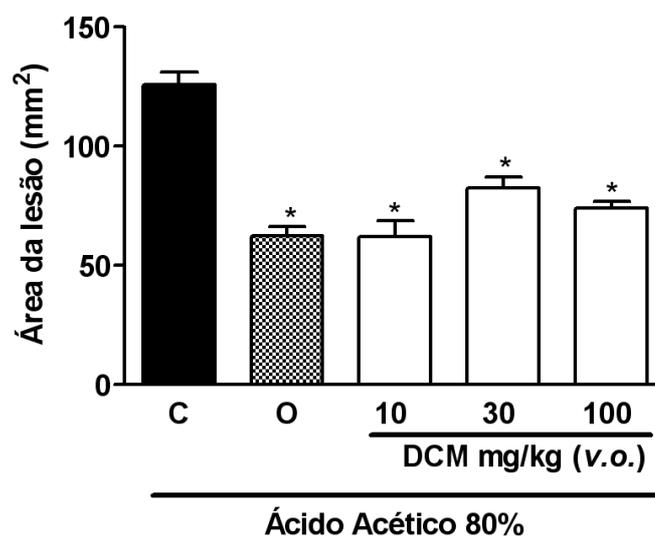


Figura 10. Efeito da DCM sobre as úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético 80% em ratas. Os animais receberam veículo (C: água + Tween 80 0,5% - 0,1 ml/100 g, v.o.), omeprazol (O: 40 mg/kg, v.o.) ou DCM (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.) durante 7 dias, a partir do 2º dia após a indução da lesão gástrica. Cada coluna representa a média \pm EPM da área gástrica lesionada (mm^2) ($n= 6$ animais por grupo). Asteriscos denotam $*P<0,05$ quando comparado com o grupo controle (C) (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

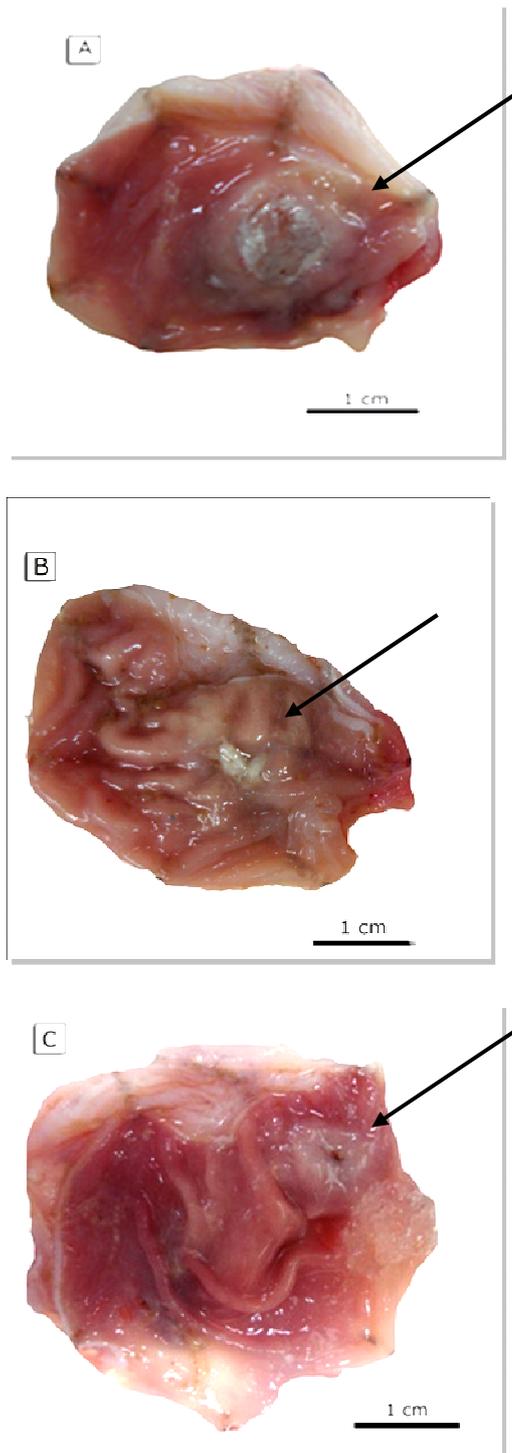


Figura 11. Análise macroscópica das úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético em ratas. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (água + Tween 80 0,5% - 0,1 ml/100 g; A), omeprazol (40 mg/kg; B) ou DCM (100 mg/kg; C) durante 7 dias, a partir do 2º dia após a indução da lesão gástrica. Escala de 1 cm.

Conforme demonstrado na figura 11, a observação macroscópica da mucosa gástrica dos animais com úlceras crônicas revelou uma redução na área da lesão dos animais tratados com omeprazol (40 mg/kg; Figura 11, B) e com DCM (100 mg/kg, Figura 11, C), quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 11, A).

4.4 Efeito da DCM sobre a proliferação celular de úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético 80%

A figura 12 mostra a imunohistoquímica utilizada para avaliar a expressão de PCNA nas células da mucosa gástrica ulcerada, a qual é caracterizada pela coloração marrom, indicativo de células em proliferação. No grupo controle, a imunorreatividade foi quantificada em $27,0 \pm 3,7$ células e nos grupos omeprazol e DCM 100 mg/kg observou-se um aumento significativo na marcação desse antígeno de 243 e 230%, respectivamente (Figura 13).

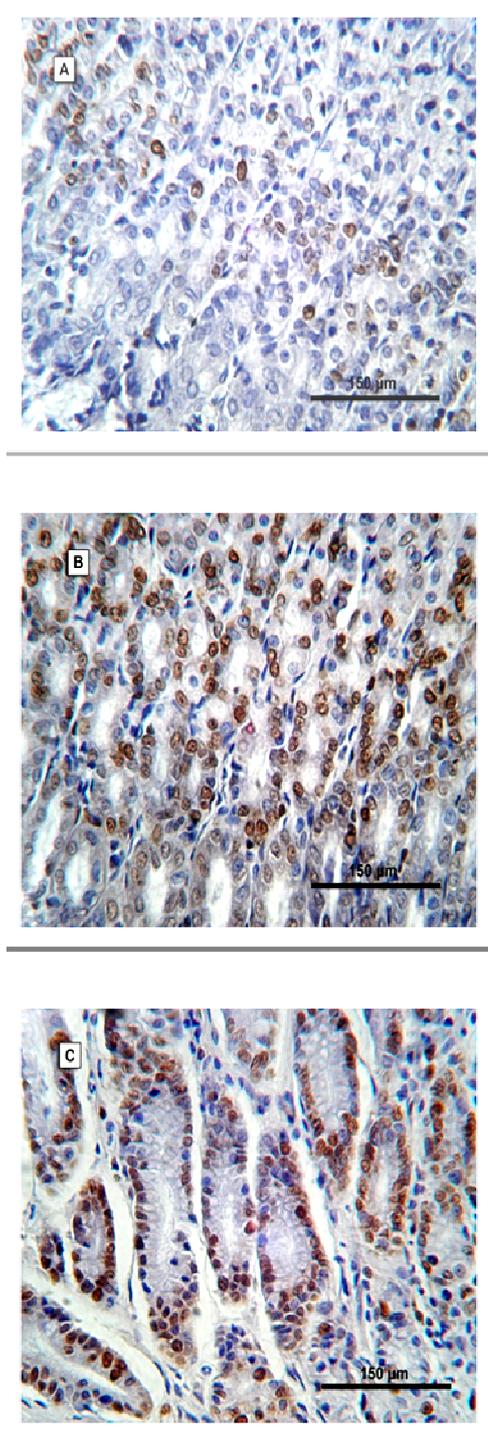


Figura 12. Imunorreatividade para PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) em cortes histológicos de úlceras crônicas induzidas por ácido acético 80%. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (água + Tween 80 0,5% - 0,1 ml/100 g; A), omeprazol (40 mg/kg; B) ou DCM (100 mg/kg; C) durante 7 dias, a partir do 2º dia após a indução da lesão gástrica. Imagens representativas da secção de estômagos de 4 animais, observando-se 5 campos diferentes em cada corte (aumento de 400x, escala 150 µm).

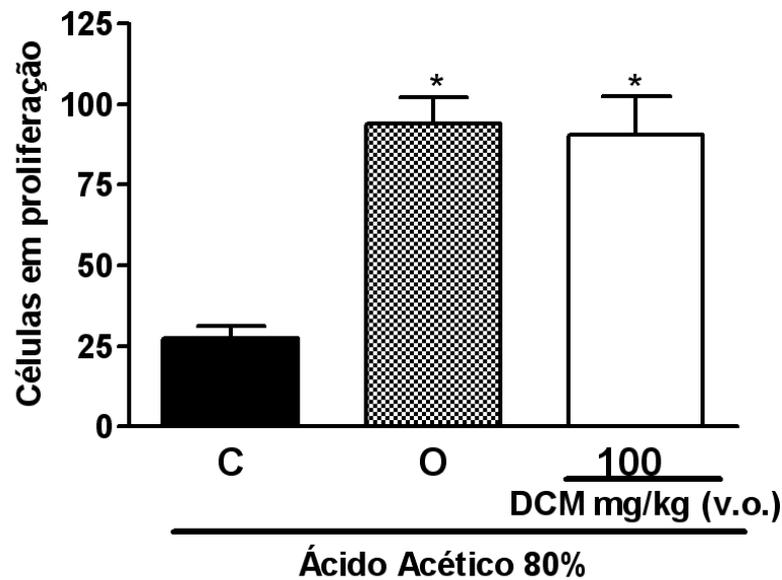


Figura 13. Quantificação da imunorreatividade para PCNA em úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético 80%. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (água + Tween 80 0,5% - 0,1 ml/100 g) omeprazol (O: 40 mg/kg) ou DCM (100 mg/kg) durante 7 dias, a partir do 2º dia após a indução da lesão gástrica. Cada coluna representa a média \pm EPM do número de células em proliferação (n= média de 5 campos). Asteriscos denotam $*P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (C) (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni). Dados referentes ao observado nos campos representados na Figura 12.

4.5 Efeito da DCM sobre os níveis de mucina de úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético 80%

A avaliação de mucina nos estômagos submetidos a úlcera crônica induzida por ácido acético 80% demonstrou uma baixa quantidade das glicoproteínas que compõe o muco nos animais tratados apenas com veículo (Figura 14, A). Os animais que receberam

omeprazol e DCM 100 mg/kg tiveram um aumento na marcação para glicoproteínas correspondentes a mucina, o que mais uma vez indica um importante fator protetor gástrico da fração DCM de *Piper tuberculatum* (Figura 14, B e C, respectivamente e Tabela 1).

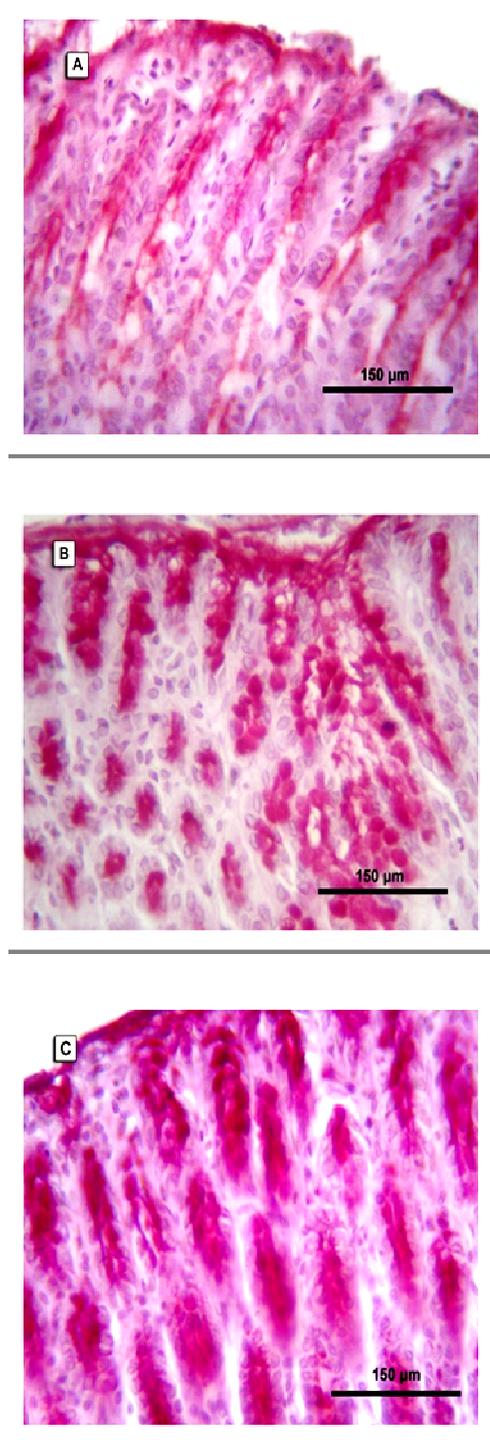


Figura 14. Avaliação dos níveis de mucina pelo método de coloração PAS de úlceras

crônicas induzida por ácido acético 80%. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (água + Tween 80 0,5% - 0,1 ml/100 g A), omeprazol (40 mg/kg; B) ou DCM (100 mg/kg; C) durante 7 dias, a partir do 2º dia após a indução da lesão gástrica. Imagens representativas da secção de estômagos de 4 animais, observando-se 5 campos diferentes em cada corte (aumento de 400x, escala 150 µm).

Tabela 1. Quantificação dos níveis de mucina de úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético 80% em ratas.

Grupo	PAS
Controle Lesado	0 – 1
Omeprazol 40 mg/kg	2 *
DCM 100 mg/kg	3 *

Os resultados são expressos em uma escala para demonstração da intensidade da reação, sendo: 3 – intenso; 2 – moderado; 1 – fraco e 0 – ausente. Asteriscos denotam *P<0,05 quando comparado com o grupo controle (C) (teste não paramétrico de Kruskal Wallis seguido pelo teste de Duns).

4.6 Efeito da DCM sobre a quantidade de GSH de úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético 80%

A exposição da mucosa gástrica ao ácido acético 80% diminuiu os níveis de GSH em aproximadamente 58% quando comparado a uma mucosa de um animal naive (557,9

$\pm 41,9 \mu\text{g}$ de GSH/g de tecido). O tratamento com DCM nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg (v.o.), 2 vezes ao dia durante 7 dias, restabeleceu os níveis de GSH em 64, 60 e 50% respectivamente, quando comparados com o grupo controle tratado com veículo. O tratamento com omeprazol também restaurou os níveis de GSH em 58% quando comparado aos níveis observados no grupo controle lesado ($232,5 \pm 12,1 \mu\text{g}$ de GSH/g de tecido) (Figura 15).

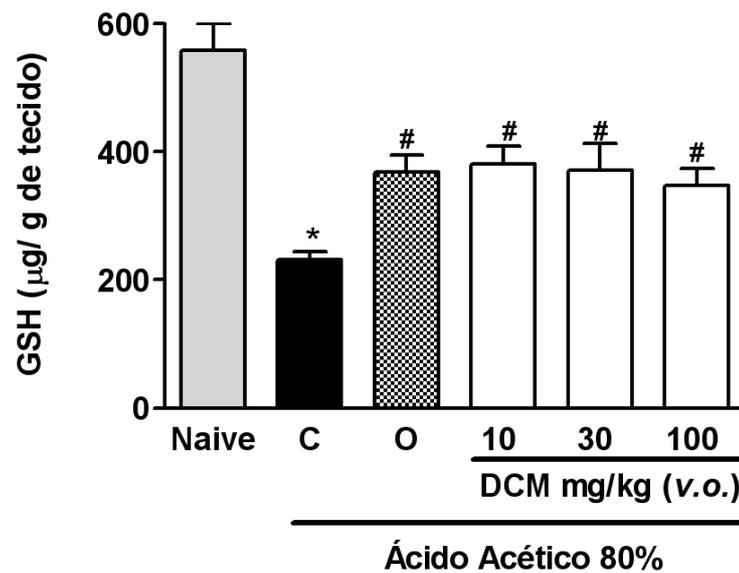


Figura 15: Efeito da DCM sobre a quantidade de GSH de úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético 80%. Os animais receberam veículo (C: água + Tween 80 0,5%, 0,1 ml/100 g, v.o.), omeprazol (O: 40 mg/kg, v.o.) ou DCM (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.) durante 7 dias, a partir do 2º dia após a indução da lesão gástrica. Cada coluna representa a média \pm EPM de μg de GSH/g de tecido ($n= 6$ animais por grupo). Asteriscos denotam $*P<0,05$ quando comparado com o grupo naive, e $\#P<0,05$ quando comparado com o grupo controle (C) (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.7 Efeito da DCM sobre a atividade da H^+, K^+ -ATPase *in vitro*

A porcentagem de inibição da atividade da H^+,K^+ -ATPase foi avaliada considerando o grupo controle como 100% de atividade. O omeprazol (345 $\mu\text{g/ml}$) inibiu a atividade da enzima em 97%, enquanto que a DCM, apenas nas maiores concentrações, correspondentes a 300 e 1000 $\mu\text{g/ml}$ inibiu a atividade da enzima em 43 e 55%, respectivamente (Figura 16).

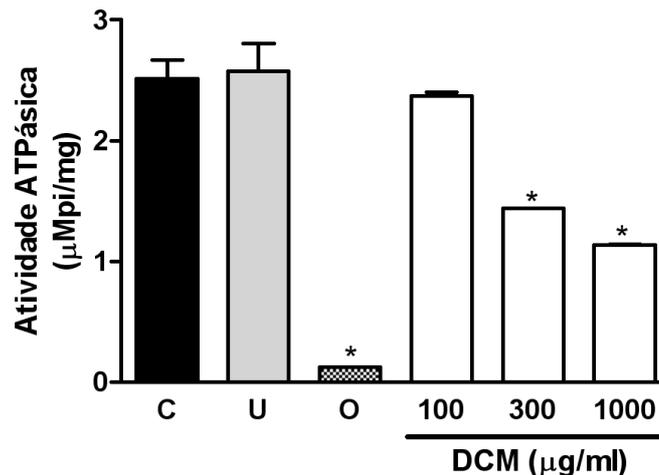


Figura 16: Efeito da DCM sobre a atividade da enzima H^+,K^+ -ATPase *in vitro*. Cada coluna representa a média \pm EPM da atividade da enzima. Asteriscos denotam $*P < 0,05$ quando comparado com o grupo Controle (C). O: omeprazol 345 $\mu\text{g/ml}$; U: ouabaína 728 $\mu\text{g/ml}$. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.8 Efeito da DCM sobre a secreção ácida gástrica basal em ratas

A administração de omeprazol (40 mg/kg, *v.o*) e da DCM nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg pela via intraduodenal (*i.d*), após realização de ligadura pilórica, foi capaz de reduzir significativamente o volume do conteúdo gástrico secretado em 43, 30, 30 e 33% respectivamente, quando comparado aos animais do grupo controle tratados com veículo ($9,1 \pm 0,5$ ml) (Figura 17 A).

A acidez da secreção gástrica mensurada nos animais tratados com o veículo foi

de $0,068 \pm 0,007$ mEq[H⁺]/ml. A administração de omeprazol e DCM, apenas na dose de 100 mg/kg, reduziu a acidez o conteúdo secretado em 75 e 47%, respectivamente (Figura 17 B).

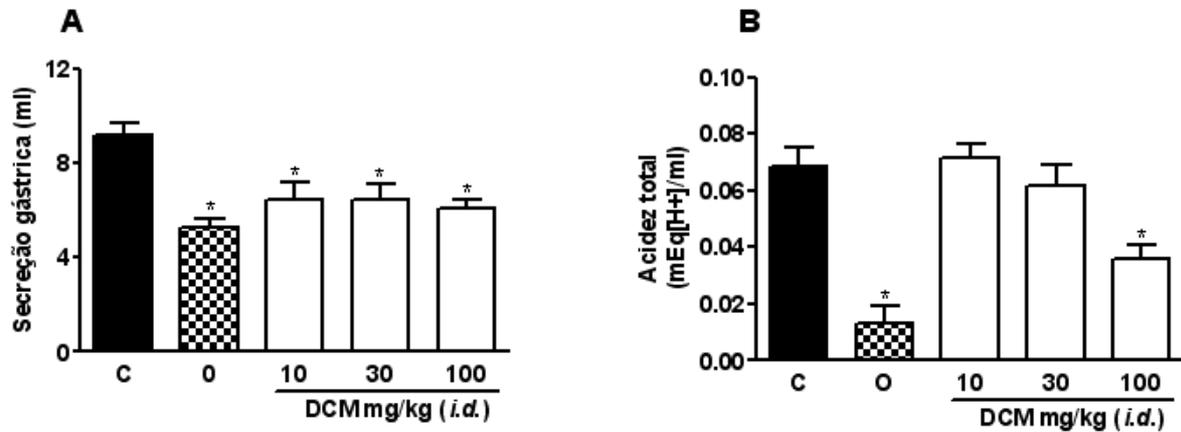


Figura 17. Efeito da DCM sobre o volume (A) e a acidez total (B) da secreção ácida gástrica basal em ratas. Os animais receberam veículo (C: água + Tween 80 0,5%, 0,1 ml/100 g, *i.d.*), omeprazol (O: 40 mg/kg, *v.o.*) ou DCM (10, 30 e 100 mg/kg, *i.d.*). Cada coluna representa a média \pm EPM (n= 8 animais por grupo). Asteriscos denotam *P<0,05 quando comparado com o grupo controle (C) (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.9 Efeito da DCM sobre a secreção ácida gástrica estimulada por betanecol, histamina e pentagastrina em ratas

A administração subcutânea dos secretagogos betanecol (agonista dos receptores muscarínicos, 2,5 mg/kg), histamina (agonista dos receptores histaminérgicos, 20 mg/kg) e pentagastrina (agonista dos receptores CCK-2, 0,4 mg/kg) aumentou o volume da secreção ácida gástrica basal de $9,8 \pm 0,6$ ml para $12,5 \pm 0,6$ ml, de $8,4 \pm 0,9$ ml para $11,7 \pm 0,9$ ml e de $8,3 \pm 0,5$ para $10,7 \pm 0,7$ ml, respectivamente. O pré-tratamento com atropina (antagonista dos receptores muscarínicos, 1 mg/kg, *s.c.*) e ranitidina (antagonista

dos receptores histaminérgicos H₂, 50 mg/kg, *i.d.*) impediram o aumento do volume do conteúdo gástrico estimulado por betanecol e histamina, respectivamente, alcançando valores de $4,8 \pm 0,5$ e $5,6 \pm 0,5$ ml, respectivamente.

A administração de DCM (100 mg/kg, *i.d.*) não foi capaz de impedir o aumento do volume de secreção ácida gástrica estimulada por betanecol ($12,5 \pm 0,6$ ml) e nem por histamina ($9,9 \pm 0,9$ ml) (Figuras 19 A e C). Contudo, quando da estimulação com pentagastrina, a administração de DCM 100 mg/kg (*i.d.*) foi capaz de impedir o aumento de secreção ácida gástrica em 50% (Figura 18 E).

Os secretagogos betanecol (2,5 mg/kg), histamina (20 mg/kg) e pentagastrina (0,4 mg/kg) foram capazes de aumentar a acidez da secreção gástrica basal em 26, 59 e 33% quando comparados com os animais tratados com veículo ($0,074 \pm 0,001$; $0,064 \pm 0,007$ e $0,067 \pm 0,004$ mEq[H⁺]/ml), respectivamente. O aumento da acidez do conteúdo gástrico estimulado por betanecol e por histamina foi impedido pela administração de atropina (1 mg/kg, *s.c.*) e de ranitidina (50 mg/kg, *i.d.*), alcançando valores de $0,036 \pm 0,006$ e $0,038 \pm 0,009$ mEq[H⁺]/ml, respectivamente. O tratamento com DCM (100 mg/kg, *i.d.*) também não foi capaz de diminuir a acidez da secreção gástrica estimulada por betanecol e por histamina, mas impediu o aumento da acidez gástrica estimulada pela pentagastrina ($0,047 \pm 0,007$ mEq[H⁺]/ml) (Figuras 18 B, D e F).

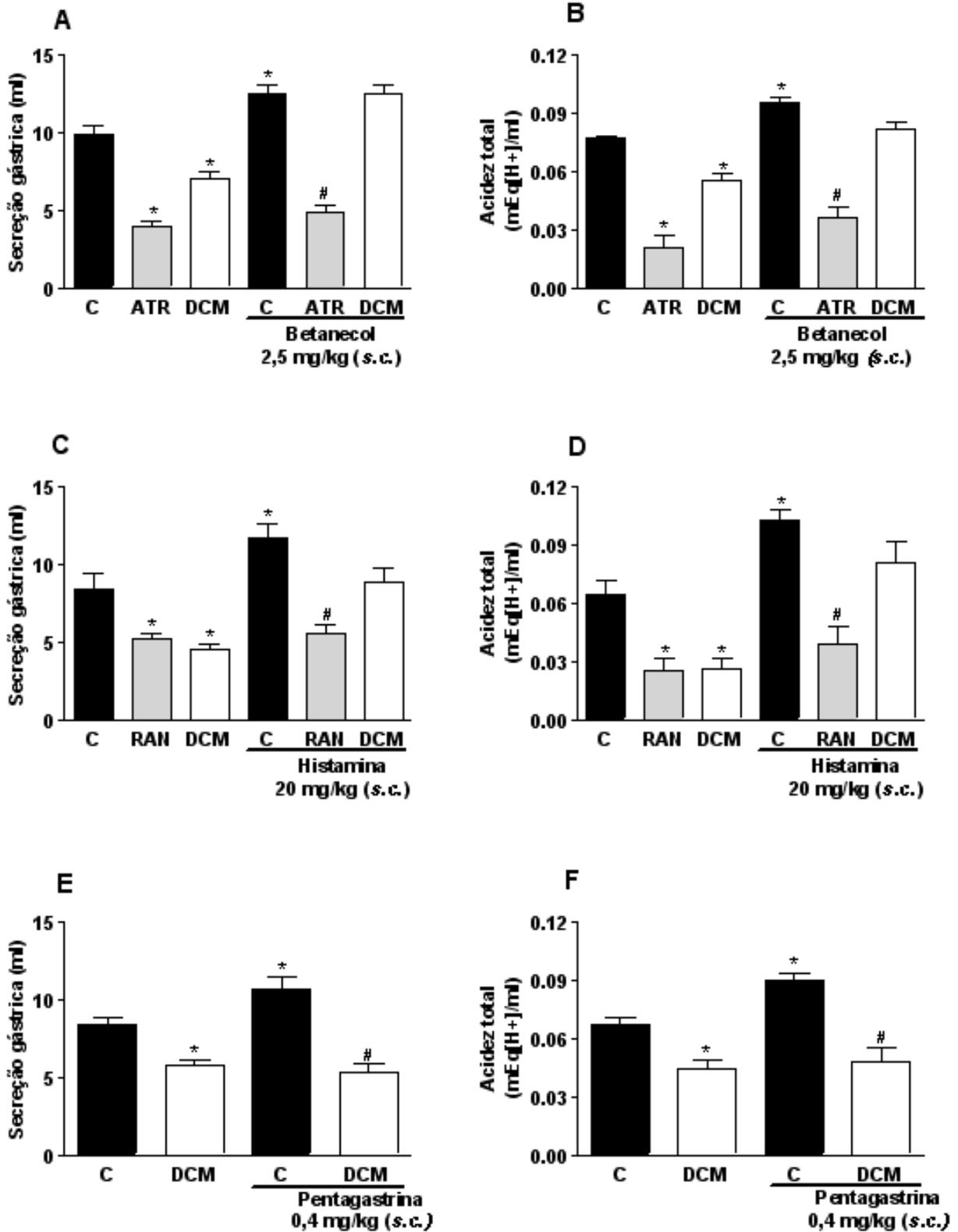


Figura 18. Efeito da DCM sobre o volume (A, C, E, respectivamente) e a acidez total (B, D, F, respectivamente) da secreção ácida gástrica estimulada por betanecol, histamina e

pentagastrina em ratas. Os animais receberam veículo (C: água + Tween 80 0,5% - 0,1 ml/100 g, *i.d.*), atropina (ATR: 1 mg/kg, *s.c.*), ranitidina (RAN: 50 mg/kg, *i.d.*) ou DCM (100 mg/kg, *i.d.*). Cada coluna representa a média \pm EPM (n= 8 animais por grupo). Asteriscos denotam *P<0,05 quando comparado com o grupo controle (C) e #P<0,05 quando comparado com o grupo controle estimulado (C) com betanecol (2,5 mg/kg), histamina (20 mg/kg) ou pentagastrina (0,4 mg/kg) (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.10 Efeito da DCM sobre a esofagite induzida por refluxo gastroesofágico em ratas

A ligadura da região pilórica e da região de transição entre o fundo e o corpo do estômago foi empregada como modelo para indução de refluxo gastroesofágico pelo contato do conteúdo gástrico com a mucosa do esôfago. A administração da DCM nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg pela via intraduodenal (*i.d.*), reduziu significativamente as lesões causadas pelo refluxo do conteúdo gástrico para o esôfago, assim como o tratamento com omeprazol (40 mg/kg, *v.o.*), utilizado como controle positivo para este teste (Figura 19). A avaliação das lesões foi realizada por escores, de acordo com a escala proposta por Okabe *et al.* (1995), com poucas modificações (Figura 20).

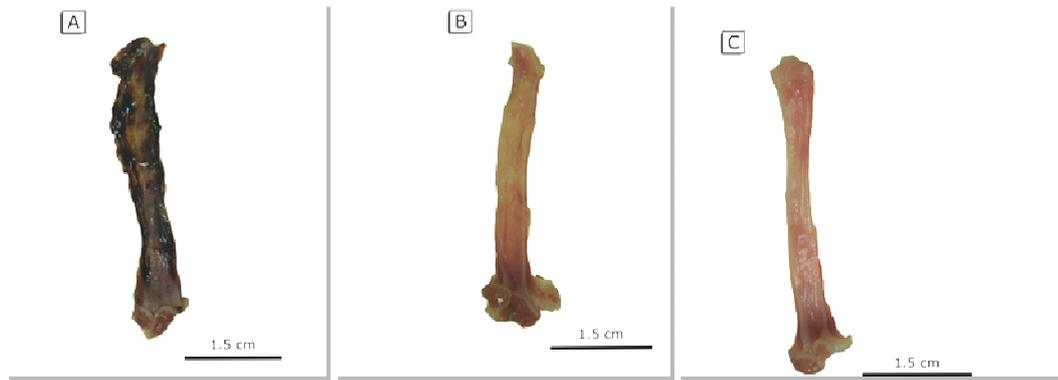


Figura 19. Análise macroscópica das lesões no esôfago induzidas por refluxo gastroesofágico. Os animais foram tratados pela via intraduodenal com veículo (água + Tween 80 0,5% - 0,1 ml/100 g; A), omeprazol (40 mg/kg; B) ou DCM (100 mg/kg; C).

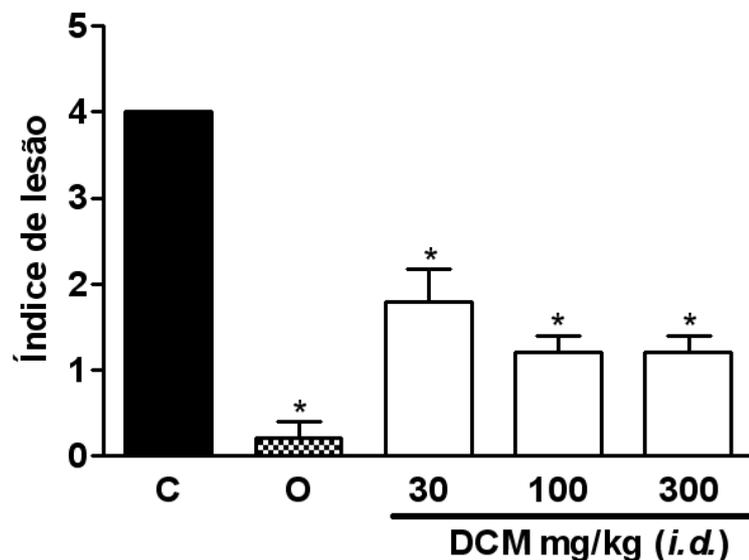


Figura 20. Efeito da DCM sobre a esofagite induzida por refluxo gastroesofágico em ratos. Os animais receberam veículo (C: água + Tween 80 0,5% - 0,1 ml/100 g, *i.d.*), Omeprazol (O: 40 mg/kg, *v.o.*) ou DCM (30, 100 ou 300 mg/kg, *i.d.*). Cada coluna representa a média \pm EPM do índice de lesão (n= 8 animais por grupo). Asteriscos denotam $*P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (C) (Teste não paramétrico de Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Duns). O escore da lesão seguiu a seguinte escala: 0 - sem lesões visíveis, 1 - poucas erosões, 2 - área total da lesão $\leq 30 \text{ mm}^2$, 3 - área total da lesão $\geq 30 \text{ mm}^2$, 4 - perfuração.

4.11 Efeito da DCM sobre os níveis da enzima mieloperoxidase na esofagite induzida por refluxo gastroesofágico

A migração de neutrófilos observada em esôfagos lesados foi determinada indiretamente pela atividade da MPO. A atividade da MPO foi aumentada significativamente em 171% em animais com lesões esofagianas induzidas pelo refluxo do conteúdo ácido gástrico, quando comparado aos níveis basais do grupo não lesado (Figura 21). O tratamento dos animais com DCM (100 e 300 mg/kg, *i.d.*) impediu significativamente o aumento da atividade da MPO em 76 e 69%, respectivamente. Os animais tratados com omeprazol apresentaram uma redução de 66% na atividade da MPO quando comparado com o grupo controle (Figura 21).

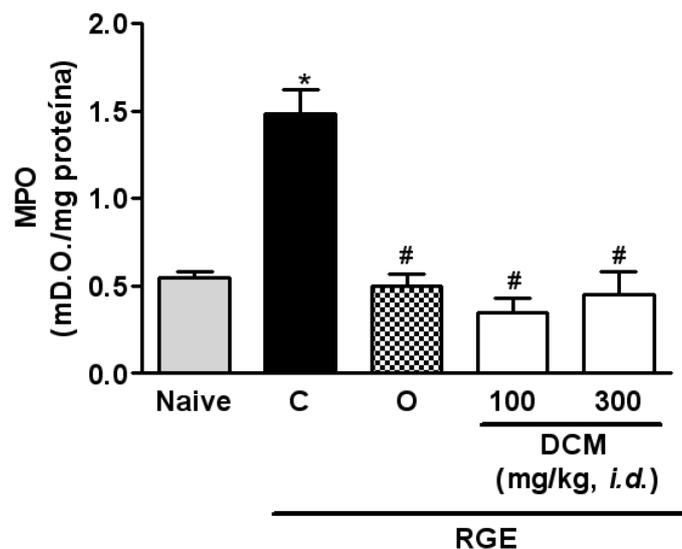


Figura 21. Efeito da DCM sobre os níveis de MPO na esofagite induzida por refluxo gastroesofágico. Os animais receberam veículo (C: água + Tween 80 0,5%, 0,1 ml/100 g, *i.d.*), omeprazol (O: 40 mg/kg, *v.o.*) ou DCM (100 e 300 mg/kg, *i.d.*). Cada coluna representa a média \pm EPM dos níveis de MPO ($n=6$ animais por grupo). Asteriscos denotam $*P<0,05$ quando comparado com o grupo naive, e $\#P<0,05$ quando comparado com o grupo controle (C) (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.12 Efeito da piplartina sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol PA e a quantidade de muco e de GSH

O tratamento oral com piplartina na dose de 4,5 mg/kg (equivalente à DE₅₀ da fração DCM) inibiu em 81% a incidência de úlceras gástricas induzidas pelo etanol. O controle positivo, omeprazol (40 mg/kg, *v.o.*) reduziu a lesão gástrica para $1,7 \pm 0,8\%$ de área de lesão quando comparado com o grupo controle ($17,9 \pm 2,1\%$) (Figura 22 A).

A administração de etanol PA reduziu os níveis de muco em 43% nos animais tratados com veículo quando comparado ao grupo não lesado ($82,8 \pm 9,7 \mu\text{g}$ de Alcian Blue/g de tecido) (Figura 22 B). O tratamento com omeprazol (40 mg/kg, *v.o.*) preveniu o decréscimo nos níveis de muco em 66% quando comparado com o grupo controle lesado, contudo, a administração de piplartina (4,5 mg/kg *v.o.*) não foi capaz de aumentar ou restabelecer o conteúdo de muco.

Conforme o esperado, a exposição da mucosa gástrica ao etanol PA diminuiu os níveis de GSH em aproximadamente 48%, quando comparado com a mucosa gástrica não lesada ($546,4 \pm 9,6 \mu\text{g}$ de GSH/g de tecido). O tratamento dos animais com piplartina (4,5 mg/kg, *v.o.*) preveniu a diminuição dos níveis de GSH em 75%, quando comparado aos níveis reduzidos encontrados nos animais do grupo lesado ($285,5 \pm 20,6 \mu\text{g}$ de GSH/g de tecido) (Figura 22 C). O tratamento com omeprazol (40 mg/kg, *v.o.*) também foi capaz de restaurar os níveis de GSH ($612,9 \pm 63,8 \mu\text{g}$ de GSH/g de tecido).

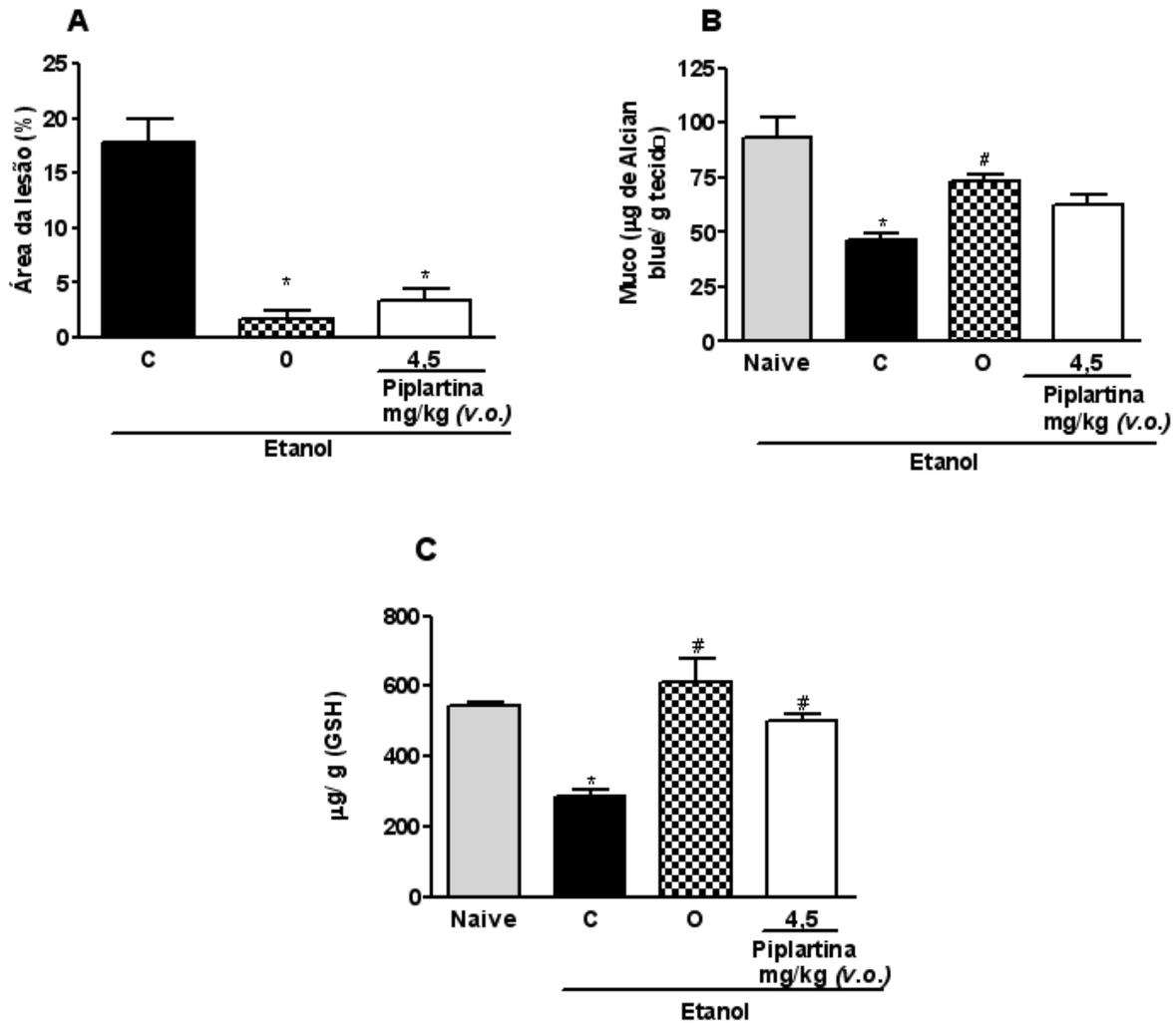


Figura 22. Efeito da piplartina sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol em ratas (A), sobre a quantidade de muco (B) e níveis de GSH (C) da mucosa gástrica glandular, dosados após a indução de lesão com etanol PA. Os animais receberam veículo (C: água - 0,1 ml/100 g, v.o.), omeprazol (O: 40 mg/kg, v.o.) ou piplartina (4,5 mg/kg, v.o.) antes da administração do etanol PA. Cada coluna representa a média \pm EPM da área gástrica lesionada (n= 8 animais por grupo). Asteriscos denotam $*P < 0,05$ quando comparado com o grupo naive e $^{\#}P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (C) (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.13 Efeito da piplartina sobre a atividade da H⁺,K⁺-ATPase *in vitro*

A piplartina nas concentrações de 1, 3, 10, 30 e 100 µg/ml inibiu a atividade da enzima H⁺,K⁺-ATPase *in vitro* em 12, 25, 81, 92 e 94%, respectivamente, sendo a inibição de maneira dependente da concentração, com uma CE₅₀ de 4,7 µg/ml. A inibição da enzima pelo omeprazol na concentração de 345 µg/ml foi de 97% (Figura 23).

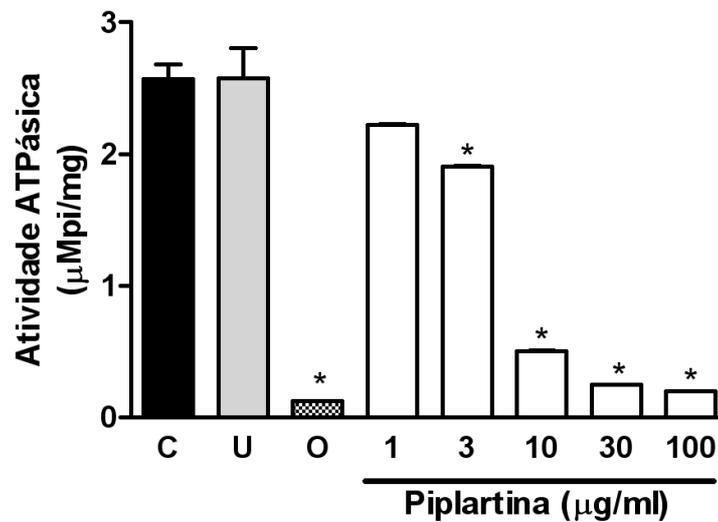


Figura 23. Efeito da piplartina sobre a atividade da enzima H⁺,K⁺-ATPase *in vitro*. Cada coluna representa a média ± EPM da atividade da enzima. Asteriscos denotam *P<0,05 quando comparado com o grupo Controle (C) (O: omeprazol 345 µg/ml; U: ouabaína 728 µg/ml) (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.14 Efeito da piplartina sobre a secreção ácida gástrica basal e estimulada por betanecol, histamina e pentagastrina em ratas

A administração de omeprazol (40 mg/kg, *v.o*) e da piplartina apenas na dose de 15 mg/kg pela via intraduodenal (*i.d*), após realização de ligadura pilórica, foi capaz de reduzir significativamente o volume do conteúdo gástrico em 43 e 45% respectivamente,

quando comparado aos animais do grupo controle tratados com veículo ($9,1 \pm 0,5$ ml) (Figura 24 A). A acidez da secreção gástrica mensurada nos animais do grupo veículo foi de $0,065 \pm 0,004$ mEq[H⁺]/ml, enquanto que a administração de omeprazol (40 mg/kg, *v.o.*) e piplartina (15 mg/kg, *i.d.*) reduziu a acidez o conteúdo secretado em 75 e 69%, respectivamente (Figura 24 B).

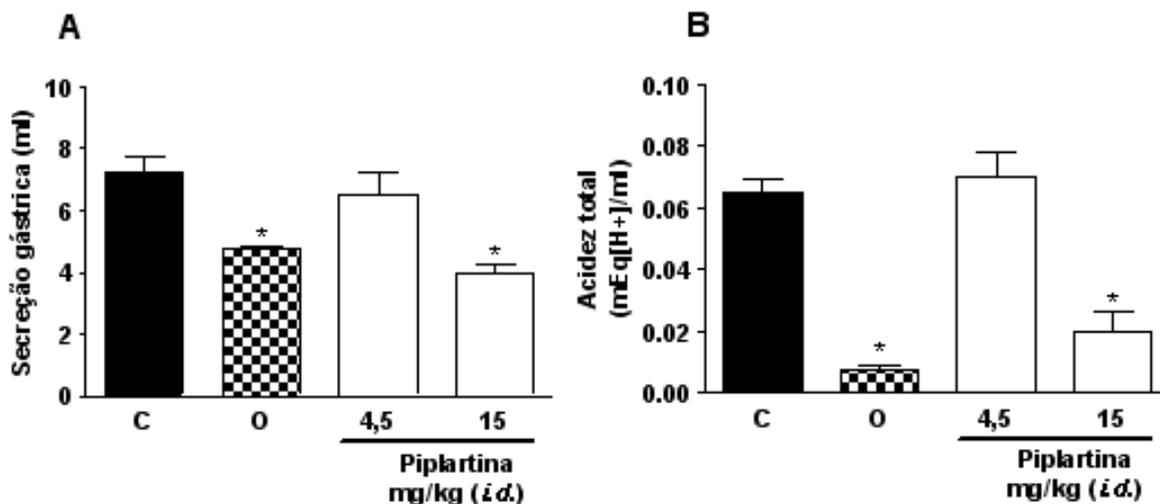


Figura 24. Efeito da piplartina sobre o volume (A) e a acidez total (B) da secreção ácida gástrica basal em ratas. Os animais receberam veículo (C: água - 0,1 ml/100 g, *i.d.*), omeprazol (O: 40 mg/kg, *v.o.*) ou piplartina (4,5 e 15 mg/kg, *i.d.*). Cada coluna representa a média \pm EPM da secreção ácida (A) e da acidez total (B) ($n= 6$ animais por grupo). Asteriscos denotam $*P<0,05$ quando comparado com o grupo controle (C) (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

A administração subcutânea dos secretagogos betanecol (agonista dos receptores muscarínicos, 2,5 mg/kg), histamina (agonista dos receptores histaminérgicos, 20 mg/kg) e pentagastrina (agonista dos receptores CCK-2, 0,4 mg/kg) aumentou o volume da

secreção ácida gástrica basal de $7,2 \pm 0,3$ para $9,3 \pm 0,6$ ml, de $7,7 \pm 0,3$ para $11,2 \pm 1,1$ ml e de $7,2 \pm 0,5$ para $10,6 \pm 0,5$ ml, respectivamente.

A administração de atropina (antagonista dos receptores muscarínicos, 1 mg/kg, *s.c.*) e ranitidina (antagonista dos receptores histaminérgicos H₂, 50 mg/kg, *i.d.*) impediram o aumento do volume do conteúdo gástrico estimulado por betanecol e histamina, respectivamente, alcançando valores de $4,2 \pm 0,4$ e $5,6 \pm 0,5$ ml, respectivamente. No entanto, a administração de piplartina (15 mg/kg, *i.d.*) não foi capaz de impedir o aumento do volume de secreção ácida gástrica estimulada por betanecol ($12,5 \pm 0,6$ ml) nem por histamina ($9,9 \pm 0,9$ ml) (Figura 25 A e C). Por outro lado, a administração subcutânea de pentagastrina (0,4 mg/kg) aumentou o volume da secreção ácida gástrica basal de $7,2 \pm 0,5$ para $10,6 \pm 0,5$ ml, e o tratamento com piplartina (15 mg/kg, *i.d.*) impediu o aumento do volume secretado em 45% (Figura 25 E).

Os secretagogos betanecol (2,5 mg/kg), histamina (20 mg/kg) e pentagastrina (0,4 mg/kg) foram capazes de aumentar a acidez da secreção gástrica basal em 44,5, 56,1 e 44,6% quando comparados com os animais tratados com veículo ($0,074 \pm 0,001$; $0,073 \pm 0,007$ e $0,065 \pm 0,004$ mEq[H⁺]/ml), respectivamente. O aumento da acidez do conteúdo gástrico foi impedido pela administração de piplartina (15 mg/kg, *i.d.*) em $0,050 \pm 0,005$ mEq[H⁺]/ml apenas frente a estimulação com pentagastrina (Figura 25 F).

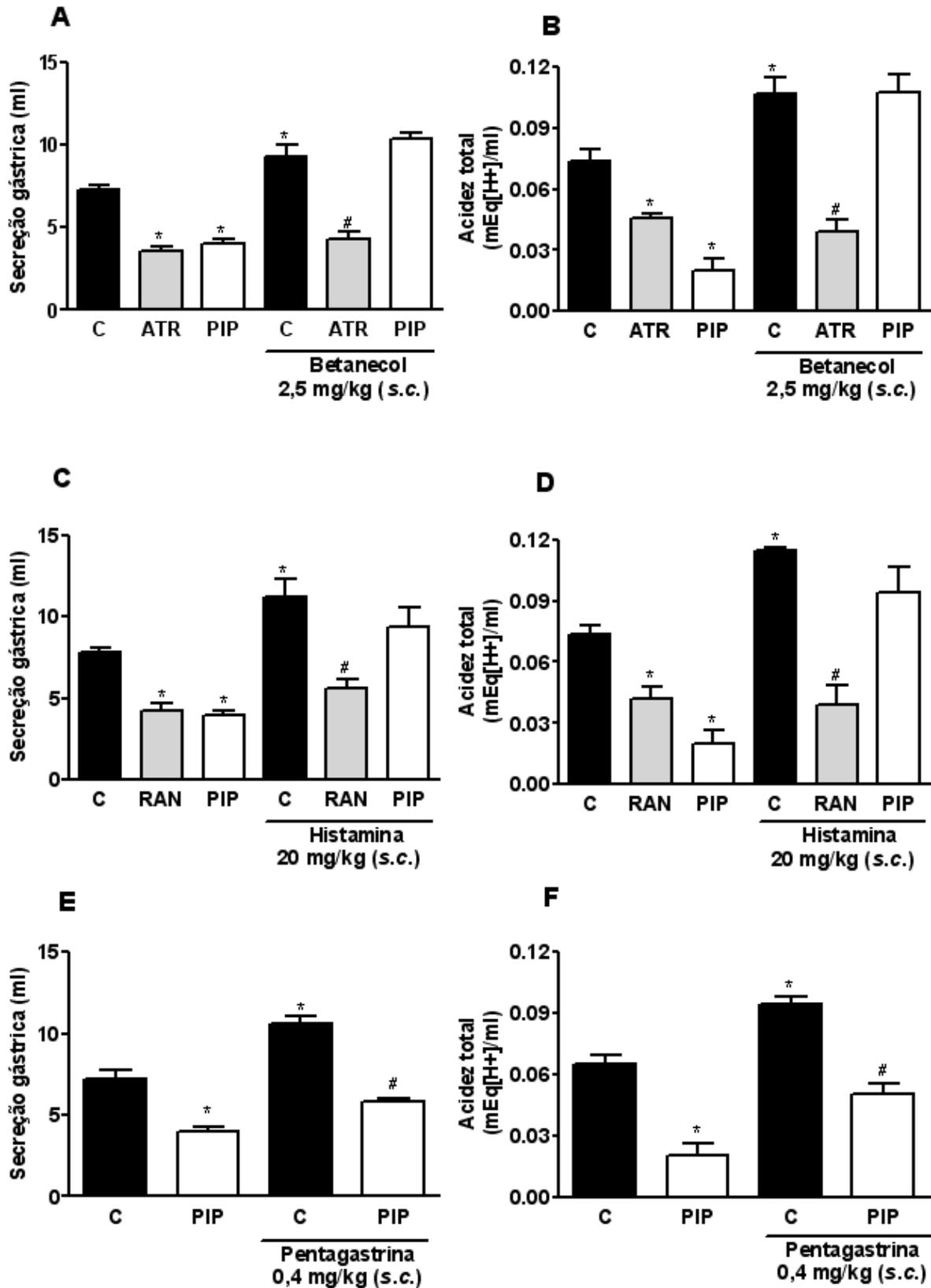


Figura 25. Efeito da piplartina sobre o volume (A, C, E) e a acidez total (B, D, F) da secreção ácida gástrica estimulada por betanecol, histamina e pentagastrina em ratos. Os

animais receberam veículo (C: água - 0,1 ml/100 g, *i.d.*), atropina (ATR: 1 mg/kg, *s.c.*), ranitidina (RAN: 50 mg/kg, *i.d.*) ou piplartina (15 mg/kg, *i.d.*). Cada coluna representa a média \pm EPM (n= 6 animais por grupo). Asteriscos denotam *P<0,05 quando comparado com o grupo controle (C) e #P<0,05 quando comparado com o grupo controle estimulado (C) com betanecol (2,5 mg/kg), histamina (20 mg/kg) ou pentagastrina (0,4 mg/kg) (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

5. DISCUSSÃO

Muitas plantas do gênero *Piper* têm sido utilizadas na alimentação e principalmente na medicina popular para o tratamento de diversas patologias. A *Piper tuberculatum* é uma planta medicinal utilizada popularmente como estimulante digestivo e na redução dos gases intestinais, além de sedativo, antídoto para veneno de cobra, analgésico para dor de dente (ARAÚJO-JÚNIOR *et al.*, 1999) e para o tratamento de problemas estomacais (CHAVES *et al.*, 2006). Devido a esta indicação popular, o objetivo desse trabalho foi de avaliar o efeito protetor gástrico e esofágico da fração diclorometano (DCM) dos frutos da *Piper tuberculatum* e do composto isolado piplartina, além de identificar os possíveis mecanismos de ação envolvidos no seu efeito gastroprotetor.

A mucosa gástrica está continuamente sujeita à ação de agentes agressores endógenos e exógenos, e para combater a esses agentes, a mucosa possui mecanismos de defesa que protegem o tecido contra danos e eventuais ulcerações (WHITTLE, 2003). Diferentes modelos animais para a indução de lesões gástricas já foram propostos, e entre esses modelos, a indução de lesão gástrica experimental pela administração de etanol foi utilizada para avaliação da ação gastroprotetora da DCM. Esse modelo permite avaliar se a fração estudada estimula e/ou mantém a resistência da mucosa gástrica frente às lesões produzidas pelo etanol (WALLACE, 2001). Já é sabido que a administração do etanol absoluto provoca danos teciduais e celulares, incluindo edema, hemorragia subepitelial e geração de espécies reativas de oxigênio (KOUNTOURAS *et al.*, 2001). Desta forma, as úlceras aparecem devido à ação necrotizante do etanol na mucosa gástrica, com participação, em menor grau, da secreção gástrica (LEWIS e HANSON, 1991; EVANS, 1996).

Como nossos experimentos foram conduzidos em ratas, nos preocupou avaliar a influência do ciclo estral do animal sobre a formação das úlceras gástricas. Nesse sentido, nós comparamos a média da área de ulceração produzida nas diferentes fases do ciclo

em animais submetidos à indução de úlcera aguda com etanol e tratados apenas com veículo (água + Tween 80%). Esta análise mostrou que há um aumento não significativo estatisticamente na área de ulceração de animais que se encontram na fase de estro. Sendo assim, como a distribuição de animais entre os grupos foi randomizada e considerando que não existem diferenças entre a incidência de ulceração nos diferentes períodos estrais, os experimentos foram continuados utilizando-se fêmeas.

Os dados experimentais obtidos através da avaliação da atividade gastroprotetora da DCM pelo modelo de indução de úlceras gástricas agudas por etanol demonstram que a administração oral de diferentes doses da DCM foi capaz de proteger efetivamente a mucosa do estômago contra as lesões causadas pelo etanol, sugerindo uma ação citoprotetora eficiente dos princípios ativos presentes nessa fração. Essa atividade citoprotetora é corroborada por resultados obtidos em experimentos envolvendo outras espécies do gênero *Piper*, como *P. longum*, *P. carpunya* e *P. chaba*, que já possuem efeitos gastroprotetores descritos em diferentes modelos de lesões gástricas agudas, incluindo a indução com etanol, indometacina ou estresse (AGRAWAL *et al.*, 2000; MORIKAWA *et al.*, 2004; QUILEZ *et al.*, 2010).

Para garantir que a atividade citoprotetora gástrica da DCM não fosse apenas uma atividade protetora tópica na mucosa gástrica, provavelmente pela formação direta de uma barreira física, a DCM foi administrada pela via intraperitoneal. Nesse experimento também observamos que a administração de doses menores da DCM apresentou atividade gastroprotetora similar ao do tratamento da DCM pela via oral, descartando a hipótese da formação de uma barreira física protetora contra a ação deletéria do etanol.

Para investigar os mecanismos envolvidos na atividade gastroprotetora da DCM, administrada pelas vias oral e intraperitoneal, foi realizada a quantificação do muco aderido à mucosa gástrica. Já é sabido que o muco é um dos principais agentes de citoproteção da mucosa gástrica, por contribuir para a defesa da mucosa através de uma

barreira física contra bactérias; ou por agir como lubrificante reduzindo os efeitos abrasivos na mucosa, além de participar na proteção contra danos causados pelo ácido e toxinas no lúmen gástrico (WALLACE *et al.*, 2000; NAM *et al.*, 2005; WALLACE, 2007). Sua forma viscosa, elástica, aderente, como um gel transparente, que contém 95% de água e 5% de glicoproteínas recobre toda a superfície da mucosa gastrointestinal sendo capaz de agir como antioxidante e reduzir danos da mucosa promovidos por radicais livres (REPETTO *et al.*, 2002). Nossos resultados mostram que a DCM, tanto administrada pela via oral quanto pela via intraperitoneal, preveniu a diminuição da quantidade de muco gástrico promovida pelo etanol. Esses dados indicam que, pelo menos em parte, o efeito protetor visualizado com a DCM nas úlceras gástricas induzidas por etanol se deve à prevenção da depleção do muco protetor gástrico. De forma interessante, este resultado também está de acordo com dados obtidos por Agrawal *et al.* (2000) que observaram um aumento na secreção de mucina após o tratamento com o extrato aquoso da *P. longum* no modelo de úlcera aguda induzida por estresse, AINEs (aspirina) e ligadura pilórica.

Dando continuidade na investigação dos mecanismos envolvidos no efeito gastroprotetor da DCM, os níveis de GSH gástrico também foram quantificados. O GSH é encontrado em altas concentrações na mucosa gástrica de ratos e humanos (BODY *et al.*, 1979) e constitui outro importante mecanismo citoprotetor (CNUBBEN *et al.*, 2001), pois participa diretamente como um potente antioxidante e indiretamente como substrato para várias enzimas antioxidantes, incluindo a glutathione *S*-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR) (CNUBBEN *et al.*, 2001). Diversos autores já descreveram que no modelo de indução de úlceras gástricas por etanol há uma importante depleção nos níveis de GSH (SIEGMUND *et al.*, 2003). De fato, em nossos experimentos, os níveis de GSH foram diminuídos na mucosa ulcerada de animais que receberam etanol e foram tratados apenas com veículo. O tratamento dos animais com a

DCM, em todas as doses testadas, preveniu essa depleção. Esse dado sugere uma possível modulação positiva no sistema de defesa antioxidante da mucosa gástrica promovida pela fração testada.

Uma vez que a DCM apresentou importante atividade gastroprotetora no modelo de indução de úlcera aguda por etanol, demonstrando eficácia em prevenir a depleção de agentes citoprotetores como o muco e o GSH gástrico, fomos investigar a atividade da fração em um modelo animal de úlcera crônica gástrica, representado pela indução por ácido acético 80%. As úlceras produzidas por ácido acético são similares às úlceras humanas em termos de localização, severidade e cronicidade, bem como no que diz respeito ao processo de cicatrização (TAKAGI *et al.*, 1969). As lesões gástricas provocadas por ácido acético são induzidas por alteração de vários fatores, incluindo fatores de crescimento, aderência e muco, microcirculação, óxido nítrico, citocinas, além da produção de PGs derivadas da enzima COX-2 (KOBAYASHI *et al.*, 2001). Vale ressaltar que a cicatrização da úlcera é um processo complexo, que envolve migração e proliferação celular, replicação de células epiteliais junto à margem da úlcera para restabelecer a arquitetura glandular e angiogênese no tecido de granulação na base da úlcera (TARNAWSKI, 2005). Em adição aos resultados gastroprotetores no modelo agudo de lesão gástrica, no modelo experimental de úlcera crônica a extensão da lesão induzida por ácido acético foi significativamente reduzida pelo tratamento crônico oral com DCM indicando um efeito cicatrizante gástrico eficaz promovido pela fração. De acordo com Vasconcelos e colaboradores (2008) o muco gástrico também é importante na proteção das células da mucosa gástrica durante o processo de cicatrização. Dado que este muco é constituído por 95% de água e 5% de glicoproteínas, como as mucinas (BERNE *et al.*, 2004), nós quantificamos a camada de muco presente nas mucosas gástricas expostas ao ácido acético pelo método histoquímico da coloração pelo ácido periódico de Schiff (PAS). Nessa reação, o ácido periódico oxida seletivamente os resíduos de glicose,

produzindo aldeídos que reagem com o reagente de Schiff e confere uma cor final púrpura-magenta, revelando a presença de macromoléculas de carboidratos como glicoproteínas, glicogênio e proteoglicanos, tipicamente encontrados no muco. Como esperado, a exposição da mucosa gástrica ao ácido acético 80% reduziu os níveis de mucina e o tratamento com omeprazol e DCM foram capazes de impedir a diminuição da quantidade de muco. Esse resultado aponta que a preservação da mucina, e conseqüentemente do muco gástrico, está envolvida tanto na atividade gastroprotetora quanto na cicatrização de úlceras gástricas já estabelecidas promovidas pela DCM. Esses resultados vão de encontro ao observado quando animais receberam um composto fenólico, o allylpirocatecol, obtido a partir da *Piper betel*, no qual foi observado que a produção de muco constituiu um fator preponderante para o processo de cicatrização de úlceras induzidas por indometacina em ratos (BHATTACHARYA *et al.*, 2007).

Da mesma forma que no modelo experimental de lesão gástrica aguda induzida por etanol, também realizamos a quantificação dos níveis de GSH na mucosa gástrica de animais submetidos ao modelo de úlcera crônica induzida por ácido acético. Nesse caso, conforme descrito por Marotta e colaboradores (1999), a exposição da mucosa gástrica ao ácido acético também promove uma diminuição no conteúdo de GSH. A administração oral da DCM também foi capaz de impedir a redução dos níveis de GSH da mucosa gástrica, indicando que a DCM é capaz de proteger a mucosa gástrica contra danos causados pelos agentes ulcerogênicos utilizados, pelo menos em parte, pela manutenção das defesas antioxidantes da mucosa gástrica.

Outro fator que desempenha um papel importante na manutenção da integridade da mucosa gástrica é a proliferação celular, que constitui um processo essencial na cicatrização e remodelamento tecidual de lesões gástricas. Diante disso, para investigar o efeito da DCM sobre a proliferação celular nas úlceras gástricas crônicas induzidas pelo ácido acético, utilizamos a determinação imunohistoquímica dos níveis de PCNA, a partir

do qual se pode observar um acúmulo de coloração escura nos pontos reacionais da diaminobenzidina (DAB) em células que apresentavam intensa proliferação na mucosa gástrica. Neste ensaio, foi verificado que o tratamento oral com DCM (100 mg/kg) promoveu um aumento na proliferação celular na mucosa gástrica exposta ao ácido acético, sugerindo que a fração estimula a proliferação celular, intensificando o processo de cicatrização das lesões gástricas e o estabelecimento de um tecido reparado no local.

Diante do fato de que a secreção ácida constitui um fator agressor endógeno da mucosa gástrica, resolvemos verificar a ação da DCM sobre a secreção ácida gástrica. Atualmente, a estratégia de diminuir a secreção ácida gástrica constitui o principal efeito dos medicamentos mais prescritos na terapia da úlcera ou gastrite, entre os quais destacam-se os antagonistas dos receptores H_2 (como a cimetidina e seus congêneres) e os inibidores de bomba de prótons (como o omeprazol e seus congêneres). Iniciando a avaliação dos efeitos da DCM sobre a secreção ácida, verificamos a atividade da fração sobre a atividade da H^+,K^+ -ATPase *in vitro*.

Os ensaios com a bomba de prótons somente ocorreram após a caracterização da enzima, que foi realizada com a confirmação de que a hidrólise do ATP não foi produzida pela presença da Na^+,K^+ -ATPase da membrana celular, uma vez que a ouabaína, um inibidor seletivo dessa isoforma não afetou a atividade ATPásica na preparação. Como controle positivo foi utilizado o omeprazol, que é um inibidor específico não competitivo da H^+,K^+ -ATPase, que atuou por sua vez, inibindo a atividade ATPásica.

É importante ressaltar que até o momento, o único resultado científico encontrado a respeito da ação de plantas da família Piperaceae na inibição da enzima H^+,K^+ -ATPase demonstrou uma inibição de até 90% da atividade da enzima quando na presença da isovitexina e da vitexina, flavonóides isolados a partir do extrato etanólico de *P. carpunya* (QUILEZ *et al.*, 2010).

Uma vez que a DCM promoveu a inibição da atividade da H^+,K^+ -ATPase, fomos avaliar o efeito da fração sobre a secreção ácida gástrica *in vivo* e observamos que a DCM, no modelo de hipersecreção ácida gástrica através da ligadura pilórica nos animais, reduziu o volume e a acidez da secreção gástrica. A H^+,K^+ -ATPase presente nas células parietais é uma enzima responsável pelo transporte de prótons de fluidos intracelulares para o lúmen gástrico (CAPLAN, 2007). A atividade fisiológica desta enzima está sujeita à modulação (estimulação ou inibição) por sinais moleculares neuronais e endócrinos, como acetilcolina, gastrina, histamina e somatostatina (SACHS E SHIN 1995). A gastrina circulante produzida e secretada pelas células G do antro estimula as células tipo enterocromafins (ECL) presentes na mucosa oxíntica do estômago através de receptores CCK-2, como resultado dessa estimulação as ECL produzem e secretam a histamina, que irá estimular a produção de ácido pelas células parietais através da sua ligação aos receptores H_2 (GOO *et al.*, 2010). Apesar de a fração inibir diretamente de forma discreta a atividade da H^+,K^+ -ATPase, a diminuição da secreção ácida gástrica produzida por DCM poderia estar relacionada à alterações nos estímulos secretagogos da célula parietal.

No intuito de esclarecer quais as vias envolvidas no efeito inibitório da DCM sobre a secreção ácida gástrica, induzimos a produção da secreção gástrica no modelo de ligadura pilórica com a administração dos secretagogos: betanecol, histamina e pentagastrina. Nossos resultados mostraram que a DCM inibe significativamente a secreção ácida gástrica estimulada pela pentagastrina, mas não quando estimulada por betanecol ou histamina, sugerindo uma ação inibitória da DCM sobre a estimulação gastrinérgica nos receptores CCK-2 da célula parietal. Visto que quando da estimulação com o betanecol e a histamina não há uma diminuição na secreção ácida gástrica, é possível afirmar que a DCM não está apresentando ação inibitória diretamente na enzima H^+,K^+ -ATPase *in vivo*, e o fato da DCM estar diminuindo a secreção estimulada por pentagastrina e não por histamina pode significar que a sua ação está se dando antes da

estimulação da produção de histamina promovida pela gastrina, ou seja, muito provavelmente esteja atuando em receptores CCK-2, contudo essa afirmação somente seria possível depois de estudos complementares, entre eles a realização de um *binding* para a confirmação de ligação nesse receptor específico.

Como mencionado anteriormente, um dos principais tratamentos das úlceras gástricas se dá através da inibição da secreção ácida gástrica com os inibidores da bomba de prótons. Esse tipo de medicamento também tem sido muito utilizado para o tratamento da DRGE, mas com falência terapêutica em muitos casos (PICHE e GALMICHE, 2005). Dessa maneira, devido ao interessante efeito gastroprotetor da DCM contra lesões gástricas induzidas por etanol e ácido acético e ao efeito inibidor da secreção ácida gástrica, avaliamos se essa fração também apresentava um efeito protetor do esôfago no modelo agudo de esofagite induzida por refluxo gastroesofágico. Em nossos dados observamos que a DCM também é eficaz na proteção da mucosa esofágica. Nesse modelo observa-se um rápido aumento na migração de neutrófilos no espaço intersticial induzido por agentes quimiotáticos em resposta à lesão esofágica causada pelo material refluído do lúmen gástrico. Esses neutrófilos promovem a liberação de espécies reativas de oxigênio e proteases, resultando em um dano tecidual inflamatório dependente de neutrófilos (HUBER e WEISS, 1989), sendo os níveis da mieloperoxidase um marcador indireto da resposta inflamatória em diferentes modelos experimentais. Como esperado, em nossos experimentos houve um aumento nos níveis da enzima mieloperoxidase na mucosa esofágica com extensa esofagite, sugerindo a ocorrência de um infiltrado de neutrófilos no sítio da lesão. Todavia, nas amostras esofágicas de animais tratados com DCM, constatamos uma significativa diminuição desses níveis, indicando uma redução do processo inflamatório local. Como foi observado anteriormente que a DCM reduziu a secreção ácida gástrica, podemos sugerir que a proteção da mucosa esofágica contra a lesão provocada pelo material refluído do lúmen

gástrico seja promovida, em parte, pela sua atividade anti-secretora ácida basal.

Com o objetivo de identificar a participação da piplartina, uma alcalamida isolada da DCM nos efeitos gastroprotetores da *P. tuberculatum* nós avaliamos a atividade gastroprotetora do composto sobre lesões gástricas agudas induzidas por etanol, a atividade anti-secretora gástrica pela avaliação *in vitro* sobre a atividade da enzima H⁺,K⁺-ATPase e de parâmetros *in vivo* obtidos no modelo de ligadura pilórica. As alcalamidas naturais constituem uma classe especial de alcalóides contendo uma função amida. Muitos alcalóides são utilizados com finalidades farmacológicas, entre elas: atividade anticolinérgica, antitumoral, diurética, simpatomimética, antiviral, antihipertensiva, hipnoanalgésicos, antidepressivos, antitussígenos, antimicrobianos e anti-inflamatórios (HENRIQUES *et al.*, 2004). As ações gastroprotetoras de alcalóides já foram relatadas, entre elas a ação da piperina, um alcalóide piperidínico que apresentou ação protetora em úlceras induzidas por estresse, indometacina, etanol e ligadura do piloro, além de diminuir o volume e a acidez do conteúdo gástrico secretado (BAY e XU, 2000). A piplartina, menos estudada do que a piperina, também é encontrada em algumas plantas do gênero *Piper* e apresenta importante atividade citotóxica *in vitro* em células de linhagem tumoral (BEZERRA, 2009), atividade antifúngica (NAVICKIENE *et al.*, 2000) e como antiagregante plaquetária (TSAI *et al.*, 2005).

A dose escolhida da piplartina (4,5 mg/kg) foi calculada com base na DE₅₀ da DCM no modelo de lesões gástricas agudas induzidas por etanol (DE₅₀ = 29 mg/kg), levando-se em consideração o seu rendimento de obtenção a partir da DCM (14%). O tratamento oral dos animais com a piplartina protegeu a mucosa gástrica contra lesões induzidas por etanol, impediu a depleção dos níveis de GSH mas não alterou a quantidade de muco gástrico. Podem existir diversas razões para que não tenha havido uma manutenção na quantidade de muco, tal qual observado nos experimentos com a DCM, entre elas o fato de que na fração podem existir diferentes compostos que atuando separadamente ou em

sinergismo auxiliam no efeito protetor gástrico final obtido pela administração da fração estudada. Além do mais, os efeitos gastroprotetores apresentados pela piplartina provavelmente envolvem outras vias de proteção, entre as quais o aumento da disponibilidade de GSH, como já discutido anteriormente. Alguns outros alcalóides também apresentaram proteção gástrica em modelos de úlcera por etanol, destacando-se a berberina, capsaicina, anisodamina, entre outros (FALCÃO *et al.*, 2008).

Para esclarecer quais os mecanismos envolvidos na atividade protetora gástrica da piplartina, resolvemos investigar a atividade deste alcalóide na secreção ácida gástrica. Tal qual nos experimentos envolvendo a DCM, a piplartina *in vitro* foi capaz de inibir a atividade da H^+,K^+ -ATPase de maneira dependente da concentração. Da mesma maneira, realizamos um estudo *in vivo* utilizando o modelo de ligadura pilórica e a piplartina reduziu a secreção ácida gástrica basal somente com a maior dose (15 mg/kg, calculada de acordo com o rendimento do alcalóide na fração e de acordo com a dose mais efetiva na diminuição da secreção ácida gástrica produzida pela fração DCM), mas não com a dose efetiva em promover gastroproteção contra lesões induzidas por etanol (4,5 mg/kg). Vários alcalóides já apresentaram ação anti-secretora, entre eles matrina, nigakinona, integerrimina, retrorsina, sendo os dois últimos responsáveis também pela cicatrização de úlceras crônicas (FALCÃO *et al.*, 2008).

Quando a secreção gástrica foi estimulada com os secretagogos, a piplartina, assim como a DCM, inibiu a secreção ácida gástrica. Apesar de o alcalóide apresentar uma potente inibição da atividade da H^+,K^+ -ATPase *in vitro*, a piplartina não teve o mesmo efeito *in vivo*, uma vez que foi ineficaz em diminuir a secreção gástrica ácida estimulada pelos secretagogos betanecol e histamina. Os resultados obtidos nos permitem concluir que a diminuição da secreção ácida gástrica produzida pela piplartina está sendo mediada por sua ação inibitória na via gastrinérgica, provavelmente envolvendo um bloqueio nos receptores das células parietais de gastrina CCK-2, o que necessita de mais

estudos para melhor esclarecimento. Haja visto que a estimulação da gastrina em receptores CCK-2 presentes na célula parietal é uma das vias mais importantes para a produção do HCl (SCHUBERT e PEURA 2008). Uma inibição dessa via, provavelmente pelo bloqueio dos receptores CCK-2 é de extrema importância para a redução da secreção ácida gástrica, o que pode explicar a diminuição na secreção ácida quando do tratamento com a piplartina.

O fato da DCM e piplartina não apresentarem *in vivo* o mesmo efeito inibitório da enzima H^+,K^+ -ATPase nos chamou a atenção. Esse evento pode estar correlacionado ao fato de que, no procedimento de ligadura pilórica, a administração da fração e do composto é realizada pela via intraduodenal, e de maneira semelhante ao omeprazol, o responsável pela inativação da bomba necessitasse de um ambiente ácido para a ação, ou exerceria uma ação local. De acordo com Schaab e colaboradores (2010), a piplartina sofre metabolização a partir do citocromo P450, sendo a oxidação sofrida tanto no anel lactâmico quanto na fração trimetoxifenil da molécula. Pode ser que essa oxidação seja a responsável pela perda da atividade da piplartina e da DCM (cujo principal composto provavelmente seja a piplartina) sobre a inibição da enzima H^+,K^+ -ATPase.

É importante esclarecer que o aumento na secreção de gastrina é observado em casos de gastrinomas que apresentam hipersecreção ácida como parte da síndrome de Zollinger-Ellison, podendo também a hipergastrinemia estar associada a condições de hipoacidez gástrica, na qual o *feedback* negativo da secreção, induzido pelo baixo pH luminal não ocorre, e as células G secretam gastrina de forma desenfreada (CALATAYUD *et al.*, 2010). Infelizmente, não existem atualmente no mercado fármacos que bloqueiem a ação da gastrina, os quais seriam muito desejados no caso de patologias gastrointestinais nas quais a diminuição da secreção ácida é bastante importante. Algumas drogas como espiroglumida (REVEL *et al.*, 1992) e itriglumida (MAKOVEC *et al.*, 1999) que atuam seletivamente em receptores CCK-2 foram testadas, contudo apresentaram baixa eficácia

e biodisponibilidade oral. Dessa forma, os resultados obtidos com a DCM e principalmente com a piplartina são interessantes, pois representam um agente terapêutico potencial que pode promover seus efeitos através da interação com receptores CCK-2.

Em nosso laboratório não foram realizados os ensaios toxicológicos e nem a determinação da DL_{50} da DCM e da piplartina. Contudo, existem relatos de citotoxicidade envolvendo a piplartina, entre eles atividade genotóxica em células de mamíferos (BEZERRA *et al.*, 2009), atividade antitumoral (BEZERRA *et al.*, 2008) e atividade antiproliferativa (BEZERRA *et al.*, 2005). É interessante mencionar que já existem pesquisas envolvendo a ação da piplartina e o câncer no estômago, relacionado à hiperproliferação celular provocada por gastrinomas (Universidade Federal do Pará, projeto aprovado pelo CNPQ, 2011). Dantas e colaboradores (2002) relataram a atividade abortofaciente provocada pela piplartina, contudo ainda há a necessidade de estudos mais aprofundados sobre a toxicidade dos componentes presentes na DCM e principalmente da piplartina.

Em conjunto, nossos resultados demonstraram que tanto a DCM quanto a piplartina possuem efeito protetor gástrico e esofágico, sendo potencialmente benéficos na prevenção e terapêutica de doenças gástricas e esofagianas, principalmente através da sua atividade anti-secretora e citoprotetora. Desta forma, nós concluímos que *Piper tuberculatum* apresenta uma importante ação antiúlcera gástrica e esofágica e que a piplartina participa de forma significativa no efeito da *Piper tuberculatum*.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que

- Tanto a DCM como a piplartina protegeram a mucosa gástrica no modelo de lesão aguda induzida por etanol PA, efeito que parece estar associado com o aumento do muco gástrico e com a manutenção dos níveis de GSH, dois importantes fatores de proteção da mucosa gástrica;
- DCM acelerou a cicatrização de úlceras gástricas induzidas por ácido acético 80%, pela manutenção dos níveis de muco, verificada pela coloração de PAS, e da estimulação da proliferação celular, verificada através da imunohistoquímica (PCNA);
- Tanto a DCM como a piplartina reduziram o volume e a acidez do conteúdo gástrico basal no modelo de ligadura pilórica, fatores que contribuem para a integridade da mucosa gástrica;
- O mecanismo pelo qual a DCM e a piplartina reduzem a secreção ácida gástrica *in vivo* parece envolver a inibição da via gastrinérgica, possivelmente através da interação com receptores CCK-2;
- Tanto a DCM como a piplartina inibiram a atividade da enzima H^+,K^+ -ATPase no ensaio *in vitro*. Contudo, é possível que a inibição da atividade da bomba de prótons não esteja ocorrendo da mesma forma *in vivo*, uma vez que ambas não inibiram a secreção ácida gástrica estimulada pelo agonista de receptores muscarínicos (betanecol) e/ou pelo agonista de receptores histaminérgicos (histamina).

Os resultados obtidos indicam que a DCM, obtida dos frutos de *Piper tuberculatum* apresenta atividade gastroprotetora, a qual envolve a manutenção de fatores de proteção gástrica como aumento dos níveis de muco e GSH, estimulação da proliferação celular e

redução da secreção ácida gástrica pela inibição da atividade da enzima H^+,K^+ -ATPase e dos receptores CCK-2 de gastrina presentes nas células parietais e ECL. Além disso, o composto isolado da DCM, piplartina parece ser o responsável pela maioria das ações gastroprotetoras da *Piper tuberculatum*.

REFERÊNCIAS

ABITOL, R.A. **Doença ulcerosa péptica**. In: Medstudents: Rotinas de Clínica Médica. Disponível em <http://www.medstudents.com.br/rotinas/clinmed/dup.htm>. Acesso em 17/08/09.

AGRAWAL, A.K.; RAO, C.V.; SAIRAM, K.; JOSHI, V.K.; GOEL, R.K. Effect of Piper longum Linn, Zingiber officianalis Linn and Ferula species on gastric ulceration and secretion in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**. 38(10):994-8, 2000.

AHLMAN H.; NILSSON, F. The gut as the largest endocrine organ in the body. **Ann Oncol**. 12 Suppl 2:S63-8. Review, 2010.

AOI M, AIHARA E, NAKASHIMA M, TAKEUCHI K. Participation of prostaglandin E receptor EP4 subtype in duodenal bicarbonate secretion in rats. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. 287(1):G96-103, 2004.

ARAÚJO-JÚNIOR, J.X.; CHAVES, M.C.O.; CUNHA, E.V.L.; GRAY, A.I. Cepharanone B from *Piper tuberculatum*. **Biochem. Syst. Ecol**. 27: 325-327. 1999.

ASPNEY, G. F.; THORNTON, P., in Medicinal Plants of Jamaica. **West Indies Medicinal Journal**, Kingston, Jamaica, 1954.

ATAY, S.; TARNAWSKI, A.S.; DUBOIS, A. Eicosanoids and stomach. **Prostaglandins & Others Lipids Mediators**. v.61, n.3-4, p.105-124, 2000.

ATHMANN, C., ZENG, N., SCOTT, D.R., SACHS, G. Regulation of parietal cell calcium signaling in gastric glands. **Am. J. Physiol.** 279, G1048– G1058, 2000.

ATTWOOD, S.E.; SMYRK, T.C.; De MEESTER, T.R.; MIRVISH, S.S.; STEIN, H.J.; HINDER, R.A. Duodeno-esophageal reflux and the development of esophageal adenocarcinoma in rats. **Surgery**, v.111, p.503-510, 1992.

BAI, Y.F.; XU, H. Protective action of piperine against experimental gastric ulcer. **Acta Pharmacol. Sin.**, 21, 357-359, 2000.

BARHAM, C.P.; GOTLEY, D.C.; MILLS, A.; ANDERSON, D. Precipitating causes of acid reflux episodes in ambulant patients with gastro-oesophageal reflux disease. **Gut**, v.36, p. 505-510, 1995.

BARROS, D. **Fitomedicamentos na indústria brasileira**. Phytomédica, ano 1, v.

1. Disponível no endereço:

http://www.ache.com.br/arquivo/institucional/phytomedica_jornal/numero5.pdf.

Acesso em 24/11/2006.

BHATTACHARYA S, BANERJEE D, BAURI AK, CHATTOPADHYAY S, BANDYOPADHYAY SK. Healing property of the *Piper betel* phenol, allylpyrocatechol against indomethacin-induced stomach ulceration and mechanism of action. **World J Gastroenterol.** 21;13(27):3705-13, 2007.

BERGO, C.L.; MENDONÇA, H.A.; SILVA, M.R. Efeito da época e frequência de corte de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) no rendimento de óleo essencial. **Acta Amazonica** 35(2): 111-117. 2005.

BERNARD, C.B.; KRISHNAMURTY, H.G.; CHAURET, D.; DURST, T.; PHILOGE NE, B.J.R.; SANCHEZ-VINDAS, P.; HASBUN, C.; POVEDA, L.; SAN ROMA ´N, L.; ARNASON, J.T. Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. **Journal of Chemical Ecology** 21, 801–814, 1995.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. **Fisiologia**: 5ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

BEZERRA, D.P.; MILITÃO, G.C.; DE CASTRO, P.O.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.; ELMIRO, F.J.; COSTA-LOTUFO, L.V. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. **Toxicol. In Vitro**. 21: 1-8, 2007.

BEZERRA, D.P.; CASTRO, F.O.; ALVES, A.P.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.; ELMIRO, F.J.; ALENCAR, N.M.; MESQUITA, R.O.; LIMA, M.W.; COSTA-LOTUFO, L.V. In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **J. Appl. Toxicol.** 28: 156-163, 2008.

BODY, S.C.; SASAME, H.A.; BODY, M.R. High concentrations of glutathione in glandular stomach: possible implications for carcinogenesis. **Science.**, v. 205, n. 4410, p.1010-1012, 1979.

BRETAN, O.; TAGLIARINI, J.V. Mecanismos das Manifestações Otorrinolaringológicas da Doença do Refluxo Gastroesofágico. **Internacional archives of otorhinolaryngology**, v. 5, p. 435- 441, 2001.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11^a Edição. United States of America: Mc Graw-Hill Companies, Inc., 2006.

BRZOZOWSKI, T. Experimental production of peptic ulcer, gastric damage and câncer models and their use in pathophysiological studies and pharmacological treatment – polish achievements. **Journal of physiology and pharmacology**. v.54., p.99-126, 2003.

CALIXTO, J. B. Estudo farmacológico pré-clínico de plantas medicinais. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. 1 ed. Chapecó: Argos,2001.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Cienc. Cult.**, v.55, n.3, p.37-39, 2003.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology** v.100, p.131–134, 2005.

CAPLAN, M.J. The Future of the pump. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 41, n.2, p. S217-S222, 2007.

CALATAYUD, S.; ÁLVAREZ, A.; VÍCTOR, V. M. Gastrin: An Acid-Releasing, Proliferative and Immunomodulatory Peptide? **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, 10, 8-19, 2010.

CHAVES, M.C.O.; JÚNIOR, A.G.F.; SANTO, B.V.O. Amides from *Piper tuberculatum* fruits. **Fitoterapia** 74: 181-183. 2006.

CHO, M. K.; JANG, Y. P.; KIM, Y. C.; KIM, S. G. Arctigenin, a phenylpropanoid dibenzylbutyrolactone lignan, inhibits MAP kinases and AP-1 activation via potent MKK inhibition: the role in TNF- α inhibition. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 1419-1429, 2004.

CÍCERO BEZERRA FELIPE, F.; FILHO, T.S.J.; SOUZA, L.E.O.; SILVEIRA, A.J., UCHOA, D., ROCHA SILVEIRA, E.A.; PESSOA, D.L., VIANA, G.S. Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice. **Phytomedicine**. Sep;14(9):605-12, 2007.

CNUBBEN, N. H. P.; RIETJENS, I. M. C. M.; WORTELBOER, H.; van ZANDEN, J.; van BLADEREN, P. J. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.10, p.141-152, 2001.

CORNE, S.J.; MORRISSEY, S.M.; WOODS, R.J. Proceedings: a method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. **The Journal of Physiology**, 242, 116– 117, 1974.

CORRÊA JÚNIOR, C.; SCHEFFER, M. C. Produção de plantas medicinais,

condimentares e aromáticas no Estado do Paraná. In: CORREA JR, C.; GRAÇA, L.R.; SCHEFFER, M.C. **Complexo Agroindustrial das Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares no Estado do Paraná – Diagnóstico e Perspectiva**. 1 ed. Curitiba: EMATER, 2004.

CRONQUIST, A. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. **New York Colombia University Press**, p.1262, 1981.

DOMER, F.R. **Animail experiments in pharmacological analysis**. Charles C. Thomas Publisher, 669p, 1971.

DONG, M.H.; KAUNITZ, J.D. Gastroduodenal mucosal defense. **Current Opinion in Gastroenterology**.v.22.,n.6, p.599-606, 2006.

DYER, L.A.; PALMER, A.D.N. *Piper*: A Model Genus for Studies of Pytochemistry, Ecology, and Evolution. **Kluwer Academic Publisher**/New York, 2004.

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

FACUNDO V. A., POLLLI A. R., RODRIGUES R. V., MILITÃO J. S. L. T., STABELLIR. G., CARDOSO C. T. **Acta Amazônica** 38, 733—742, 2008.

FILHO, R.B., SOUZA, M.P., MATTOS, M.E.O. Piplartine-dimer A, a new alkaloid from *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry** 20, 345–346, 1981.

FALCÃO, H.S.; LEITE, J.A.; BARBOSA-FILHO, J.M.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; CHAVES, M.C.O.; MOURA, M.D.; FERREIRA, A.L.; ALMEIDA, A.B.A.; SOUZA-BRITO, A.R.; DINIZ, M.F.; BATISTA L. Gastric and Duodenal Antiulcer Activity of Alkaloids: A Review. **Molecules**. 13, 3198-3223, 2008.

FINIZIA, C.; LUNDELL, L.; CANGE, L.; RUTH, M. The effect of cisapride on oesophageal motility and lower sphincter function in patients with gastro-oesophageal reflux disease. **Eur J Gastroenterol Hepatol**. 14(1):9-14, 2002.

FISKE, C. H.; SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **J. Biol. Chem.**, v. 66, p. 375-400, 1925.

FLEMSTRÖM, G.; HÄLLGREN, A.; NYLANDER, O.; ENGSTRAND, L.; WILANDER, E.; ALLEN, A. Adherent surface mucus gel restrict diffusion of macromolecules in rat duodenum in vivo. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 277, p. G375-G382, 1999.

FONTENELE J. B., LEAL L. K., SILVEIRA E. R., FELIX F. H., BEZERRA FELIPE C. F., VIANA G. S., **J. Pharm. Pharmacol.**, 61, 511—515, 2009.

FORNAI, M.; NATALE, G.; COLUCCI, R.; TUCCORI, M.; CARAZZINA, G.; ANTONIOLI, L.; BALDI, S.; LUBRANO, V.; ABRAMO, A.; BLANDIZZI, C.; DEL TACCA, M. Mechanisms of protection by pantoprazole against NSAID-induced gastric mucosal damage. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 372, p. 79–87, 2005.

FREEMAN, M. E. The ovarian cycle of the rat. In: E. Knobil & J. Neil (eds.), **Physiology of reproduction**. Raven Press Ltd., New York, pp. 1893-1928, 1988.

FREITAG, C.P.F. Implante endoscópico no esôfago distal de polimetilmetacrilato para controle do refluxo gastroesofágico: estudo experimental em modelo animal. UFRGS. Dissertação de Mestrado. Pós graduação em Gastroenterologia. Porto Alegre, Brasil, p.139, 2003.

GANOOG, W.F. **Review of medical physiology**. 21 ed. San Francisco: Lange Medical Books, 2003.

GAVAZZONI, F.B.; ATAÍDE, A.L; JÚNIOR, F.H; FILHO, E.D.M. Esofagite por refluxo e laringite por refluxo: Estágios clínicos diferentes da mesma doença? **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v.68, 2002.

GUIMARÃES, E.F.; GIORDIANO, L.C.S. Piperaceae do Nordeste Brasileiro I: Estado de Ceará. **Rodriguesia**, 55: 21-25, 2004.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday. **Molecular Aspect of Medicine**, 27, 1-93, 2006.

HADOM, H.; JUNGKUNZ, R. **Pharmaceutics Acta. Helvetia**, 25, 1951.

HOAR, W.; HICKMAN, C. P., Ovariectomy and the estrous cycle of the rat. In: W. Hoar & C. P. Hickman (eds.), **General and comparative physiology**. 2. ed. Prentice-Hall, New Jersey, pp. 260-265, 1975.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian medicine for treatment of infectious disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, p. 1027-1031, 2002.

HOGABOAM, C.M.; BISSONNETTE, E.Y.; CHIN, B.C.; BEFUS, A.D.; WALLACE, J.L. Prostaglandins inhibit inflammatory mediator release from rat mast cells. **Gastroenterology**. 104(1):122-9, 1993.

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

HOOGERWERF, W.; PASRICHA, P.J. Agentes usados para o controle da acidez gástrica e no tratamento de úlceras pépticas e da doença do refluxo gastroesofágico. In: **Goodman & Gilman – As bases farmacológicas da terapêutica**, Joel Hardman e Lee E. Limbird, 10 ed. , Rio de Janeiro, 2003.

HOU, W.; SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 22, p. 593–598, 2006.

JACOBSON, M.; CROSBY, D. G. **Naturally Occurring Insecticides** (Marcel Dekker), 44,226, 1971.

JAIN, K.S.; SHAH, A.K.; BARIWAL, J.; SHELKE, S.M.; KALE, A.P.; JAGTAP, J.R.; BHOSALE, A.V. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.15, p. 1181-1205, 2007.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**. São Paulo, Ed. Nacional, 10. ed., p.777, 1991.

KALLAYA, E.; SUTHILUK, P.; NARUEMON, V.; DUANGPORN, T. Effects of *Aloe vera* and sucralfate on gastric microcirculatory changes, cytokine levels and gastric ulcer healing in rats. **World J Gastroenterol.**, v. 7, n.12, p. 2034-2039, 2006.

KAHRILAS, P.J.; QUIGLEY, E.M.M. Clinical esophageal pH recording: a technical review for practice guideline development. American gastroenterological association. **Gastroenterology**, v.110, p. 1982-1996, 1996.

KAZUMORI, H.; ISHIHARA, S.; RUMI, M.A.K. Transforming growth factor- α augments histidine decarboxylase and vesicular monoamine transporter 2 production in rat enterochromaffin-like cells. **Am. J. Gastrointest. Liver Physiol.** v.286, p. G508-G514, 2004.

KIRKPATRICK, J. Concierge medicine gaining ground. Competition forces medical center into 'boutique' business. **Physician Exec.** 28(5):24-6, 2002.

KIRTIKAR, K. R.; BASU, B. D., **Indian Medicinal Plants**, Vol. III, 2128, 1933.

KOBAYASHI, T.; OHTA, Y.; YOSHINO, J.; NAKAZAWA, S. Teprenone promotes the healing of acetic acid-induced chronic gastric ulcers in rats by inhibiting neutrophil infiltration and lipid peroxidation in ulcerated gastric tissues. **Pharmacology Research**, v.43, p.23–30, 2001.

KOMASAKA, M.; HORIE, S.; WATANABE, K.; MURAYAMA, T. Antisecretory effect of somatostatin on gastric acid via inhibition of histamine release in isolated mouse stomach. **Eur.J.Pharmacol.**, v. 452, n. 2, p. 235-243, 2002.

KONTUREK, P.C.; KONTUREK, S.J.; BURNAT, G.; BRZOZOWSKI, T.; BRZOZOWSKA, I.; REITER, R.J. Dynamic physiological and molecular changes in gastric ulcer healing achieved by melatonin and its precursor L-tryptophan in rats. **Journal of Pineal Research**, v. 45, p. 180-190, 2008.

KUBO, K.; UEHARA, H.; KUBOTA, T.; NOZU, T.; MORUYA, M.; WATANABE, Y.; SHOJI, E.; SANTOS, S. B.; HARADA, K.; KONGO, Y. Effects of ranitidine on gastric vesicles containing H⁺, K⁺ - ATPase adenosine triphosphatase in rats. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 30, p. 944-951, 1995.

KUSTERS, J.G.; VAN VLIET, A.H.; KUIPERS, E.J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Clin Microbiol Rev.** 19(3):449-90. Review, 2006.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. **Gastroenterology**, v.135, p.41–60, 2008.

LANZMASTER, D. Avaliação da atividade antinociceptiva do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico extraído de *Piper tuberculatum* JACQ. Florianópolis, 2009. Monografia (conclusão de curso)– Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Curso de Gradação em Ciências Biológicas.

LEAL, L.F. Estudo Químico e Avaliação da Atividade Farmacológica e Microbiológica de *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel. Florianópolis, 2000. 158f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Pós-Graduação em Química.

LEWIS, D.A. and HANSON, P.J. Anti-ulcer drugs oh plant origin, **Progress Medicinal Chemistry, Elsevier Science Publishers**, 28: 201-231, 1991.

LONG, J. A. and EVANS, H. M. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. **Memories of University of California**, 6: 1-148, 1922.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas Medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas. **Instituto Plantarum**. Nova Odessa, SP. 2002.

MAIA, J.G.S.; ZOHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A.; SANTOS, A.R.S.; SILVA, M.H.L.; LUZ, A.I.R.; BASTOS, C.N. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the amazon region. **Flavour and Fragrance Journal** 13(4): 269- 272. 1998.

MAJUMDAR B.; RAY CHAUDHURI S. G.; RAY A.; BANDYOPADHYAY, S. K. Effect of ethanol extract of *Piper betel* Linn leaf on healing of NSAID-induced experimental

ulcer--a novel role of free radical scavenging action. **Indian J Exp Biol** , 311-315, 2003.

MAKOVEC, F.; REVEL, L.; LETARI, O.; MENNUNI, L.; IMPICCIATORE, M. Characterization of antisecretory and antiulcer activity of CR 2945, a new potent and selective gastrin/CCK(B) receptor antagonist. **Eur. J. Pharmacol.**, 81-90, 1999.

MARCONDES, F. K. Influence of gender and estrous cycle phases on the stress reaction in rats. Master's Degree Dissertation, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil, 1995.

MAROTTA, F.; TAJIRI, H.; SAFRAN, P.; et al. Ethanol related gastric mucosal damage: evidence of a free radical-mediated mechanism and beneficial effect of oral supplementation with bionormalizer, a novel natural antioxidant. **Digestion**, v. 60, p. 538-543, 1999.

MATSUI, K.; MUNAKATA, K. **Tetrahedron Letters**, 1905, 1975.

MILANI, S.; CALABRÒ, A. Role of growth factors and their receptors in gastric healing. **Microscopy Research and Technique**. v.53, p.3060-371, 2001.

MÖSSNER, J.; CACA, K. Developments in the inhibition of gastric acid secretion. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 35, n.8, p.469-475, 2005.

MORAES, J.D.; NASCIMENTO, C.; LOPES, P.O.; NAKANO, E.; YAMAGUCHI, L.F.; KATO, M.J.; KAWANO, T. Schistosoma mansoni: In vitro schistosomicidal activity of

piplartine. **Exp Parasitology** , 2010.

MORAES-FILHO, J.; CECCONELLO, I.; GAMA-RODRIGUES, J.; CASTRO, L.; HENRY, M.A.; MENEGHELLI, U.G.; et al. Brazilian Consensus on gastroesophageal reflux disease: proposals for assessment, classification, and management. **American Journal of Gastroenterology** ,v. 97, p. 241-248, 2002.

MORAIS, S.M., FACUNDO, V.A., BERTINI, L.M., CAVALCANTI, E.S.B., ANJOS-JR, J.F., FERREIRA, S.A., BRITO, E.S., SOUZA, M.A. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from Piper species. **Biochemical Systematics and Ecology**, 35: 670-675, 2007.

MOREIRA, D.L.; GUIMARÃES, E.F.; KAPLAN, M.A.C. A C – Glucosylflavone from Leaves of *Piper lhotzkyanum*. **Phytochemistry** 55: 783-785. 2000.

MORIKAWA, T., MATSUDA, H., YAMAGUCHI, I., PONGPIRIYADACHA, Y., YOSHIKAWA, M. New amides and gastroprotective constituents from the fruit of *Piper chaba*. **Planta Med.** 70(2):152-9, 2004.

MOWRY R, WINKLER CH. The coloration of acidic carbohydrates of bacteria and fungi in tissue sections with special reference to capsules of *Cryptococcus neoformans*, Pneumococci and Staphilococci. **Am J Pathol** ;32:628–9, 1956.

MURAKAMI, S.; ARAI, L.; MURAMATSU, M.; OTOMO, S.; BABA, K.; KIDO, T.; KOZAWA, M. Inhibition of gastric H⁺, K⁺ - ATPase and acid secretion by cassigarol

A, a polyphenol from *Cassia garrettiana* Craib. **Biochem. Pharmacol.**, v. 44, p. 33-37, 1992.

NAKAMURA, K.; OZAWA, Y.; FURUTA, Y. and MIYAZAKI, H. Effects of sodium polyacrylate (PANa) on acute esophagitis by gastric juice in rats. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 32, p. 445-456, 1982.

NAM, S.Y.; KIM, N.; LEE, C.S.; CHOI, K.D.; LEE, H.S.; JUNG, H.C.; SONG, I.S. Gastric mucosal protection via enhancement of MUC5AC and MUC6 by geranylgeranylacetone. **Digestive Diseases and Sciences**, 50(11), 2110-2120, 2005.

NAVICKIENE, H.M.D., ALÉCIO, A.C., KATO, M.J., BOLZANI, V.S., YOUNG, M.C.M., CAVALHEIRO, A.J., FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, 55(6): 621-626, 2000.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Product**, 66, 1022-1037, 2003.

OFMAN, J.J.; ETCHASON, J.; ALEXANDER, W.; STEVENS, B.R.; HERRIN, J.; CANGIALOSE, C.; BALLARD, D.J.; BRATZLER, D.; ELWARD, K.S.; FITZGERALD, D.; CULPEPPER-MORGAN, J.; MARSHALL, B. The Quality of Care for Medicare Patients With Peptic Ulcer Disease. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 95, n. 1, 2000.

OKABE, S., ROTH, L.A., PFEIER, J. A method of experimental penetrating gastric and duodenal, ulcers in rats. **Am J Dig Dis.**, v.16, p. 277–280, 1971.

PARMAR, V.S., JAIN, S.C., BISHT, K.S., JAIN, R., TANEJA, P., JHA, A., TYAGI, O.D., PRASAD, A.K., WENGEL, J., OLSEN, C.E., BOLL, P.M. Phytochemistry of the genus Piper. **Phytochemistry**, 46(4): 597-673, 1997.

PICHE, T.; GALMICHE, J.P. Pharmacological targets in gastro-oesophageal reflux disease. **Disease Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.** v.97, p. 333–341, 2005.

POMMIER, B.; MARIE-CLAIRE, C.; DA NASCIMENTO, S.; WANG, H. L.; ROQUES, B. P.; NOBLE, F. Further evidence that the CCK-2 receptor is coupled to two transduction pathways using site-directed mutagenesis. **Journal of Neurochemistry.** v.85, p.454-461 2003.

PRABHU M.S.; PLATEL, K.; SARASWATHI, G.; SRINIVASAN, K. Effect of orally administered betel leaf (*Piper betle* Linn.) on digestive enzymes of pancreas and intestinal mucosa and on bile production in rats. **Indian J. Exp. Biol.**, 33: 752-756, 1995.

QUÍLEZ, A.; BERENQUER, B.; GILARDONI, G.; SOUCCAR, C.; DE MENDONÇA, S.; OLIVEIRA, L.F.; MARTÍN-CALERO, M.J.; VIDARI, G. Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-*Helicobacter pylori* activities of several fractions isolated from *Piper carpunya* Ruiz & Pav. **Journal of Ethnopharmacol.** 128(3):583-9, 2010.

REITZ, R. Piperaceae. In: Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 4-7, 2003.

REPETTO, M. G.; LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Braz.J.Med.Biol.Res.**, v. 35, n. 5, p. 523-534, 2002.

REVEL, L.; FERRARI, F.; MAKOVEC, F.; ROVATI, L.C.; IMPICCIATORE, M. Characterization of antigastrin activity in vivo of CR 2194, a new R-4-benzamido-5-oxo-pentanoic acid derivative. **Eur. J. Pharmacol.**, 216, 217-24, 1992.

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. **Gastroenterology**, v.77, pg.433-443, 1979.

RODRIGUES, R.V.; LANZMASTER, D.; LONGHI-BALBINOT, D.T.; GADOTTI, V.M.; FACUNDO, V.A.; SANTOS, A.R.S. Antinociceptive effect of crude extract, fractions and three alkaloids obtained from fruits of *Piper tuberculatum*. **Bio. & Pharm. Bull.** 32(10): 1809-1812. 2009.

SACHS, G.; SHIN, J.M.; MUNSON, K.; VAGIN, O.; CHO, Y.M.; YABUKOV, I. **Insights into control of gastric acid secretion from the structure and function of the gastric H,K-ATPase.** In: Modlin I. Gastrin to GERD. 1 Ed. Konstanz: Felsenstein CCCP. 2006.

SCHAAB, E.H.; CROTTI, A.E.M.; IAMAMOTO, B.Y.; KATO, C.M.J.; LOTUFO, L.V.C.; LOPES, N.P. Biomimetic Oxidation of Piperine and Piplartine Catalyzed by Iron(III) and Manganese(III) Porphyrins. **Biol. Pharm. Bull.** 33(5) 912—916, 2010.

SHAY, H. A simple for the uniform production of gastric ulceration in rat. **Gastroenterology.** 5: 43-61, 1945.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 20, p. 519–525, 2004.

SCHUBERT, M.L.; PEURA, D.A. Control of gastric acid secretion in health and disease. **Gastroenterology.** , v.134, n.7, p.1842-1860, 2008.

SEDLAK, J., LINDSAY, R.H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry** 25, 192–205, 1968.

SIEGMUND S.; HAAS, S.; SCHNEIDER, A.; SINGER, M.V. Animal models in gastrointestinal alcohol research-a short appraisal of the different models and their results. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, 17: 519-542, 2003.

VENKATARANGANNA, M.V.; GOPUMADHAVAN, S.; SUNDARAM, S.K.; MITRA. Evaluation of possible mechanism of anti-ulcerogenic activity of UL 409, a herbal preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.63, p. 187-192, 1998.

TAKAGI, E.; OKABE, S.; SAZIKI, R. A new method for the production of chronic

gastric ulcer in rats and effect of several drugs on healing. **Japanese Journal of Pharmacology**. v. 19, p.416-426, 1969.

TARNAWSKI, A. Cellular and molecular mechanism of gastrointestinal ulcer healing. **Dig. Dis. Sci.**, v.50, s.1, p.24-33, 2005.

TSAI I. L., LEE F. P., WU C. C., DUH C. Y., ISHIKAWA T., CHEN J. J., CHEN Y. C., SEKI H., CHEN I. S. **Planta Med.**, 71, 535—542, 2005.

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

WALLACE, J. Mechanisms of Protection and Healing: Current Knowledge and Future Research. **Am J Med**, v.110, p. 19S–23S, 2001.

WALLACE, J.; DICAY, M.; MCKNIGHT, W.; MARTIN, G.R. Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats. **FASEB J**. v. 21, p. 4070–4076, 2007.

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

YUAN, Y.; PADOL, I.T.; HUNT, R.H. Peptic ulcer disease today. **Nature Clin Pract. Gastroent & Hepat.**, v. 3, n.2, 2006.