

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS CELULARES E MOLECULARES
ENVOLVIDOS NA AÇÃO CICATRIZANTE GÁSTRICA DE FRAÇÕES
DO LÁTEX DE *Vasconcellea cundinamarcensis***

Ana Cândida Araújo e Silva

Belo Horizonte

2014

**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS CELULARES E MOLECULARES
ENVOLVIDOS NA AÇÃO CICATRIZANTE GÁSTRICA DE FRAÇÕES
DO LÁTEX DE *Vasconcellea cundinamaricensis***

Ana Cândida Araújo e Silva

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof. Dra. Miriam T. P. Lopes

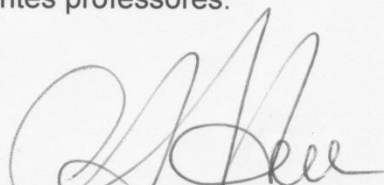
Belo Horizonte

2014

**"AVALIAÇÃO DE MECANISMOS CELULARES E MOLECULARES
ENVOLVIDOS NA AÇÃO CICATRIZANTE GÁSTRICA DE
FRAÇÕES DO LÁTEX DE VASCONCELLEA
CUNDINAMARCENSIS"**

ANA CÂNDIDA ARAÚJO E SILVA

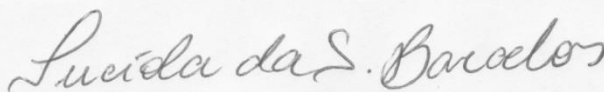
Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 17 de fevereiro de 2014, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



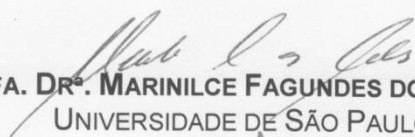
PROFA. DR^a. CLÉLIA AKIKO HIRUMA LIMA
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



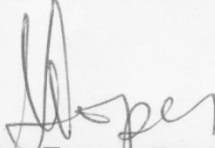
PROF. DR. ENIO FERREIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DR^a. LUCÍOLA DA SILVA BARCELOS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DR^a. MARINILCE FAGUNDES DOS SANTOS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



PROFA. DR^a. MIRIAM TERESA PAZ LOPES
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADORA

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

Belo Horizonte, 17 de fevereiro de 2014

COLABORADORES:

- ✓ Profa. Dra. Maria de Fátima Leite, Departamento de Fisiologia e Biofísica – ICB/UFMG.
- ✓ Profa. Carlos Edmundo Salas Bravo, Departamento de Bioquímica e Imunologia – ICB/UFMG.
- ✓ Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali, Departamento de Patologia Geral – ICB/UFMG.

Trabalho realizado no Laboratório de Substâncias Antitumorais do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Pessoa

***Aos meus amores,
Pai, Mãe, Marisa, Toninho e Neilor.***

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me sempre guiar em todos os caminhos. Por ter me dado oportunidades, colegas e amizades tão maravilhosos que tornaram a realização desse trabalho mais leve e prazerosa.

À Profa. Dra. Miriam Teresa Paz Lopes pela orientação, amizade, confiança e por me encorajar sempre durante esses anos.

Aos professores. Dr. Carlos Edmundo Salas Bravo, Dr. Geovanni Dantas Cassali e Dra. Maria de Fátima Leite, pelos ensinamentos e ajuda em experimentos.

Aos meus pais por serem os meus maiores incentivadores nesse projeto. Muitas vezes acreditaram mais em mim que eu mesma! São meus exemplos de perseverança e fé! Obrigada por acreditarem em mim! Amo muito vocês!

Aos meus irmãos, Marisa e Toninho pelo amor, apoio e amizade incondicionais! A torcida de vocês foi fundamental para eu chegar até aqui!

Ao Neilor, amor da minha vida e grande companheiro nessa caminhada... Obrigada por compartilhar este sonho comigo, pela compreensão e amor. Por me proporcionar muitos momentos felizes em meio a tantas tempestades!

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

Às queridas amigas de república, Vanessa, Rayane, Luciana, Carol, Juliana, Roberta, Hévila e Kirla pelo aconchego familiar, conversas e risadas intermináveis...

Aos queridos LSATs e ex-LSATs: Ariadne, Celso, Cinthinha, Dalton, Denise, Fernanda, Heveline, Imaculada, Katinha, Lawrey, Luciana, Ludmila, Luiz Felipe, Marina, Matheus, Sandrinha e Verlane pela amizade, momentos de alegria e ajuda nos experimentos. O ambiente do nosso laboratório é único, o que tornou as dificuldades mais leves e os objetivos mais fáceis de serem alcançados. Sem vocês seria impossível. São amizades que quero conservar para toda a vida! Obrigada por tudo!

Aos agregados do LSAT: Alysson, Christian, Rubens, Márcio, Afílio, Alano e Luiz, pela amizade e momentos de descontração.

Aos amigos do laboratório de Patologia, Cristina, Diego e Conrado pela ajuda nas análises imunohistoquímicas e momentos de descontração.

Aos colegas do Laboratório de Sinalização de Cálcio, Erika Alvarenga, Pedro, e Clarissa, pela inestimável ajuda com imunofluorescência e imagens no confocal,

além da amizade e momentos de descontração. Obrigada também à Erika Souza e Lídia, pela amizade e as colaborações estabelecidas.

Ao Prof. Ricardo Fujiwara e seu aluno Daniel Menezes pela ajuda com o Real time-PCR.

Aos colegas e ex-colegas do Laboratório de Produtos Naturais, Fábio Lucas, Brisa, Luz Alba e Giselle pela ajuda nos experimentos e alegre convivência.

À pesquisadora Dra. Marcella Faria de Almeida Prado e sua aluna Thamiris pela doação da linhagem celular HUVEC-CS e ajuda nos experimentos no Instituto Butantan - SP.

Aos colegas e professores da Pós-graduação pela disponibilidade, companheirismo e ensinamentos.

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

Aos colegas do GIDE e em especial, ao Prof. Dr. Alan Lane de Melo por disponibilizar a lupa para as análises macroscópicas.

Aos amigos da farmacologia e fisiologia, em especial, Luciana Guzzo, Naty e Paty, pela agradável convivência.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular do SVR/Funed, Felipe, Paulo, Bruno, Lorena, Tássia, Katiussia, Grazi e Nilcéia que me incentivaram e apoiaram muito na fase final desse projeto.

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

À Capes, FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Abreviaturas	xii
Lista de Figuras	xv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO	19
1.1. <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i>	19
1.2. Aspectos anatômicos e fisiológicos do estômago	26
1.3. Úlcera péptica	29
2. JUSTIFICATIVA	42
3. OBJETIVOS	43
3.1. Geral	43
3.2. Específicos	43
4. MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1. Material	44
4.1.1. Biológicos	44
4.1.2. Reagentes e solventes	44
4.1.3. Principais soluções	46
4.1.3.1. Obtenção e caracterização das frações	46
4.1.3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida	47
4.1.3.3. Zimografia	49
4.1.3.4. Ensaio in vivo	50
4.1.3.5. Cultura celular, imunofluorescência e Western Blotting	50
4.1.4. Equipamentos	53
4.1.5. Diversos	54
4.2. Métodos	55
4.2.1. Obtenção e caracterização bioquímica das frações P1G10, CMS1 e CMS2	55
4.2.1.1. Determinação da atividade amidásica	56
4.2.1.2. Estimativa da concentração de proteína	57
4.2.1.3. Inibição das frações por iodoacetamida	57
4.2.1.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante	57
4.2.1.5. Coloração do gel por azul de coomassie	58
4.2.1.6. Determinação da massa molecular	58
4.2.2. Avaliação in vivo	59
4.2.2.1. Animais	59
4.2.2.2. Avaliação do efeito cicatrizante gástrico de CMS1 e CMS2	59
4.2.2.3. Avaliação da importância da atividade proteolítica no efeito cicatrizante das frações	59
4.2.2.4. Avaliação macroscópica das lesões gástricas	60
4.2.2.5. Avaliação dos efeitos de CMS1 e CMS2 sobre eventos e fatores envolvidos na cicatrização gástrica	60
4.2.2.5.1. Análise histológica	61
4.2.2.5.2. Análises imunohistoquímica e morfométrica da proliferação celular e angiogênese	61
4.2.2.5.3. Zimografia	62
4.2.2.5.4. Avaliação da expressão de fatores envolvidos na cicatrização gástrica por Real Time PCR quantitativo	63

4.2.3. Avaliação <i>in vitro</i>	64
4.2.3.1. Cultivo celular	64
4.2.3.2. Avaliação da atividade mitogênica de CMS1 e CMS2.....	65
4.2.3.2.1. Incorporação de [³ H] Timidina	65
4.2.3.2.2. Incorporação de BrdU ao DNA	65
4.2.3.3. Avaliação do efeito das proteases sobre a migração celular.....	66
4.2.3.4. Avaliação do efeito das frações sobre a polimerização de actina e formação de fibras de estresse em células epiteliais gástricas.....	67
4.2.3.5. Avaliação do papel de MAPK e EGF-R nos efeitos proliferativos e de migração de CMS1 e CMS2.....	67
4.2.3.6. Western Blotting	68
4.3. Análises Estatísticas	69
5. RESULTADOS	70
5.1. Obtenção e caracterização das frações	70
5.2. Avaliações <i>in vivo</i>	73
5.2.1. Atividade cicatrizante de CMS1 e CMS2 sobre úlceras gástricas induzidas por ácido acético	73
5.2.2. Influência da atividade proteolítica de CMS1 e CMS2 em seu efeito cicatrizante gástrico.....	75
5.2.3. Efeitos de CMS1 e CMS2 sobre eventos e fatores envolvidos na cicatrização gástrica.....	77
5.2.3.1. Análise histológica.....	77
5.2.3.2. Análise imunohistoquímica e morfométrica	80
5.2.3.2.1. Proliferação Celular	80
5.2.3.2.2. Angiogênese	82
5.2.3.3. Avaliação do efeito das frações na atividade de MMP-2 em úlceras gástricas induzidas pelo ácido acético.....	84
5.2.3.4. Efeito das frações sobre a expressão gênica de fatores envolvidos na cicatrização gástrica	85
5.3. Avaliação <i>in vitro</i>	91
5.3.1. Efeito mitogênico de CMS1 e CMS2 sobre células gástricas e endoteliais e a importância da atividade proteolítica	91
5.3.2. Efeitos de CMS1 e CMS2 sobre a migração de células epiteliais gástricas e endoteliais	93
5.3.3. Importância da atividade proteolítica no estímulo de migração de células epiteliais gástricas por CMS1 e CMS2	96
5.3.4. Efeito de CMS1 e CMS2 sobre a polimerização de actina em células epiteliais gástricas	98
5.3.5. Participação das vias das MAPK no efeito mitogênico e migratório de CMS1 e CMS2 sobre células epiteliais gástricas	100
6. DISCUSSÃO	106
7. CONCLUSÃO.....	121
8. REFERÊNCIAS.....	122
9. APÊNDICE	135
10. ANEXOS	137

Abreviaturas

AGS = Linhagem de adenocarcinoma gástrico humano
AMPc = Adenosina 3',5'monofosfato cíclico
ANOVA = Análise de variância
ATP = Adenosina 5-trifosfato
bFGF = Fator de crescimento básico de fibroblastos
CCK2 = Receptor de colecistocinina do tipo 2
CDC47 = Marcador de proliferação epitelial
cDNA = DNA complementar
CEBIO = Centro de Bioterismo
Célula D = Célula secretora de somatostatina
Célula G = Célula secretora de gastrina
COX = Ciclooxigenase
COX-1 = Ciclooxigenase do tipo 1
COX-2 = Ciclooxigenase do tipo 2
DAINEs = Drogas antiinflamatórios não-esteroidais
DMEM = Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco
e.p.m. = Erro padrão da média
ECL = Células enterocromafins like
ECM = *Extracellular matrix* (matriz extracelular)
EGF = Fator de crescimento epidermal
EGF-R = Receptor do fator de crescimento epidermal
ERK-1 = *Extracellular-regulated kinases 1*
ERK-2 = *Extracellular-regulated kinases 2*
EROs = Espécies reativas de oxigênio
F12-K = Meio de cultura nutriente F12 modificado por Kaingh
FAK = *Focal adhesion kinase* (quinase de adesão focal)
FBS = *Fetal bovine serum* (soro fetal bovino)
GPCR = *G protein coupled receptor* (receptor acoplado a proteína G)
GSH = Glutationa na forma reduzida
³H = Trício
H⁺ = Íon hidrogênio

H⁺/K⁺-ATPase = H⁺/K⁺-adenosina trifosfatase (bomba de prótons)
H2 = Receptor de histamina do tipo 2
HE = Corante hematoxilina/eosina
HGF = Fator de crescimento do hepatócito
HUVEC-CS = Linhagem de células endoteliais de cordão umbilical humano
I.L.U = Índice de Lesão Ulcerativa
IAA = Iodoacetamida
ICB = Instituto de Ciências Biológicas
IL-1a = Interleucina 1 a
IL-1b = Interleucina 1 b
IL-6 = Interleucina 6
M1 = Receptor muscarínico do tipo 1
M3 = Receptor muscarínico do tipo 3
MAPK = *Mitogen activated protein kinase*
MMP = Metaloproteinase
mRNA = RNA mensageiro
MT-MMP = Metaloproteinase tipo membrana
NO = Óxido nítrico
p.o. = administração *per oros*
PARs = Receptores ativados por proteases
PCR = *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia de polimerase)
PDGF = Fator de crescimento derivado de plaquetas
PECAM-CD31 = Molécula de adesão plaqueta-célula endotelial
pERK = Forma fosforilada de ERK
PGE2 = Prostaglandina do tipo E₂
PGs = Prostaglandinas
PKC = Proteína quinase C
PMN = Polimorfonucleares
RAN = Ranitidina
SHs = Grupos sulfidríla
SST2 = Receptor de somatostatina do tipo 2
TGF-α = Fator de crescimento transformador α
TIMP = Inibidor tecidual de metaloproteinase

TNF- α = Fator de necrose tumoral α

UFMG = Universidade Federal de Minas Gerais

VEGF = Fator de crescimento endotelial vascular

VEGF-R1 = Receptor do fator de crescimento endotelial vascular 1

VEGF-R2 = Receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2

As demais abreviaturas e siglas serão explicadas quando forem citadas pela primeira vez no texto.

Lista de Figuras

Figura 1: <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i>	20
Figura 2: Representação esquemática dos componentes e processos envolvidos na cicatrização da úlcera gástrica.. ..	31
Figura 3: Esquema da ativação da via das MAPK através de interação de fatores de crescimento com receptores tirosina-quinases e por clivagem proteolítica de PAR..	37
Figura 4: Perfis cromatográficos de frações do látex de <i>V. cundinamarcensis</i>	71
Figura 5: Inibição da atividade proteolítica de CMS1 e CMS2 com IAA.....	72
Figura 6: Avaliação da atividade cicatrizante gástrica de CMS1 e CMS2.	74
Figura 7: Comparação do efeito cicatrizante gástrico das frações CMS1 e CMS2 com P1G10 e com o medicamento de referência, ranitidina, em úlceras induzidas por ácido acético.. ..	75
Figura 8: Avaliação da importância da atividade proteolítica no efeito cicatrizante gástrico de CMS1 e CMS2.....	76
Figura 9: Fotomicrografias de cortes histológicos de estômago de ratas Wistar com úlcera induzida por ácido acético e tratadas com P1G10, CMS1 e CMS2 corados com hematoxilina e eosina.....	78
Figura 10: Fotomicrografias de cortes histológicos de estômago de ratas Wistar com úlcera induzida por ácido acético e tratadas com P1G10, CMS1 e CMS2 corados com tricrômico de Gomori.	79
Figura 11: Avaliação da proliferação celular através da imunolocalização de CDC-47	81
Figura 12: Avaliação da angiogênese através da imunolocalização de PECAM-1/CD31	83
Figura 13: Atividade de MMP2 em estômagos de animais portadores de úlceras induzidas por ácido acético e tratados com as frações	84
Figura 14: Expressão gênica de fatores de crescimento em estômagos de animais portadores de úlceras induzidas por ácido acético e tratados com as frações	87
Figura 15: Expressão gênica de COX-1, COX-2 em estômagos de animais portadores de úlceras induzidas por ácido acético e tratados com as frações.	89
Figura 16: Expressão gênica de MMP2 e seu inibidor TIMP2 em estômagos de animais portadores de úlceras induzidas por ácido acético e tratados com as frações.	90

Figura 17: Efeito proliferativo de CMS1 e CMS2 sobre células AGS e HUVEC-CS..	92
Figura 18: Efeito migratório de CMS1 e CMS2 sobre células AGS, <i>in vitro</i>	94
Figura 19: Efeito migratório de CMS1 e CMS2 sobre células HUVEC-CS, <i>in vitro</i> ...	95
Figura 20: Importância da atividade proteolítica de CMS1 e CMS2 para seu efeito migratório sobre células AGS, <i>in vitro</i>	97
Figura 21: Efeito de CMS1 e CMS2 sobre a polimerização de G-actina em F-actina	99
Figura 22: Efeito das frações CMS1 e CMS2 sobre a fosforilação de ERK 1/2 em células AGS.....	100
Figura 23: Importância da atividade proteolítica sobre a fosforilação de ERK1/2 por CMS1 e CMS2, em células AGS.....	101
Figura 24: Avaliação da participação da via das MAPK no efeito proliferativo e migratório de CMS1 e CMS2 sobre células epiteliais gástricas.	103
Figura 25: Avaliação da participação de EGF-R no efeito proliferativo e migratório de CMS1 e CMS2 sobre células epiteliais gástricas.	105

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Tabela de avaliação de lesões gástricas.....	135
Tabela 2 - Primers utilizados para a PCR quantitativa	136

RESUMO

P1G10 é uma fração rica em cisteíno proteases, obtida do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis*, através de separação cromatográfica (Sephadex G10). Em estudos anteriores, se demonstrou a atividade cicatrizante gástrica dessa fração, em úlceras induzidas por ácido acético em ratos, a qual foi dependente de sua atividade proteolítica e associada a um aumento de proliferação celular e angiogênese. Dando continuidade ao estudo, neste trabalho, avaliamos os efeitos cicatrizantes gástricos de subfrações de P1G10, CMS1 e CMS2, assim como possíveis mecanismos envolvidos. CMS1 1 mg/kg e CMS2 30 mg/kg apresentaram atividade cicatrizante em lesões causadas pelo ácido acético, sendo os efeitos semelhantes aos obtidos para P1G10 10 mg/kg e Ranitidina 100 mg/kg, e independentes da atividade proteolítica de ambas. Análises histológicas/imunohistoquímicas mostraram que o tratamento com P1G10, CMS2 e em especial, CMS1, estimula a proliferação celular nos bordos das lesões, a angiogênese e o remodelamento tecidual. Esses efeitos se relacionam a alterações na expressão de fatores envolvidos na cicatrização; CMS1 estimulou significativamente a transcrição gênica de bFGF, VEGF e COX-1, reduziu as de COX-2 e TIMP-2 e aumentou a expressão gênica/atividade de MMP-2. Já P1G10 e CMS2 aumentaram a quantidade de mRNA para EGF e VEGF, reduziram a de COX-2 e TIMP-2, mas não alteraram MMP-2. Sobre linhagens celulares estabelecidas epiteliais (AGS) e endoteliais (HUVEC-CS) as subfrações exerceram atividade proliferativa e efeito estimulador da migração celular, envolvendo a ativação do sistema Ras/Raf/MEK/ERK e a participação de EGF-R, em AGS. A atividade proteolítica das frações influencia no seu efeito proliferativo, mas na migração apenas para CMS2, essa propriedade foi relevante. As frações também promovem modificações no citoesqueleto, estimulando a polimerização de actina e a formação de fibras de estresse em AGS. Assim, CMS1 e CMS2 apresentam interessantes atividades cicatrizantes gástricas, sendo CMS1 a mais potente e a que promove efeitos pró-cicatrizantes mais pronunciados.

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

ABSTRACT

P1G10 is a cysteine protease rich fraction from *Vasconcellea cundinamarcensis* latex obtained through chromatographic separation in Sephadex G10 column. Previous studies demonstrated the gastric healing activity of P1G10 in lesions induced by acetic acid in rats. The effects were dependent on its proteolytic property and related to an increase of cell proliferation and angiogenesis. Continuing the pharmacological studies of *V. cundinamarcensis* latex, here, we evaluated the gastric healing properties of P1G10 subfractions, CMS1 e CMS2, as well as some pathways involved. Both fractions – CMS1 at 1mg/kg and CMS2 at 30 mg/kg – display healing activities in lesions caused by acetic acid, with similar intensity to P1G10 10 mg/kg and Ranitidine 100 mg/kg, and were independent on their proteolytic action. Histological and immunohistochemical analysis showed higher proliferation, angiogenesis and tissue remodeling in gastric lesions treated with P1G10, CMS2 and, in special, CMS1. These effects were related to a modulation on growth factors and mediators gene expression by the fractions; CMS1 increased mRNA copies for bFGF, VEGF and COX-1, and reduced COX-2 and TIMP-2 ones. Both MMP-2 gene expression and activity were increased by CMS1 treatment. P1G10 and CMS2 increased EGF and VEGF transcripts, reduced COX-2 and TIMP-2, but did not alter expression/activity of MMP-2. *In vitro* investigation confirmed the proliferative action of CMS1 and CMS2 on epithelial (AGS) and endothelial (HUVEC-CS) cells, beyond it demonstrated a cell migratory stimulus by the fractions. The proliferative and migratory effects by CMS1 and CMS2 were dependent on the activation of Ras/Raf/MEK/ERK pathway, and seem to involve the participation of EGFR. The proteolytic activity is important for proliferative actions by the fractions, however it just influence the migration activity of CMS2. Both fractions promote cytoskeleton modifications in AGS cells through actin polymerization and stress fiber formation. As completion, CMS1 and CMS2 display interesting gastric healing activities, however CMS1 showed a greater potency comparing to CMS2 or P1G10 and more intensive pro-healing effects.

Keywords: *Caricaceae*, cysteine proteinase, antiulcer effect.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Vasconcellea cundinamarcensis*

Já há alguns anos, nosso grupo de pesquisa vem caracterizando bioquímica e farmacologicamente frações obtidas do látex da espécie *Vasconcellea cundinamarcensis* V. M. Badillo (*syn. Carica candamarcensis*). Trata-se de uma planta nativa da América do Sul, localizada principalmente na região Andina, a qual se estende do Panamá até o Chile, sendo encontrada predominantemente em altitudes superiores a 1000 metros. É pertencente à família *Caricaceae* e popularmente conhecida como “mountain papaya” ou “mamão da montanha” e alguns sinônimos científicos também podem ser encontrados, como *Carica candamarcensis*, *Carica pubescens*, *Carica cundinamarcensis*, *Carica chiriquensis* e *Vasconcellea cestriflora* (WALRAEVENS et al., 1999).

Na Figura 1 estão mostradas algumas partes da planta, que se caracteriza por apresentar um tronco grosso geralmente ramificado (Figura 1A), medindo até 10 m de altura e contém uma coroa compacta de folhas na sua parte terminal ou nas extremidades das ramificações. O fruto é elipsoide, de coloração amarelada quando madura (Figura 1B), com cinco depressões largas e longitudinais (Figura 1C), mede de 5 a 15 cm de comprimento, sendo sua polpa delgada, aquosa, aromática e comestível somente após o cozimento. A partir de incisões no epicarpo de frutos imaturos, pode ser obtido o látex, que apresenta com coloração de branco à transparente e consistência pegajosa (LEON, 1987). É rico em carboidratos, vitaminas, sais minerais e peptídeos de baixo peso molecular, além de cisteíno proteases de alta atividade proteolítica. Essas proteases possuem uma cisteína no sítio ativo e seu mecanismo de catálise envolve a participação de um grupamento tiólico. A família de cisteíno proteases C1 é a mais numerosa família destas proteases e compreende as enzimas semelhantes estruturalmente à papaína, obtida de *Carica papaya* (BAEZA et al., 1990; BRAVO et al., 1994).

Supõe-se que a função biológica das proteases que fazem parte do látex de *V. cundinamarcensis* seja a de fornecer proteção ou promover a cicatrização do fruto após injúrias (AZARKAN et al., 2004). Nesse processo ocorre a formação do coágulo, envolvendo o processamento e ativação de enzimas em sequência, de

maneira semelhante ao processo de coagulação e cicatrização em animais (MOUTIM et al., 1999).



Figura 1: *Vasconcellea cundinamarcensis*. A – Inflorescências; B – Fruto maduro; C – Frutos imaturos. Fonte: Ecocrop e Flickr.

Caracterização bioquímica e farmacológica do látex de *V. cundinamarcensis*

Através de separação cromatográfica em coluna Sephadex G10, a partir do látex são obtidos 2 frações com picos bem definidos, denominadas P1G10 e P2G10. A primeira apresenta grande quantidade de cisteíno proteases, algumas das quais apresentam atividade proteolítica 6 vezes maior que a da papaína, além de outras características diferentes, tais como: pH ótimo, ponto isoelétrico e reatividade imunológica (GRAVINA et al., 1994; BRAVO et al., 1994; SILVA et al., 2003).

Em um passo subsequente, a fração P1G10 é submetida a uma etapa de purificação cromatográfica em coluna de troca iônica CM-Sephadex, obtendo-se 2 subfrações principais, CMS1 e CMS2, que se diferenciam pelos níveis de atividade proteolítica, número de proteases que as compõem e atividades biológicas. Quando submetidas à cromatografia em coluna Mono S são isoladas 3 proteases a partir de CMS1 (CMS1MS1-3) e 5, a partir de CMS2 (CMS2MS1-5). As proteases possuem peso molecular próximo de 23 kDa, mas diferem em preferência de substrato e atividade proteolítica (PEREIRA et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2008).

A partir do conhecimento de mecanismos envolvidos na regeneração do tecido vegetal de plantas da família *Caricaceae*, onde a ativação e processamento

de proteases ocorrem de maneira bem similar ao processo da coagulação sanguínea e cicatrização em animais, vimos a possibilidade de o látex apresentar atividade semelhante a um fator de crescimento em sistemas animais. Assim, foram propostos a caracterização bioquímica e o estudo da atividade mitogênica de frações e proteases purificadas do látex de *V. cundinamarcensis*.

Atividade proliferativa in vitro

Em estudos anteriores, foi demonstrado que uma fração contendo diversas cisteíno proteases provenientes do látex de *V. cundinamarcensis* foi capaz de estimular a proliferação de células da linhagem L929 (SILVA et al., 2003). Em estudos mais recentes, foram demonstrados os efeitos mitogênicos de 2 proteases isoladas de CMS2, CMS2MS2 e CMS2MS3. A primeira estimulou a proliferação celular acima de 50% quando comparado ao controle em fibroblastos, osteoblastos e insulinooma. O efeito mitogênico foi observado com aproximadamente 1 nM de enzima, sendo independente de sua atividade proteolítica. Verificou-se, ainda, que o estímulo proliferativo é mediado pela ativação da via das MAP-quinases (MAPK), envolvendo a ativação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGF) – que, provavelmente, se deve à liberação de fatores de crescimento das células com posterior atuação autócrina destas substâncias – e a participação da fosfolipase C (PLC) (GOMES et al., 2009).

Atividade cicatrizante cutânea

Na literatura são descritas proteases utilizadas como agentes cicatrizantes. Preparações contendo colagenase e/ou papaína, por exemplo, têm sido utilizadas como terapia principal ou adjuvante para tratar feridas crônicas de difícil cicatrização, como queimaduras, úlceras de pressão e venosas. Essas proteases promovem o debridamento enzimático das lesões, removendo o tecido necrosado, melhorando a oxigenação e favorecendo a reepitelização do leito da lesão (AYELLO & CUDDIGAN, 2004; ROSENBERG et al. 2004). Uma vez que a fração P1G10 possui cisteíno proteases estruturalmente relacionadas a papaína, com alta atividade

proteolítica e com ação mitogênica sobre fibroblastos, foi proposta a avaliação para uma possível atividade cicatrizante cutânea da fração P1G10.

O primeiro modelo de estudo utilizado foi o de escoriações em camundongos *Hairless*, onde o tratamento tópico com P1G10 a 0,1% em creme Polawax® aumentou a taxa de cicatrização em até 600% em comparação aos animais controles, sendo também mais eficaz que a papaína, que promoveu uma melhora de 66% na taxa de cicatrização (MELLO et al., 2006). Nesse modelo, verificou-se ainda que a fração estimula a proliferação celular e que sua atividade proteolítica não é essencial para a ação cicatrizante (LEMOS et al., 2011).

O efeito cicatrizante de P1G10 também foi avaliado sobre lesões mais profundas, como as excisionais e as queimaduras. Nos dois modelos, o tratamento com a fração à 0,05 e 0,1% respectivamente, reduziu o período de reepitelização das feridas em relação ao controle. Análises histológicas mostraram uma redução da área do tecido de granulação, do infiltrado inflamatório, além de aumento da deposição e organização do colágeno (GOMES et al., 2010; FREITAS, 2011). Estudos utilizando a fração com a atividade proteolítica inibida sugeriram que na cicatrização de lesões excisionais, essa propriedade seria relevante para o efeito cicatrizante (FREITAS, 2011).

Uma das etapas mais importantes na cicatrização é a neoformação vascular ou angiogênese (MORGAN & NIGAM, 2013). Para avaliar uma possível ação angiogênica de P1G10, implantes de polietileno foram afixados na região subcutânea dorsal de camundongos *Swiss* e, durante 8 dias, soluções da fração a 0,1 e 1% foram aplicadas intraesponja. O conteúdo de hemoglobina presente nos implantes foi determinado e verificou-se que P1G10 a 0,1% promoveu um aumento de 57% na concentração de hemoglobina em relação ao controle. Por outro lado, a concentração de 1% provocou uma redução de 35%, o que pode ser explicado pela sobreposição da atividade proteolítica em relação à atividade angiogênica (MELLO et al., 2008).

Devido aos resultados já obtidos indicando a fração P1G10 como um agente promissor para o reparo tecidual, estudos clínicos de Fase I e um estudo inicial de Fase II utilizando esta fração, também, já foram desenvolvidos. A Fase I realizada com indivíduos hígidos (n = 25), objetivando verificar a segurança e a inocuidade da fração, mostrou ausência de evidências clínicas e laboratoriais de toxicidade de

P1G10 0,1%. Resultados preliminares de ensaio clínico de Fase II (n=10), com o objetivo de avaliar a taxa de cicatrização em voluntários portadores de úlceras de pressão e venosas, mostraram que P1G10 0,1% reduziu os valores de comprimento (51,0%), largura (67,0%) e profundidade (37,0%) das feridas, enquanto que apenas os valores de profundidade das feridas tratadas com sulfadiazina de prata 1,0% (tratamento padrão) foram diminuídos (74,0%) (GOMES, 2009). Atualmente, está sendo dada continuidade ao estudo de Fase II, com financiamento aprovado pelo CNPq/MS Processo 563935/2010-3.

Atividade antitumoral e antimetastática

Paralelamente aos estudos cicatrizantes, também vem sendo avaliada a atividade antitumoral de P1G10 e suas subfrações. Em ensaios com modelos murinos de melanoma B16-F1 e B16-F10, e tumor de Ehrlich, P1G10 demonstrou considerável efeito antitumoral e antimetastático. Uma redução de aproximadamente 88% na massa do tumor foi observada para os animais portadores de melanoma B16-F1, quando tratados com 5 mg/Kg de P1G10 e, ainda, uma redução de 52 % da celularidade presente no líquido ascítico, comparado ao grupo controle, para os animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich (FIGUEIREDO, 2009; VIANA, 2010). Foi observado que P1G10 reduziu a ocorrência (83%) e número de pontos metastáticos (82%) no pulmão de camundongos portadores de melanoma B16-F10 e, ainda, diminuiu em 55% os níveis tumorais de VEGF, em relação ao grupo controle, sugerindo uma provável ação antiangiogênica local da fração (FIGUEIREDO, 2009).

Em um estudo mais recente, DITZ et al. (no prelo) evidenciaram a atividade antimetastática de P1G10 e CMS2 (ambas a 5 mg/kg) em modelo de carcinoma de cólon (CT26-WT) e de CMS2 em melanoma B16-F10. Esse efeito parece ser mediado por uma atividade citotóxica dessas frações, através do aumento da apoptose caspase-dependente e da diminuição da adesão celular das células tumorais à matriz extracelular (ECM – *Extracellular Matrix*). Em todo o estudo, CMS-1 não demonstrou qualquer efeito significativo. Assim, verificou-se que as proteases contidas em CMS-2 são as responsáveis pela ação antitumoral/antimetastática de P1G10.

Estudos farmacocinéticos e de toxicidade

Com intuito de avaliar alguns parâmetros farmacocinéticos sistêmicos da fração P1G10, a mesma foi marcada com o isótopo radioativo ^{99m}Tc . Em camundongos Swiss tratados com a fração (1 mg/kg) por via e.v. e s.c. observou-se maior acúmulo de P1G10 em órgãos relacionados a excreção de fármacos, como o fígado, rim e bexiga. A fração quando administrada p.o. apresentou baixa biodisponibilidade (8,3%), com maior retenção de P1G10 no estômago e intestinos, o que se correlaciona com a natureza proteica, a alta massa molecular e a hidrofiliabilidade de P1G10.

Na avaliação da toxicidade tóxica de P1G10, foram feitas aplicações da fração nas concentrações de 0,1; 1 e 10% (p/v) incorporado em creme Polawax[®] no dorso de camundongos *Hairless*. Após um período de 10 dias de tratamento com 0,1 e 1% não foi observada qualquer alteração que pudesse ser caracterizada como efeito tóxico. Nos animais tratados com P1G10 10%, observou-se uma vermelhidão difusa no local da aplicação, caracterizando uma resposta inflamatória leve. As avaliações da toxicidade tóxica subcrônica e crônica de P1G10 0,1% foram realizadas após três e seis meses de tratamento, respectivamente. As massas do baço, estômago, fígado, pulmão e rim não sofreram alterações durante o tratamento e as análises histológicas do fígado, pulmão e da pele não mostraram diferenças em relação ao grupo controle correspondente (LEMOS et al., 2011).

Estudos toxicológicos sistêmicos demonstraram que as atividades de enzimas do citocromo P450, o consumo alimentar, o ganho de peso corporal, o peso do fígado e os valores de proteínas totais microssomais não foram alterados pela administração oral de P1G10 (334 mg/kg/dia durante 6 dias consecutivos, totalizando nesse período, 2 g/kg, p.o.) (VILLALBA et al., 2007). A avaliação da atividade mutagênica também foi realizada pelo teste de Ames (MARON & AMES, 1983) e da formação de Micronúcleos *in vivo* (OECD 474, 1997). O primeiro foi realizado com um painel de cepas de *Salmonella typhimurium* (TA 97, 98, 100 e 102) e os resultados mostraram que P1G10 não apresenta efeito mutagênico nas concentrações de 0,1 e 1%. No teste de Micronúcleos, P1G10 foi administrada nas doses de 5 e 10 mg/kg via *i.p.* a camundongos Swiss e após 36 h células da medula óssea desses animais foram avaliadas. A análise mostrou que P1G10 não apresenta

genotoxicidade, uma vez que não provocou micronucleação maior que o controle utilizado (VILLALBA, 2010).

Atividade antiúlcera

As lesões crônicas cutâneas e as úlceras gástricas têm em comum a natureza crônica de seu desenvolvimento e os processos envolvidos na cicatrização (SCHULTZ & WYSOCKI, 2008). Assim, a partir dos resultados obtidos sobre a cicatrização cutânea, a fração P1G10 foi submetida à avaliação das atividades protetora e cicatrizante gástricas. Na primeira, P1G10 foi eficaz em proteger o estômago de ratos contra lesões induzidas por indometacina, atingindo na maior dose testada (10 mg/kg) um efeito similar aos dos medicamentos controle (ranitidina – 100 mg/kg e omeprazol – 10 mg/kg) (MELLO et al., 2008). Nas lesões produzidas pelo etanol e ligadura pilórica, o tratamento com a fração (10 mg/kg) inibiu o aparecimento das ulcerações em 40% e 64%, respectivamente, em relação ao controle. Já em animais submetidos à indução de úlceras por estresse, P1G10, em todas as doses testadas (0,1-10 mg/kg) foi eficaz em proteger em mais de 80% (ARAUJO E SILVA et al., no prelo).

No estudo de mecanismos de ação da fração, foi demonstrado que P1G10 promove um aumento significativo do pH do suco gástrico, reduz a acidez total e os níveis séricos de gastrina, evidenciando uma atividade anti-secretora ácida. A atividade péptica também se encontra diminuída nos animais tratados com a fração, que foi ainda capaz de aumentar os níveis gástricos de muco, de prostaglandina E2 (PGE2) e de grupos sulfidrílicos não proteicos. Na avaliação da participação de óxido nítrico (NO) e da importância da atividade proteolítica no efeito gastroprotetor de P1G10, verificou-se que esta atividade independe da produção do mediador e de sua ação proteolítica (ARAUJO E SILVA, et al., no prelo).

Na avaliação da atividade cicatrizante gástrica, verificou-se que a administração *p.o.* de P1G10 (10 mg/kg), reduziu o tamanho e a gravidade das úlceras induzidas por ácido acético, mostrando uma aceleração no processo de cicatrização das lesões gástricas. O efeito observado foi similar ao grupo tratado com omeprazol 10 mg/kg (63%) e superior ao apresentado pela ranitidina 100 mg/kg (52%) (MELLO et al., 2008). Estudos posteriores demonstraram que a ação

cicatrizante de úlceras gástricas da fração P1G10 é dependente de sua atividade proteolítica, sugerindo a participação de mecanismos dependentes da ativação de receptores ativados por proteases (PAR – *Proteinase activated receptors*). Contudo, a avaliação da proliferação celular e da angiogênese promovidas pela fração *in vivo*, mostrou que a atividade proteolítica da mesma não é importante nesses eventos, reduzindo as chances de um mecanismo envolvendo a ativação de PAR por clivagem pelas proteases, não descartando, entretanto, a possibilidade da ação direta de determinadas sequências presentes na estrutura das proteases.

Diante desses resultados, reconhecemos ser necessário o estudo mais detalhado do efeito cicatrizante de frações do látex de *V. cundinamarcensis*, em especial quanto a vias envolvidas no mesmo. Para isso, conhecimentos teóricos sobre os mecanismos de gênese e cicatrização de úlceras gástricas são fundamentais. A seguir, serão feitas considerações nesse sentido.

1.2. Aspectos anatômicos e fisiológicos do estômago

O estômago pode ser anatomicamente dividido em quatro regiões revestidas por mucosa: cárdia, fundo, corpo e antro (KUTCHAI, 1996). Essas regiões são limitadas por dois esfíncteres: esofágico inferior, na porção proximal do estômago; e o pilórico, na porção distal do estômago. Funcionalmente, a mucosa gástrica pode ser dividida em três regiões glandulares: cárdia, oxíntica e pilórica. Na primeira, localizada logo abaixo do esfíncter esofágico inferior, predominam células glandulares secretoras de muco. A mais extensa, a região oxíntica, é o sítio da secreção de ácido clorídrico, sendo formada por células parietais, secretoras de ácido clorídrico; células principais, secretoras de pepsinogênio; células D, produtoras de somatostatina e células enterocromafins “like” (ECL), secretoras de histamina. Já a região pilórica é composta pelos mesmos tipos celulares que as glândulas oxínticas, exceto as células principais e incluem as células G produtoras de gastrina (JAIN et al, 2006).

Secreção ácida: papel e regulação

Uma das mais importantes funções do estômago é a produção de ácido hidrocloreídrico, que facilita a digestão de proteínas pela pepsina, a absorção de ferro, cálcio, vitamina B12, e previne o crescimento de patógenos e a infecção entérica. O controle intracelular da secreção ácida é dado pela atividade da H^+/K^+ ATPase, presente nas células parietais. Nas células parietais em repouso, esta enzima é estocada em tubovesículas, que na ocorrência de estímulo por diferentes secretagogos, fundem com a membrana apical dos canalículos da célula parietal, iniciando a liberação do ácido clorídrico, através da troca de íons H^+ e K^+ . Quando o estímulo é cessado, as enzimas são recicladas novamente para o compartimento citoplasmático (HOU & SCHUBERT, 2006).

Os principais secretagogos do ácido gástrico são a acetilcolina (ach), um neurotransmissor parassimpático vagal, a histamina, liberada das células ECL e a gastrina, liberada das células G antrais que atuam sobre receptores muscarínicos (M3), CCKB e H2, respectivamente, localizados na membrana basolateral da célula parietal. Quando ativados, promovem o aumento de Ca^{2+} intracelular (ach e gastrina) ou de AMP cíclico (AMPc) (histamina) que levam à translocação da H^+/K^+ ATPase e dos canais para cloro para a superfície celular apical, resultando em secreção ácida para o lúmen (SCHUBERT, 2011).

Outros peptídeos como a somatostatina e a galanina reduzem a secreção ácida, agindo, sobretudo, inibindo a liberação de gastrina. A somatostatina, também, atua de forma direta sobre a célula parietal, sendo suas ações mediadas por receptores do tipo SST2 (HOU & SCHUBERT, 2006). Outras substâncias com efeito inibitório sobre a secreção ácida são as prostaglandinas, que diminuem a secreção ácida pelo bloqueio da síntese de AMPc, estimulado por histamina dentro da célula parietal (WALLACE, 2008; AL-JIBOURY & KAUNITZ, 2012).

Fatores protetores da mucosa gástrica

A mucosa gástrica representa uma barreira dinâmica, permitindo a passagem de certos íons e moléculas para a circulação e restringindo a entrada de outros. Essa proteção não é realizada apenas por uma barreira anatômica, mas por uma

série de mecanismos de defesa consecutivos que mantêm a integridade da mucosa (WALLACE, 2008). Na primeira linha de defesa está a barreira muco-bicarbonato. O epitélio gástrico é recoberto por uma contínua camada de muco, o qual adere na superfície da mucosa, e juntamente com o bicarbonato secretado, serve como uma barreira física e química entre o lúmen gástrico e a superfície das células apicais, protegendo contra a ação lesiva causada pelo ácido e a pepsina (LAINE, TAKEUCHI, & TARNAWSKI, 2008). O muco se apresenta como um gel transparente com atividade antioxidante e de natureza altamente hidrofóbica, reduzindo assim, a permeabilidade do muco aos íons H^+ e a difusão de macromoléculas do lúmen para a superfície epitelial, incluindo as pepsinas (ALLEN & FLEMSTRÖM, 2005).

Outros importantes fatores de proteção epitelial são os grupos sulfidrílicos (SHs), que funcionam como um sistema antioxidante contra radicais livres. A glutathiona reduzida (GSH), uma espécie de SH, atua como uma varredora de espécies reativas do oxigênio (EROs) e substâncias tóxicas ingeridas com a comida ou produzidas no trato gastrointestinal devido a um processo inflamatório (REPETTO & LLESUY, 2002, TARIQ et al., 2006). Além disso, são importantes na produção e manutenção do muco gástrico, uma vez que suas subunidades glicoprotéicas são unidas entre si por pontes dissulfeto que, uma vez reduzidas, tornam o muco hidrossolúvel (AVILA et al., 1996).

A defesa gástrica ainda conta com as prostaglandinas, que são ácidos graxos modificados produzidos localmente por ação das cicloxigenases 1 (COX-1; constitutiva) e 2 (COX-2; induzível). As prostaglandinas, em especial PGE₂, promovem a inibição da motilidade gástrica, secreção ácida, apoptose, ativação de mastócitos e a diminuição da aderência leucocitária ao endotélio vascular. Juntamente com o óxido nítrico, outro importante fator protetor, atua na produção de muco e bicarbonato que recobrem as células epiteliais e na manutenção do fluxo sanguíneo gástrico. Quando na presença de agentes lesivos, este último assegura a chegada de uma quantidade ótima de oxigênio, nutrientes e bicarbonato, permitindo o rápido tamponamento do ácido e uma rápida remoção de substâncias tóxicas, limitando sua penetração em camadas mais profundas da mucosa (WALLACE, 2008; AL-JIBOURY & KAUNITZ, 2012).

1.3. Úlcera péptica

Definição e epidemiologia

A úlcera é uma lesão profunda da mucosa, onde os componentes do tecido epitelial e conjuntivo, incluindo miofibroblastos subepiteliais, células do músculo liso, vasos e nervos, podem ser destruídos (LEONG & CHAN, 2004 *apud* LEONG, 2009).

Tanto as úlceras localizadas no estômago quanto as do duodeno são referidas como úlceras pépticas, sendo mais comuns as que ocorrem no duodeno (90%), próximas à junção do piloro com a mucosa duodenal. Dentre as úlceras localizadas no estômago, 60% se localizam no antro e 25% na junção do antro com o corpo na pequena curvatura. Sua incidência mundial é estimada em 1500 a 3000 casos por 100000 habitantes por ano. No Brasil, apesar de ser uma doença frequente, não se conhece precisamente sua real incidência. Apesar de ocorrerem em qualquer idade, a úlcera duodenal ocorre com mais freqüência na faixa de 30 – 55 anos, enquanto a úlcera gástrica na faixa de 50 – 70 anos (CASTRO et al., 2009).

Etiologia

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

Desse modo, nos dias atuais, está bem estabelecido que independentemente da etiologia da úlcera, esta é formada quando ocorre um desequilíbrio entre os fatores protetores da mucosa (secreção de muco e bicarbonato, prostaglandinas, fluxo sanguíneo e NO) e agressores luminiais endógenos como o ácido clorídrico e a pepsina ou exógenos – como estresse, uso de drogas anti-inflamatórias não esteroidais (DAINEs), tabagismo, consumo de álcool e infecção por *Helicobacter pylori* (TARNAWSKI, 2005; YUAN et al., 2006).

Dentre os fatores agressores, a infecção por *H. pylori* é apontada como o principal fator etiológico da úlcera gástrica, com 75% dos casos associados à presença dessa bactéria (NAPOLITANO, 2009). A utilização de DAINEs fica em segundo lugar, tendo usuários crônicos dessa classe de fármacos, um risco de desenvolver úlceras 46 vezes maior que a média da população e a prevalência de úlcera gástrica nesse grupo é de 9 a 13% (CASTRO et al., 2009). Além desses fatores, patologias como o estresse, a doença de Chron, linfomas, gastrinomas, hipercalcemias, mastocitose sistêmica, dentre outras, aumentam o risco para o desenvolvimento de úlceras. Entretanto, ocorrem também as úlceras chamadas idiopáticas, que não apresentam uma causa conhecida, cuja prevalência tem aumentado na última década. Na América do Norte, 20 a 40% dos casos de úlceras gástricas não estão associados à infecção por *H. pylori* ou ao uso crônico de DAINE (CHOW & SUNG, 2007).

Seja qual for o agente causador, as úlceras aparecem devido à necrose tissular ocasionada pela isquemia da mucosa, formação de EROs e interrupção da oxigenação e da chegada de nutrientes. Todos esses efeitos são resultados da formação de trombos e outras oclusões que reduzem o fluxo sanguíneo local (TARNAWSKI & AHLUWALIA, 2012). As EROs têm sido reportadas como mediadoras dos distúrbios microvasculares que precedem as lesões da mucosa gástrica induzidas por estresse, DAINEs e etanol. Essas moléculas são altamente reativas e interagem indiscriminadamente com macromoléculas essenciais como o DNA, proteínas e lipídios, promovendo o dano tecidual (AL-JIBOURY & KAUNITZ, 2012).

Cicatrização de úlceras

A cicatrização de úlceras é um processo complexo e altamente regulado de reparo da mucosa gástrica, que inclui dentre outros processos, proliferação, migração celular, angiogênese, vasculogênese, interação entre células e ECM, e remodelamento tecidual (Figura 2). Todas as etapas e eventos são controlados por fatores de crescimento, citocinas e fatores de transcrição que, em conjunto, visam o restabelecimento da continuidade da camada epitelial, das estruturas glandulares e

microvasos, e do tecido conjuntivo dentro da lesão (TARNAWSKI & AHLUWALIA, 2012).

Histologicamente, uma úlcera é composta de duas estruturas principais; uma margem, ou borda, que é formada pela mucosa adjacente não necrosada – chamada de componente epitelial, onde ocorre a migração e proliferação de células epiteliais a fim de reepitelizar o tecido – e um tecido de granulação no leito da úlcera – o componente tecidual conjuntivo, consistindo de fibroblastos, macrófagos e células endoteliais em proliferação formando microvasos, através da angiogênese (TARNAWSKI, 2005) (Figura 2).



Figura 2: Representação esquemática dos componentes e processos envolvidos na cicatrização da úlcera gástrica. Adaptado de TARNAWSKI (2005).

Eventos celulares e moleculares envolvidos na cicatrização de úlceras gástricas

A necrose tecidual e a subsequente liberação de metabólitos do ácido araquidônico das células lesadas, incluindo leucotrienos B, atraem leucócitos polimorfonucleares (PMN) que fagocitam o tecido necrótico e liberam citocinas pró-

inflamatórias (p. ex. fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas (IL) IL-1a e 1b, que ativam os fibroblastos, células endoteliais e epiteliais de forma a restaurar o tecido (COTRAN et al., 1999; TARNAWSKI, 2005). Esta infiltração inicial de PMN é reduzida dias após a injúria, sendo seguida pelo acúmulo de macrófagos via recrutamento de monócitos sanguíneos e de macrófagos residentes. Essas células, uma vez ativadas, fagocitam os debrís necróticos e liberam uma variedade de fatores de crescimento e citocinas, incluindo o fator de crescimento transformador alfa (TGF- α) e beta (TGF- β), fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento endotelial (VEGF) (TARNAWSKI, 2001).

Nas margens da úlcera é formada uma “zona de cicatrização”. Nesse local, as glândulas se tornam dilatadas, com células desdiferenciadas, altamente proliferantes e expressando o fator de crescimento epidérmico (EGF) e seu receptor (EGF-R). Em adição ao *pool* inicial de fatores de crescimento derivados de plaquetas, macrófagos e tecidos lesados, ocorre também a transcrição gênica de bFGF, PDGF, peptídeos trefoil, fator de crescimento derivado do hepatócito (HGF) e COX-2 de maneira sincronizada espacial e temporalmente (MILANI & CALABRÒ, 2001). Por ação desses fatores, as células epiteliais começam a migrar da margem em direção à área ulcerada, num processo conhecido como reepitelização. Esse evento é essencial para a cicatrização da lesão, uma vez que fornece células epiteliais cruciais a reconstrução das glândulas e a cobertura do tecido de granulação jovem, produzindo uma barreira contra infecções e injúrias mecânicas e químicas (CHEN & PARKS, 2009).

A migração é um processo importante para o reparo e a sobrevivência tecidual. É dependente de rearranjos do citoesqueleto, uma complexa estrutura – filamentos de actina, microtúbulos, filamentos intermediários, adesões focais e suas proteínas associadas – que desempenha um importante papel na estrutura, forma e mobilidade celular (STOSSEL, 1993). Os microfilamentos citoplasmáticos consistem de G-actina, uma proteína globular que pode se ligar, desligar e formar feixes de ligações cruzadas, que são ancoradas a outros componentes celulares, incluindo a membrana celular. Quando a migração é iniciada, ocorre a polimerização de G-actina e sua superorganização em uma rede filamentosa (F-actina). Isso ocorre na porção frontal da célula (*leading edge*), promovendo a formação de grandes

projeções de membrana (lamelipódios) e o estabelecimento de novas adesões com a ECM, as adesões focais. Algumas dessas adesões nascentes amadurecem e se ancoram em feixes contráteis de actina-miosina II (fibras de estresse), o que gera forças que facilitam o movimento do corpo celular na direção determinada. O ciclo se encerra com a liberação das adesões na porção posterior da célula (RIENTO et al., 2003; CHAI, BAATAR & TARNAWSKI, 2004, MITRA et al., 2005). O estímulo para o início da migração pode ser deflagrado por citocinas e fatores de crescimento como EGF, HGF, PDGF e bFGF que ao se ligarem aos seus receptores, iniciam cascatas de sinalização envolvendo a ativação de MAPKs e a atividade de PLC, que promovem a ativação da quinase de adesão focal (FAK – *Focal Adhesion Kinase*) e a regulação das Rho GTPases (MADDALA et al., 2003; TARNAWSKI, 2005).

Na base da úlcera, entre 48-72 h após a lesão, ocorre a formação do tecido de granulação, que também é essencial para a cicatrização, pois fornece células de tecido conjuntivo – que secretam ECM para restaurar a lâmina própria – e microvasos para a restauração da microvasculatura dentro da úlcera, através da angiogênese (TARNAWSKI & AHLUWALIA, 2012). Nesse processo, ocorre a formação de uma nova rede microvascular a partir de outras já existentes, através de etapas sequenciais, envolvendo: i) degradação das membranas basais dos capilares por metaloproteinases de matriz (MMPs), ii) migração de células endoteliais para o espaço perivascular e proliferação, iii) formação de tubos microvasculares e anastomoses, iv) estabelecimento do lúmen e membranas basais, e por último, v) formação da rede capilar. O crescimento do tecido de granulação e a geração de novos microvasos através da angiogênese é estimulada por bFGF, VEGF, PDGF, angiopoietinas, que aumentam a atividade da fosfatidilinositol-3-quinase (IP-3K) (GERBER et al., 1998).

Em contraste ao bFGF, que promove proliferação e migração em uma variedade de células epiteliais e mesenquimais, o VEGF é um mitógeno específico de células endoteliais pelo fato de os seus receptores (VEGF-R1 e VEGF-R2) serem primariamente restritos às células endoteliais. Além da proliferação, esse fator de crescimento estimula a migração desses tipos celulares e coordena a formação de tubos microvasculares sendo considerado um regulador fundamental da angiogênese. Atua através da ativação da via Ras/Raf/MEK/ERK e sua produção é

estimulada pela hipóxia e por outros fatores como PDGF, TGF- β 1, bFGF, citocinas, NO e PGE2 (FERRARA, 2004).

Na fase final da cicatrização, a substituição do tecido de granulação por tecido conjuntivo cicatricial envolve, principalmente, mudanças na composição da ECM. Fatores de crescimento que estimulam a síntese de colágeno (p. ex. bFGF, TGF- β) e de outros componentes da ECM, também modulam a síntese e ativação de MMPs. Estas são enzimas com zinco em sua estrutura e grande similaridade estrutural entre si, porém diferentes especificidades de substrato. Assim, podem ser classificadas como colagenases, gelatinases, estromelinas, MMP tipo membrana (MT-MMPs) e elastases (AMALINEI et al., 2007). São secretadas na forma de pró-MMPs (zimogênio) por diversos tipos celulares (fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais e algumas epiteliais), sendo sua secreção induzida por certos fatores de crescimento como PDGF, FGF, VEGF e citocinas como IL-1 e TNF- α (SHAHIN et al., 2001; CALABRÒ et al., 2004). Além do remodelamento tecidual, as MMPs desempenham papéis chaves na angiogênese e reepitelização. Ao degradar os componentes da ECM, essas proteases proporcionam a liberação de fatores de crescimento e revela sítios de ativação de receptores para esses e outros elementos. Dessa maneira, as MMPs podem modificar o comportamento celular e regular processos fisiológicos e patológicos como a cicatrização e a tumorigênese (SCHULTZ & WYSOCKI, 2008).

As gelatinases MMP-2 (72 kDa) e MMP-9 (92 kDa) degradam colágeno tipo IV como substrato primário e são distintas pela sua capacidade de degradar gelatina (MCAWLECY & MATRISIAN, 2000). A MMP-2 é expressa constitutivamente, estando relacionada à homeostase da ECM gástrica. Já MMP-9 é considerada uma proteína inflamatória, sendo liberada por neutrófilos e com expressão regulada pelo controle transcricional de NF- κ B. Em lesões gástricas por indometacina foi verificado uma redução da expressão e atividade de MMP-2 e aumento de MMP-9, sendo a magnitude esse desequilíbrio associado à gravidade das lesões (LEMPINEN et al., 2000). O aumento da atividade de MMP-2 está associado a uma cicatrização mais rápida, principalmente devido ao aumento da angiogênese (GANGULY et al., 2006; SWARNAKAR et al., 2005).

O controle da atividade de MMPs é dado em três níveis: transcrição gênica, proteólise e inibição pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). Quatro

TIMPs (TIMP-1 a 4) já foram identificadas em vertebrados e sua expressão é regulada durante o desenvolvimento e remodelamento tecidual (BREW et al., 2000). São produzidos pela maioria das células mesenquimais e se ligam não covalentemente às MMPs, inibindo-as e prevenindo sua ação descontrolada. O TIMP-2 é o principal regulador da atividade de MMP-2, envolvendo um balanço dinâmico com MT1-MMP. Em baixas concentrações, TIMP-2 se liga ao sítio catalítico ativado de MT1-MMP e gera receptores para MMP-2, o que resulta na ativação da última. Ao contrário, quando em altas concentrações, TIMP-2 inibe a atividade de MT1-MMP, prevenindo a ativação de MMP-2 (ENGLISH et al., 2006; GANGULY et al., 2006). Dessa maneira, o equilíbrio entre MMP-2 e TIMP-2 é essencial para a regulação do remodelamento tecidual e das demais atividades dessa protease. Estudos tem mostrado que em lesões por indometacina ocorre uma superexpressão de TIMP-2 o que se relaciona a uma diminuição da atividade de MMP-2 e angiogênese diminuída, o que influencia na cicatrização (SHARMA et al., 2012). Além disso, TIMPs podem promover outras atividades, como por exemplo, inibindo o crescimento endotelial induzido por bFGF, independentemente da inibição de MMPs, o que infere sobre o necessário controle de sua atividade para a progressão de processos fisiológicos como a cicatrização (MURPHY et al., 1993).

Fatores de crescimento celular e seu mecanismo de ação

Fatores de crescimento são substâncias de ocorrência natural, usualmente proteínas, capazes de estimular o crescimento, proliferação e diferenciação celular. Regulam uma variedade de processos celulares, atuando como moléculas sinalizadoras. Exemplos de fatores de crescimento incluem o fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que estão envolvidos em processos de crescimento e diferenciação celulares, cicatrização e tumorigênese (SCHULTZ & WYSOCKI, 2009).

O EGF é o fator de crescimento mais estudado. Trata-se de uma proteína de 53 aminoácidos, incluindo seis resíduos de cisteína que formam três pontes de dissulfeto. Como a maioria dos outros fatores de crescimento, essa proteína é sintetizada na forma de precursor, com unidades repetidas da molécula de EGF

(OGISO et al., 2002). Seu receptor é do tipo tirosina quinase, consistindo de 1186 aminoácidos formando uma glicoproteína transmembrânica, com um sítio de ligação no domínio extracelular, e a atividade quinase em seus domínios citoplasmáticos (GAN et al. 2007).

A ligação de EGF ao seu receptor ocorre na região extracelular, entre os domínios I e III, ocasionando uma mudança em conformação tridimensional tornando-o capacitado para interagir com outro receptor que também tenha se ligado ao EGF. Portanto, é formado um complexo de proporção EGF:receptor de 2:2 (OGISO et al., 2002). Essa dimerização na superfície extracelular aproxima os domínios citoplasmáticos que possuem atividade de tirosino-quinase perto o suficiente para ativar a autofosforilação do receptor. A fosforilação do receptor de EGF, assim como de outros receptores de fatores de crescimento com domínio tirosino-quinase, ativa várias vias de sinalização, como a das MAP-quinases (MAPK – *Mitogen Activated Protein Kinase*), no citoplasma da célula. A ativação dessas vias origina várias respostas celulares como síntese de proteínas, proliferação, migração, diferenciação, dentre outras (OSAKI & GAMA, 2013).

A Via de Sinalização Celular das MAPK

A ativação de MAPK é parte de uma cascata de sinalização que depende da fosforilação aumentada ou diminuída de moléculas no ambiente intracelular. As origens do sinal para ativação de MAPK podem ser várias, incluindo fatores de crescimento, citocinas e hormônios e uma vez ativada no citosol, MAPK se dissocia das proteínas ancoradoras e rapidamente se transloca para o núcleo e regula a transcrição através de fosforilação de proteínas envolvidas no evento celular (YANG et al. 2013).

Diferentes proteínas são parte do grupo MAPK, como as ERKs 1 e 2 (*Extracellular-regulated kinases 1 e 2*), JNKs (*c-Jun NH₂-terminal kinases*), p38 e ERK5 (OSAKI & GAMA, 2013). As primeiras fazem parte do sistema Ras/Raf/MEK/ERK que é definitivamente o melhor caracterizado mecanismo de MAPK. A cascata de ERK inicia com a ligação de ligantes (p. ex. EGF e PDGF) aos seus receptores (Figura 3). Nessa conexão, uma proteína denominada *Grb2* em células de mamíferos, se ativa ao ligar no receptor através de uma proteína

“adaptadora” denominada *Shc*. Esta última se liga ao receptor fosforilado através de um domínio SH2 (“*Src* homology region 2”). A proteína *Grb2* forma um complexo com uma proteína denominada SOS, que faz a troca de GDP por GTP na molécula da proteína *Ras*, tornando-a ativa (LIEBMANN, 2001).

A cascata de fosforilação então começa: a proteína *Ras* carregada com GTP tem a capacidade de ativar a proteína *Raf* [“Mitogen Activated Protein” (MAP Kinase Kinase Kinase - MAPKKK)], que por sua vez, causa a fosforilação de MEK (MAP Kinase Kinase - MAPKK). MEK, então, fosforila as isoformas da proteína ERK (MAPK), 1 e 2, ERK1 e ERK2. Quando fosforiladas são translocadas para o núcleo onde fosforilam fatores de transcrição tais como *c-myc* e *Elk-1* resultando em uma mudança no perfil de expressão gênica da célula podendo causar efeitos como mitose e diferenciação celular (OSAKI & GAMA, 2013).

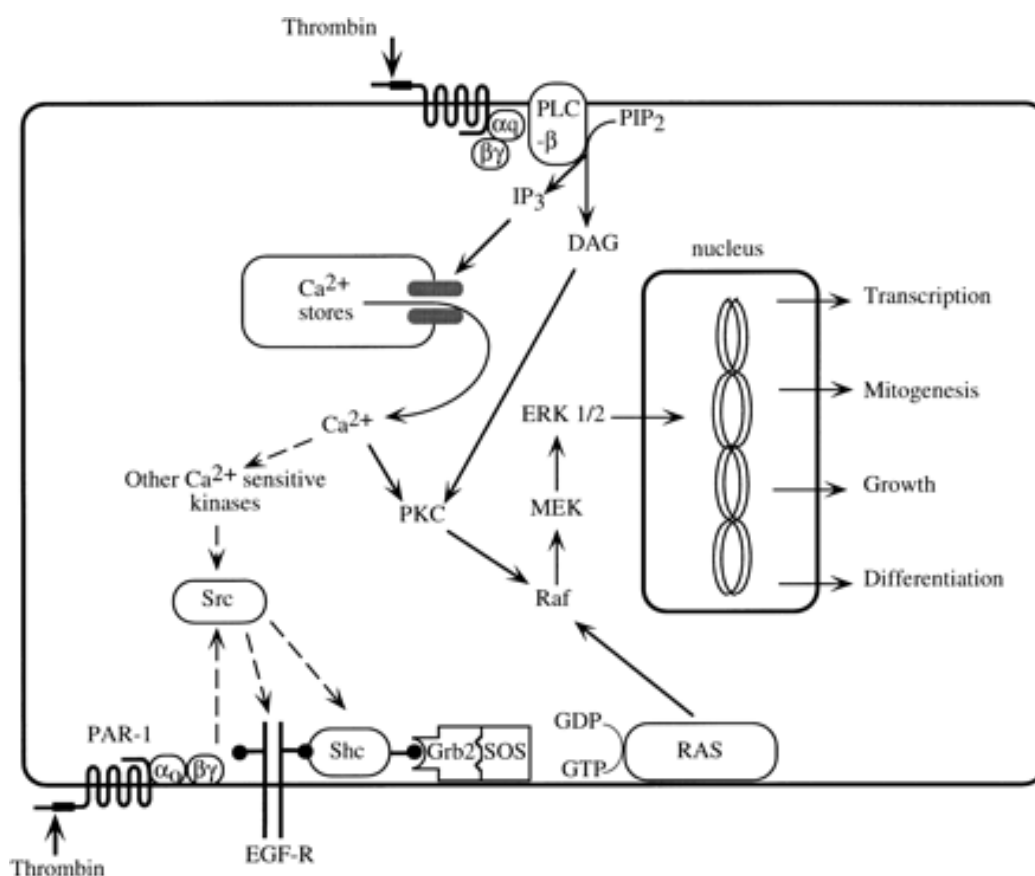


Figura 3: Esquema da ativação da via das MAPK através de interação de fatores de crescimento com receptores tirosina-quinases e por clivagem proteolítica de PARs; DÉRY et al.(1998).

A ativação da via Ras/Raf/MEK/ERK também pode ocorrer por ação de proteases via receptor PAR (Figura 3). Como o receptor PAR é acoplado à proteína G, a ativação da via passa pela ativação desta proteína, assim como ocorre com outros GPCR. Entretanto, existem diferentes isoformas de proteína G acopladas ao PAR, e elas podem ativar MAPK de maneiras diferentes. A forma mais comum de ativação envolve a proteína G com as subunidades, α_q , β e γ . Após a ativação do receptor, a subunidade $G\alpha_q$ se torna ativa e se desloca para ativar a fosfolipase C- β (PLC- β). A ativação dessa fosfolipase hidrolisa fosfoinositol formando diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3). O IP_3 mobiliza íons cálcio de reservatórios intracelulares. Tanto íons cálcio quanto o DAG ativam a proteína quinase C (PKC), que por sua vez fosforila *Raf* dando início à via das MAPK (LIEBMANN, 2001). A importância da subunidade $G\alpha_q$ no acoplamento da ativação do receptor com a via das MAPK foi demonstrada após um experimento no qual a sinalização celular era interrompida em fibroblastos tratados com trombina com a microinjeção de anticorpos específicos para esta subunidade da proteína G (BAFFY et al., 1994). Em adição, foi demonstrado que astrócitos sofrem proliferação celular após tratamento com trombina utilizando uma via dependente de PLC- β e MAPK (WANG et al., 2002).

Outro modo de ativar a via das MAPK através de PAR mediante proteína G é através da ativação da tirosino-quinase *Src* no citoplasma da célula (Figura 3). Essa ativação é via complexo de subunidades $\beta\gamma$ da proteína G_i ou G_o . Uma vez ativada, *Src* pode interagir e ativar receptores tirosina-quinase, como o receptor de EGF (EGF-R, como mostrado na Figura 3), ou a proteína *Shc*. Em ambos os casos haverá a ativação das MAPK (VAN CORVEN et al., 1993; MACFARLANE et al., 2001).

Da mesma forma, alguns compostos químicos podem ativar a via das MAPK, estimulando proteínas que atuam nesta via. Assim, foi demonstrado que ésteres de forbol e ionóforos de cálcio ativam a via das MAPK por ativarem a PKC direta ou indiretamente. Os ésteres de forbol são compostos que ativam diretamente PKC (HUANG et al., 2004), e o ionóforo de cálcio aumenta a concentração citoplasmática deste íon acarretando também a ativação desta proteína (MYNOTT et al., 1999).

Como mostrado na Figura 3, a ativação de PKC pode resultar na ativação da via das MAPK.

Tratamento das úlceras pépticas

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

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

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

Os inibidores da bomba de prótons, como o omeprazol, o lansoprazol e o pantoprazol são os fármacos anti-úlceras mais utilizados. Funcionam como pró-fármacos, sendo convertidos na forma ativa, como cátions tiofílicos, no ambiente ácido presente nos canalículos das células parietais. Estes cátions efetuam uma ligação covalente com os resíduos de cisteína presentes na subunidade α da H⁺K⁺ ATPase, inibindo irreversivelmente sua atividade, independentemente do secretagogo envolvido (SACHS, et al., 2002; AIHARA, 2003). Além disso a secreção ácida se torna dependente da síntese *de novo* da bomba, garantindo a maior eficácia em inibição da secreção ácida aos inibidores da bomba (SCHUBERT, 2008). De fato, a inibição da secreção é marcante: a redução pode atingir mais de 95%. Entretanto, atualmente, isso não se apresenta como uma vantagem. Estudos mostram que a inibição profunda da secreção ácida pode ter efeitos indesejados. CENTANNI et al. (2006) mostraram que pacientes com bócio multinodular, com secreção ácida prejudicada requerem uma dose 3 vezes maior de tiroxina, implicando que a secreção ácida normal é necessária para a efetiva absorção desta.

Além dos anti-secretóres, as úlceras pépticas podem ser tratadas com outra classe de fármacos, que apresenta uma ação mais relacionada como os fatores protetores da mucosa gástrica, podendo reduzir ou não, a secreção ácida. O sucralfato é um sal complexo de sulfato de sucrose e hidróxido de alumínio, que na presença de ácido libera alumínio, adquirindo uma forte carga negativa, e se liga eletrostaticamente a qualquer grupo químico carregado positivamente no ambiente, tais como a pepsina, diminuindo sua atividade, peptídeos, fármacos, metais e grandes moléculas como a mucina (NYSÆTER & BERSTAD, 2006). Assim, adere ao epitélio injuriado, sendo capaz de formar uma barreira mecânica contra os fatores luminiais. Além disso, aumenta os níveis de prostaglandinas na mucosa, o que ocorre via NO e neurônios sensoriais, sendo eficazes na prevenção de úlceras por estresse (ARISAWA et al., 2006; LAINE et al., 2008).

A erradicação da bactéria *Helicobacter pylori*, é outro importante alvo na terapia das úlceras pépticas (HUNT, 2005). Os esquemas terapêuticos propostos preconizam o uso de inibidores da bomba de prótons associado a antibióticos, como a amoxicilina, ou associando o subcitrato de bismuto, metronidazol e um antibiótico, que pode ser a tetraciclina ou a amoxicilina. Esta terapia tripla alcança uma erradicação em 60 a 80%, entretanto um dos problemas que justificam o insucesso deste esquema em cerca de 20% dos casos é a resistência adquirida ao metronidazol (OKOLOBA et al., 2013).

Apesar do arsenal disponível no tratamento da úlcera gástrica, ainda são necessários medicamentos mais eficazes na erradicação do *H. pylori*, métodos e tratamentos que melhorem a cicatrização de lesões, impedindo o seu desenvolvimento e recorrência, tanto em pacientes de risco (p. ex. usuários crônicos de álcool e DAINEs) como naqueles casos em que as causas não são associadas à presença desses agentes ou do *H. pylori*.

2. JUSTIFICATIVA

Como já demonstrado em estudos anteriores, P1G10 é ativo sobre a regeneração de lesões gástricas, uma vez que alia múltiplas ações, como a capacidade de estimular a produção de fatores protetores, inibir a ação dos agressores na mucosa gástrica, além das atividades proliferativa e angiogênica, mostradas em estudos *in vivo* e *in vitro*. Nesses últimos, observou-se que proteases isoladas a partir de P1G10 promovem a proliferação de fibroblastos através da ativação da via das MAPKs, envolvendo a participação de EGFR, sugerindo que uma modulação na expressão e/ou ação de fatores de crescimento estaria envolvida no efeito cicatrizante da fração. Entretanto, estudos *in vivo*, mostrando o envolvimento desses fatores ainda, não tinham sido realizados.

Além da ação cicatrizante, outras atividades são atribuídas a P1G10, como a antiinflamatória e antitumoral/antimetastática. Verificou-se que dependendo do tecido, ou da concentração/dose, a fração pode promover diferentes atividades, determinando até, efeitos opostos. Como exemplo, podemos citar ação angiogênica em tecido normal (MELLO et al., 2008) e antiangiogênica em tumores (DITZ et al., no prelo). Essa variedade de efeitos pode ser justificada pela composição da fração, que consta de 14 proteases com diferenças bioquímicas marcantes, principalmente no que se refere à atividade proteolítica e preferência por substratos (TEIXEIRA et al., 2008). Corroborando essa hipótese, apenas uma das subfrações de P1G10, CMS2, apresentou atividade antitumoral/antimetastática, sugerindo que uma ou mais proteases possam ser responsáveis por uma ou outra atividade (DITZ et al., no prelo). Diante disso, propomos investigar o efeito cicatrizante de subfrações de P1G10, CMS1 e CMS2, assim como mecanismos celulares e moleculares envolvidos, a fim de determinar o papel de cada uma como agente cicatrizante gástrico.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Estudo da atividade cicatrizante sobre úlceras gástricas das subfrações de P1G10, CMS1 e CMS2, obtidas do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis*, bem como de mecanismos celulares e moleculares envolvidos na mesma

3.2. Específicos

- 1) Avaliação do efeito de CMS1 e CMS2 sobre:
 - i) a cicatrização de úlceras induzidas pelo ácido acético em ratos Wistar, bem como sobre a proliferação e angiogênese nessas lesões.
 - ii) a atividade e expressão gênica de MMP-2 e a expressão de fatores de crescimento (EGF, bFGF e VEGF) e outros mediadores da cicatrização gástrica (COX-1, COX-2 e TIMP-2).
 - iii) o efeito proliferativo *in vitro* sobre células epiteliais de adenocarcinoma gástrico humano (AGS) e endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC-CS) e a importância da atividade proteolítica nesses efeitos;
 - iv) o efeito estimulatório de migração *in vitro* em células AGS e HUVEC-CS;
 - v) os possíveis mecanismos envolvidos na ação proliferativa e de migração das frações sobre células AGS, quanto à:
 - (a) Participação da via das MAPK
 - (b) Participação de receptores de fatores de crescimento (p.e. EGF-R)
 - (c) Polimerização de G-actina em F-actina e formação de fibras de estresse.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. *Biológicos*

Látex exudado de frutos imaturos de *Vasconcellea cundinamarcensis*, 2–4 anos de idade. Uma amostra da planta foi depositada no herbário da Universidad de La Serena, Chile, exsicata 15063.

Ratos albinos fêmeas, variedade Wistar, adquiridos do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (Cebio-ICB/UFMG).

Linhagens celulares de adenocarcinoma gástrico humano (AGS – CRL1739) proveniente do *American Type Culture Collection* (ATCC, USA) e de células endoteliais de cordão umbilical humano imortalizadas (HUVEC-CS), gentilmente doadas pela Dra. Marcella Faria de Almeida Prado do Instituto Butantan, São Paulo.

4.1.2. *Reagentes e solventes*

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

1,4-Bis(5-fenil2-oxazolil)benzeno (POPOP), 2,5-difeniloxazol (PPO), acrilamida 30%, albumina bovina fração V (BSA), AG1478 (inibidor de EGF-R) ampilina sódica, benzoil-arginil- ρ -nitro-anilida (BAPNA), chaps, coquetel de inibidores (P-8340) dimetilsulfóxido (DMSO), ditioneitol (DTT), fluoreto de sódio, gelatina, iodoacetamida (IAA), L-cisteína, meio de cultura F12 (Kaighn's modification) desidratado, metil-metano-tiosulfonado (MMS), ortovanadato de sódio, PD98059 (inibidor de MEK), persulfato de amônio (APS), resina "Sephadex G-10", sulfato de estreptomicina, tris base, triton X-100 e tween 85 (Sigma Chemical Co, St. Louis, MD, EUA).

Ácido acético glacial P.A., ácido fosfórico 85%, ácido tricloroacético (TCA), bicarbonato de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de potássio, cloreto de sódio,

clorofórmio, formaldeído 37%, hidróxido de sódio, glicerol, glicina, isopropanol, metanol absoluto, tolueno (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil).

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

Anticorpo anti-CDC47 (Thermo Fisher Scientific, EUA).

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

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

[H³-metil]-timidina em solução aquosa (GE HealthCare, Buckinghamshire, Inglaterra).

Kit *First-Strand cDNA Synthesis* (Amersham Biosciences/GE HealthCare Lifesciences, EUA).

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

Luminata Forte Western HRP substrate, ReBlot plus strong antibody stripping solution, 10x (EMD Millipore Corporation, USA).

Nitrogênio líquido (White Martins do Brasil S/A, Brasil).

Papel fotográfico Ultra Premium, solução reveladora e solução fixadora para revelação de Western blotting (Kodak Company, Rochest, NY, EUA).

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

Soro fetal bovino (FBS) e tripsina 0,25% (Cultilab, Campinas, SP, Brasil).

Sonda para marcação de F-actina – Conjugado Alexa Fluor 488[®] phalloidin (A12379 – Molecular Probes – Life Technology, EUA).

Sonda para marcação de G-actina – Conjugado Texas Red[®] DNase I (D972 – Molecular Probes – Life Technology, EUA).

SYBR[®] Green PCR Master Mix, Trizol[®], água tratada com DEPC (água DEPC) (Life Technologies, EUA).

Solução de cetamina a 10% (Cetamin[®]) e solução de xilazina a 2% (Xilazin[®]) (Syntec do Brasil, Cotia, São Paulo, Brasil) .

4.1.3. Principais soluções

4.1.3.1. Obtenção e caracterização das frações

Tampão acetato de sódio 2,0 M pH 5:

Acetato de sódio.....272,16 g

Água destilada q.s.p.1000,00 mL

O pH foi ajustado para 5. A partir da diluição desta solução foram obtidas as soluções de tampão acetato de sódio a 1,5 M, 1,0 M e 0,1 M pH 5.

Solução de EDTA 500 mM:

EDTA.....37,22 g

Água destilada q.s.p.200,00 mL

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

Tampão de ativação

L-Cisteína.....606,00 mg

EDTA.....4,00 mL

DTT.....160,00 mg

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

Solução de BAPNA 100 mM

BAPNA.....90,00 mg

DMSO.....2,00 mL

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

Solução de Bradford

Corante azul-brilhante de coomassie G-250.....125,00 mg

Etanol absoluto.....10,00 mL

Ácido fosfórico 85% (v/v) P.A.....20,00 mL

Água deionizada q.s.p.200,00 mL

4.1.3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Solução aquosa de SDS 10% (p/v)

SDS1,00 g
Água deionizada q.s.p.10,00 mL

Solução aquosa de APS 10% (p/v)

APS1,00 g
Água deionizada q.s.p.10,00 mL

Tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8

Tris base.....18,21 g
Água deionizada q.s.p.100,00 mL
O pH foi ajustado para 8,8 com solução de ácido clorídrico 10 M e, em seguida, o volume completado com água deionizada.

Tampão Tris-HCl 1,0 M pH 6,8

Tris base.....12,14 g
Água deionizada q.s.p.100,00 mL
O pH foi ajustado para 6,8 com solução de ácido clorídrico 10 M e, em seguida, o volume completado com água deionizada.

Solução para o gel separador desnaturante 10% acrilamida

Solução aquosa de Acrilamida 30%1,67 mL
Tampão Tris-HCl 1,5 mM pH 8,8.....1,25 mL
SDS 10% (p/v)50,00 µL
Água deionizada.....1,98 mL
Solução aquosa de APS 10% (p/v)50,00 µL
TEMED10,00 µL

Solução para o gel separador desnaturante 12% acrilamida

Solução aquosa de Acrilamida 30%2,00 mL

Tampão Tris-HCl 1,5 mM pH 8,8.....	1,25 mL
SDS 10% (p/v)	50,00 µL
Água deionizada	1,65 mL
Solução aquosa de APS 10% (p/v)	50,00 µL
TEMED	10,00 µL

Solução para o gel concentrador desnaturante 4% acrilamida

Solução aquosa de Acrilamida 30%	267,00 µL
Tampão Tris-HCl 1,0 mM pH 8,8.....	250,00 µL
SDS 10% (p/v)	20,00 µL
Água deionizada	1,44 mL
Solução aquosa de APS 10% (p/v)	20,00 µL
TEMED	5,00 µL

Solução fixadora para géis

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

Solução corante de géis

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

Solução descorante de géis

Metanol P.A.....	4,00 mL
Ácido acético glacial P.A.....	8,00 mL
Água destilada q.s.p.....	100,00 mL

Tampão de amostra eletroforese desnaturante 6X

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

Azul de bromofenol.....120,00 mg

Tampão de corrida eletroforese desnaturante 5X (solução estoque)

Tris base.....15,10 g

Glicina.....94,00 g

SDS.....5,00 g

Água destilada q.s.p.....1000,00 mL

A solução de uso (1X) foi preparada no momento do uso por diluição 1:5 em água milli Q.

4.1.3.3. Zimografia

Solução aquosa de gelatina 1% (p/v)

Gelatina.....20,00 mg

Água deionizada.....2,00 mL

A gelatina foi dissolvida em água e aquecida por 20 segundos em microondas na potência máxima.

Tampão Tris-HCl 1M pH 7,4

Tris base.....121,14 g

Água deionizada q.s.p.1000,00 mL

O pH foi ajustado para 7,4 com solução de ácido clorídrico 10 M e, em seguida, o volume completado com água deionizada.

Tampão de lavagem

Tris-HCl 1M pH 7,425,00 mL

Triton X-100.....12,50 mL

Água deionizada q.s.p.500,00 mL

Tampão de incubação

Tris-HCl 1M pH 7,425,00 mL

Cloreto de cálcio.....555,00 mg

Cloreto de sódio.....5,85 g

Chaps.....	100,00 mg
Água deionizada q.s.p.	500,00 mL

Solução para gel separador acrilamida 7,5% e gelatina 0,1 %

Solução aquosa de Acrilamida 30%	1,25 mL
Tampão Tris-HCl 1,5 mM pH 8,8.....	1,25 mL
SDS 10% (p/v)	50,00 µL
Gelatina 1% (p/v).....	500,00 µL
Água deionizada	3,65 mL
Solução aquosa de APS 10% (p/v)	50,00 µL
TEMED	20,00 µL

4.1.3.4. Ensaios *in vivo*

Solução salina 0,9%

Cloreto de sódio.....	9,00 g
Água destilada q.s.p.....	1000,00 mL

Solução anestésica

Cetamina 10%.....	10,00 mL
Xilazina 2%.....	7,50 mL

Solução de ácido acético 10%

Ácido acético glacial PA.....	10,00 mL
Água destilada q.s.p.....	100,00 mL

4.1.3.5. Cultura celular, imunofluorescência e Western Blotting

Tampão PBS pH 7,4

Fosfato dibásico de sódio.....	1,15 g
Fosfato monobásico de potássio.....	250,00 mg
Cloreto de sódio.....	8,20 g
Cloreto de potássio.....	200,00 mg

Água destilada q.s.p.....1000,00 mL
O pH foi ajustado para 7,4 com solução de ácido fosfórico 0,1 M e, em seguida, a solução foi esterilizada por autoclavação a 120°C , 2 ATMs durante 20 min.

Tampão PBS/EDTA pH 7,4

Fosfato dibásico de sódio P.A.1,15 g
Fosfato monobásico de potássio P.A.250,00 mg
Cloreto de sódio.....8,20 g
Cloreto de potássio.....250,00 mg
EDTA.....1,37 g
Água destilada q.s.p.1000,00 mL
O pH foi ajustado para 7,4 com solução de ácido fosfórico 0,1 M e o tampão foi esterilizado por autoclavação a 120°C durante 20 min.

Meio F12 Knight's Modification pH 7,4 (F12-K)

Meio F12-K desidratado11,10 g
Bicarbonato de sódio.....1,50 g
Ampicilina sódica.....100,00 mg
Estreptomicina.....100,00 mg
Água deionizada q.s.p.....1000,00 mL
Após a completa dissolução dos componentes, o pH foi ajustado com hidróxido de sódio 1 M ou ácido clorídrico 1 M para 7,4 e o meio foi esterilizado por filtração em membrana com porosidade absoluta de 0,22 µm.

Meio DMEM high glucose pH 7,4

Meio DMEM high glucose desidratado.....11,10 g
Bicarbonato de sódio.....3,70 g
Ampicilina sódica.....100,00 mg
Estreptomicina.....100,00 mg
Água deionizada q.s.p.....1000,00 mL
Após a completa dissolução dos componentes, o pH foi ajustado com hidróxido de sódio 1 M ou ácido clorídrico 1 M para 7,4 e o meio foi esterilizado por filtração em membrana com porosidade absoluta de 0,22 µm.

Solução de aquassol para leitura de cintilação

PPO.....	4,00 g
POPOP.....	200,00 mg
Triton X-100.....	333,00 mL
Tolueno q.s.p.....	1000,00 mL

Para completa dissolução dos componentes, a solução foi deixada sob agitação por 12 h em frasco âmbar.

Tampão de lise

Tris-HCl 1 M pH 7,4.....	250,00 µL
Cloreto de sódio.....	44,00 mg
Triton X-100.....	50,00 µL
Fluoreto de Sódio.....	4,20 mg
Ortovanadato de sódio 40 mM.....	100,00 µL
Coquetel de inibidor (P8340 – Sigma®).....	100,00 µL
Água deionizada q.s.p.	1000,00 µL

A solução de ortovanadato 40 mM foi preparada pela dissolução de 7,36 mg do reagente para 1 mL de água deionizada.

Tris-Buffered Saline plus Tween 20 (TTBS)

Cloreto de sódio	8,70 g
Tris base	24,20 g
Tween 20.....	500,00 µL
Água deionizada q.s.p.	1000,00 mL

Solução de bloqueio para “Western Blotting”

BSA	2,50 g
TTBS q.s.p.	50,00 mL

Tampão de transferência para “Western Blotting”

Metanol absoluto.....	100,00 mL
-----------------------	-----------

Glicina.....	7,2 g
Tris base.....	1,52 g
Água deionizada q.s.p.	500,00 mL

Solução de AG 1478 (3,16 mM)

AG 1478.....	1,00 mg
DMSO.....	1,00 mL

Solução de PD98059 (3,75 mM)

PD98059.....	1,00 mg
DMSO.....	1,00 mL

4.1.4. Equipamentos

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

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

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

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

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

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

Câmera fotográfica para microscópio Moticam 2500 (Motic Incorporation Ltd., Hong Kong, China).

Contador automático de cintilações com registrador Tri-Carb 2100 TR (Packard Instruments CO, New Prague, MN, EUA).

Célula de transferência semi-seca Trans-Blot[®] SD, cuba de Eletroforese Mini-Protean[®] Tetra Cell, e fonte de energia para eletroforese e transferência em “Western Blot” modelo 3000 xi (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

Espectrofotômetro de duplo feixe para faixas UV (ultra-violeta) e visível, modelo UV-150-02 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) e do tipo leitor de placas Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, EUA).

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

Lupa entomológica (Westover, China).

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

Microscópio Confocal LSM Meta 510 (Carl Zeiss[®] Microscopy, Jena, Alemanha).

Microscópio invertido Motic[®] AE30 (Motic Incorporation Ltd., Hong Kong, China).

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

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

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

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

Termociclador PTC-150 Minicycler e termociclador ABI Prism 7500 DNA sequence detection System (Applied Biosystems, EUA).

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

4.1.5. Diversos

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

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

Pipetadores automáticos com capacidade máxima de 2, 20, 200 e 1000 µl, acompanhados de ponteiros de polipropileno (Fisherbrand, Leicestershire, Inglaterra).

Béqueres, ehrlenmeyers, funis, pipetas graduadas, provetas, quitassatos, balões volumétricos (Pyrex[®], Cidade do México, México).

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

Lâminas e lamínulas (INVICTA, São Paulo, Brasil). Lamínula 22 X 22 mm para microscopia confocal (Fisher Scientific, EUA).

Microtubos de Fechamento Seguro de 600 e 1500 µL (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA e Eppendorf, Hamburg, Alemanha).

Saco de diálise com poro 10 kDa de diâmetro (Sigma Chemical Co, St. Louis, MD, EUA).

Software GraphPrism versão 5.0 para análise estatística (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA), Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA), LSM Image Browser (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) e TScratch (CSElab, Zurique, Suíça), Kodak versão 1D-3.5 (Kodak Company, Rochest, NY, EUA).

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

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

4.2. Métodos

4.2.1. Obtenção e caracterização bioquímica das frações P1G10, CMS1 e CMS2

A obtenção e purificação das frações foram realizadas conforme descrito por TEIXEIRA et al. (2008). A partir de incisões no epicarpo de frutos imaturos, o látex foi coletado e armazenado a 4°C. Posteriormente, o mesmo foi liofilizado e armazenado, em freezer, a -20°C. Para a separação cromatográfica, foram dissolvidos 15,0 g do látex liofilizado em 75,0 mL de solução tampão de ativação (item 4.1.3.1.). A mistura foi, então, agitada durante 30 min e centrifugada (9.000 x g) durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi filtrado, sendo repetido o procedimento descrito acima com o resíduo, utilizando-se 25,0 mL do tampão de ativação. O filtrado foi aplicado em uma coluna contendo resina Sephadex G-10, após esta ter sido equilibrada com tampão acetato de sódio 1,0 M pH 5,0 (item 4.1.3.1.). As

frações coletadas foram triadas mediante a determinação da absorvância a 280 nm. De acordo com o perfil cromatográfico proteico obtido, as frações que compunham o primeiro pico foram reunidas originando a amostra P1G10 e as correspondentes ao segundo pico, P2G10.

Em um sistema de ultrafiltração (Amicon), as amostras de P1G10 foram filtradas, lavadas três vezes com água deionizada e recolhida a solução residual que, posteriormente, foi liofilizada. As determinações da concentração proteica total e da atividade proteolítica específica do liofilizado foram realizadas como parâmetros para a caracterização da fração.

A fim de inibir a atividade proteolítica de P1G10, foi adicionado ácido para-hidroximercuribenzóico. O excesso do inibidor foi removido por diálise contra tampão acetato 0,1 M pH 5,0 (item 4.1.3.1.). A solução resultante foi submetida à cromatografia em coluna CM Sephadex C-25 (25 x 150 mm) equilibrada com 0,1 M de acetato de sódio. As proteínas foram eluídas contra gradiente linear, entre 0,1 e 1,2 M de acetato de sódio (itens 4.1.3.1.) e as frações obtidas, agrupadas conforme perfil protéico medido em 280 nm, correspondendo aos três picos cromatográficos denominados de CMS-1, CMS-2 e CMS-3, tendo esse último, um baixo rendimento, sendo assim, inviável sua utilização no presente trabalho.

4.2.1.1. Determinação da atividade amidásica

A atividade amidásica das frações foi determinada com o substrato sintético BAPNA (BAEZA et al., 1990). Na determinação da atividade amidásica específica, 10 µg das frações foram incubados a 37°C com 1,0 mL do tampão de ativação juntamente com 3 µL da solução de BAPNA 100 mM (item 4.1.3.1.). Após surgimento de uma cor amarela, a reação foi paralisada com 60 µL de solução de ácido acético 60% (v/v). A determinação da concentração molar de *para*-nitro-anilida liberada (produto formado) foi feita através da densidade ótica em 405 nm e sua relação com o coeficiente de extinção molar desta substância, que é 8800 M⁻¹.cm⁻¹. A atividade amidásica específica foi expressa em concentração molar de produto formado por unidade de massa da enzima em um determinado tempo, mais especificamente, nM produto x min⁻¹ x µg⁻¹ enzima.

4.2.1.2. Estimativa da concentração de proteína

A concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Nesse caso, foram incubadas quantidades entre 1,0 e 10,0 µL das amostras completando o volume destas para 100,0 µL com cloreto de sódio 100 mM. Foi adicionado em seguida 1,0 mL da solução de Bradford (item 4.1.3.1.), permanecendo incubada por 15 min até a leitura da densidade ótica em 595 nm. Para cálculo das concentrações de proteína, foi estimada uma curva padrão utilizando BSA.

4.2.1.3. Inibição das frações por iodoacetamida

Para a inibição enzimática irreversível das frações CMS1 e CMS2, se utilizou o inibidor inespecífico de grupos tióis, iodoacetamida (IAA). Inicialmente, foi determinada a relação molar necessária para inibição efetiva. Para isso, as frações (50 µg/mL) foram incubadas com L-cisteína (5 mM) por 15 min em banho de gelo sob agitação e a seguir foram adicionadas diferentes quantidades de IAA (concentrações finais de 2-2000 µM) e incubadas por mais 90 min. As amostras foram, então, dialisadas com leve agitação contra 2.500 mL de água mili-Q, a 4°C, durante 48 h (com troca de água a cada 12 h), para eliminar o excesso de inibidor. Após esse procedimento, as amostras foram esterilizadas, estando prontas para os ensaios biológicos (GOMES et al, 2005).

4.2.1.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante

Um volume correspondente a 30 µg de proteína – para CMS1, CMS1IAA, CMS2 e CM2-IAA – foi aliqotado. Em seguida, foram adicionados tampão de amostra 6 X (1/6 do volume total – item 4.1.3.2.), 1,0 µL de solução MMS 50 mM e água q.s.p. 20 µL. Para desnaturação das proteínas, as amostras foram fervidas por 5 min, antes que fossem aplicadas no gel. Esse último consistia de um gel separador (acrilamida a 12% - porção inferior) e um gel concentrador (acrilamida a 4% - porção superior), cuja composição se encontra no item 4.1.3.2. A aplicação das amostras foi feita nas canaletas localizadas no gel superior, correspondente ao pólo negativo da

preparação. A eletroforese foi desenvolvida em corrente elétrica de 80 V de tensão, 20 mA de corrente e 2 W de potência, durante aproximadamente 2 h (LAEMMLI, 1970).

4.2.1.5. Coloração do gel por azul de coomassie

Terminada a corrida eletroforética, o gel foi mergulhado na solução fixadora (item 4.1.3.2.) por 30 min. Após este período, o gel foi lavado 2 vezes com água destilada para hidratá-lo. Depois foi adicionada a solução corante (conforme item 4.1.3.2.) de géis, permanecendo nesta por 30 min ou até o aparecimento das bandas. O fundo do gel (“background”) foi descorado utilizando a solução descorante para géis (4.1.3.2.). O gel foi fotografado (câmara Kodak DC-40) sobre um transiluminador para a análise dos resultados. A intensidade das bandas foi calculada por densitometria usando o software Kodak versão 1D-3.5 (GOMES et al., 2005).

4.2.1.6. Determinação da massa molecular

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

4.2.2. Avaliação in vivo

4.2.2.1. Animais

Foram utilizadas ratas albinas, variedade Wistar, adquiridas do Centro de Bioterismo do ICB/UFMG (Cebio-ICB/UFMG), pesando entre 180-220g. As ratas foram mantidas em gaiolas metabólicas individuais no período de 5 dias anteriores ao procedimento e até o final do experimento, submetidas a um ciclo de claro/escuro de 12/12 h, recebendo água e alimentação *ad libitum*.

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

4.2.2.2. Avaliação do efeito cicatrizante gástrico de CMS1 e CMS2

A indução das ulcerações foi feita através da injeção de ácido acético 10% na parede estomacal, conforme o método descrito por TAKAGI et al (1969). Após 24 h de jejum, os animais foram submetidos a uma laparotomia abdominal na região epigástrica, sob anestesia, utilizando a solução anestésica na dose de 0,1 mL/100 g de peso corporal. Após a exposição do estômago, foi injetada na subserosa da parede externa da face posterior do órgão, 50 µl de solução aquosa de ácido acético 10%. A região foi lavada cuidadosamente com salina 0,9% e a parede abdominal suturada. Os tratamentos foram iniciados 24 h após o procedimento cirúrgico e repetido uma vez ao dia, durante um período de 7 dias. Os animais receberam água (controle), CMS1 (1-30 mg/kg), CMS2 (3-30 mg/kg), num volume de 5 mL/kg. Ao final desse período, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e seus estômagos retirados para avaliação macroscópica. Após determinada as doses de maior efeito para CMS1 e CMS2, realizou-se um estudo comparativo com a fração P1G10 (10 mg/kg) e o fármaco referência, ranitidina (RAN – 100 mg/kg).

4.2.2.3. Avaliação da importância da atividade proteolítica no efeito cicatrizante das frações

A indução das ulcerações foi feita conforme descrito no item 4.2.2.2. Os animais receberam água (controle), CMS1 ou CMS1IAA (1 mg/kg), CMS2 ou CMS2 IAA (30 mg/kg), num volume de 5 mL/kg. Ao final deste período, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e seus estômagos retirados para avaliação macroscópica (item 4.2.2.4.).

4.2.2.4. Avaliação macroscópica das lesões gástricas

Os estômagos foram estendidos e fixados com auxílio de alfinetes sobre uma plataforma de parafina e realizada a quantificação das lesões gástricas presentes na mucosa da área do corpo estomacal, a qual foi realizada com auxílio de uma lupa entomológica, sendo os resultados expressos como índice de lesão ulcerativa (I.L.U.), calculado conforme Tabela 1 (APÊNDICE) (modificado de MESIA-VELA, 1998). Para o cálculo do I.L.U., foram avaliados alguns parâmetros, que compreendem: perda de pregas, descoloração da mucosa ou hiperemia, presença de edema, petéquias e hemorragia. De acordo com a intensidade com que ocorrem, recebem pontuações: leve (1 ponto), moderado (2 pontos) ou intenso (3 pontos). Às pontuações aplicadas a cada situação são somadas a medida da área da lesão (expressa em mm²), calculada pelo produto da medida do comprimento e pela largura da mesma, observando-se os dois maiores eixos em ângulo de 90°.

4.2.2.5. Avaliação dos efeitos de CMS1 e CMS2 sobre eventos e fatores envolvidos na cicatrização gástrica

Os animais foram submetidos à indução de úlceras gástricas por ácido acético e tratados com veículo (controle), P1G10 (10 mg/kg), CMS1 (1 mg/kg) ou CMS2 (30 mg/kg), conforme item 4.2.2.2.. Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados, seus estômagos retirados e, em seguida, a lesão foi dividida, sendo parte fixada em solução tamponada de formalina a 10%, por 24 h (análises histológicas e imunohistoquímicas) e a outra parte, em nitrogênio líquido para análises de Real Time PCR quantitativo e zimografia. Um grupo de animais não lesados (Sham) foi incluído nessas análises.

4.2.2.5.1. Análise histológica

As amostras de estômago fixadas em solução tamponada de formalina à 10% foram processadas como de rotina para inclusão em parafina, e cortadas em secções de 4 µm de espessura. As lâminas obtidas foram submetidas à coloração por hematoxilina-eosina (HE) (BEHMER et al., 1976) e tricrômico de Gomori (GOMORI, 1950) para análises morfológicas em microscopia de luz. Foram preparados cortes em lâminas cobertas com gelatina para a realização de técnica de imunohistoquímica para o estudo da proliferação celular e angiogênese.

4.2.2.5.2. Análises imunohistoquímica e morfométrica da proliferação celular e angiogênese

Na análise imunohistoquímica, foi utilizada a técnica de estreptavidina-peroxidase, usando o Kit Ultra vision large volume detection system anti-polyvalent, HRP (Lab Vision - DAKO), sendo empregada recuperação antigênica usando solução de Retrieval pH 6 em calor úmido durante 20 min. As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 1 h com o anticorpo primário (anti-CDC47 – diluição de 1:300; anti-PECAM-1/CD31 – diluição de 1:20), por 2 etapas subsequentes de 25 min de bloqueio da peroxidase endógena e por 15 min na aplicação do soro de bloqueio, anticorpo secundário, e da estreptavidina peroxidase. O cromógeno utilizado foi o DAB, em incubação durante 10 min e foi feita a contra-coloração com hematoxilina de Meyer por 1 min.

A taxa de proliferação de células epiteliais foi determinada utilizando o marcador anti-CDC47, sendo analisados 5 campos no aumento de 600x, em áreas de maior número de células marcadas positivamente na borda da úlcera. Um total de 1000 células entre marcadas negativa e positivamente foram contabilizadas. O índice de proliferação foi dado como porcentagem de células marcadas positivamente em relação ao total de células.

O índice angiogênico foi determinado utilizando o marcador anti-PECAM-1/CD31, através da técnica de contagem microvascular (MVC) segundo MAEDA (1995), sendo analisadas as áreas de tecido de granulação com maior número de vasos por campo. As áreas de maior vascularização foram identificadas utilizando-se

um aumento de 600x. Qualquer célula ou grupo celular endotelial, corado positivamente separado dos microvasos adjacentes e de outros elementos do tecido conjuntivo, foi considerado como um vaso unitário, assim como, também, os vasos contendo lúmen. Estruturas ramificadas foram contadas como vasos, mesmo com descontinuidade na sua estrutura. A contagem dos vasos procedeu-se em cinco campos, selecionados previamente como de elevada densidade vascular.

4.2.2.5.3. Zimografia

Fragmentos de úlceras foram homogeneizadas em 1,0 mL de tampão de lise (item 4.1.3.5.) à 4°C. Após a centrifugação (15.000 x g), o sobrenadante foi dividido em alíquotas de 50 µl, e a concentração proteica foi determinada através do método de Bradford como descrito no item 4.2.1.2..

As zimografias foram executadas segundo protocolo previamente descrito (HU & BEETON, 2010) em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 7,5 % contendo gelatina na concentração final de 0,1%. Trinta µg de proteína de cada amostra foram submetidas a 90 Volts por um tempo médio de 90 min. Após a eletroforese, os géis foram lavados duas vezes de 30 min em tampão de lavagem (item 4.1.3.3.) para total remoção do SDS, seguido de incubação a 37°C em tampão de incubação (4.1.3.3.) por 18 horas. A seguir, os géis foram corados com a solução corante de géis (4.1.3.2) e descorados (solução descorante – 4.1.3.2.). A atividade da gelatinase foi visualizada por bandas não marcadas em um fundo azul representando áreas de proteólise no substrato de proteína. A análise semiquantitativa foi feita usando o programa de análise de imagem ImageJ[®].

4.2.2.5.4. Avaliação da expressão de fatores envolvidos na cicatrização gástrica por Real Time PCR quantitativo

Extração de RNA total: A extração de RNA total foi realizada utilizando-se o método “guanidinoisotiocianato-fenol-clorofórmio”. Imediatamente após a análise macroscópica das lesões, as úlceras foram removidas e congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em tubos plásticos de 5 mL contendo o reagente Trizol[®] (0,1 g de tecido/1,0 mL do reagente extrativo), utilizando-se um homogeneizador de tecido. Os recipientes plásticos contendo o homogenato foram incubados a temperatura ambiente por 10 min. Após esse procedimento, adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio. Os tubos foram vigorosamente agitados e deixados em repouso por 5 min a 4°C, sendo, em seguida, centrifugados a 12.000 rpm por 15 min. A camada superior (fase aquosa) foi recuperada em tubos para microcentrífuga, com subsequente adição de 0,5 mL de isopropanol. O material foi levemente agitado e mantido em repouso a 4°C por 10 min. Após centrifugação a 12.000 rpm por 10 min, à mesma temperatura utilizada anteriormente, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de etanol 70% gelado (solução manufaturada em água DEPC), agitando-se novamente. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram mantidos à temperatura ambiente até secagem das amostras. A redissolução do RNA total foi realizada com adição de 0,05 mL de água DEPC.

Após os procedimentos descritos anteriormente, as amostras de RNA total foram diluídas 1:100 e estimou-se a concentração em Nanodrop. Para o cálculo da concentração do nucleotídeo, utilizou-se a seguinte equação: $[RNA_{total}] = A_{260} \times 40 \times \text{Fator de diluição}$, sendo o resultado expresso em µg/mL.

Transcrição reversa: O RNA total foi utilizado para a síntese de DNA complementar (cDNA), utilizando o kit *First-Strand cDNA Synthesis* (Amersham Biosciences/GE HealthCare Lifesciences). A reação foi realizada num volume final de 30 µL utilizando-se 1 µg de RNA total, 0,2 µg de hexadeoxinucleotídeos, tampão para RT (concentrações finais: Tris-HCl 45 mM pH 8,3; KCl 68 mM), 5 µl de MgCl₂ 50 mM, DTT 15 mM, dNTPs 1,8 mM e 150 UI de transcriptase reversa. O cDNA foi sintetizado em termociclizador durante um período de 60 min de incubação a 37 °C. A reação foi paralisada pelo aquecimento a 90°C por 5 min.

Real Time PCR quantitativo: As reações foram feitas utilizando “primers” específicos para o cDNA dos genes de interesse. A análise dos pares de bases foi executada através do programa específico BLASTN, sintetizados pelas empresas Sigma e Invitrogen® (Tabela 1 – APÊNDICE). Alíquotas na concentração de 150 µM foram preparadas e guardadas em freezer a –20°C. Uma subsequente diluição para 1nmol/µl foi necessária para uso. Os primers do gene utilizado para normalização da reação (controle endógeno) foram para beta actina.

O cDNA obtido da etapa de transcrição reversa foi utilizado como fita molde para a amplificação por PCR. As reações tiveram um volume final de 25 µl e foram feitas em duplicatas, utilizando 19 µl do Master Mix de SYBR Green (Applied Biosystem), 2 µl de cada primer na concentração de 1nmol/µl, 2 µl de cDNA e água q.s.p.. O aparelho para reação foi o ABI Prism 7500 DNA Sequence Detection System (Applied Biosystem, EUA), sendo realizados 40 ciclos com temperatura de anelamento de 60°C.

4.2.3. Avaliação *in vitro*

4.2.3.1. Cultivo celular

Células de adenocarcinoma gástrico (AGS– ATCC CRL1739) e endoteliais de cordão umbilical (HUVEC-CS – ATCC CRL2873), de origem humana, foram cultivadas em meio F12-K ou DMEM (item 4.1.3.5.) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS), respectivamente. As linhagens foram cultivadas em frascos de cultivo, em estufa incubadora a 37° C e 5% (v/v) de CO₂.

Ao atingirem aproximadamente 90% de confluência, procedeu-se à tripsinização das linhagens. Para isso, o meio de cultivo foi aspirado, as células foram lavadas com 2,0 mL de PBS/EDTA pH 7,4 (item 4.1.5), aspirando-o logo em seguida. Colocou-se 0,5 mL de solução de tripsina 0,25%. A tripsina foi inativada após completa soltura das células com 1,5 mL do meio F12K ou DMEM a 10 % (v/v) de FBS. Obteve-se, então, uma suspensão celular que, após contagem, foi ajustada à densidade celular apropriada para a realização dos experimentos.

4.2.3.2. Avaliação da atividade mitogênica de CMS1 e CMS2

4.2.3.2.1. Incorporação de [³H] Timidina

Células AGS foram semeadas em placas de poliestireno de 24 cavidades (5 x 10⁴ células/cavidade) suspensas em 1,0 mL de meio F12-K (item 4.1.3.5.) com FBS 10%, sendo incubadas posteriormente em estufa de cultura até atingirem 50% de confluência. As células, então, foram carenciadas da presença de fatores de proliferação através da incubação destas com meio de igual volume de F12-K com FBS 0,5%. Tendo decorrido 24 h de carenciamento, foram adicionadas nas cavidades as amostras esterilizadas de CMS1, CMS2 e as frações inibidas, CMS1-IAA e CMS2-IAA (0,1-10 ng/mL) diluídas em meio de cultura F12-K com FBS 0,5%. Além do controle de FBS 0,5%, foi mantido um controle positivo com FBS 10%, ambos diluídos em F12-K.

Após 24 h de exposição às amostras, foi adicionado 0,5 µCi/cavidade de [³H-metil]- timidina, deixando as placas em condições de cultivo por 18 h. Em seguida, foi aspirado o meio de cultura e as células foram lavadas com 1,0 mL de meio F12-K. As células, então, foram fixadas com duas lavagens utilizando solução de TCA 5% (v/v). Para desidratá-las utilizou-se etanol 96% (v/v), deixando as placas secarem ao ar livre. A seguir, as células foram dissolvidas com 250 µL de hidróxido de sódio 0,5 M, neutralizando em seguida esta base com a adição de 375 µL de ácido clorídrico 1,0 M e a solução obtida foi transferida para tubos de polipropileno. A cada tubo foi adicionado 3,0 mL de solução de aquassol (preparado como descrito no item 4.1.3.5), seguido por agitação até completa dissolução. Os tubos foram então submetidos a contagem automática das cintilações por minuto (cpm) em contador de radiação beta, sendo o resultado expresso convertendo-se os dados das cpm obtidas para “índice de proliferação”. Para isso, foi atribuído à média das cpm das cavidades tratadas com FBS 0,5% um valor arbitrário de 1,0.

4.2.3.2.2. Incorporação de BrdU ao DNA

Células HUVEC-CS foram semeadas em placas de poliestireno de 96 cavidades (5 x 10³ células/cavidade) suspensas em 100 µL de meio DMEM High

Glucose (item 4.1.3.5.) com FBS 10% sendo incubadas posteriormente em estufa de cultura até atingirem 50% de confluência. As células, então, foram carenciadas da presença de fatores de proliferação através da incubação destas com meio de igual volume de DMEM sem FBS (0%). Tendo decorrido 24 h de carenciamento, foram adicionadas nas cavidades as amostras esterilizadas de CMS1, CMS2 e as frações inibidas, CMS1-IAA e CMS2-IAA (0,1-10 ng/mL) diluídas em meio de cultura DMEM sem FBS. Como controles foram utilizados meio de cultura sem FBS (negativo) e FBS 10% (positivo). Nas 18 h restantes, cada cavidade recebeu BrdU e a análise foi feita por ELISA, conforme instruções do kit (*BrdU Cell Proliferation Kit* – Millipore). Os resultados foram expressos como “índice de proliferação”, considerando a média de absorbância das cavidades controle (FBS 0%) como 1,0.

4.2.3.3. Avaliação do efeito das proteases sobre a migração celular

O estudo da migração celular foi baseado no *In Vitro Scratch Assay*, descrito por LIANG et al. (2007). Células AGS e HUVEC-CS ($1,5 \times 10^5$ células/cavidade) foram semeadas em placas de poliestireno de 24 cavidades, e cultivadas até atingirem confluência. Utilizando uma ponteira de P200, foi feita uma ranhura em linha reta na monocamada, a fim de se mimetizar uma lesão. As células foram lavadas duas vezes com o respectivo meio de cultura (F12-K ou DMEM) e a seguir tratadas com as frações CMS1 ou CMS2 (10 ng/mL). Para acompanhar o fechamento da fenda, fotografias foram adquiridas por uma câmera (Moticam 2500 – Motic[®], China) acoplada a um microscópio invertido (A30 – Motic[®], China) nos tempos de 0, 6 e 24 h após os tratamentos com as frações. As imagens foram analisadas pelo programa TScratch, sendo os resultados expressos como porcentagem de fechamento da lesão em relação a área inicial. A fim de eliminar a influência da proliferação celular sobre o fechamento da fenda, o inibidor de proliferação celular hidroxiuréia foi adicionado nos meios de lavagem e aplicado juntamente com as soluções de CMS1 ou CMS2, nas concentrações finais de 10 mM para AGS e 2 mM para HUVEC-CS.

A influência da atividade proteolítica das frações também foi avaliada nesse modelo de estudo sobre células AGS, utilizando as frações inibidas (CMS1-IAA e CMS2-IAA), nas mesmas concentrações das ativas (10 ng/mL).

4.2.3.4. Avaliação do efeito das frações sobre a polimerização de actina e formação de fibras de estresse em células epiteliais gástricas

Nessa avaliação foi realizada marcação para F-actina, que permite avaliar a polimerização de actina e a formação de fibras de estresse. Células AGS ($1,5 \times 10^5$ células/cavidade) foram crescidas sobre lamínulas de vidro e, após atingirem confluência, foram carenciadas de fatores de crescimento (FBS 0,5%) por 24 h. A seguir, foram submetidas ao protocolo do *In vitro Scratch Assay*, como descrito acima e tratadas com CMS1, CMS1-IAA, CMS2 e CMS2-IAA, todos a 10 ng/mL, por 6 h. Ao final do tratamento, a monocamada foi lavada com PBS pH 7,4 e fixada com paraformaldeído (PFA) 4% durante 20 min em temperatura ambiente. A seguir, as células foram permeabilizadas com Triton X-100 a 0,5% (3 vezes de 5 min) e o bloqueio foi feito com BSA 1% em PBS pH 7,4 por 2 h. Posteriormente, as lamínulas foram incubadas com os conjugados de Alexa Fluor 488[®] Phalloidin (para detecção de F-actina) e Texas Red[®] DNase I (para G-actina), por 20 min, de acordo com instruções do fabricante. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com PBS (3 vezes de 5 min) e a seguir, montadas sobre lâminas microscópicas com Prolong Antifade[®]. Após secagem das lâminas, foram feitas imagens em microscópio confocal LSM Meta 510 (Zeiss[®], Alemanha), do Centro de Análise e Processamento de Imagens (CAPI/ICB/UFMG), utilizando filtros de emissão/excitação de acordo com o fluoróforo utilizado. As imagens foram analisadas no programa de processamento KS300 (Zeiss[®], Alemanha) e a quantificação da fluorescência feita no programa ImageJ[®]. Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência.

4.2.3.5. Avaliação do papel de MAPK e EGF-R nos efeitos proliferativos e de migração de CMS1 e CMS2

A fim de confirmar o envolvimento da via das MAPK nos efeitos de CMS1 e CMS2, foi mensurada a fosforilação de ERK1/2 em células gástricas tratadas com as frações. Primeiramente, células AGS foram crescidas até a confluência e em seguida carenciadas de fatores de crescimento por 24 h (incubadas com FBS 0,5% diluído em meio de cultura F12-K). Decorrido esse tempo, as células foram tratadas

com CMS1 e CMS2 na concentração de 10 ng/mL, por 0, 30, 60 e 120 min. Decorridos os períodos de tratamento, o meio foi aspirado, a monocamada celular lavada com PBS gelado e as células lisadas por incubação com tampão de lise (50 µL/cavidade – item 4.1.3.5.) por 30 min, sobre gelo. A seguir, os lisados foram recolhidos e centrifugados a 13.000 x g/4°C e o sobrenadante recolhido e conservado a -20°C. A dosagem de proteínas foi realizada através do método de Bradford (item 4.1.2.2.) e os lisados analisados para a quantificação da fosforilação de ERK1/2 por Western blotting, em diferentes tempos, como descrito adiante (item 4.2.3.6.).

Após determinação do tempo com maior taxa de fosforilação, foi avaliada a influência da atividade proteolítica na ativação da via das MAPK. Assim, foram utilizadas as frações com atividade proteolítica inibida (CMS-IAA e CMS2-IAA) a 10 ng/mL.

Para avaliar mecanismos de ação através dos quais CMS1 e CMS2 afetam a proliferação e a migração celulares, células AGS foram pré-tratadas por 45 min com o inibidor da via de MEK, PD98059 a 50 µM, para avaliar a participação da via das MAPK ou com AG1478 a 10 µM, inibidor de tirosino-quinase, para avaliar a ativação do receptor de EGF – e, em seguida, tratadas com CMS1 ou CMS2 a 10 ng/mL, conforme os protocolos acima.

4.2.3.6. Western Blotting

Trinta µg dos lisados proteicos foram fracionados em gel de poliacrilamida a 10% a 120 V por 2,5 h. Após a eletroforese, o gel foi incubado à temperatura ambiente durante 10 min com o tampão de transferência (item 4.1.3.5.) sob lenta agitação. Concomitantemente, uma membrana de PVDF de mesma dimensão do gel foi lavada por 1 min com metanol absoluto e depois incubada juntamente com 2 papéis de filtro de iguais dimensões nas mesmas condições descritas anteriormente. O “sandwich” foi montado com o gel e a membrana envoltos pelos papéis de filtro. A transferência foi processada durante 45 min, em 20 V de tensão usando a célula de transferência semi-seca. As membranas foram então coradas com "Ponceau" para verificar a eficiência da transferência e para confirmar a quantidade de proteínas em cada canaleta. Após a transferência, a membrana de PVDF foi incubada na solução

de bloqueio (4.1.3.5.) por 1 h. Depois, lavou-se a membrana seis vezes de 5 min em TTBS (4.1.3.5.), seguindo-se a incubação à 4°C *overnight* com 10 mL dos anticorpos primários anti-ERK 1/2 fosforilada (pERK1/2) ou ERK total (todos diluídos 1:1000 em BSA 1% em TTBS). Ao final da incubação, lavou-se 6 vezes a membrana por 5 min em TTBS, sendo posteriormente incubada por 1 h com 10 mL de anticorpo anti-IgG de coelho com peroxidase conjugada (diluído 1:5000 em BSA 1% em TTBS) nas mesmas condições anteriores. Lavou-se novamente a membrana por 6 vezes de 5 min em TTBS, e procedeu-se a revelação por quimioluminescência utilizando o Luminatta Forte (Invitrogen[®]) como revelador, em câmara escura. Após adição do reagente, as membranas foram expostas contra filme de raios X, sendo os filmes revelados utilizando-se soluções reveladoras e fixadoras (Kodac[®]), seguindo-se as instruções do fabricante.

4.3. Análises Estatísticas

Os resultados foram expressos como media \pm e.p.m. e analisados no programa Graph Prism 5.0[®], usando análise de variância (One-way ANOVA) seguido do teste de Student Newman Keuls. Foram considerados significativos os resultados cujos valores de “p” foram inferiores a 0,05 ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

Resultados prévios do nosso grupo mostram que a fração P1G10 apresenta atividade antiúlcera gástrica em modelos animais de lesões agudas e crônicas (MELLO et al., 2008; ARAUJO E SILVA et al., no prelo). Através de separação cromatográfica, a fração P1G10 é resolvida em dois picos principais, que possuem número diferente de proteases, com características peculiares. Assim, a seguir são descritos os resultados referentes ao estudo da atividade cicatrizante das duas principais subfrações de P1G10, CMS1 e CMS2, sobre úlceras gástricas induzidas por ácido acético, assim como o estudo de alguns mecanismos envolvidos nesses efeitos.

5.1. Obtenção e caracterização das frações

A Figura 4 A mostra o perfil cromatográfico da primeira etapa purificação do látex na coluna de filtração Sephadex G10. Como se pode observar, ocorre a separação de dois picos bem definidos (P1G10 e P2G10) determinados pela leitura de absorvância a 280 nm, e pela atividade amidásica, sendo que a primeira fração apresenta uma maior atividade proteolítica.

Em um próximo passo cromatográfico, a fração P1G10 foi aplicada na coluna de troca catiônica “CM-Sephadex”, obtendo-se uma separação em quatro picos (CMS0-CMS3) de acordo com o perfil proteico (absorvância 280 nm), como apresentado na Figura 4B. Os picos CMS1 e CMS2 concentram a maior quantidade de proteínas e uma atividade amidásica mais significativa dentre os demais, sendo, portanto, escolhidos para os estudos subsequentes.

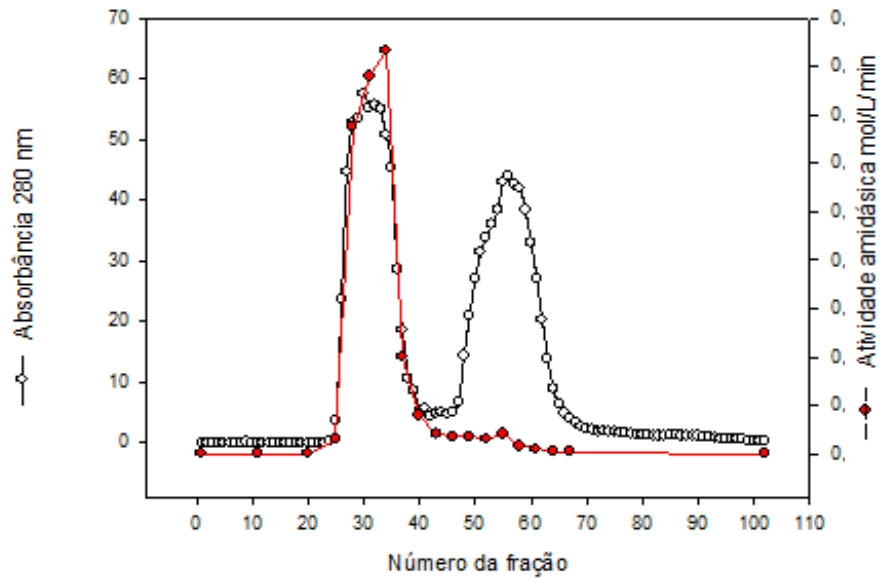
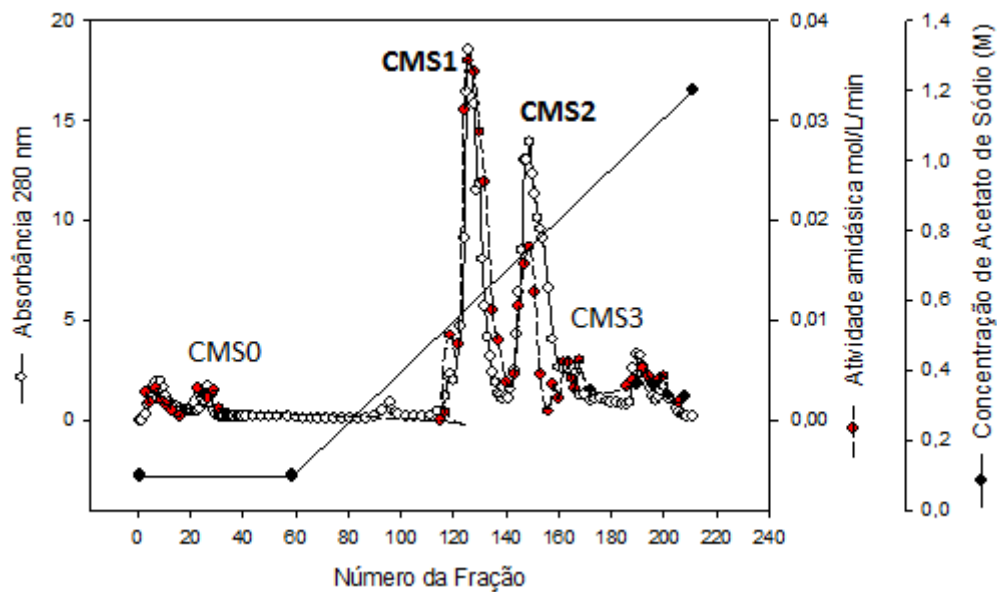
A**B**

Figura 4: Perfis cromatográficos de frações do látex de *V. cundinamarcensis*. A – A solução do látex foi aplicada sobre a coluna Sephadex G10 e a determinação do perfil proteico (280 nm) e da atividade amidásica (BAPNA) permitiram a separação de dois picos bem definidos, P1G10 e P2G10. B – Em um segundo passo cromatográfico, a fração P1G10 foi aplicada em coluna de troca iônica, CM-Sephadex, e obteve-se a eluição de 4 picos (CMS0-CMS3), sendo CMS1 e CMS2 os detentores da maior quantidade de proteínas e atividade amidásica.

A fim de verificar se os efeitos farmacológicos de CMS1 e CMS2 dependem da sua atividade proteolítica, obtivemos as frações inibidas com IAA (bloqueador de grupos tióis). Na Figura 5 A, é apresentado o perfil de inibição das frações, através da medida da atividade amidásica específica residual, expressa como porcentagem da atividade original. Com o aumento da concentração molar de IAA, houve um decréscimo da atividade amidásica das frações atingindo 2% para CMS1 e 3% para CMS2. A razão molar determinada foi de 1:1000, sendo esta utilizada para as inibições seguintes. A análise do gel de eletroforese em condições desnaturantes mostrou a presença mais abundante de proteínas com massa relativa ao redor de 23 kDa, concordando com resultados prévios do nosso grupo, e que a inibição da atividade proteolítica das frações não promoveu qualquer alteração no seu perfil proteico (Figura 5 B).

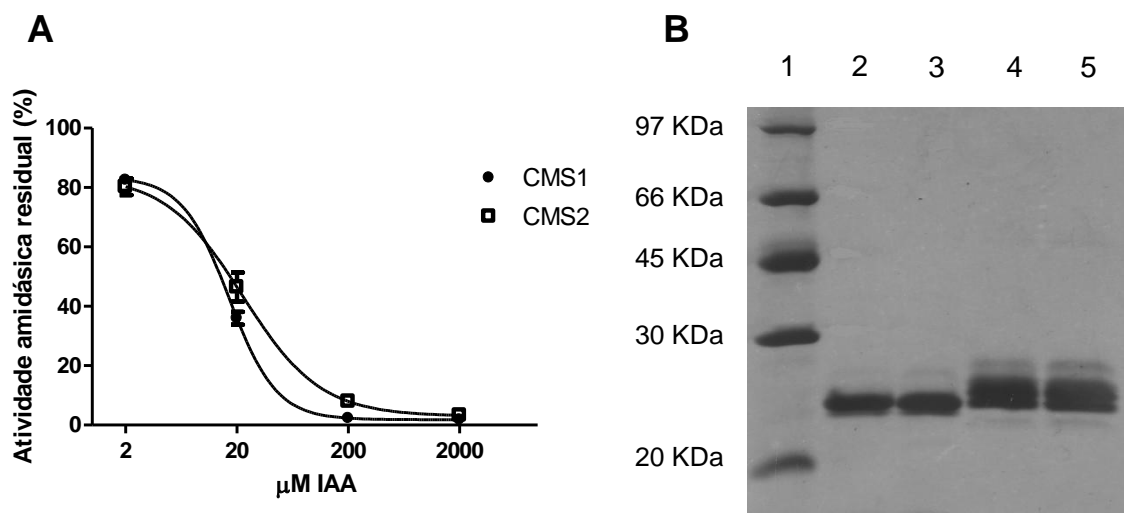


Figura 5: Inibição da atividade proteolítica de CMS1 e CMS2 com IAA. A- Curvas de Inibição: CMS1 ou CMS2 (2 μM) foram incubadas como iodoacetamida (IAA, 2-2000 μM). B- Eletroforese em gel desnaturante. Uma amostra de 10 μg foi aplicada em cada canaleta: 1 - Padrão de peso molecular; 2 - CMS1; 3 - CMS1-IAA; 4 - CMS2; 5 - CMS2-IAA.

5.2. Avaliações *in vivo*

5.2.1. Atividade cicatrizante de CMS1 e CMS2 sobre úlceras gástricas induzidas por ácido acético

Pela análise macroscópica das lesões, observamos que as duas frações apresentam atividade cicatrizante de úlceras. Os resultados (Figura 6 A e B) são expressos como índice de lesão ulcerativa (I.L.U.). A fração CMS1 (Figura 6 A) nas doses de 1 mg/kg ($5,46 \pm 0,51$) e 3 mg/kg ($7,58 \pm 1,00$) apresentou redução significativa ($p < 0,01$, ANOVA pós- teste Student Newman Keuls) no I.L.U, em relação ao controle ($14,69 \pm 1,48$). Já para CMS2 (Figura 6 B), apenas a dose de 30 mg/kg ($8,70 \pm 0,99$, $p < 0,05$, ANOVA, pós teste Student Newman Keuls) estimulou a cicatrização das lesões gástricas, evidenciada pela redução de 50% do I.L.U., em relação ao controle ($16,42 \pm 2,07$).

Na Figura 6 C, observam-se imagens representativas de lesões tratadas com CMS1 1 mg/kg, CMS2 30 mg/kg ou controle. A injeção do ácido acético induziu a formação de úlceras gástricas caracterizadas por lesão escavada, com exsudato fibrino-necrótico em sua superfície (imagem controle). Nos grupos tratados com CMS1 ou CMS2, nota-se que a menor extensão das lesões, menos exsudato fibrino-necrótico, além de edema e hiperemia menos pronunciado em relação ao controle.

Com fins de comparação, foi realizada a avaliação da atividade cicatrizante de CMS1 1 mg/kg e CMS2 30 mg/kg com o medicamento de referência Ranitidina (RAN - 100 mg/kg) e com a fração P1G10 (10 mg/kg). Os resultados apresentados na Figura 7 mostram que as frações foram mais uma vez eficazes em reduzir o I.L.U., em relação ao grupo controle ($14,21 \pm 2,30$, ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls), com reduções de 52% para CMS1 ($6,87 \pm 1,47$, $p < 0,001$), de 44% para CMS2 ($7,90 \pm 1,25$, $p < 0,01$) e 52% para P1G10 ($6,79 \pm 0,76$, $p < 0,01$). Esses resultados não foram significativamente diferentes do apresentado pela RAN ($7,27 \pm 1,17$), que reduziu em 49% ($p < 0,01$) o I.L.U. em relação ao grupo controle.

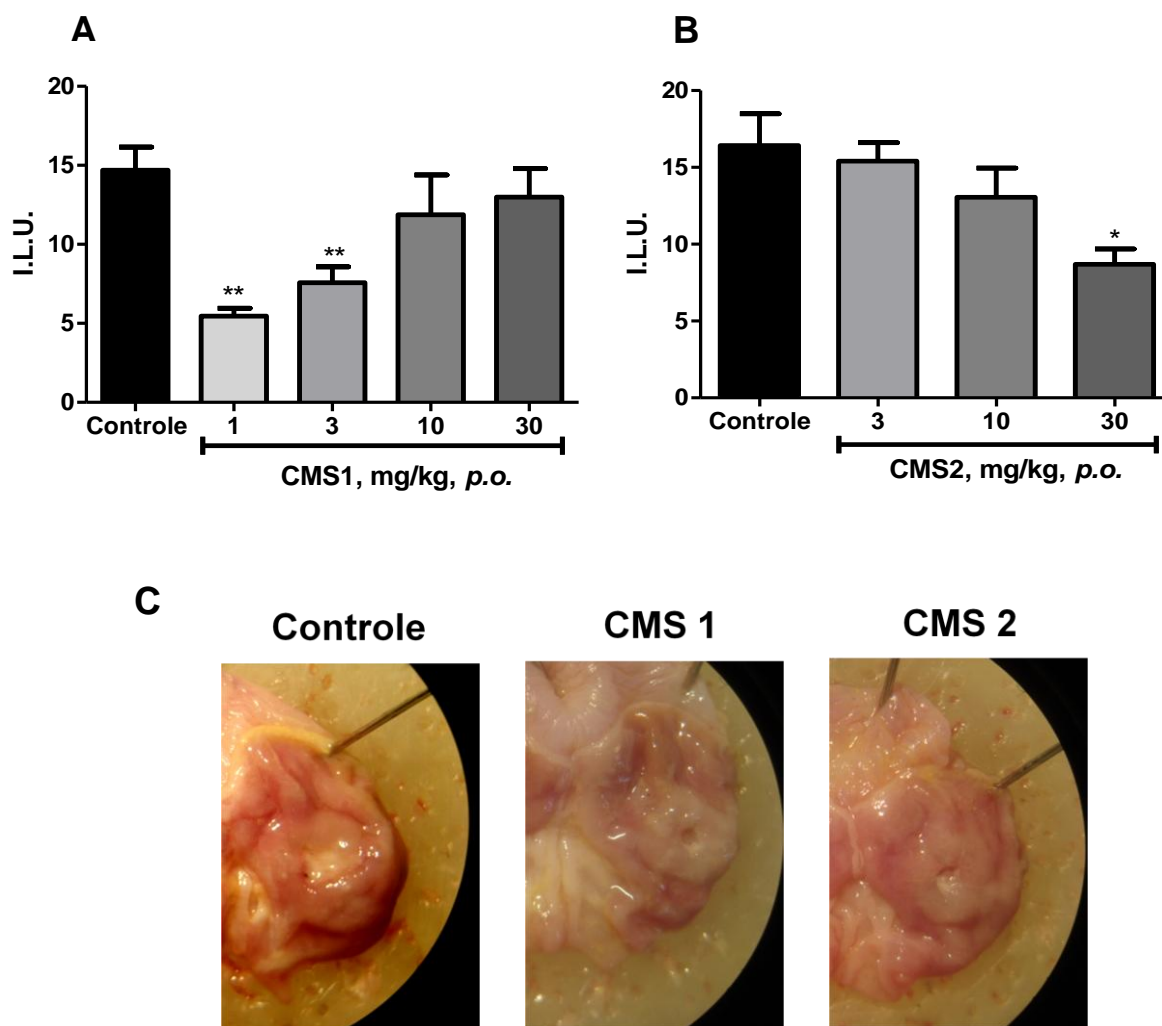


Figura 6: Avaliação da atividade cicatrizante gástrica de CMS1 e CMS2. Ratas Wistar foram submetidas à indução de úlceras gástricas com ácido acético a 10% e tratadas com A) CMS1 (1-30 mg/kg) e B) CMS2 (3-30 mg/kg) por 7 dias após a indução. No 8º dia, os animais foram eutanasiados para avaliação das ulcerações. C) Imagens representativas das lesões de animais controle e tratados com CMS1 1 mg/kg e CMS2 30 mg/kg. O resultado é expresso como média ± e.p.m do Índice de lesão ulcerativa (I.L.U) para cada grupo. * e ** indicam resultados diferentes estatisticamente do Controle com $p < 0,05$ e $0,01$, respectivamente) (ANOVA seguida de pós-teste Student Newman Keuls).

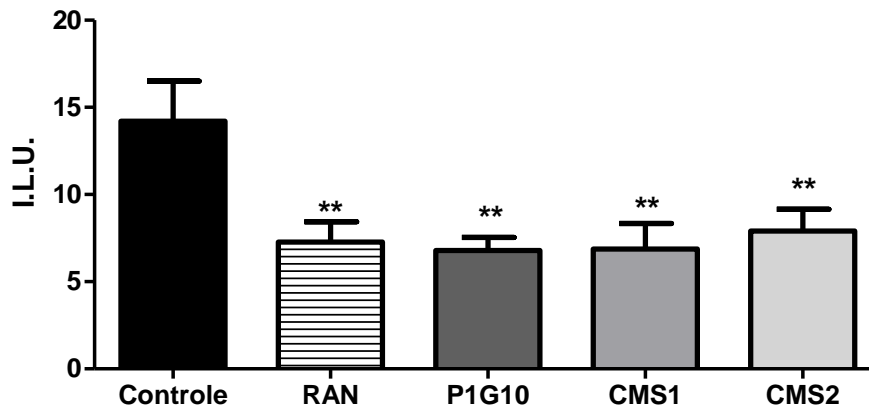


Figura 7: Comparação do efeito cicatrizante gástrico das frações CMS1 e CMS2 com P1G10 e com o medicamento de referência, ranitidina, em úlceras induzidas por ácido acético. Ratas Wistar foram submetidas à indução de úlceras gástricas com ácido acético a 10% e tratadas com CMS1 (1 mg/kg), CMS2 (30 mg/kg), P1G10 (10 mg/kg) ou RAN (100 mg/kg) por 7 dias após a indução. No 8º dia, os animais foram eutanasiados para avaliação das ulcerações. O resultado é expresso como média ± e.p.m do Índice de lesão ulcerativa (I.L.U) para cada grupo. ** indica resultado diferente estatisticamente do Controle com $p < 0,01$ (ANOVA seguida de pós-teste Student Newman Keuls).

5.2.2. Influência da atividade proteolítica de CMS1 e CMS2 em seu efeito cicatrizante gástrico

A fim de verificar a importância da atividade proteolítica de CMS1 e CMS2 em seu efeito cicatrizante, animais portadores de úlceras foram tratados com as frações com a atividade proteolítica inibida (CMS1-IAA e CMS2-IAA). Como podemos observar na Figura 8, o tratamento com as frações ativas foram eficazes em reduzir o I.L.U., apresentando CMS1, 70 % ($5,24 \pm 1,43$, $p < 0,01$) e CMS2, 56% ($7,62 \pm 1,69$, $p < 0,01$) de redução em relação ao controle ($17,29 \pm 1,53$, ANOVA pós-teste Student Newman Keuls). Por sua vez, em animais tratados com CMS1-IAA observou-se uma redução de 52% no I.L.U. ($8,23 \pm 2,97$) e naqueles tratados com CMS2-IAA, a redução de 49% ($8,75 \pm 1,51$), as quais foram significativas ($p < 0,05$, $p < 0,01$, respectivamente) em relação ao controle, e não diferentes estatisticamente ($p > 0,05$) das respectivas frações ativas.

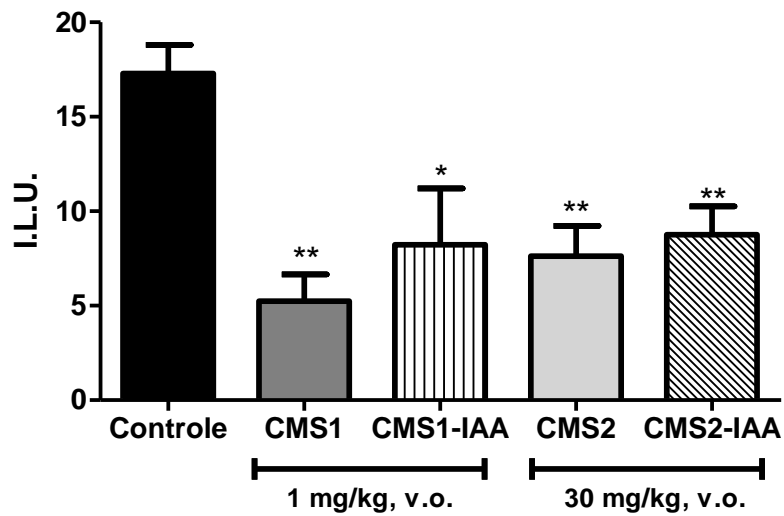


Figura 8: Avaliação da importância da atividade proteolítica no efeito cicatrizante gástrico de CMS1 e CMS2. Ratas Wistar foram submetidas à indução de úlceras gástricas com ácido acético a 10% e tratadas com CMS1 ou CMS1-IAA (1mg/kg), CMS2 ou CMS2-IAA (30 mg/kg) por 7 dias após a indução. No 8º dia, os animais foram eutanasiados para avaliação das ulcerações. O resultado é expresso como média \pm e.p.m do Índice de lesão ulcerativa (ILU) para cada grupo. * e ** indicam resultados diferentes estatisticamente do Controle com $p < 0,05$ e $0,01$, respectivamente (ANOVA seguida de pós-teste Student Newman Keuls).

5.2.3. Efeitos de CMS1 e CMS2 sobre eventos e fatores envolvidos na cicatrização gástrica

5.2.3.1. Análise histológica

A Figura 9 mostra fotomicrografias de cortes de estômago corados por HE, de ratas Wistar ulceradas pela injeção de ácido acético, tratados com veículo (controle) ou com P1G10 (10 mg/kg), CMS1 (1 mg/kg) ou CMS2 (30 mg/kg). Em 9 A é mostrado o aspecto da mucosa gástrica não-lesada, onde se observa a integridade das camadas que compõem a parede estomacal: mucosa (m), submucosa (sm) e muscular da mucosa (mm). Já nos estômagos ulcerados (Figura 9 B-E) observa-se que o ácido acético induziu a formação de lesões escavadas, com destruição da mucosa, submucosa e por vezes, parte da muscular. A superfície da lesão ulcerada apresentou exsudato fibrino-necrótico-leucocitário e logo abaixo, proliferação conjuntivo vascular (tecido de granulação) associada à infiltrado inflamatório. Os animais tratados com P1G10 (C), CMS1 (D) e CMS2 (E) apresentaram uma menor extensão da lesão com início de reepitelização a partir dos bordos da úlcera; tecido de granulação com maior organização e com menor número de vasos em direção ao leito da lesão; e material fibrino-necrótico mais solto e em menor quantidade em relação ao controle.

Nas lâminas coradas com o tricrômico de Gomori (Figura 10), observando em detalhe o tecido de granulação, verifica-se que os tratamentos com P1G10, CMS1 ou CMS2 promoveram maior deposição de fibras colágenas. Nas lesões tratadas, com P1G10 e CMS1, observa-se melhor organização dessas fibras e menor celularidade em relação ao controle. Nos cortes de animais tratados com CMS1 estão presentes glândulas em formação junto ao tecido de granulação, indicando um processo de regeneração mais avançado.

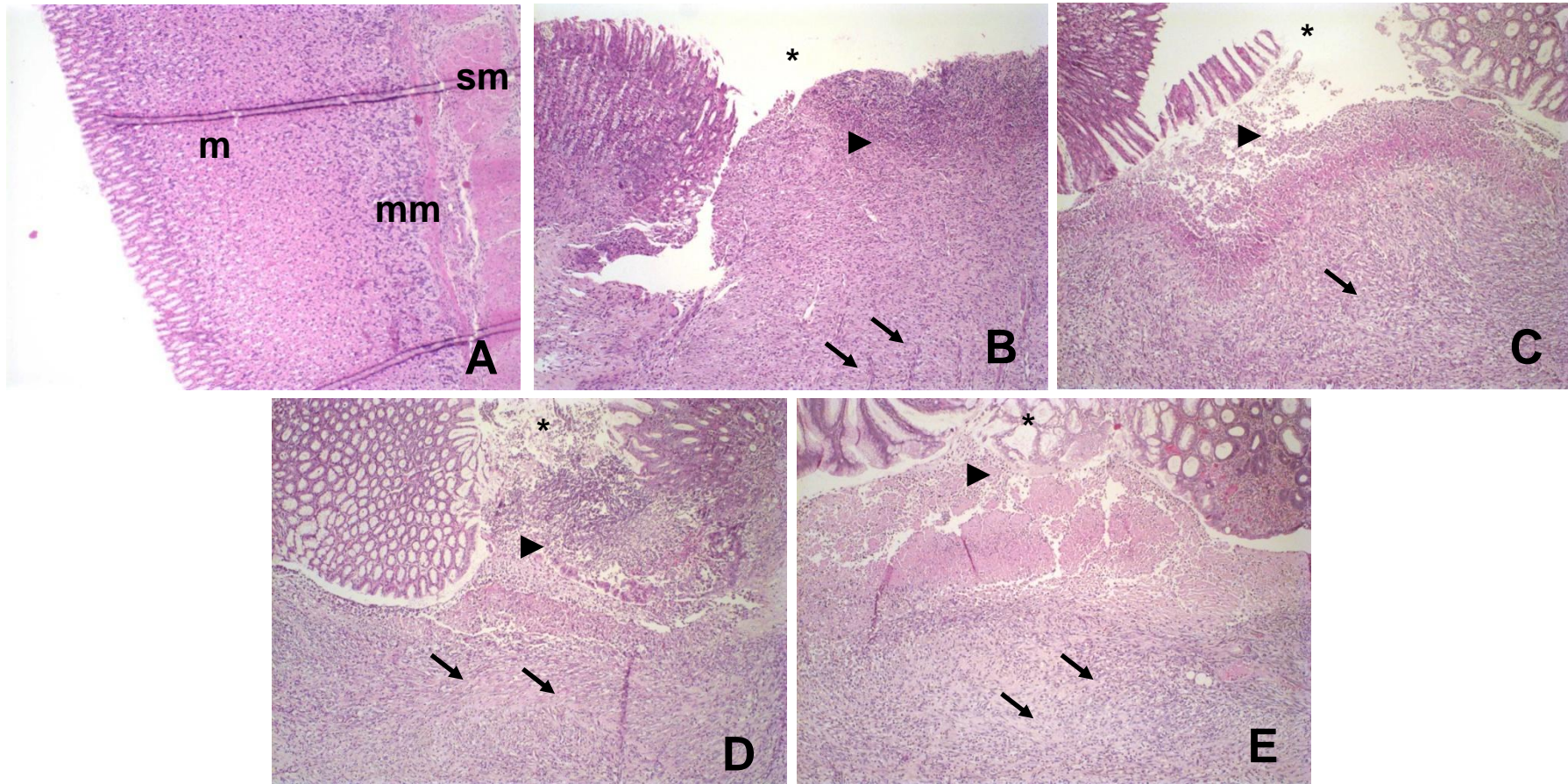


Figura 9: Fotomicrografias de cortes histológicos de estômago de ratas Wistar com úlcera induzida por ácido acético e tratadas com P1G10, CMS1 e CMS2 corados com hematoxilina e eosina. A – Sham; B – controle; C – P1G10 (10 mg/kg); D – CMS1 (1 mg/kg); E – CMS2 (30 mg/kg). * extensão da lesão; cabeças de seta: material fibrino-necrótico-leucocitário; setas pretas: tecido de granulação. Aumento de 100x.

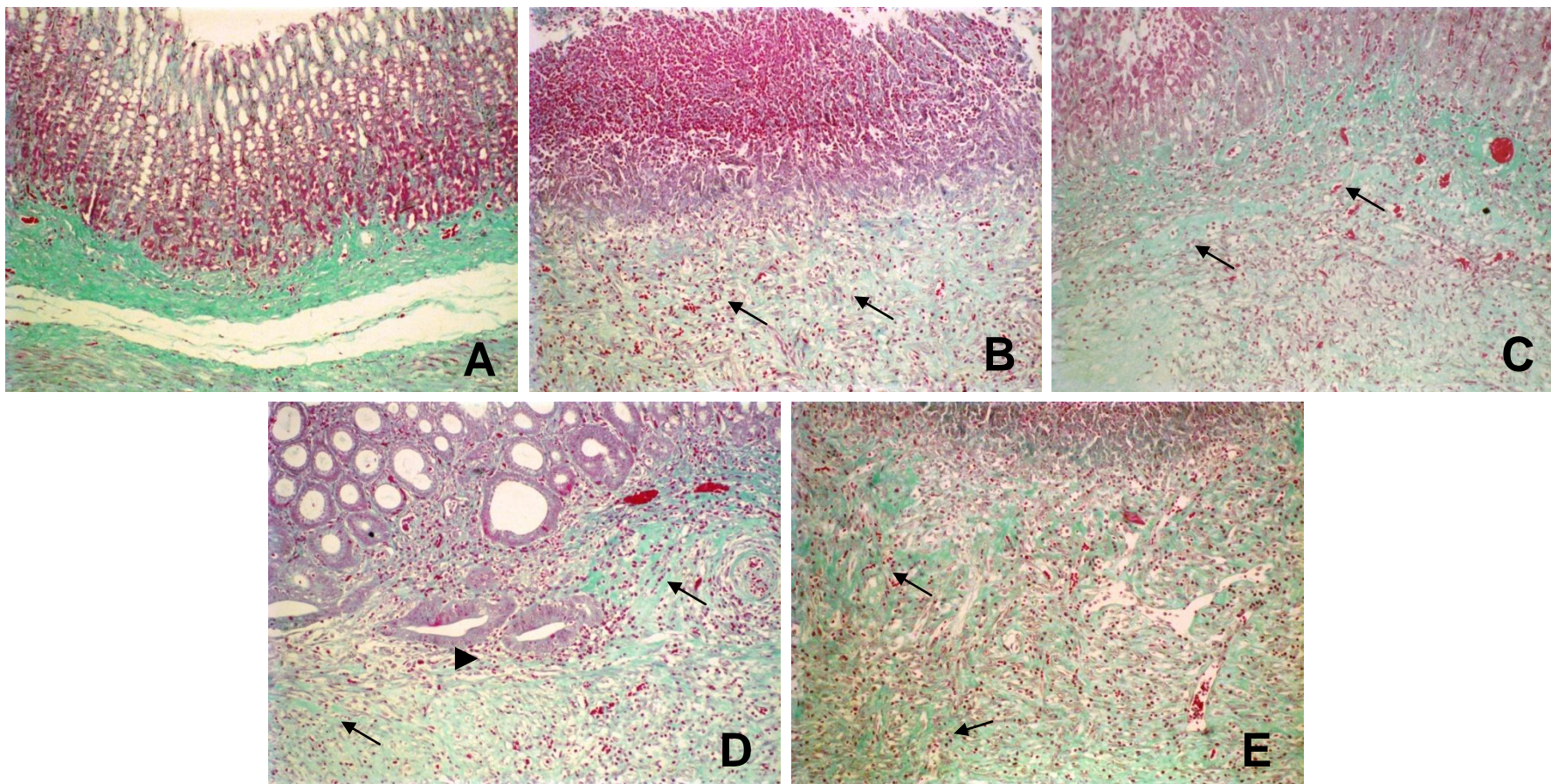


Figura 10: Fotomicrografias de cortes histológicos de estômago de ratas Wistar com úlcera induzida por ácido acético e tratadas com P1G10, CMS1 e CMS2 corados com tricrômico de Gomori. A – Sham; B – controle; C – P1G10 (10 mg/kg); D – CMS1 (1 mg/kg); E – CMS2 (30 mg/kg). Setas: deposição e orientação de fibras colágenas. Cabeças de seta: Glândulas em formação. Aumento de 200x.

5.2.3.2. Análise imunohistoquímica e morfométrica

5.2.3.2.1. Proliferação Celular

Para avaliar o efeito das frações sobre a proliferação celular *in vivo*, cortes de úlceras induzidas pelo ácido acético e tratadas com CMS1, CMS2 e P1G10 foram submetidas à imunolocalização de CDC47, um marcador de proliferação celular. Na fotomicrografia mostrada na Figura 11, correspondente ao grupo Sham, nota-se células em proliferação, na direção do lúmen estomacal. Nos estômagos ulcerados tratados com P1G10, CMS1 e CMS2, observa-se a presença de grande número de células em proliferação nos bordos da lesão, e em quantidade maior do que o visto no grupo controle. A confirmação dessa observação foi dada pela quantificação das taxas de proliferação celular (% - calculada conforme descrito no item 4.2.2.5.2.), representada na Figura 11 F. Verificou-se que as taxas dos grupos tratados com P1G10 ($18,14 \pm 2,06$ % – $p < 0,01$), CMS1 ($25,00 \pm 4,42$ % – $p < 0,001$), e CMS2 ($16,94 \pm 2,48$ % – $p < 0,01$) foram superiores às encontradas para o grupo controle ($5,02 \pm 0,92$ %, ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls), mas sem diferença estatística entre si.

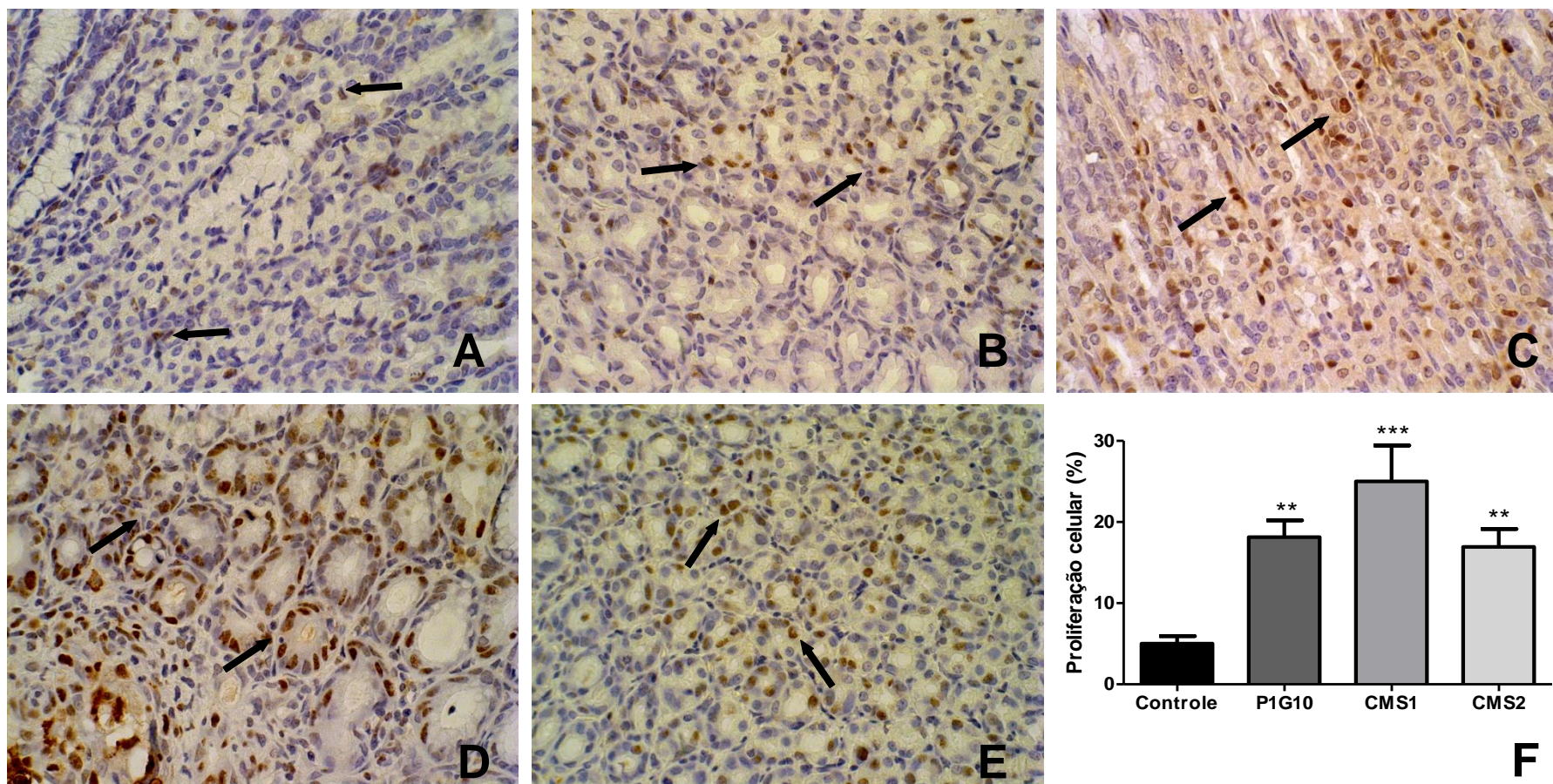


Figura 11: Avaliação da proliferação celular através da imunolocalização de CDC47. (A–E) Fotomicrografias de cortes histológicos de estômago de ratos Wistar normais (A) e com úlcera induzida por ácido acético e tratadas com veículo (B – controle), P1G10 10 mg/kg (C), CMS1 1 mg/kg (D) e CMS2 30 mg/kg (E), submetidos à imunolocalização de CDC47. F) Análise quantitativa da proliferação celular na mucosa gástrica de ratos controle e tratadas com P1G10, CMS1 e CMS2. A taxa de proliferação foi obtida através do cálculo da porcentagem de células marcadas positivamente, num total de 1000 células nas margens das lesões. O resultado é expresso como média \pm e.p.m da porcentagem de proliferação celular. ** e *** diferente estatisticamente do Controle $p < 0,01$ e $0,001$, respectivamente (ANOVA seguida de pós-teste Student-Newman-Keuls). Setas: células em proliferação. Aumento de 600x.

5.2.3.2.2. Angiogênese

A angiogênese foi avaliada nos cortes histológicos submetidos à imunolocalização pelo marcador PECAM-1/CD31, que é expresso em células endoteliais. Na Figura 12, são mostradas as fotomicrografias dos cortes marcados para PECAM-1/CD31, onde são identificados vasos presentes na mucosa normal (Sham) e no tecido de granulação dos grupos controle, P1G10, CMS1 e CMS2. Nas fotomicrografias nota-se que a indução da lesão promoveu um aumento do número de vasos, quando comparados ao Sham. Em relação ao controle, os tratamentos com as frações aumentaram ainda mais o número de vasos nos tecido de granulação. Através da análise morfométrica dos cortes, a densidade de vasos foi quantificada como descrito em 4.2.2.5.2.. Como se pode observar na Figura 12 F, ocorreu um aumento significativo na quantidade de vasos nos animais tratados com P1G10 ($5,26 \pm 0,46$ vasos/campo – $p > 0,001$), CMS1 ($5,84 \pm 0,30$ vasos/campo – $p > 0,001$) e CMS2 ($4,56 \pm 0,24$ vasos/campo – $p > 0,01$) em relação ao controle ($2,85 \pm 0,26$ vasos/campo, ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

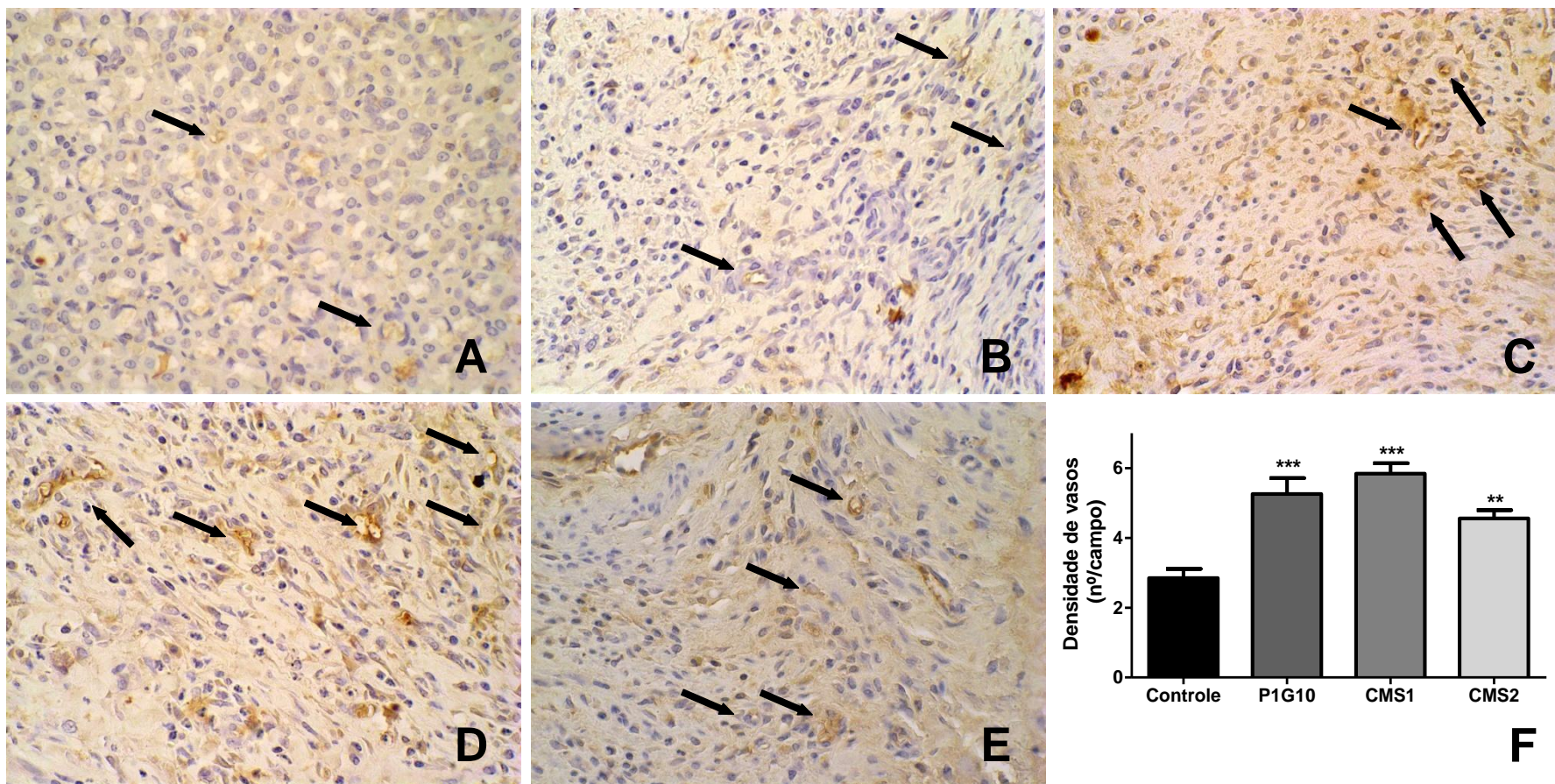


Figura 12: Avaliação da angiogênese através da imunolocalização de PECAM-1/CD31. A–E) Fotomicrografias de cortes histológicos de estômago de ratos Wistar normais (A) e com úlcera induzida por ácido acético e tratadas com veículo (B – controle), P1G10 10 mg/kg (C), CMS1 1 mg/kg (D) e CMS2 30 mg/kg (E), submetidos à imunolocalização de PECAM-1/CD31. F) Análise quantitativa da densidade de vasos no tecido de granulação de ratos controle e tratadas com P1G10, CMS1 e CMS2. O resultado é expresso como média \pm e.p.m do número de vasos/campo. ** e *** diferente estatisticamente do Controle $p < 0,01$ e $0,001$, respectivamente (ANOVA seguida de pós-teste Student-Newman-Keuls). Setas: neovasos formados. Aumento de 600x.

5.2.3.3. Avaliação do efeito das frações na atividade de MMP-2 em úlceras gástricas induzidas pelo ácido acético

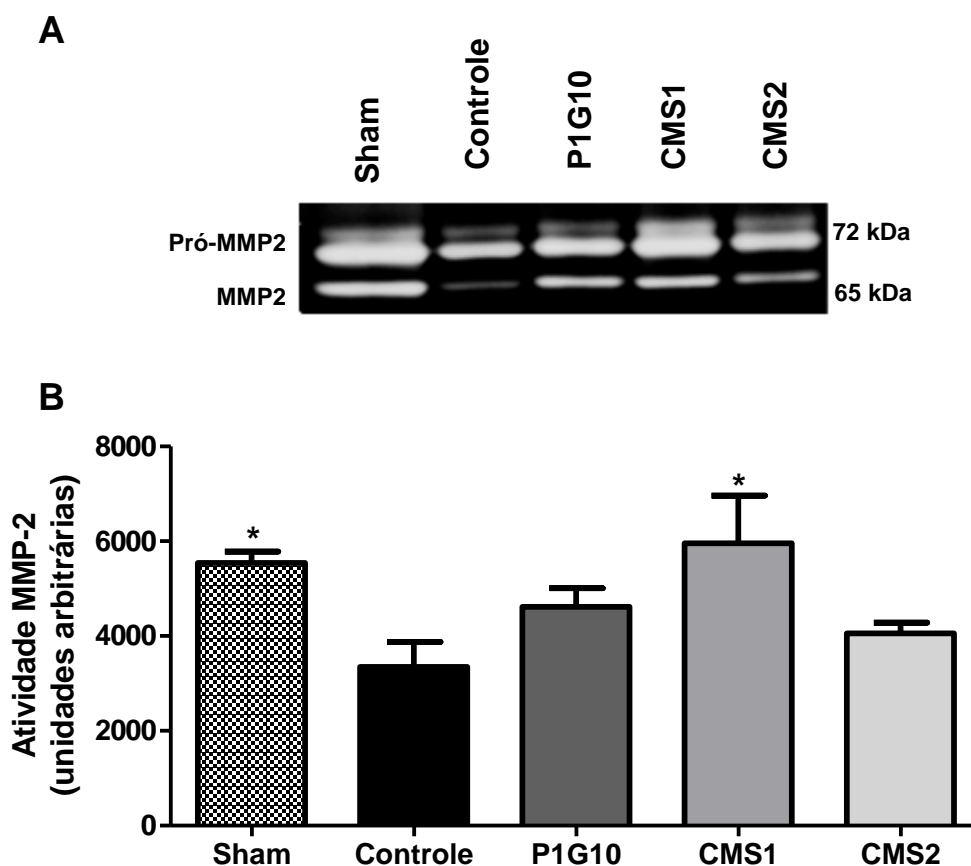


Figura 13: Atividade de MMP2 em estômagos de animais portadores de úlceras induzidas por ácido acético e tratadas com as frações. Ratas Wistar foram submetidas à indução de úlceras gástricas por ácido acético a 10% e tratadas com CMS1 (1 mg/kg), CMS2 (30 mg/kg) ou P1G10 (10 mg/kg) por 7 dias após a indução. No 8º dia, os animais foram eutanasiados e seções do estômago processadas para a análise por zimografia. (A) Zimograma mostrando os halos de atividade de Pró-MMP-2 (72 kDa) e de MMP-2 ativa (65 kDa). (B) Atividade de MMP-2, medida por densitometria no programa ImageJ. Os dados são expressos como média \pm e.p.m. de unidades arbitrárias de atividade para MMP-2. * indica resultado diferente estatisticamente do Controle com $p < 0,05$ (ANOVA seguida de pós-teste Student Newman Keuls).

Como se pode observar na Figura 13 A, a indução de úlceras gástricas pelo ácido acético reduziu de maneira significativa a atividade de MMP-2, evidenciada pela menor densidade da banda controle em relação ao grupo não lesado (Sham). Essa observação foi quantificada na análise densitométrica (Figura 13 B) que

mostrou uma redução de 40% da atividade de MMP-2 do grupo controle ($3351,00 \pm 524,1$) em relação ao grupo Sham ($5543,00 \pm 241,90$, $p < 0,05$ - ANOVA seguida de pós-teste Student Newman Keuls). Por sua vez, o tratamento com CMS1 ($5954,00 \pm 1007,00$), aumentou em 78% a atividade de MMP-2, o que foi significativamente maior ($p < 0,05$) ao apresentado pelo grupo controle. Já as frações P1G10 ($4618,00 \pm 389,80$) e CMS2 ($4054,00 \pm 231,30$) não alteraram significativamente a atividade dessa enzima ($p > 0,05$).

5.2.3.4. Efeito das frações sobre a expressão gênica de fatores envolvidos na cicatrização gástrica

A expressão de mRNA para fatores de crescimento, EGF, VEGF e bFGF, além de COX-1, COX-2, MMP2 e TIMP-2 foi avaliada através da técnica de Real Time PCR quantitativo. Para isso os valores foram normalizados em relação ao grupo não lesado (Sham) e expressos como *Fold changes*.

Com relação ao EGF (Figura 14 A), observa-se que nas lesões controle ($0,26 \pm 0,04$) houve uma quantidade diminuída de mRNA em relação ao grupo Sham (não lesado - $0,90 \pm 0,19$ - $p < 0,01$ - ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls). As frações P1G10 10 mg/kg ($0,51 \pm 0,09$) e CMS2 30 mg/kg ($0,59 \pm 0,08$) aumentaram significativamente ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) a expressão de EGF, em relação ao grupo controle. Já a fração CMS1 1 mg/kg ($0,39 \pm 0,02$) não alterou significativamente este parâmetro.

Por sua vez, a expressão de bFGF (Figura 14 B) foi aumentada tanto pelo tratamento com CMS1 1 mg/kg e CMS2 30 mg/kg. A primeira aumentou em 26 vezes a quantidade de mRNA ($16,50 \pm 5,43$, $p < 0,001$) para esse gene, em relação ao controle ($0,63 \pm 0,18$ - ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls). Já a fração CMS2 apresentou um aumento de 5 vezes ($p < 0,01$) na expressão de bFGF e o tratamento com P1G10 ($1,31 \pm 0,22$) não alterou significativamente ($p > 0,05$) a expressão do mesmo, em relação ao controle.

Por sua vez, na expressão de VEGF (Figura 14 C), que foi significativamente diminuída na mucosa lesada (controle - $0,26 \pm 0,01$, $p < 0,01$) em relação a mucosa sadia (Sham - $1,00 \pm 0,21$ - ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls), observou-se um aumento com todos os tratamentos. P1G10 ($0,81 \pm 0,23$), CMS1 ($1,16 \pm 0,09$)

e CMS2 ($1,02 \pm 0,06$) apresentaram resultados semelhantes, com aumentos significativos ($p < 0,05$) da ordem de 4 vezes na quantidade de mRNA para VEGF, em relação ao controle ($0,26 \pm 0,01$).

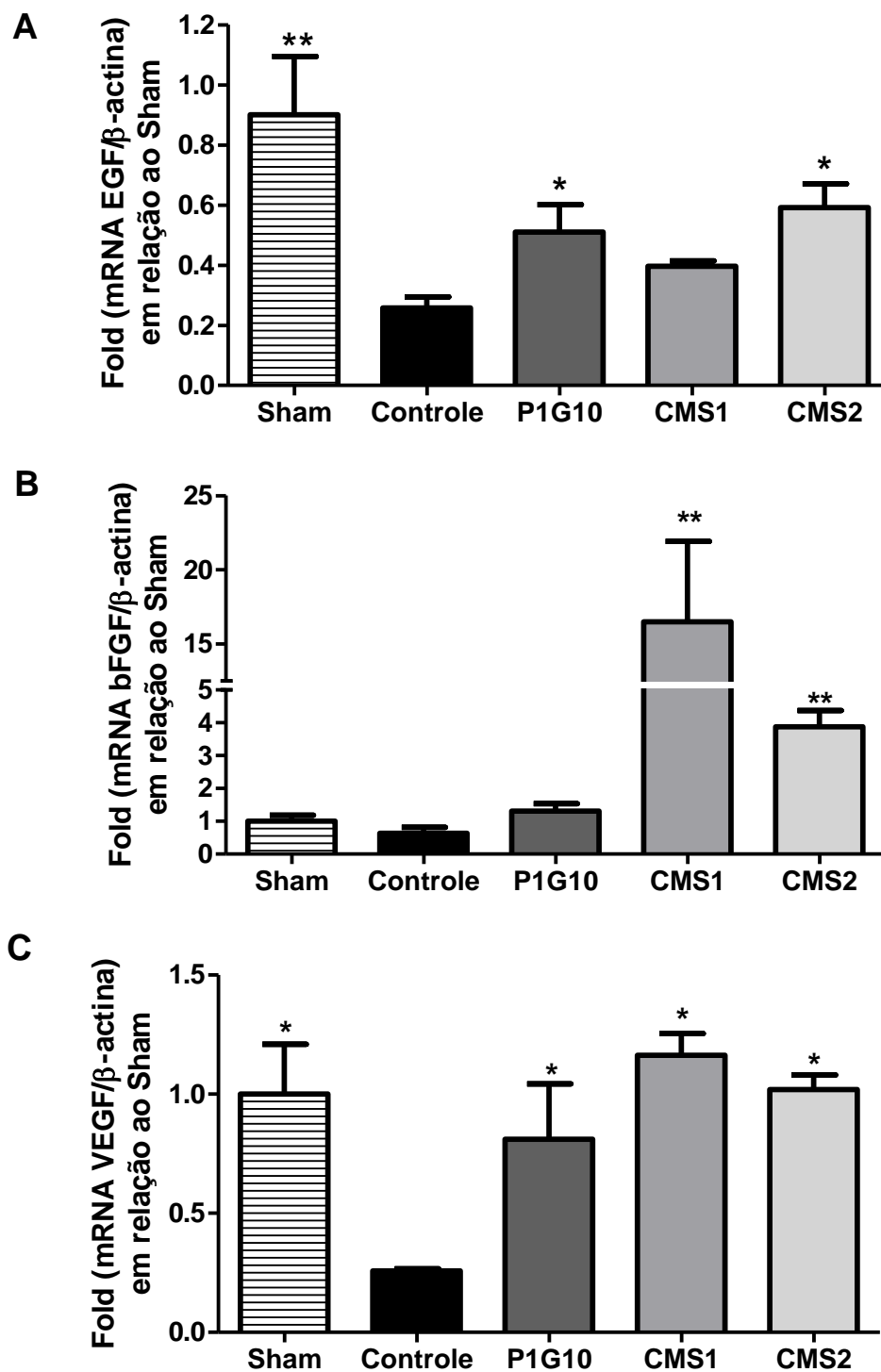


Figura 14: Expressão gênica de fatores de crescimento em estômagos de animais portadores de úlceras induzidas por ácido acético e tratadas com as frações. Ratas Wistar foram submetidas à indução de úlceras gástricas por ácido acético a 10% e tratadas com CMS1 (1 mg/kg), CMS2 (30 mg/kg) ou P1G10 (10 mg/kg) por 7 dias após a indução. No 8º dia, os animais foram eutanasiados e secções do estomago processadas para a análise por Real Time PCR. (A) Expressão de EGF; (B) Expressão de bFGF (C) Expressão de VEGF. Os dados são expressos como média \pm e.p.m. de unidades arbitrárias corrigidas para o gene de β -actina e normalizadas para o grupo Sham. * e ** indicam resultados diferentes estatisticamente do Controle com $p < 0,05$ e $0,01$, respectivamente) (ANOVA seguida de pós-teste Student Newman Keuls).

Com relação à enzima COX, também se observou alteração da expressão gênica de suas duas isoformas, COX-1 e COX-2. No primeiro caso (Figura 15 A), nos animais controle, se observou quantidades semelhantes ($p > 0,05$) de mRNA para COX-1, em relação ao grupo Sham ($1,00 \pm 0,20$ - ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls). Já os tratamentos com CMS1 ($12,28 \pm 0,96$) e P1G10 ($1,62 \pm 0,17$) aumentaram significativamente ($p < 0,001$ e $p < 0,05$) a expressão de COX-1, em relação ao controle ($0,51 \pm 0,05$), enquanto CMS2 ($1,04 \pm 0,36$) não a alterou significativamente ($p > 0,05$).

No caso de COX-2 (Figura 15 B), nos animais controle ($17,73 \pm 5,09$) ocorreu um aumento na expressão dessa enzima, em relação ao controle sadio (Sham – $1,00 \pm 0,12$, $p < 0,01$ – ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls). Os tratamentos com P1G10, CMS1 ou CMS2 reduziram a expressão gênica dessa enzima em 94 ($1,06 \pm 0,21$, $p < 0,01$), 53 ($8,24 \pm 3,24$, $p < 0,05$) e 93% ($1,29 \pm 0,19$, $p < 0,01$) respectivamente, em relação ao controle ($17,73 \pm 5,09$ - ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls).

Por último, as expressões de mRNA para MMP-2 e TIMP-2 também foram avaliadas. Na mucosa gástrica de animais tratados com CMS1 ($48,80 \pm 13,38$, $p < 0,01$) observou-se um acentuado aumento (mais de 100 vezes) na expressão gênica de MMP-2, em relação ao controle ($0,34 \pm 0,20$ – ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls). Nos tratados com P1G10 e CMS2 também foi evidenciado um aumento na quantidade de mRNA para MMP-2 em 23 vezes ($8,00 \pm 3,58$) e 13 vezes ($4,50 \pm 2,55$), respectivamente (Figura 16 A).

Com relação à TIMP-2 (Figura 16 B), comparando ao grupo Sham ($1,00 \pm 0,15$), houve um aumento significativo em sua expressão nos animais controle ($9,65 \pm 2,32$, $p < 0,01$ – ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls). Em relação a esse grupo, todos os tratamentos alteraram de maneira significativa a expressão desse gene, com reduções de 64% para P1G10 ($3,23 \pm 1,48$, $p < 0,05$), 66% para CMS1 ($3,27 \pm 0,60$, $p < 0,05$) e 52% para CMS2 ($4,68 \pm 0,91$, $p < 0,05$).

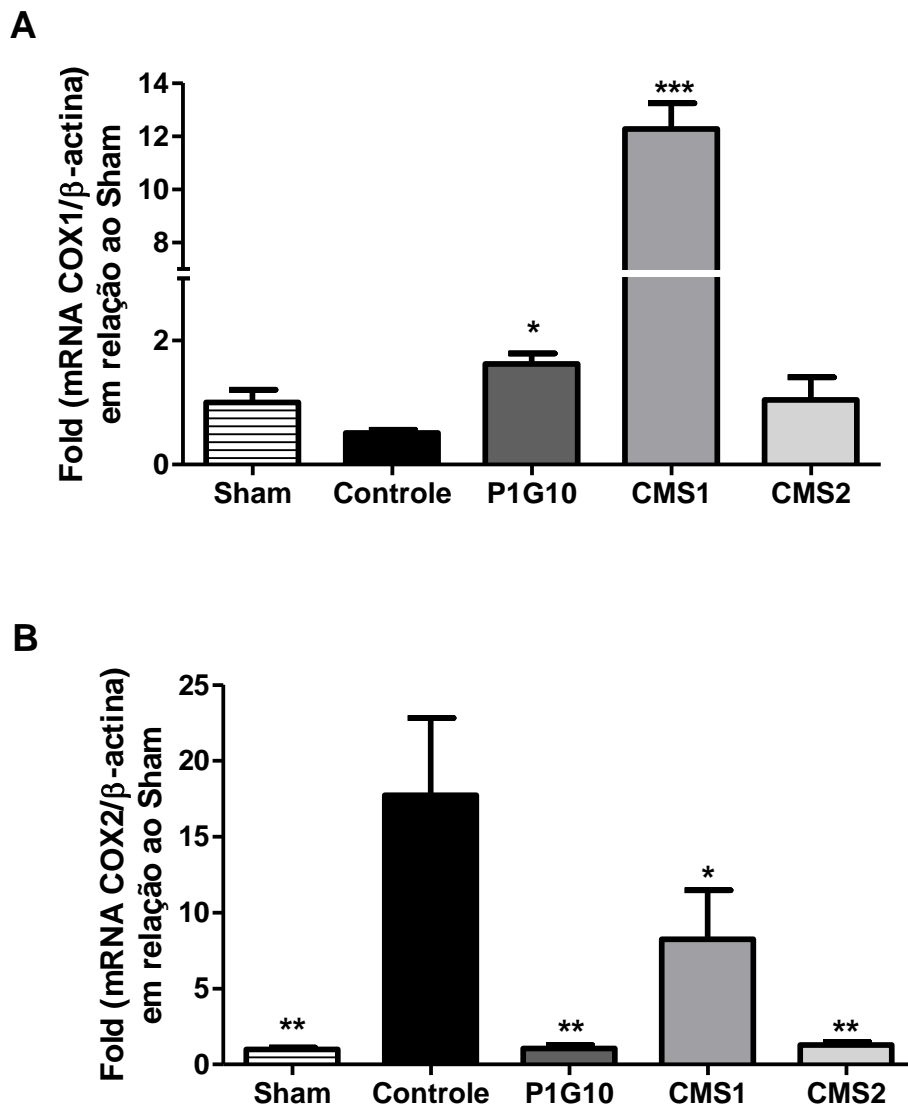


Figura 15: Expressão gênica de COX-1, COX-2 em estômagos de animais portadores de úlceras induzidas por ácido acético e tratadas com as frações. Ratas Wistar foram submetidas à indução de úlceras gástricas por ácido acético a 10% e tratadas com CMS1 (1 mg/kg), CMS2 (30 mg/kg) ou P1G10 (10 mg/kg) por 7 dias após a indução. No 8º dia, os animais foram eutanasiados e secções do estômago processadas para a análise por Real Time PCR. (A) Expressão de COX-1; (B) Expressão de COX-2. Os dados são expressos como média \pm e.p.m. de unidades arbitrárias corrigidas para o gene de β -actina e normalizadas para o grupo Sham. ** e *** indicam resultados diferentes estatisticamente do Controle com $p < 0,01$ e $0,001$, respectivamente) (ANOVA seguida de pós-teste Student Newman Keuls).

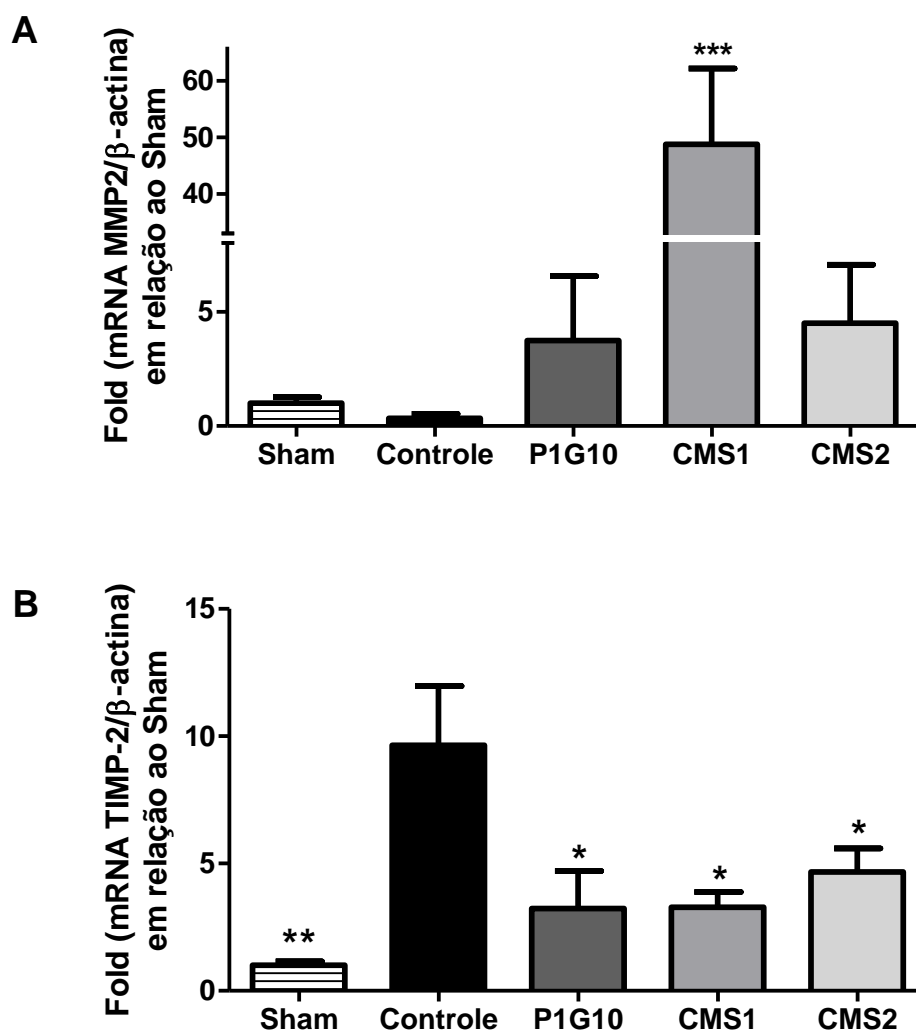


Figura 16: Expressão gênica de MMP2 e seu inibidor TIMP2 em estômagos de animais portadores de úlceras induzidas por ácido acético e tratados com as frações. Ratas Wistar foram submetidas à indução de úlceras gástricas por ácido acético a 10% e tratadas com CMS1 (1 mg/kg), CMS2 (30 mg/kg) ou P1G10 (10 mg/kg) por 7 dias após a indução. No 8º dia, os animais foram eutanasiados e secções do estomago processadas para a análise por Real Time PCR. (A) Expressão de MMP2; (B) Expressão de TIMP2. Os dados são expressos como média \pm e.p.m. de unidades arbitrárias corrigidas para o gene de β -actina e normalizadas para o grupo Sham. * e *** indicam resultados diferentes estatisticamente do Controle com $p < 0,05$ e $0,001$, respectivamente) (ANOVA seguida de pós-teste Student Newman Keuls).

5.3. Avaliação *in vitro*

5.3.1. Efeito mitogênico de CMS1 e CMS2 sobre células gástricas e endoteliais e a importância da atividade proteolítica

A capacidade de CMS1 e CMS2 em estimular a proliferação de células epiteliais gástricas (AGS) e endoteliais (HUVEC-CS) foi determinada, utilizando o método de incorporação de [³H-metil]-Timidina e BrdU, respectivamente (Figura 17).

Em células AGS (Figura 17 A), a fração CMS1 ativa aumentou em 75% ($1,75 \pm 0,01$, $p < 0,001$) o índice de proliferação em relação ao grupo controle (FBS 0,5% - 1,0 - ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls). Já a fração inibida (CMS1-IAA) obteve estímulo proliferativo significativo em relação ao controle, entretanto com índice significativamente menor ($1,37 \pm 0,20$, $p < 0,05$) que o observado para a fração ativa. Em células HUVEC-CS, apenas CMS1 10 ng/mL aumentou em 53% a taxa de proliferação ($1,53 \pm 0,10$, $p < 0,001$) (Figura 17 B). Apesar de a fração inibida (CMS1-IAA) não ter apresentado estímulo proliferativo significativo em quaisquer das concentrações testadas, quando a 10 ng/mL estimulou a proliferação moderadamente, aumentando o índice em 30% ($1,30 \pm 0,05$, $p > 0,05$) em relação ao controle negativo, não sendo estatisticamente diferente ($p > 0,05$) do grupo CMS1.

Por sua vez, CMS2 a 10 ng/mL aumentou a proliferação de AGS em 78% ($1,78 \pm 0,13$, $p < 0,001$) e de HUVEC-CS em 32% ($1,32 \pm 0,04$, $p < 0,05$), em relação aos respectivos controles, FBS 0,5% e FBS 0% (ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls). A inibição da atividade proteolítica reduziu o índice de proliferação de AGS (Figura 17 C) para $1,36 \pm 0,03$, um valor significativamente menor ($p < 0,01$) ao observado a fração ativa, mas que ainda apresentou aumento ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo (FBS 0,5%). Em células HUVEC-CS, a inibição da atividade proteolítica (CMS2-IAA - $1,12 \pm 0,04$, $p > 0,05$) reduziu a atividade proliferativa da fração, entretanto esse efeito não foi diferente estatisticamente ($p > 0,05$) entre CMS2 e CMS2-IAA (Figura 17 D).

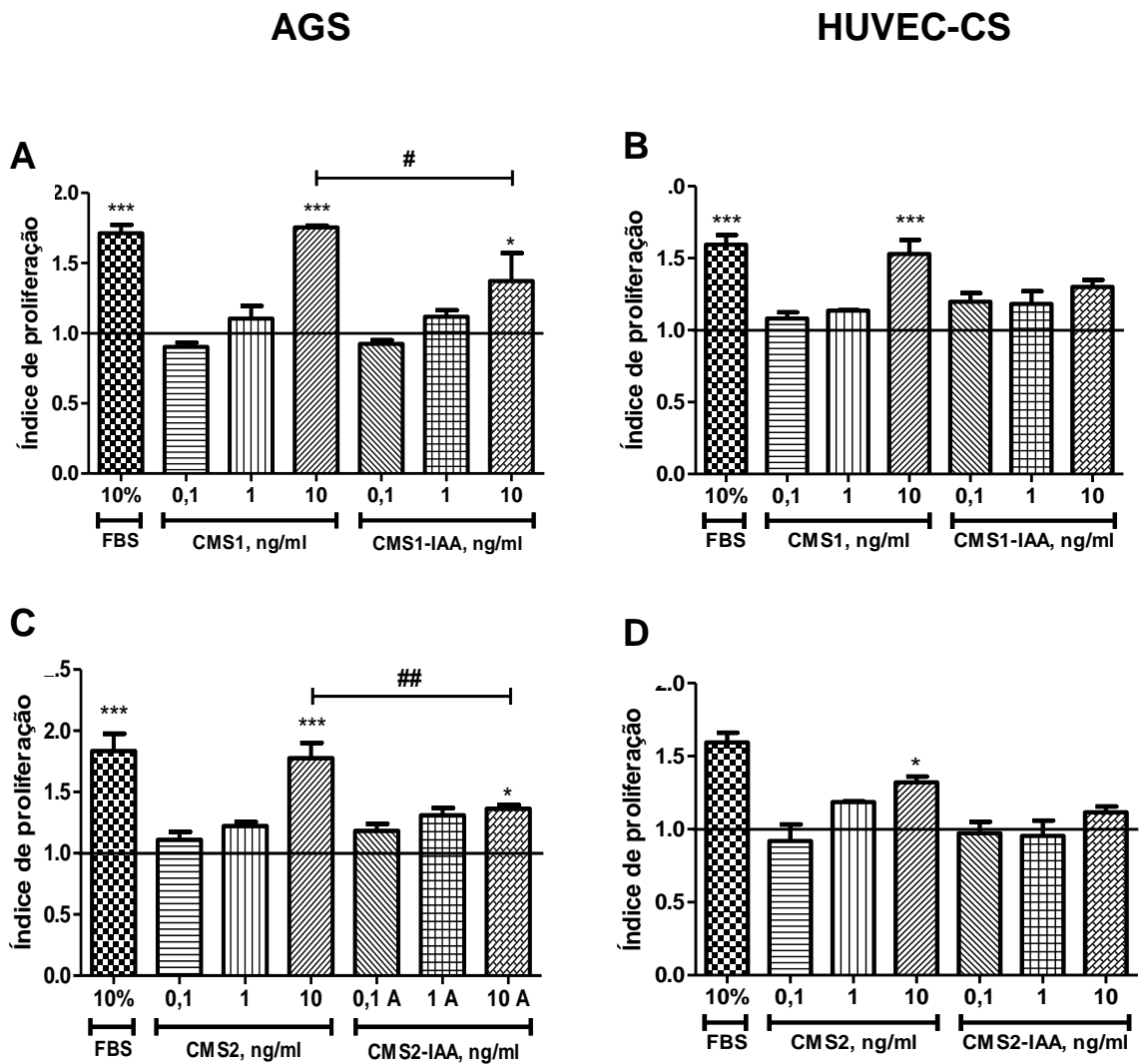


Figura 17: Efeito proliferativo de CMS1 e CMS2 sobre células AGS e HUVEC-CS. (A) e (C): Células AGS (5×10^4 células/poço) foram semeadas em placas de 24 poços e expostas às frações (0,1-10,0 ng/mL) por 48 h. A taxa de proliferação foi medida por incorporação de $[3H]$ Timidina. (B) e (D): Células HUVEC-CS (1×10^4 células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e expostas às frações (0,1-10,0 ng/mL) por 24 h. A taxa de proliferação foi medida por incorporação de BrdU. Os resultados são expressos como proliferação celular (%), atribuindo um valor de 100% à proliferação celular obtida com o controle negativo (carenciado). * e *** indicam resultados diferentes estatisticamente do grupo Controle, com $p < 0,05$ e $0,001$; # e ## indicam resultados diferentes estatisticamente do grupo tratado com a fração ativa, respectivamente (ANOVA seguido do pós-teste Student Newman Keuls, $p < 0,05$).

5.3.2. Efeitos de CMS1 e CMS2 sobre a migração de células epiteliais gástricas e endoteliais

Como pode ser observado na Figura 18, tanto CMS1 (Figura 18 B) quanto CMS2 (18 C) estimularam a migração das células AGS, sendo o percentual de fechamento maior que do controle. CMS1 promoveu o fechamento de 38% ($38,05 \pm 4,20$ %, $p < 0,05$) da área da lesão nas primeiras 6 h em relação ao controle negativo (FBS 0,5%) que reduziu 22% ($22,44 \pm 2,51$ % - ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls). Em 24 h, CMS1 reduziu a área da fenda em $65,10 \pm 8,00$ %, o que foi significativamente maior ($p < 0,01$) ao observado em relação ao FBS 0,5% ($42,09 \pm 2,83$ %).

A fração CMS2 também foi eficaz em estimular a migração celular, apresentando, em 6 h, 39% ($38,86 \pm 4,55$ %, $p < 0,01$) de redução da lesão em relação ao FBS 0,5% ($14,35 \pm 3,57$ %). Em 24 h, o fechamento da lesão dos poços tratado com CMS2 atingiu 62% ($62,26 \pm 2,84$ %), sendo significativamente maior ($p < 0,05$) que o controle negativo ($40,96 \pm 3,03$ %). Em 18 A são mostradas figuras representativas do ensaio de migração, às 0 h e 24 h.

Em células HUVEC-CS (Figura 19) também foi observado um efeito estimulatório da migração celular tanto por CMS1 (19 B) quanto por CMS2 (19 C). Esta última, já em 6 h, promoveu o fechamento de $20,44 \pm 5,87$ % da área da lesão, o que foi significativamente maior ao observado para o grupo controle (FBS 0% - $45,59 \pm 4,00$ %, $p < 0,05$ - ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls), chegando a $60,38 \pm 7,10$ % ($p < 0,01$) em 24 h (FBS 0% - $30,78 \pm 5,07$ %). CMS1 por sua vez atingiu $62,53 \pm 1,27$ % ($p < 0,001$) de fechamento da lesão original (em 24 h), o que foi significativamente maior que o observado para o grupo FBS 0% ($40,85 \pm 1,93$ %). Em 19 A são mostradas figuras representativas do ensaio de migração, às 0 h e 24 h.

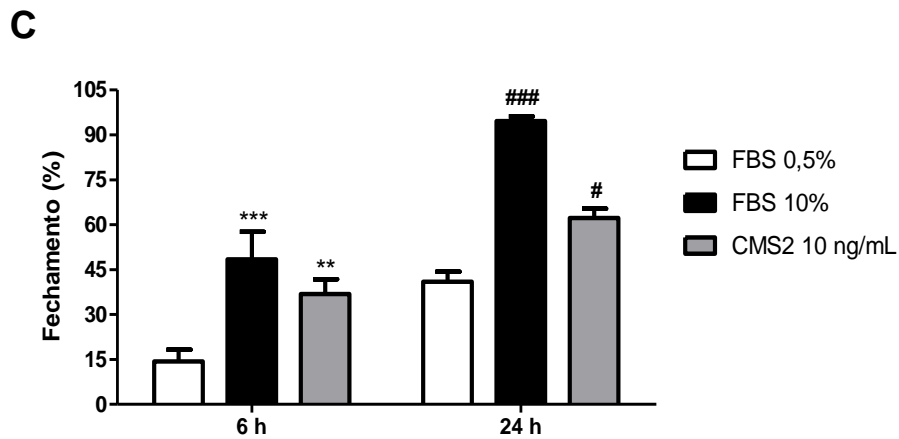
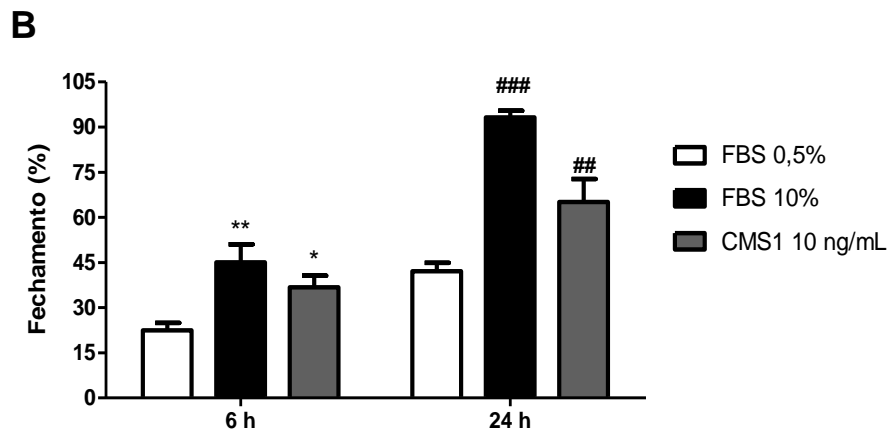
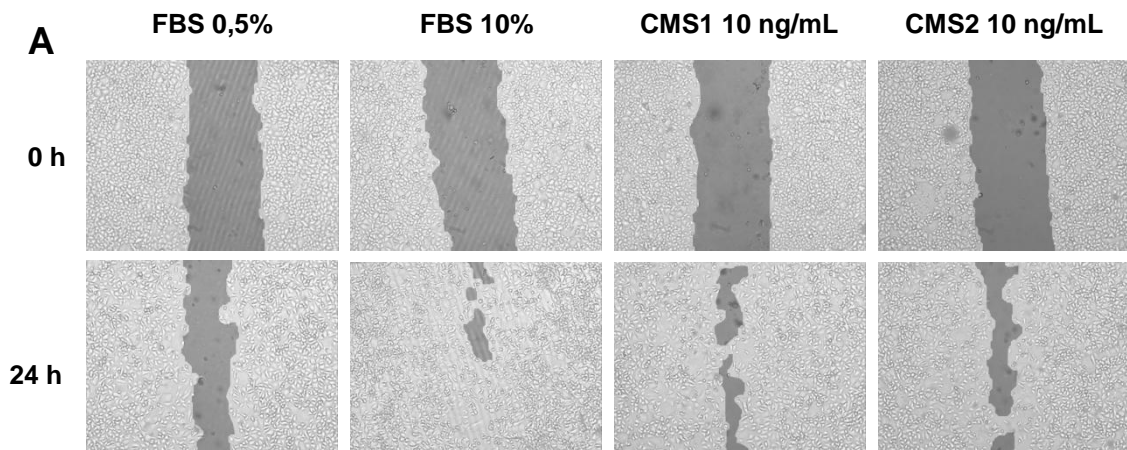


Figura 18: Efeito migratório de CMS1 e CMS2 sobre células AGS, *in vitro*. Células AGS ($1,5 \times 10^5$ células/poço) cresceram até confluência. Na monocamada foi feita uma lesão e em seguida as células foram tratadas com CMS1 ou CMS2 (10 ng/ml), na presença de hidroxiuréia 10 mM. Fotos da fenda formada (A) foram tomadas às 0, 6 e 24 h e a área da lesão foi medida nesses tempos utilizando o programa *TScratch*. Os resultados são apresentados como fechamento (%), em 6 e 24 h, em relação ao controle de cada tempo. * ou #, ** ou ## e *** ou ### indicam resultados diferentes estatisticamente do controle, com $p < 0,05$, $0,01$ e $0,001$ (ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls, $p < 0,05$).

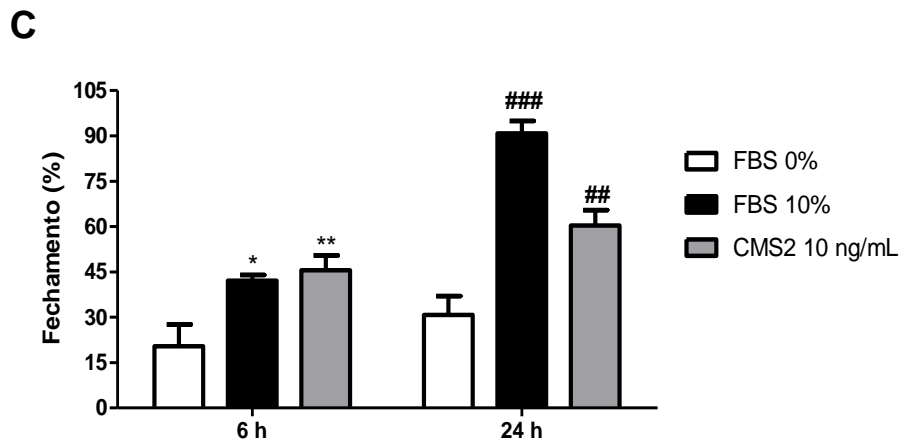
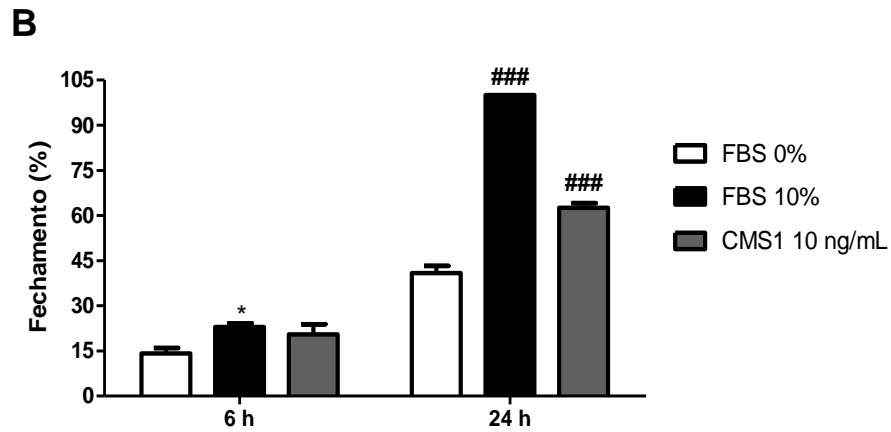
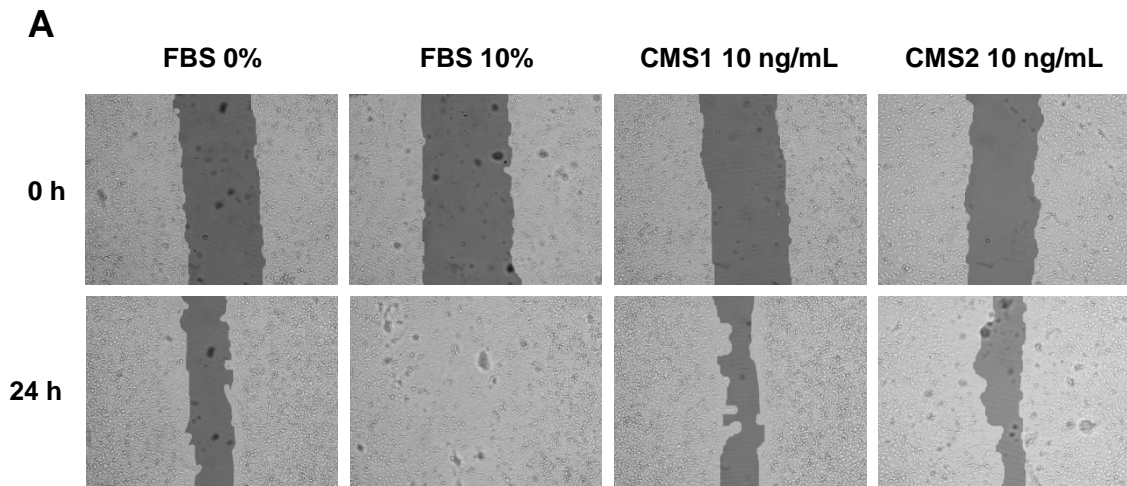


Figura 19: Efeito migratório de CMS1 e CMS2 sobre células HUVEC-CS, *in vitro*. Células HUVEC-CS (2×10^5 células/poço) cresceram até confluência. Na monocamada foi feita uma lesão e em seguida as células foram tratadas com CMS1 ou CMS2 (10 ng/ml), na presença de hidroxirúria 2 mM. Fotos da fenda formada (A) foram tomadas às 0, 6 e 24 h e a área da lesão medida nesses tempos utilizando o programa *Tscratch*. Os resultados são apresentados como fechamento (%), em 6 e 24 h, em relação ao controle de cada tempo. * ou #, ** ou ## e *** ou ### indicam resultados diferentes estatisticamente do controle, com $p < 0,05$, 0,01 e 0,001 (ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls, $p < 0,05$).

5.3.3. Importância da atividade proteolítica no estímulo de migração de células epiteliais gástricas por CMS1 e CMS2

Na figura 20 são mostrados os resultados da avaliação da participação da atividade proteolítica das frações sobre a migração de células epiteliais gástricas. Para CMS1 (Figura 20 A), a inibição da atividade proteolítica reduziu a ação estimulatória dessa fração na migração em células AGS, porém de maneira não significativa ($p > 0,05$). Nas fendas tratadas com CMS1 ou CMS1-IAA, nas primeiras 6 h, observou-se fechamentos de 37 e 36 %, respectivamente, que foram significativamente maiores ($p < 0,01$) ao apresentado pelo grupo controle ($19,41 \pm 4,48$ %), porém não diferentes entre si ($p > 0,05$). O mesmo comportamento foi visto no tempo de 24 h, em que o tratamento com a fração ativa (CMS1 – $57,89 \pm 4,60$ %) ou inibida (CMS1-IAA – $50,14 \pm 5,82$ %) aumentaram de maneira semelhante o fechamento das lesões e de maneira significativa, em relação ao controle (FBS 0,5% - $25,18 \pm 4,23$ %).

Já para CMS2, nas primeiras 6 h, as fendas tratadas (Figura 20 B) apresentaram 40% de fechamento ($42,70 \pm 1,37$ %), o que foi significativamente maior ($p < 0,001$) ao apresentado pelo controle (FBS 0,5% - $19,13 \pm 2,82$ %) e também ($p < 0,05$) ao observado para a fração inibida (CMS2-IAA – $30,26 \pm 1,37$ %). Em 24 h, observou-se que o fechamento das lesões tratadas tanto com CMS2 ($61,58 \pm 3,53$ %) quanto com CMS2-IAA ($44,08 \pm 2,85$ %) foram significativamente maiores ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente) em relação ao controle ($30,53 \pm 5,88$ %), mas também diferentes entre si ($p < 0,01$).

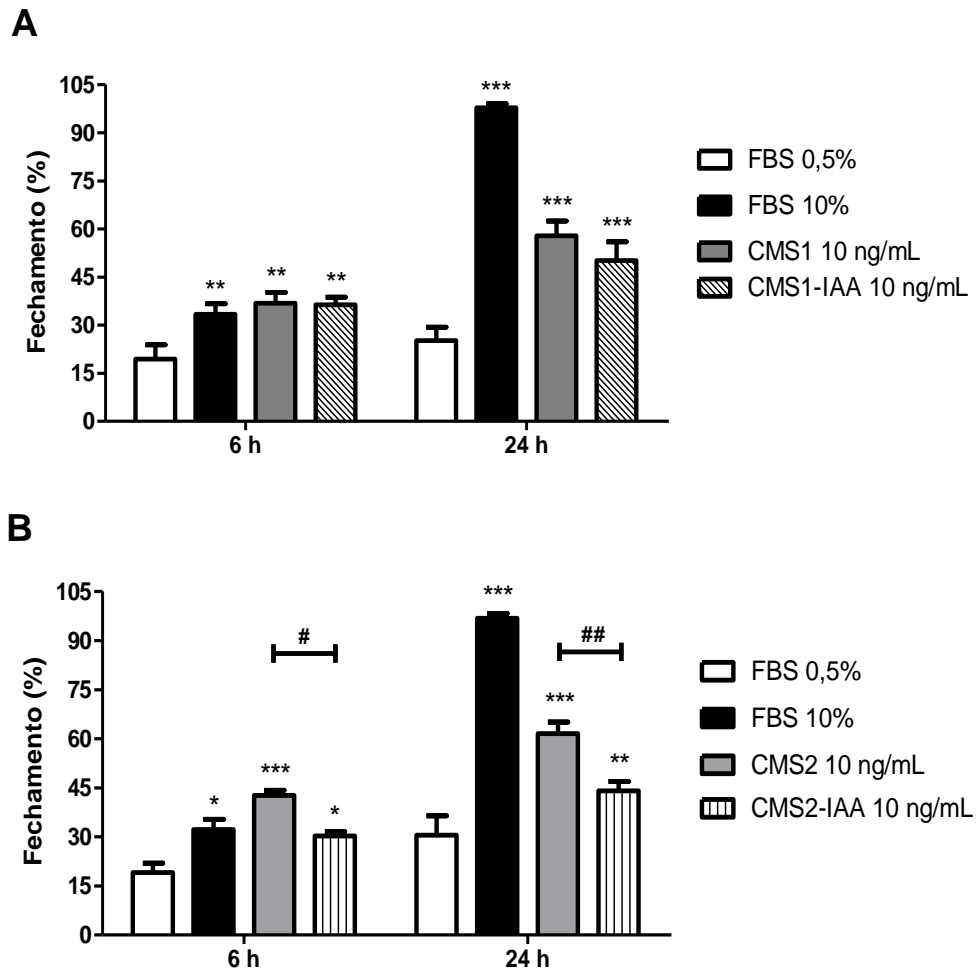


Figura 20: Importância da atividade proteolítica de CMS1 e CMS2 para seu efeito migratório sobre células AGS, *in vitro*. Células AGS ($1,5 \times 10^5$ células/well) cresceram até confluência e foram carenciadas (24 h – FBS 0,5%). Na monocamada foi feita uma lesão e em seguida as células foram tratadas com: A) CMS1 ou CMS1-IAA ou B) CMS2 ou CMS2-IAA (10 ng/ml), na presença de hidroxiuréia 10 μ M. Fotos da fenda foram tomadas às 0, 6 e 24 h e a área da lesão medida nesses tempos utilizando o programa *TScratch*. Os resultados são apresentados como fechamento (%), em 6 e 24 h, em relação ao controle de cada tempo. *, ** ou *** indicam resultados diferentes estatisticamente do controle no respectivo tempo (6 ou 24 h), com $p < 0,05$, 0,01 e 0,001. ## indica diferença estatística entre as frações ativas e inibidas, com $p < 0,01$ (ANOVA seguido do pós-teste Student Newman Keuls, $p < 0,05$).

5.3.4. Efeito de CMS1 e CMS2 sobre a polimerização de actina em células epiteliais gástricas

O efeito de CMS1 e CMS2 sobre a polimerização de actina foi avaliado em células AGS, submetidas ao protocolo do *In Vitro Scratch Assay*. A análise por microscopia confocal (Figura 21 A) mostrou um aumento na quantidade de F-actina e na formação de fibras de estresse, nas células presentes nas margens da fenda expostas a CMS1 e CMS2 (10 ng/mL), em relação ao controle (FBS 0,5%). Na quantificação da fluorescência (Figura 21 B), essa observação foi confirmada pela análise da razão F/G actina que mostrou um aumento significativo nas células tratadas com CMS1 ($4,58 \pm 0,49$, $p < 0,001$) ou CMS2 ($3,39 \pm 0,38$, $p < 0,01$) em relação ao controle ($1,38 \pm 0,16$ – ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls) e também uma diferença significativa entre os grupos tratados ($p > 0,05$).

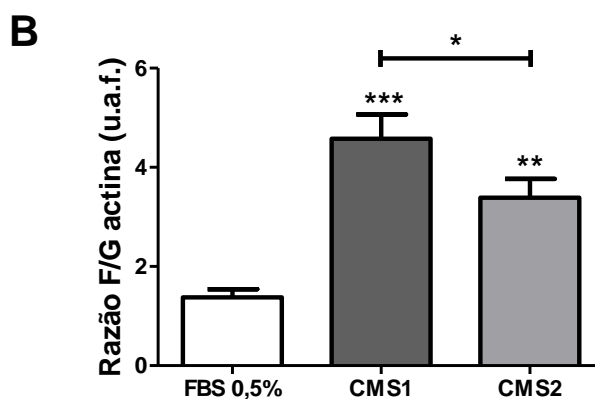
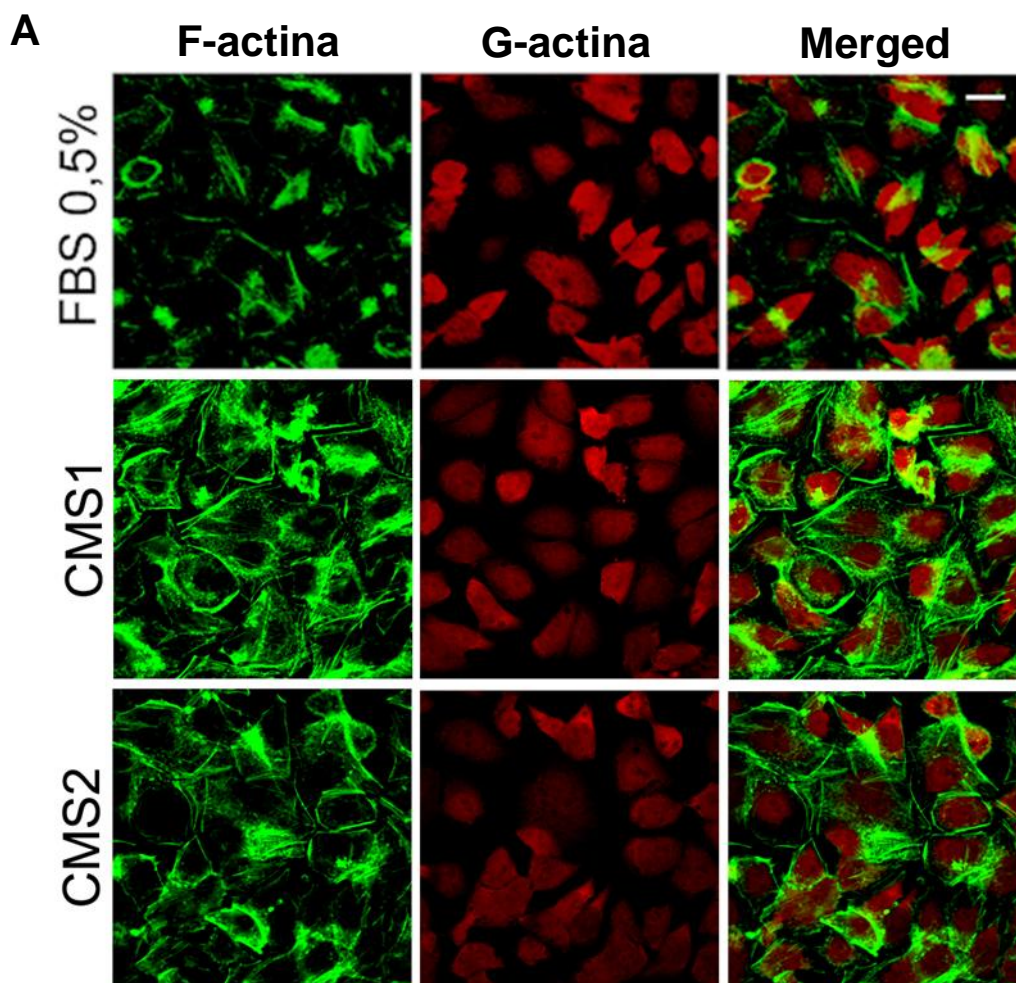


Figura 21: Efeito de CMS1 e CMS2 sobre a polimerização de G-actina em F-actina. Células AGS foram cultivadas sobre lamínulas e submetidas ao protocolo do *In Vitro Scratch Assay*. As células foram tratadas com CMS1 ou CMS2, ambas a 10 ng/ml, por 6 h e submetidas à dupla coloração A - para G-actina (fluorescência vermelha) e F-actina (verde) e visualizadas em microscópio confocal. B – Quantificação da razão entre as fluorescências de G e F-actina para cada tratamento. Os resultados são apresentados como razão entre unidades arbitrárias de fluorescência de F-actina/G actina. * ou *** indicam resultados diferentes estatisticamente do controle (FBS 0,5%), com $p < 0,05$ e $0,001$. (ANOVA seguido do pós-teste Student Newman Keuls, $p < 0,05$).

5.3.5. Participação das vias das MAPK no efeito mitogênico e migratório de CMS1 e CMS2 sobre células epiteliais gástricas

Para avaliar a participação da via das MAPK nos efeitos mediados por CMS1 e CMS2 foi realizada a quantificação da fosforilação de ERK1/2. Tanto CMS1 quanto CMS2 estimularam significativamente a fosforilação de ERK1/2, como mostrado na Figura 22. Em termos quantitativos, normalizado em relação à ERK total, CMS1 (Figura 22 A) promoveu o aumento de 137% ($2,21 \pm 0,50$, $p < 0,05$) na quantidade de pERK em células AGS expostas por 30 min a fração, em relação ao grupo tempo 0 h ($0,93 \pm 0,05$, ANOVA, seguido do pós-teste Student Newman Keuls). No tempo de 60 min, observou-se ainda uma quantidade aumentada de pERK1/2, porém não significativa ($p > 0,05$) e em 120 min houve o retorno aos níveis de 0 h. Já para CMS2 (Figura 22 B), o pico de fosforilação ocorreu em 60 min de exposição. Células tratadas por esse período apresentaram 134% mais pERK ($2,34 \pm 0,57$, $p < 0,05$), quando comparado ao tempo 0 h ($1,02 \pm 0,02$).

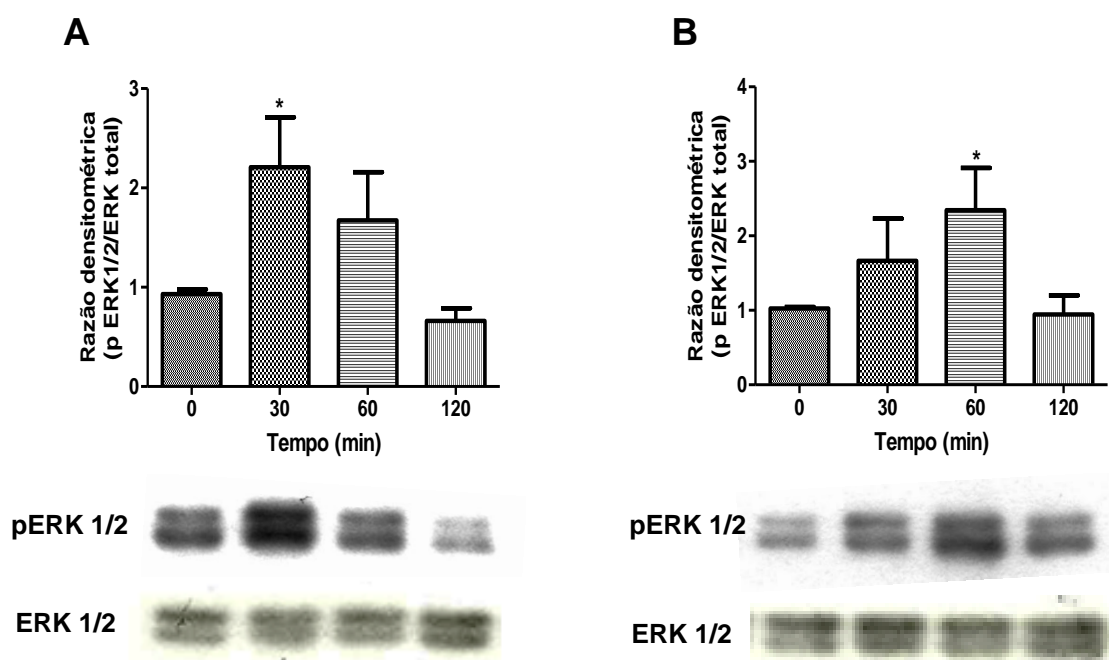


Figura 22: Efeito das frações CMS1 e CMS2 sobre a fosforilação de ERK 1/2 em células AGS. Células AGS foram tratadas com CMS1 (A) ou CMS2 (B) por 0, 30, 60 e 120 min, conforme descrito no item 4.2.3.5. Foram aplicados 30 μ g do lisado celular em cada canaleta e as eletroforeses e western blotting foram desenvolvidos como descrito em 4.2.3.6. A análise densitométrica foi realizada pelo software ImageJ e os resultados são apresentados como porcentagem de reação em relação à 0 h. * indica resultado diferente estatisticamente do tempo 0 h, com $p < 0,05$ (ANOVA seguido do pós-teste Student Newman Keuls, $p < 0,05$).

A fim de verificar se a atividade proteolítica das frações é importante na ativação da via da MAPK, a fosforilação de ERK foi mensurada em células AGS expostas às frações com atividade proteolítica inibida, CMS1-IAA e CMS2-IAA. Na figura 23, observa-se que tanto o tratamento com CMS1 ou CMS1-IAA por 30 min, promoveu a fosforilação de ERK1/2, produzindo quantidades detectáveis semelhantes de pERK1/2. Em relação ao controle (FBS 0,5% - $1,03 \pm 0,14$, ANOVA seguido do pós teste Student Newman-Keuls, $p < 0,05$), CMS1 ($2,39 \pm 0,20$, $p < 0,05$) aumentou em 2,4 vezes a expressão de pERK e, CMS1-IAA, um pouco menos, 2 vezes ($1,99 \pm 0,30$, $p < 0,05$), não diferindo estatisticamente entre si ($p > 0,05$). Da mesma maneira, a exposição à CMS2 e CMS2-IAA por 60 min também promoveu intensidades semelhantes ($p > 0,05$) de fosforilação de ERK, com razões densitométricas de $2,19 \pm 0,23$ e $2,14 \pm 0,41$, respectivamente, o que foi significativamente maior ($p < 0,05$) em relação ao controle FBS 0,5% ($0,96 \pm 0,06$).

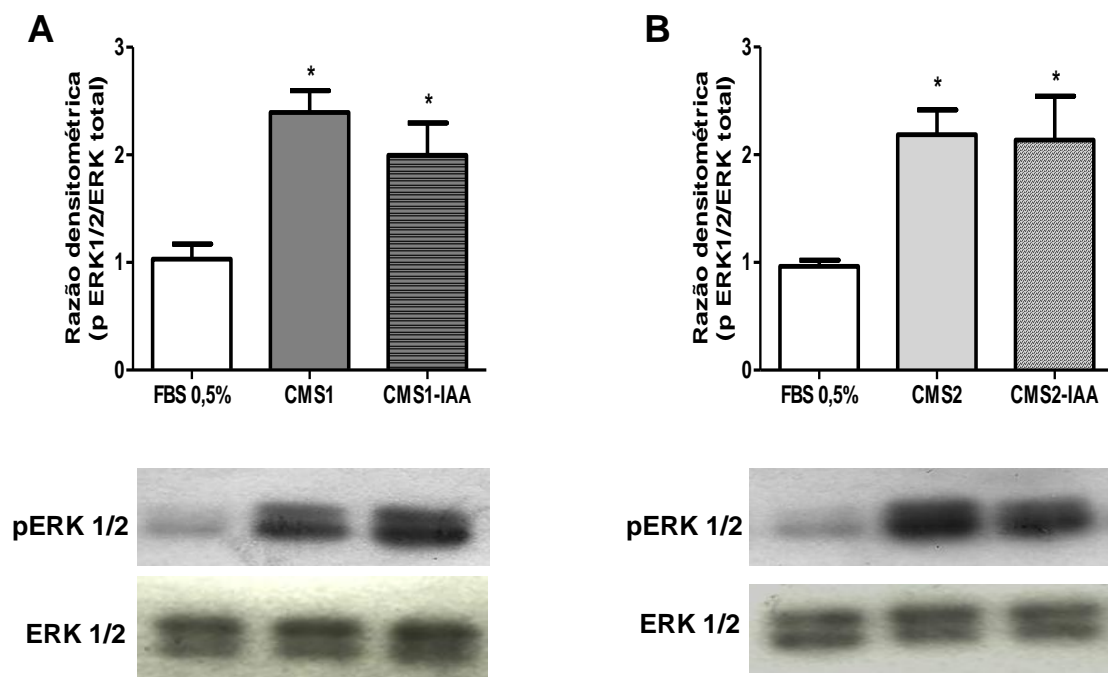


Figura 23: Importância da atividade proteolítica sobre a fosforilação de ERK1/2 por CMS1 e CMS2, em células AGS. Células AGS foram tratadas com CMS1 ou CMS1-IAA (A) por 30 min ou CMS2 ou CMS2-IAA (B) por 60 min, conforme descrito no item 4.2.3.5. Foram aplicados 30 µg do lisado celular em cada canaleta e as eletroforeses e western blotting foram desenvolvidos como descrito em 4.2.3.6. A análise densitométrica foi realizada pelo software ImageJ e os resultados são apresentados como porcentagem de reação em relação à 0 h. * indica resultado diferente estatisticamente do controle (FBS 0,5%), com $p < 0,05$ (ANOVA seguido do pós-teste Student Newman Keuls, $p < 0,05$).

Por fim, para avaliar se a ativação de ERK1/2 poderia estar envolvida no estímulo mitogênico das frações CMS1 e CMS2, foi determinada a atividade mitogênica destas frações em células AGS na presença do inibidor de MEK, PD98059 (PD), conforme descrito no item 4.2.3.5.. Pela Figura 24 A, observa-se que na presença de PD, o estímulo mitogênico mediado tanto por CMS1 quanto por CMS2 foi abolido. No primeiro caso, o índice de proliferação na ausência do inibidor foi de $1,66 \pm 0,03$, o que foi significativo em relação ao controle FBS 0,5% (normalizado como índice 1,0 - linha; $p < 0,001$ - ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls). Já na presença de PD atingiu $1,06 \pm 0,04$, não sendo estatisticamente diferente em relação ao FBS 0,5% ($p > 0,05$). Em células tratadas com CMS2 obteve-se efeito semelhante; em células tratadas com essa fração na presença de PD observou-se índice de proliferação de $1,14 \pm 0,04$ que foi significativamente menor ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo tratado apenas com CMS2 ($1,56 \pm 0,03$). A taxa de proliferação no grupo FBS 0,5% tratado com o inibidor não foi alterada de maneira estatisticamente significativa ($p > 0,05$) em relação ao grupo FBS 0,5% sem inibidor (1,0 representado pela linha). Mesmo o controle positivo, FBS 10% teve seu poder proliferativo bastante diminuído ($p < 0,001$) na presença de PD ($1,38 \pm 0,03$), quando comparado na sua ausência ($1,93 \pm 0,08$).

A participação da via das MAPK também é essencial no efeito migratório estimulado pelas frações. Como mostrado na Figura 24 B mostra que na presença do inibidor de MEK, houve a completa abolição do efeito migratório das frações CMS1 ou CMS2. Em células tratadas com CMS1 a porcentagem de fechamento passou de $62,58 \pm 2,73$ % para $31,74 \pm 5,17$ % na presença de PD, correspondendo a uma redução de 49% ($p < 0,001$, pós-teste ANOVA Student Newman-Keuls) na capacidade de CMS1 em estimular a migração. Com CMS2 não foi diferente; na presença do inibidor, o fechamento da lesão ($28,49 \pm 2,16$ %) foi 50% menor ($p < 0,001$), quando comparado ao tratamento na ausência do inibidor $59,48 \pm 4,69$ %). Aliás, a ativação dessa via se mostrou de fundamental importância para a linhagem celular de estudo, como foi evidenciado pela redução drástica no fechamento promovido pelo FBS 10%, na presença do inibidor de MEK.

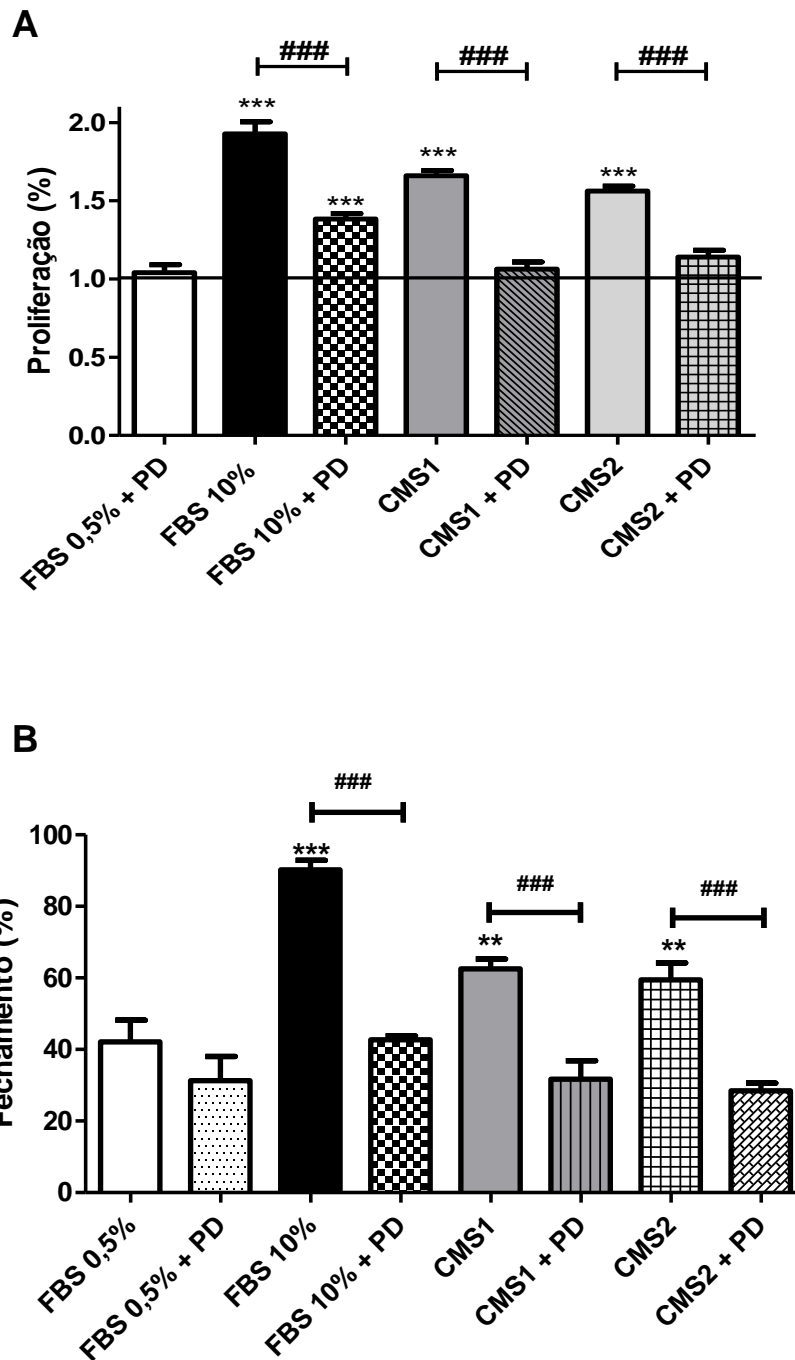


Figura 24: Avaliação da participação da via das MAPK no efeito proliferativo e migratório de CMS1 e CMS2 sobre células epiteliais gástricas. A) Efeito da inibição de MEK na ação proliferativa de CMS1 e CMS2 (ambas a 10 ng/mL). Células foram pré-tratadas com PD98059 (PD – 50 μ M) por 45 min e submetidas ao protocolo de proliferação conforme descrito no item 4.2.3.5. Os resultados são expressos como “índice de proliferação”, atribuindo um valor de 1,0 à proliferação celular obtida com FBS 0,5%. B) Efeito da inibição de MEK na ação migratória de CMS1 e CMS2 (10 ng/mL), conforme descrito em 4.2.3.5. Os resultados são apresentados como fechamento (%), em 24 h. ** ou *** indicam resultados diferentes estatisticamente do grupo FBS 0,5%, com $p < 0,01$ e $0,001$. ## indica diferença estatística entre o grupo tratado com PD e o não tratado, com $p < 0,001$ (ANOVA seguido do pós-teste Student Newman Keuls, $p < 0,05$).

Na tentativa de desvendar um possível mecanismo pelo qual a cascata de reações que leva a ativação mitogênica das células gástricas pudesse estar sendo ativada pelas frações, foi avaliada a influência do inibidor da ativação do receptor de EGF, AG1478 (AG) no efeito proliferativo de CMS1 e CMS2. Como se pode observar na Figura 25 A, na presença do inibidor, houve uma redução significativa ($p < 0,001$) nas atividades proliferativas de CMS1 e CMS2 que passaram de índices $1,64 \pm 0,05$ e $1,67 \pm 0,03$, respectivamente (sem AG) para $1,21 \pm 0,02$ e $1,31 \pm 0,03$, respectivamente (com AG). Mesmo com os receptores de EGF inibidos, as frações ainda foram capazes de estimular a proliferação celular, sendo índices significativamente maiores (CMS1, $p < 0,01$ e CMS2, $p < 0,001$) em relação ao controle ($1,03 \pm 0,01$ - FBS 0,5% - ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls).

A inibição da ativação de EGF também influenciou o efeito migratório das frações (Figura 25 B). Na presença de AG, o efeito migratório de CMS1 ($38,64 \pm 2,72$, $p < 0,01$) foi drasticamente reduzido em relação ao grupo não inibido ($66,68 \pm 2,71$), não apresentando diferença na porcentagem de fechamento da fenda em relação ao grupo controle (FBS 0,5% - $31,15 \pm 5,68$ % - ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls). Já no grupo tratado com CMS2 e AG ($47,05 \pm 3,98$ %) houve uma redução de 30% na capacidade da fração ($67,52 \pm 3,93$ %) em estimular a migração celular. No entanto, mesmo na presença do inibidor, houve um maior fechamento das fendas promovido por CMS2 ($p > 0,05$), em relação ao controle (FBS 0,5% - $31,15 \pm 5,68$ %)

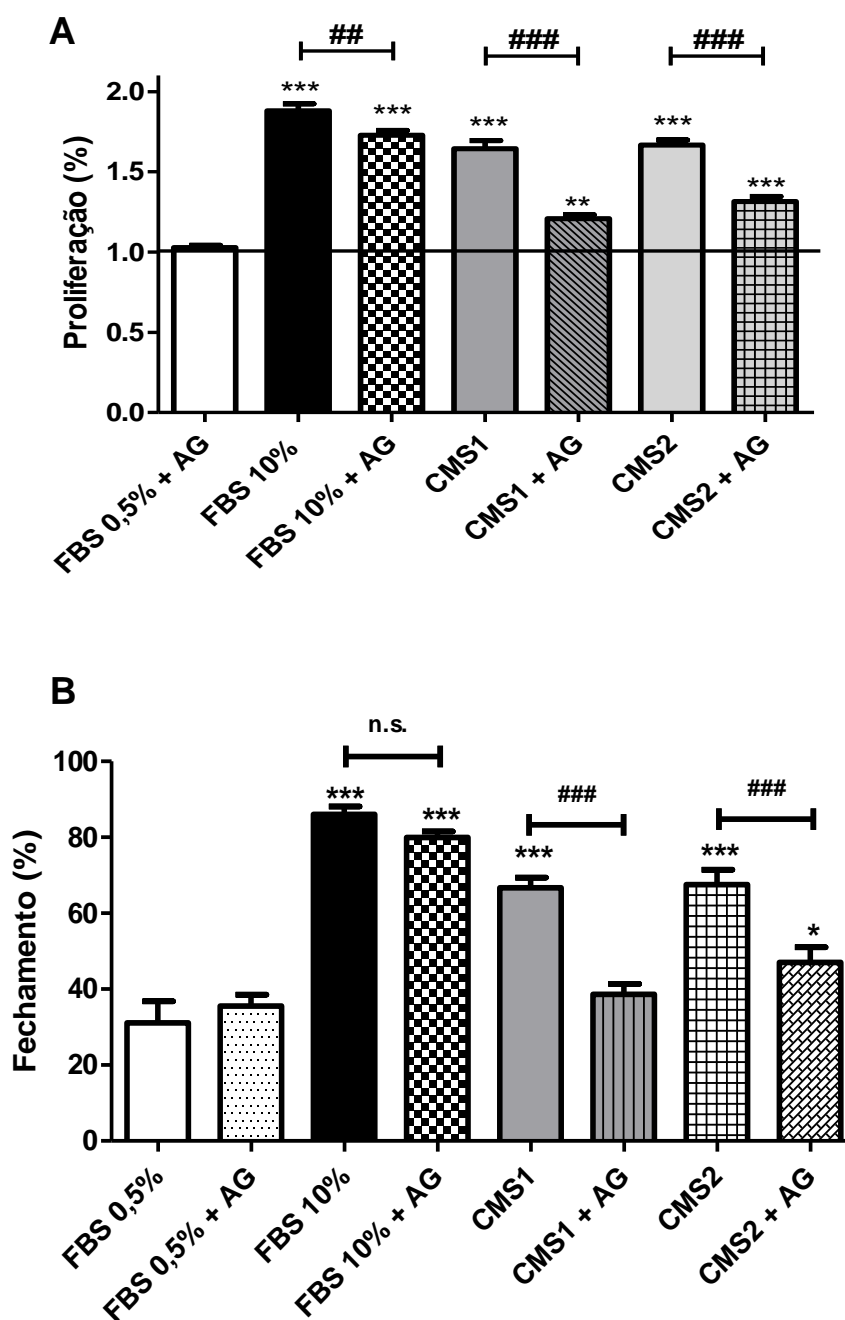


Figura 25: Avaliação da participação de EGF-R no efeito proliferativo e migratório de CMS1 e CMS2 sobre células epiteliais gástricas. A) Efeito da inibição da ativação de EGF-R na ação proliferativa de CMS1 e CMS2 (ambas a 10 ng/mL). Células foram pré-tratadas com AG1478 (AG – 10 μ M) por 45 min e submetidas ao protocolo de proliferação conforme descrito no item 4.2.3.5. Os resultados são expressos como “índice de proliferação”, atribuindo um valor de 1,0 à proliferação celular obtida com FBS 0,5%. B) Efeito da inibição da ativação de EGF-R na ação migratória de CMS1 e CMS2 (10 ng/mL), conforme descrito em 4.2.3.5. Os resultados são apresentados como fechamento (%), em 24 h. ** ou *** indicam resultados diferentes estatisticamente do grupo FBS 0,5%, com $p < 0,01$ e 0,001. ## e ### indicam diferença estatística entre o grupo tratado com AG e o não tratado, com $p < 0,01$ e 0,001, respectivamente (ANOVA seguido do pós-teste Student Newman Keuls, $p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

A cicatrização de úlceras gástricas é um processo complexo e altamente regulado de preenchimento do defeito na mucosa por células epiteliais em proliferação/migração e por tecido conjuntivo. Esse processo inclui o restabelecimento da continuidade da camada epitelial, estruturas glandulares epiteliais, microvasos e tecido conjuntivo dentro da lesão (TARNAWSKI et al. 2001), obedecendo temporalmente a seguinte ordem: 1) de 0 a 3 dias, necrose do tecido, infiltração inflamatória e formação da margem da úlcera; 2) de 3 a 10 dias, fase rápida de cicatrização envolvendo migração rápida de células epiteliais e contração da base da úlcera; 3) de 10 a 20 dias, fase lenta da cicatrização que compreende angiogênese, remodelação dos tecidos de granulação e completa reepitelização da cratera da úlcera (SCHMASSMANN, 1998).

Dentre os modelos utilizados no estudo das lesões gástricas, o de indução por ácido acético em ratos (TAKAGI et al., 1969) é o que mais se aproxima da lesão crônica humana, com relação à patogênese, à morfologia (delimitada e profunda) e aos processos envolvidos na cicatrização. Além disso, a lesão produzida pela instilação do ácido responde bem a vários tipos de agentes anti-úlcera. Devido a essas características, esse modelo vem sendo muito utilizado na determinação do potencial de substâncias capazes de minimizar o agravamento das lesões gástricas crônicas e/ou de acelerar processos envolvidos na cicatrização (OKABE & AMAGASE 2005; TARNAWSKI & AHLUWALIA, 2012).

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

crescimento aumentaram a taxa de reepitelização, o número de microvasos na região da lesão, acelerando assim a cicatrização (SATO, et al., 1997).

A partir da constatação da atividade cicatrizante cutânea da fração P1G10 e do efeito mitogênico de frações purificadas a partir desta, inferimos que essa fração poderia atuar, também, como um agente cicatrizante de úlceras gástricas já estabelecidas. Assim, em estudos prévios, demonstrou-se tal atividade para P1G10 utilizando o modelo de indução de úlceras por ácido acético (MELLO et al., 2008). A fração administrada durante 8 dias reduz em 63% o tamanho das lesões, sendo o efeito semelhante ao observado para o omeprazol (52%) e melhor quando comparado ao apresentado pela ranitidina (40%). Dando continuidade aos estudos, SILVA et al. (2010) verificou que a ação cicatrizante estava relacionada à um aumento na proliferação de células nas margens de úlceras, e possivelmente à angiogênese, indicando que P1G10 poderia atuar via modulação de fatores de crescimento. Corroborando esses resultados, uma protease isolada a partir de P1G10, CMS2MS2, apresentou atividades mitogênicas sobre fibroblastos murinos, *in vitro*, com o envolvimento do receptor de EGF nesses efeitos (GOMES et al., 2009).

Como já descrito, ao ser submetida à cromatografia em coluna CM Sephadex C-25, P1G10 dá origem a duas outras frações (CMS1 e CMS2) contendo número diferente de cisteíno proteases, que são peculiares quanto à natureza catalítica e atividade biológica (TEIXEIRA et al., 2008). Estudos *in vitro* (GOMES, 2008) demonstraram diferenças na capacidade proliferativa de CMS1 e CMS2 sobre fibroblastos murinos, o que pode sugerir diferentes papéis no efeito cicatrizante de P1G10. Dessa maneira, a fim de estudar a relevância de cada subfração no efeito cicatrizante de úlceras de P1G10, neste trabalho, avaliamos os efeitos de CMS1 e CMS2 no modelo de lesão por ácido acético, além de estudarmos alguns mecanismos de ação envolvidos.

Como podemos ver na Figura 6 A e B, tanto CMS1 quanto CMS2 estimularam a cicatrização das lesões, com reduções no I.L.U. de 63% e 47% para CMS1 1 mg/kg e CMS2 30 mg/kg, respectivamente. Na comparação com P1G10 10 mg/kg e Ranitidina 100 mg/kg, observou-se que as frações e esses controles tiveram efeitos não diferentes estatisticamente (Figura 7). Esses resultados evidenciaram uma maior potência da fração CMS1 em relação a P1G10 e CMS2 como agente

cicatrizante, uma vez que necessitou de uma dose 10 e 30 vezes menor, respectivamente, para produzir um efeito semelhante. As análises histológicas em HE (Figura 9) confirmaram os efeitos cicatrizantes das frações, evidenciando lesões de menor extensão e com menor infiltrado inflamatório em relação ao controle. Pela coloração com tricrômico de Gomori (Figura 10), visualizou-se um tecido de granulação mais maduro, com maior deposição e organização das fibras colágenas nos animais tratados com P1G10, CMS1 e CMS2. Nos animais tratados com CMS1 ainda notou-se células epiteliais mais profundas formando glândulas, um indicativo de um processo de cicatrização mais avançado (BRZOZOWSKI, 2003).

Contudo, ainda na Figura 6, observa-se que as frações demonstraram diferentes comportamentos farmacológicos; com o aumento das doses, verificou-se um aumento da atividade cicatrizante para CMS2, atingindo na dose de 30 mg/kg uma redução significativa (47%) no I.L.U. Já para CMS1, a atividade cicatrizante foi evidenciada com as doses menores, 1 ou 3 mg/kg. Perfil como o de CMS1 já foi relatado em outros trabalhos do grupo: MELLO et al. (2008) e (ARAUJO E SILVA et al., no prelo) verificaram que com o aumento da dose de P1G10, houve perda da atividade gastroprotetora contra lesões induzidas por indometacina ou etanol, respectivamente. A atividade cicatrizante de dermoabrasões também se mostrou diminuída com concentrações mais altas de P1G10 (10%) (MELLO, 2005), o que acreditamos ser devido à uma alta atividade proteolítica da fração nessas situações, determinando efeitos deletérios ao invés de protetores e cicatrizantes. Comparando CMS1 e CMS2, a primeira possui uma atividade proteolítica 2,5 vezes maior, o que poderia justificar a ausência de efeitos cicatrizantes nas doses maiores. Entretanto, essa suposição deve ser confirmada com estudos utilizando a fração CMS1 inibida proteoliticamente nessa faixa de dose.

Apesar de sugerido que o excesso de atividade proteolítica de P1G10 possa determinar efeitos prejudiciais à mucosa, SILVA et al. (2010) demonstrou que o efeito cicatrizante de P1G10 é dependente de sua atividade proteolítica. Em cortes de estômagos de animais submetidos à indução de úlceras e tratados com a fração ativa, evidenciou-se além da redução do tamanho da lesão, uma diminuição do material fibrino-necrótico-leucocitário e uma maior organização do tecido de granulação em relação ao grupo tratado com a fração inibida proteoliticamente por iodoacetamida (P1G10-IAA). Esses efeitos são compatíveis com os mediados

através do debridamento das lesões, como descrito para outras proteases, como a bromelina e a papaína, que são utilizadas no tratamento de queimaduras e outras ulcerações crônicas. O debridamento auxilia na remoção do tecido necrosado, dificultando o crescimento de microrganismos, e proporcionando um ambiente adequado para outros eventos, como a angiogênese (KLASEN, 2000, PIEPER & CALIRI, 2003; AYELLO & CUDDIGAN, 2004). Diante do exposto, frações com atividade proteolítica inibida (CMS1-IAA e CMS2-IAA) foram administradas nas mesmas doses – 1 e 30 mg/kg, respectivamente – que as frações ativas e avaliadas quanto a capacidade cicatrizante gástrica. Foram observados níveis semelhantes de I.L.U. aos apresentados pelas frações ativas, sugerindo que a inibição da atividade proteolítica de CMS1 e CMS2 não altera significativamente seus efeitos cicatrizantes (Figura 8). Contrapondo a esse fato, em cortes de estômago de animais tratados com CMS1 e CMS2 foram observados efeitos sugestivos de uma ação debridante, como a maior deposição de fibras colágenas e organização do tecido de granulação, sugerindo um efeito no remodelamento tecidual das lesões (Figura 9 e 10).

Na cicatrização de úlceras gástricas, esse processo ocorre naturalmente, pela ação de MMPs, que, juntamente com seus inibidores teciduais (TIMPs) regulam a degradação e a renovação de componentes da ECM (AMALINEI et al., 2007). Apesar de estarem principalmente envolvidas na fase de remodelamento tecidual, sua expressão e atividade são detectáveis durante todo o processo de cicatrização sendo, por conta disso, a elas atribuídas importância nos processos de proliferação, migração e angiogênese (SCHULTZ & WYSOCKI, 2008). Através da análise por zimografia (Figura 13), verificou-se que a fração CMS1 estimulou o aumento da atividade de MMP-2 em 78% enquanto CMS2 e P1G10 o fizeram mais discretamente, em 38 e 21%, respectivamente. É possível que esse aumento de atividade de MMP-2 esteja relacionado a um efeito debridante das frações, sugerindo que este não seria mediado diretamente pela atividade proteolítica das frações, mas através de sua atuação indireta sobre fatores debridantes endógenos. Corroborando esse resultado, verificamos que CMS1 aumentou em mais de 100 vezes a transcrição gênica de MMP-2 nos animais tratados em relação ao controle (Figura 16 A). As frações P1G10 e CMS2 também promoveram um aumento na quantidade de mRNA para MMP-2, mas que não foi estatisticamente significativo. Em um trabalho realizado por SWARNAKAR et al. (2005) verificou-se que a

curcumina, um componente bioativo da *Curcuma longa*, estimulou a cicatrização de lesões gástricas induzidas pela indometacina através da suprarregulação da transcrição e atividade de MMP-2, o que nos leva a crer que, na atividade cicatrizante das frações, e principalmente de CMS1, possa ter a influência da atividade de MMP-2.

A atividade aumentada de MMP-2 também pode ser atribuída à uma atividade diminuída de TIMP-2, devido à inibição da transcrição gênica desse fator, promovida pelas frações (Figura 16 B). Acreditamos que uma das maneiras através das quais as frações, em especial CMS1, podem mediar suas ações angiogênicas é alterando o balanço MMP-2/TIMP-2. A presença dos TIMPs é essencial para o remodelamento tecidual, uma vez que evitam a ação excessiva de MMPs que pode se tornar lesiva. Contudo, em algumas lesões crônicas, como de pacientes diabéticos, tanto a quantidade excessiva de TIMP-1 e TIMP-2 como a de MMP-2 e MMP-9 contribui para a dificuldade de cicatrização (DEROSA et al., 1997). Em nossos experimentos, verificamos que a ulceração por ácido acético reduziu a atividade da MMP-2 na mucosa gástrica dos animais lesados (Figura 16 B), o que pode ser devida a uma atividade aumentada de TIMP-2. A menor disponibilidade de MMP-2 ativa na ECM gástrica retardaria a alteração da membrana basal e da arquitetura vascular, dificultando a cicatrização (GANGULY et al., 2010). Assim, ao estimular a transcrição gênica de MMP-2 e inibir a de TIMP-2, as frações podem estabelecer o balanço adequado entre esses componentes, acelerando o processo de cura das lesões.

Entre os mecanismos determinantes da cicatrização de úlceras gástricas estão a angiogênese, a proliferação e migração celulares. Na margem da úlcera, células epiteliais proliferam e migram para leito da lesão de modo a promover tanto a reepitelização como a reconstrução das estruturas glandulares (TARNAWSKI, 2005). Desse processo participam citocinas liberadas pelas células em proliferação e vários fatores de crescimento, como: EGF, HGF, bFGF e PDGF, os quais podem ser utilizados como marcadores indiretos da proliferação celular (TARNAWSKI, 2000). Além de fatores de crescimento, um dos marcadores mais utilizados é a CDC47, pertencente à família de proteínas de manutenção de minicromossomo (MCM – “*Minichromosome maintenance*”), responsável por regular a duplicação do DNA, permitindo somente uma única duplicação por ciclo. Sua expressão aumenta nas fases G1 e S do ciclo celular e por isso, é considerado um agente associado à

replicação celular, sendo a sua expressão um indicativo de proliferação celular ativa (ROJIANI et al., 2010).

Na Figura 11 é possível observar que tanto nos cortes de animais tratados com a fração P1G10 quanto nos tratados com CMS1 ou CMS2, ocorreu marcação aumentada para CDC47 nos bordos das lesões, quando comparado ao grupo controle, indicando atividade proliferativa sobre células epiteliais. Na quantificação da mesma (Figura 11 F), esta observação foi comprovada, mostrando que o estímulo da proliferação nos animais tratados com P1G10 (10 mg/kg), CMS1 (1 mg/kg) e CMS2 (30 mg/kg) foi de 3,6, 5,0 e 3,4 vezes maior que o observado para o grupo controle. Corroborando os resultados *in vivo*, CMS1 e CMS2 também estimularam a proliferação de células epiteliais gástricas (AGS) *in vitro*. Como se pode observar na Figura 17, a proliferação foi estimulada com a concentração utilizada mais elevada (10 ng/mL), sendo o efeito próximo ao obtido com o controle positivo (FBS 10%). A atividade proliferativa de frações e proteases isoladas do látex de *V. cundinamarcensis* já havia sido relatada em estudos anteriores. GOMES et al., 2009 demonstrou que CMS2MS2, uma protease obtida de CMS2, estimulou a proliferação de fibroblastos murinos *in vitro*, na mesma concentração em que foi vista a atividade proliferativa de CMS1 e CMS2 sobre AGS. Além do efeito proliferativo em úlceras gástricas (SILVA et al., 2010), em um modelo de lesão cutânea por dermoabrasão, LEMOS et al. (2011) mostrou que o tratamento tópico com a fração P1G10 a 0,1% estimulou a proliferação celular nas lesões, aumentando a quantidade de células em proliferação em mais de 300%. Os relatos na literatura e os presentes resultados demonstram que o estímulo da proliferação celular constitui um dos mecanismos através dos quais as frações exercem suas atividades cicatrizantes gástricas.

Fatores de crescimento como o EGF e o bFGF são especialmente relacionados ao processo de reepitelização gástrica, uma vez que estimulam a proliferação e a migração das células epiteliais nas margens das lesões (TARNAWSKI et al., 2001). A transcrição de genes para esses fatores é iniciada entre 6 h e 2 dias após a ulceração e ocorre em resposta à hipóxia e à ação de fatores e citocinas liberadas por células inflamatórias locais (WONG et al., 2000). Entretanto, em feridas crônicas, ao invés do aumento verifica-se uma redução gradual dos seus níveis, comprometendo a resolução da lesão (BARRIENTOS et al.,

2008). Como pode ser observado na Figura 14 A, o tratamento com P1G10 e CMS2 por 7 dias estimulou significativamente a transcrição do gene para EGF nas úlceras dos animais tratados em relação ao controle. Apesar de não estatisticamente significativo, CMS1 também promoveu um aumento da expressão de EGF. Esse fator, juntamente com o seu receptor (EGF-R) estão primordialmente envolvidos com a proliferação de células após a injúria tecidual e o aumento de sua expressão se correlaciona com um estímulo mitogênico (CHAI, BAATAR & TARNAWSKI, 2004).

Além de aumentar a expressão de EGF, as frações CMS1 e CMS2 também estimularam a expressão de bFGF (Figura 14 B). A quantidade de mRNA para bFGF nos animais tratados com CMS1 foi 26 vezes e a de CMS2, 6 vezes maiores que a apresentada para o controle. Este fator estimula a proliferação de células epiteliais, e também endoteliais e mesenquimais, sendo fortemente angiogênico. Atua, ainda, na formação e maturação do tecido de granulação, ao estimular a migração de fibroblastos, a produção de ECM e o remodelamento tecidual (BARRIENTOS et al. 2008). Os resultados das análises histológicas e imunohistoquímicas de animais tratados com CMS1 e CMS2 mostraram além da proliferação aumentada, um tecido de granulação mais organizado e maduro, sugerindo um processo de remodelamento mais precoce, compatível com uma ação aumentada de fatores como o bFGF. Em conjunto, o estímulo de transcrição de genes para EGF e bFGF sugerem um mecanismo através do qual, P1G10, CMS1 e CMS2, estimulam a proliferação celular.

Outra etapa importante no processo de cicatrização gástrica é a angiogênese, que permite a formação de novos vasos na área lesada, garantindo o suprimento de oxigênio e nutrientes essenciais para o reparo tecidual. A angiogênese ocorre a partir do tecido de granulação desenvolvido na base da úlcera, que é composto de fibroblastos, macrófagos e células endoteliais em proliferação. Os eventos iniciais da formação dos vasos são mediados pela proteólise da membrana basal, promovida pelas MMPs, que permite a invasão de células endoteliais microvasculares e pela interação de moléculas de adesão do tipo PECAM-1/CD31 (molécula de adesão plaqueta-célula endotelial-1). Essas moléculas atuam promovendo a interação célula-célula, levando a estruturação das mesmas no tubo, podendo ser utilizados como marcadores de angiogênese (CHOW et al., 1998).

A atividade angiogênica de P1G10 já havia sido constatada em estudos anteriores. Utilizando o modelo de implante de esponja em dorso de camundongos, MELLO et al. (2008) verificaram um aumento da quantidade de hemoglobina na esponja de animais tratados com a fração a 0,1% (intraesponja). Além disso, SILVA et al. (2010) relatou um aumento no número de vasos neoformados no tecido de granulação em úlceras de animais tratados com a P1G10 por 8 dias. No presente estudo, a capacidade pró-angiogênica de P1G10, CMS1 e CMS2 foi avaliada através da imunolocalização de PECAM-1/CD31. Analisando os cortes histológicos de animais com úlcera, mostrados na Figura 12 observamos que os tratamentos com as frações aumentaram o número de vasos no tecido de granulação. Essa observação foi comprovada pela análise quantitativa, apresentada na Figura 12 F, que mostra um aumento na densidade de vasos de 85, 105 e 60%, no tecido de granulação de úlceras de animais tratados com P1G10, CMS1 e CMS2, respectivamente.

Aliado a esse resultado, as três frações aumentaram significativamente a expressão gênica de VEGF nas úlceras dos animais tratados (Figura 14 C). Esse fator é um mitógeno específico de células endoteliais, atuando na regulação da proliferação, diferenciação e crescimento vascular, sendo seu aumento de expressão intimamente relacionado ao aumento da densidade de microvasos (TOI et al., 2001; FERRARA & KERBEL, 2005). Esses dados ainda são corroborados pelos estudos *in vitro* com células endoteliais (HUVEC-CS) que mostraram que CMS1 e CMS2, ambos a 10 ng/mL, estimularam a proliferação desse tipo celular (Figura 17). Além disso, estudos recentes do nosso grupo demonstraram que em lesões excisionais, P1G10 aplicada topicamente estimula a produção de VEGF, sendo um indicativo de que a atividade cicatrizante da fração nesse modelo (FREITAS, dados não publicados).

Os efeitos angiogênicos das frações, em especial o de CMS1 também podem ter relação com o aumento da atividade de MMP-2, já que é conhecida a suprarregulação dessa protease por VEGF e bFGF (LAMOREAUX et al., 1998; WANG et al., 1998). Além da expressão de VEGF, CMS1 estimulou fortemente a de bFGF, o que provavelmente levou ao incremento dessa proteína na mucosa dos animais tratados. Assim, uma provável soma dos efeitos de VEGF e bFGF aumentados por CMS1 poderia justificar o grande aumento da atividade de MMP-2

visto para essa fração (Figura 16). Apoiando essa hipótese, SHARMA et al. (2012) verificou que a curcumina, promove a angiogênese através do aumento da atividade de MMP-2, promovida pelo aumento dos níveis de VEGF.

Além das MMPs, outras enzimas participam do cenário cicatricial (JONES et al., 1999; TARNAWSKI & AHLUWALIA, 2012). As isoformas COX-1 e COX-2 são responsáveis pela produção de prostaglandinas (PGs), que auxiliam na proteção da mucosa – ao estimular a produção de muco/bicarbonato e aumentar o fluxo sanguíneo – e no processo de reparo, estimulando a proliferação epitelial e endotelial e a angiogênese (KONTUREK et al., 2005). Genes para COX-2 são altamente expressos nas margens da úlcera em resposta a fatores como EGF e a PGE₂, produzida por essa isoforma, é associada ao aumento da expressão de VEGF (SAKURAI et al., 2004). Em um estudo recente, utilizando modelo de indução de lesões gástricas por indometacina, em animais tratados com P1G10 foi determinada uma maior quantidade de PGE₂ em relação ao controle, sugerindo que a modulação positiva de COX poderia estar envolvida no efeito protetor e cicatrizante da fração (ARAUJO E SILVA et al., no prelo). Entretanto, no presente estudo, verificamos que a expressão de COX-2 foi reduzida pelo tratamento com as três frações (Figura 15 B), contrapondo o exposto até o momento. Esse fato inesperado pode ser devido à diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias que são responsáveis pela ativação da expressão de COX-2, como em lesões cutâneas excisionais tratadas com P1G10 onde ocorreu a redução dos níveis de TNF- α (FREITAS, 2011). KONTUREK et al. (2010) também mostraram que o tratamento de úlceras com pioglitazona reduziu a expressão de COX-2, mas estimulou a angiogênese em úlceras gástricas de animais diabéticos, evidenciando um mecanismo de aumento da expressão de VEGF independente de COX-2.

Por outro lado, observou-se que o tratamento com P1G10 e CMS1 aumentou a expressão de COX-1 (Figura 15 A). Essa isoforma de COX é constitutivamente expressa na mucosa gástrica e vários estudos apontam que sua expressão não é modificada em lesões crônicas durante o processo de cicatrização (BRZOZOWSKI et al., 2001; KONTUREK et al., 2005). Entretanto, relatos de produtos naturais que aumentam a expressão gênica de COX-1 tem sido descritos. BANERJEE et al. (2008) demonstraram que a atividade cicatrizante de um composto fenólico natural foi mediada pelo aumento da expressão de COX-1 e não de COX-2. Outro estudo,

demonstrou que o tocotrienol, um produto do óleo de palma, induziu o aumento de mRNA para COX-1 e dos níveis de PGE2 em animais com lesões gástricas induzidas pelo estresse, associando essas ações com seu efeito protetor (NUR AZLINA et al., 2013). Esses efeitos sugerem uma importância de COX-1 na cicatrização da mucosa, sendo o aumento de sua expressão um mecanismo de atividade cicatrizante.

Além da proliferação e da angiogênese, EGF, bFGF, VEGF e enzimas controlam outro evento importantíssimo na cicatrização de lesões gástricas, a migração celular (TARNAWSKI & AHLUWALIA, 2012). Neste trabalho, utilizando o modelo do *In Vitro Scratch Assay*, verificamos que tanto CMS1 quanto CMS2 estimularam a migração de células AGS e HUVEC-CS, sendo visíveis as reduções nas larguras das fendas já nas primeiras 6 h (Figura 18 e 19). A concentração utilizada foi de 10 ng/mL, a mesma que já tinha conhecido efeito proliferativo nesses tipos celulares. Dessa maneira, para eliminar a influência da proliferação, os ensaios foram realizados na presença de hidroxiuréia, um inibidor de proliferação celular. Os resultados mostraram que mesmo na presença desse composto, houve um maior fechamento da lesão na monocamada celular em relação ao controle (FBS 0,5% - AGS e FBS 0% - HUVEC-CS), sugerindo que as frações podem promover a reepitelização por processos independentes da proliferação celular.

No processo de migração estão envolvidos os rearranjos do citoesqueleto de actina, com a formação de fibras de estresse, lamelipódios e adesões focais que permitem a contração celular e seu movimento (STOSSEL, 1993). As chamadas fibras de estresse se dão pela polimerização da G-actina em F-actina e a combinação desta com a miosina II na periferia celular. Essas fibras ficam ligadas à membrana interna e mantêm contato com a ECM através da formação de adesões focais que servem de âncora para o movimento celular. Nas adesões focais estão envolvidas integrinas, que são receptores que fazem o contato célula-ECM além de proteínas do complexo de adesão e FAK. Através de técnicas de imunofluorescência e microscopia confocal, utilizando marcadores específicos é possível identificar e quantificar a expressão de componentes do citoesqueleto. A DNase I é uma endonuclease que tem alta afinidade pelo subdomínio 2 de G-actina, ao qual se liga em proporção de 1:1, podendo ser utilizado como marcador direto sua presença. Já no caso de F-actina, a identificação é possível utilizando o *phalloidin*, que é um

peptídeo isolado do cogumelo *Amanita phalloides*, que se liga a junções entre as subunidades de actina na forma filamentosa (CHAI et al., 2004). Em nosso estudo, através de microscopia confocal (Figura 21), verificou-se que as frações CMS1 e CMS2 estimularam a polimerização de actina e a formação de fibras de estresse em células epiteliais gástricas (AGS). Nas imagens ainda se observa que CMS1 estimulou mais a polimerização de actina e a formação das fibras de estresse em relação à CMS2. Essas observações foram confirmadas pela quantificação da intensidade de fluorescência, que demonstrou maior relação F-actina/G-actina maior nas células tratadas com CMS1 em relação ao controle e à CMS2. O tratamento com as frações alterou visivelmente o comportamento celular, levando a maior formação de lamelipódios, evidenciando o movimento celular, como já sugerido no *In vitro Scratch Assay*.

No processo de cicatrização, em células epiteliais gástricas, a ativação do sistema Ras/Raf/MEK/ERK está envolvido com o crescimento, a diferenciação e a migração celulares (OSAKI & GAMA, 2013). Dentre as diversas vias de sinalização, este sistema é o módulo mais conservado em células de mamíferos através da evolução via a estimulação de receptores do tipo tirosina-kinases, receptores acoplados a proteínas-G e integrinas (POUYSSÉGUR et al., 2002). A fim de verificar se essa via estaria envolvida no mecanismo de ação molecular das frações, primeiramente, foi estudado o efeito de CMS1 e CMS2 na fosforilação de ERK1/2 (pERK1/2), ou seja, no estado ativo. Como observado na Figura 22, tanto CMS1 quanto CMS2, promoveram a ativação de ERK1/2 em relação ao controle (tempo 0 min), diferindo apenas em relação ao pico de fosforilação que foi de 30 min para a primeira e 60 min para a segunda fração. Nesses tempos, a exposição às frações não influenciou na quantidade de ERK total, sugerindo que CMS1 e CMS2 aumentam a fosforilação de ERK sem, contudo, aumentar a expressão desta proteína. Esses resultados inferem sobre uma participação do sistema Ras/Raf/MEK/ERK nos efeitos de CMS1 e CMS2, corroborando os obtidos por GOMES et al. (2009) que mostraram que CMS2MS2, uma protease obtida a partir de CMS2, promove proliferação de fibroblastos através de um mecanismo dependente de ERK.

Para avaliar a relevância de ERK no efeito proliferativo e de migração de CMS1 e CMS2, células AGS foram tratadas com as frações e submetidas aos

protocolos de proliferação e migração, na presença do inibidor de MEK, PD98059. Seu efeito inibitório é mediado pela interação de forma reversível desta substância com MEK, evitando que esta proteína seja fosforilada por Raf (DAVIES et al., 2000), a primeira quinase do sistema Ras/Raf/MEK/ERK (Figura 3). Desta forma, MEK não é ativada e, por conseguinte, não há fosforilação de ERK (DUDLEY et al., 1995). Como observado na Figura 24 A, na presença de PD98059, a proliferação celular mediada por CMS1 ou CMS2 foi completamente abolida. O inibidor PD98059 também reduziu de maneira significativa o estímulo mitogênico provocado pelo controle positivo FBS 10%, que ainda assim manteve estímulo proliferativo. Um resultado semelhante foi obtido por SAZONOVA et al. (2007) ao avaliarem o efeito desse inibidor nas células L₉₂₉ na presença de FBS 10%. Esses dados sugerem que os fatores que promovem mitose celular presentes no FBS podem agir, pelo menos em parte, por vias que são independentes da ativação de ERK1/2, enquanto que mostramos que CMS1 e CMS2 ativam a mitose celular por um mecanismo dependente da fosforilação desta proteína.

Na migração (Figura 24 B), a inibição de MEK promoveu um efeito mais drástico. Tanto nos grupos tratados com CMS1 e CMS2 como no controle positivo FBS 10%, o efeito migratório foi totalmente abolido, mostrando a importância dessa via na regulação desse evento celular em células epiteliais gástricas. A diferença de efeito observada no controle positivo nos dois processos, proliferação e migração, pode ser devido à diferença de tempo experimental, considerando que a ação de PD98059 é reversível (DAVIES et al., 2000). No protocolo de migração os resultados são avaliados dentro de 24 h e no de proliferação após 48 h, tempo esse, em que parte da atividade da enzima já pode ter sido restabelecida.

O sistema Ras/Raf/MEK/ERK é a via que está mais comumente envolvida no processo de proliferação e migração celulares direcionadas por fatores de crescimento em células gástricas (TARNAWSKI & AHLUWALIA, 2012; OSAKI & GAMA, 2013). Em trabalhos anteriores, nosso grupo demonstrou que uma fração do látex de *V. cundinamarcensis*, que induzia a proliferação celular em fibroblastos da linhagem L₉₂₉, reagia positivamente com anticorpos específicos ao EGF humano. Esse dado sugere que alguns compostos do látex com atividade mitogênica poderiam compartilhar epítomos com a molécula de EGF (SILVA et al., 2003). Apesar da presença de EGF em plantas não ter sido documentada, um trabalho

descreveu a presença de receptor transmembrânico para EGF em *Arabidopsis thaliana* (KOHORN et al., 1992), abrindo precedentes para a presença de fatores de crescimento similares ao EGF em plantas. Além disso, trabalhos mais recentes demonstraram que a protease CMS2MS2 teve sua atividade proliferativa e capacidade de fosforilar ERK 1/2 diminuídas quando o receptor de EGF esteve inibido. Assim sendo, na tentativa de desvendar um possível mecanismo pelo qual a cascata de reações que leva a ativação mitogênica da célula pudesse estar sendo ativada, a influência do inibidor do receptor de EGF (AG1478) no efeito proliferativo de CMS1 e CMS2 sobre células da linhagem AGS foi avaliada. Seu mecanismo inibitório ocorre através do bloqueio do sítio de ligação ao ATP dos domínios citoplasmáticos do receptor de EGF, evitando assim a autofosforilação com posterior ativação desta proteína (GAN et al., 2007).

Como observado na Figura 25 A, o estímulo proliferativo de CMS1 e CMS2 sobre AGS foi diminuído parcialmente quando o receptor de EGF esteve bloqueado. Na migração (Figura 25 B), houve grande diminuição do efeito de CMS2, mas ainda se manteve significativo em relação ao controle. Já para CMS1, o efeito migratório foi abolido, enfatizando a importância da ativação de EGF-R em seu mecanismo de ação. Na cicatrização de úlceras gástricas, a expressão de EGF-R é um dos primeiros eventos que ocorre, o que evidencia a sua importância para a proliferação e a migração celulares que dão início ao processo de cura (TARNAWSKI, 2005). As reduções na proliferação e migração celulares em resposta ao CMS1 e CMS2, na presença de AG1478 sugere um mecanismo de ação mitogênico, pelo menos parcialmente, através da ativação de receptores de EGF. No entanto, não poderia indicar de maneira definitiva que as frações estivessem atuando diretamente em receptores de EGF, pois o efeito observado pode ter sido mediado de maneira indireta. Mecanismos de ativação de EGF-R através de uma ativação cruzada com receptores acoplados à proteína G já foram descritos. O complexo de subunidades $\beta\gamma$ da proteína G_i ou G_o , quando ativado, pode ativar *Src*. Uma vez ativada, *Src* pode interagir e ativar receptores tirosina-quinase (VAN CORVEN et al., 1993; MACFARLANE et al., 2001), como o EGF-R (Figura 3). A ativação cruzada também pode ocorrer através do estímulo de fosfolipase C- β previamente ativada pela subunidade $G\alpha$. Além de hidrolisar fosfoinositol, a fosfolipase C- β pode ativar MMPs na membrana citoplasmática que através de proteólise liberam unidades funcionais

de EGF a partir de precursores também localizados na membrana da célula. Essas moléculas de EGF podem atuar em seus receptores específicos autocrinamente induzindo mitose e migração celular (NEW & WONG, 2007). Nos estudos *in vivo*, foi demonstrado o aumento da atividade de MMP-2 nos animais tratados com CMS1 e CMS2, apoiando a última hipótese. A ativação de EGF-R também promove a ativação da via das MAPK, com aumento da fosforilação de ERK 1/2, que foi descrito para CMS1 e CMS2 no presente trabalho.

Ao contrário do observado no ensaio de cicatrização *in vivo*, nos ensaios de proliferação e migração *in vitro*, foi evidenciada a importância da atividade proteolítica das frações em seus efeitos. Houve redução na ação mitogênica de CMS1 e CMS2 em células epiteliais e endoteliais quando da inibição da atividade proteolítica das frações (Figura 17). Em células AGS, observou-se que a inibição não aboliu o efeito proliferativo das frações, mas o reduziu significativamente em relação às frações ativas. Já em HUVEC-CS, o efeito mitogênico foi abolido pela inibição da atividade proteolítica. Entretanto, os índices apresentados para as frações inibidas não diferiram estatisticamente das frações ativas, o que pode ser justificado pelo estímulo mitogênico menos pronunciado na linhagem HUVEC-CS. Com relação ao efeito sobre a migração (Figura 20), foram analisados somente em células AGS e apenas a fração CMS2 (20 B) teve seu efeito estimulador de migração significativamente reduzido pela inibição de sua atividade proteolítica. Apesar de reduzido, o efeito migratório na ausência da atividade proteolítica de CMS2 ainda foi significativo em relação ao controle, indicando ser essa propriedade importante para seu efeito, porém não essencial. As diferenças quanto à participação na atividade proteolítica de CMS1 e CMS2 podem indicar mecanismos diferentes através dos quais essas frações estimulam a migração. Entretanto, são necessários estudos adicionais para verificar isso.

A observação da influência da atividade proteolítica de CMS1 e CMS2 em seus efeitos proliferativos e migratórios abriu precedentes para um possível envolvimento de receptores PAR, como ativador da via das MAPK. Esses receptores são ativados através de clivagem por serino-proteases como a tripsina e trombina e mediam funções, como a proliferação celular e a secreção em vários tecidos (KAWABATA, 2003). O trato gastrointestinal é abundante em PAR-1 e PAR-2, sendo sua ativação relacionada com a proteção da mucosa gástrica através da produção

de prostaglandinas e do aumento da renovação celular (NAKAYA et al., 2003, NISHIKAWA et al., 2003). Há relatos do estímulo de receptores PAR por cisteíno proteases não pertencentes a mamíferos, como a gingipaína. Essa cisteíno protease sintetizada pela bactéria *Porphyromonas gingivalis* (causadora de periodontite) é capaz de induzir células epiteliais gengivais a liberarem IL-6, num processo dependente da clivagem de PAR-1 e PAR-2 com a ativação da via das MAPK (LOURBAKOS et al., 2001). Nos resultados apresentados na Figura 23, verificamos que apesar da diferença na proliferação e migração mediadas pelas frações inibidas proteoliticamente em relação às ativas, a fosforilação de ERK não foi modificada pela inibição da atividade proteolítica. Isso sugere que as ações mediadas por CMS1 e CMS2 não envolvem a clivagem de receptores PAR. Apoiando essa hipótese, resultados prévios do grupo, verificaram que proteases isoladas do látex de *V. cundinamarcensis* clivam as porções extracelulares do receptor PAR-1 em pontos diferentes daqueles feitos pelo seu agonista endógeno, trombina, enfraquecendo a possibilidade de ativação por clivagem. Entretanto, não se deve descartar a hipótese de que algum determinante peptídico das frações possa agir como agonista de PAR, uma vez que é descrita a ativação desses receptores por peptídeos sintéticos (KAWABATA, 2003).

7. CONCLUSÃO

Neste estudo evidenciamos a atividade cicatrizante gástrica de subfrações de P1G10, CMS1 e CMS2. Os mecanismos de ação envolvem o estímulo da angiogênese, a proliferação celular e o remodelamento tecidual através da modulação da expressão de fatores de crescimento e outros mediadores relacionados à cicatrização. Em comparação com CMS2 e P1G10, CMS1 se destacou por apresentar uma maior potência farmacológica e efeitos pró-cicatrizantes mais pronunciados. Em nível celular e molecular, verificou-se que os efeitos mitogênicos e migratórios de CMS1 e CMS2 envolvem a participação da via Ras/Raf/MEK/ERK, possivelmente através da ativação de EGFR, o estímulo da polimerização de actina e formação de fibras de estresse. Diante disso, concluímos que CMS1 e CMS2 apresentam efeitos que por si só são capazes de determinar atividade cicatrizante gástrica, sendo difícil atribuir a uma delas o efeito cicatrizante de P1G10. Entretanto, CMS1 apresenta uma maior gama de efeitos, além de maior potência, sendo a mais indicada como potencial agente cicatrizante gástrico.

8. REFERÊNCIAS

- AIHARA, T.; NAKAMURA, E.; AMAGASE, K. ET AL. Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: past, present, and future. *Pharmacol Ther*, 98:109-27, 2003.
- AL-JIBOURY, H.; KAUNITZ, J. D. Gastroduodenal mucosal defense. *Curr Opin Gastroenterol*, 28(6):594-601, 2012.
- ALLEN, A. & FLEMSTROM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am J Physiol Cell Physiol*, 288(1):C1-19, 2005.
- AMĂLINEI C, CĂRUNTU ID, BĂLAN RA. Biology of metalloproteinases. *Rom J Morphol Embryol*, 48(4):323-34, 2007.
- ARISAWA, T.; SHIBATA, T.; KAMIYA, Y. Effects of sucralfate, cimetidine and rabeprazole on mucosal hydroxyproline content in healing of Ethanol-HCl-induced gastric lesions. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 33:628-632, 2006.
- AYELLO, E. A. & CUDDIGAN, J. E. Debridement: controlling the necrotic/cellular burden. *Adv Skin Wound Care*, 17(2):66-75, 2004.
- AZARKAN, M.; WINTJENS, R.; LOOZE, Y. & VOLANT, D.B. Detection of three wound-induced proteins in papaya latex. *Phytochem*, 65(5):525-534, 2004.
- BAEZA, G.; CORREA, D.; SALAS, C. E. Proteolytic enzymes in *Carica candamarcensis*. *J Sci Food Agric*, 51:1-9, 1990.
- BAFFY, G.; YANG, L.; RAJ, S.; MANNING, D. R.; WILLIAMSON, J. R. G protein coupling to the thrombin receptor in Chinese hamster lung fibroblasts. *J Biol Chem*, 18;269(11):8483-8487, 1994.
- BANERJEE, D.; BHATTACHARYA, S.; BANDYOPADHYAY, S. K.; CHATTOPADHYAY, S. Biochemical mechanism of healing activity of the natural phenolic, allylpyrocatechol, against indomethacin-induced gastric ulceration in mice. *Dig Dis Sci*, 53:2868–2877, 2008.
- BARRIENTOS, S.; STOJADINOVIC, O.; GOLINKO, M. S.; BREM, H.; TOMIC-CANIC, M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*, 16(5):585-601, 2008.

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

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

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitative estimation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254, 1976.

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

BREW, K.; DINAKARPANDIAN, D.; NAGASE, H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*, 1477(1-2):267-83.

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

BRZOZOWSKI, T.; KWIECIEN, S.; KONTUREK, P. C. H. et al. Comparison of nitric oxide-releasing NSAID and vitamin C with classic NSAID in healing of chronic gastric ulcers; involvement of reactive oxygen species. *Med Sci Monitor*, 7:592-599, 2001.

BRZOZOWSKI, T. Experimental production of peptic ulcer, gastric damage and cancer models and their use in pathophysiological studies and pharmacological treatment polish achievements. *J Physiol Pharmacol*, 54 (S3): 99.126, 2003.

CALABRÒ, A.; GRAPPONE, C.; PELLEGRINI, G. et al. Spatial and Temporal Pattern of Expression of Interstitial Collagenase, Stromelysin/Transin, Gelatinase A, and TIMP-1 during Experimental Gastric Ulcer Healing. *Digestion*, 70:127-138, 2004.

CASTRO, L.P.; COELHO, L.G.V.; VIEIRA, W.L.S.V.; RODRIGUES, M.A.G. Úlcera Péptica Gastroduodenal. Tratado de Clínica Médica. 2ª Ed. São Paulo: Ed. Roca.

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

CHAI, J.; BAATAR, D. & TARNAWSKI, A. Serum Response Factor Promotes Re-epithelialization and Muscular Structure Restoration During Gastric Ulcer Healing. *Gastroenterol.*, 126:1809-1818, 2004.

CHEN, P. & PARKS, W. C. Role of matrix metalloproteinases in epithelial migration. *J Cell Biochem*, 108(6):1233-1243, 2009

CHOW, D.K. & SUNG, J.J. Is the prevalence of idiopathic ulcers really on the increase? *Natural Clin Practice Gastroenterol Hepatol*, 4:176-177, 2007.

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

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. Gastric ulceration. *In* Robbins Pathologic Basis of Disease. 5th Edition. RS Cotran, V Kumar, SL Robbins (eds). Philadelphia, Saunders, p. 298–299, 773–777, 1999.

DAVIES, S.P.; REDDY, H.; CAIVANO, M. & COHEN, P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*, 351:95-105, 2000.

DÉRY, O.; CORVERA, C. U.; STEINHOFF, M. & BUNNETT, N. W. Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am. J. Physiol.*, 274: C1429-C1452, 1998.

DEROSA, G.; D'ANGELO, A.; TINELLI, C. et al. Evaluation of metalloproteinase 2 and 9 levels and their inhibitors in diabetic and healthy subjects. *Diabetes Metab*, 33:129–134, 1997.

DUDLEY, D.T.; PANG, L.; DECKER, S.J. et al. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7686-7689, 1995.

ENGLISH, J. L.; KASSIRI, Z.; KOSKIVIRTA, I. Individual Timp deficiencies differentially impact pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem*, 281:10337-10346, 2006.

FERRARA, N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocrine reviews*, 25(4):581-611, 2004.

FERRARA, N. & KERBEL, R. S. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, 438(7770):967-974, 2005.

FREITAS, K. M. *Avaliação dos Efeitos da Fração Proteolítica P1G10 de Vasconcellea cundinamarcensis sobre cicatrização de lesões cutâneas excisionais em camundongos*. 2011. (Dissertação de mestrado em Fisiologia e Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GAN, H. K.; WALKER, F.; BURGESS, A.W. et al. The epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor AG1478 increases the formation of inactive untethered EGFR dimers. Implications for combination therapy with monoclonal antibody 806. *J Biol Chem*, 282: 2840-2850, 2007.

GANGULY, K; KUNDU, P.; BANERJEE, A et al. Hydrogen peroxide-mediated downregulation of matrix metalloprotease-2 in indomethacin-induced acute gastric ulceration is blocked by melatonin and other antioxidants. *Free Radic Biol Med*, 41(6):911-25, 2006.

GANGULY, K.; SHARMA, A. V.; REITER, R. J; SWARNAKAR, S. Melatonin promotes angiogenesis during protection and healing of indomethacin-induced gastric ulcer: role of matrix metalloproteinase-2. *J Pineal Res*, 49:130-140, 2010.

GERBER, H. P.; MCMURTREY, A.; KOWALSKI, J. et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem*, 273(46):30336-30343, 1998.

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

GOMES, F. S. L. *Efeito da fração proteolítica de Carica candamarsensis na cicatrização cutânea: avaliação pré-clínica e clínica Fase I*. 230 f. (Tese de doutorado em Enfermagem) – Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

GOMES, M. T.; TURCHETTI, A. P.; LOPES, M. T.; SALAS, C. E. Stimulation of fibroblast proliferation by the plant cysteine protease CMS2MS2 is independent of its proteolytic activity and requires ERK activation. *Biol Chem*, 390(12):1285-91, 2009.

GOMES, F. S.; SPÍNOLA, C. V.; RIBEIRO, H. A. et al. Wound-healing activity of a proteolytic fraction from *Carica candamarcensis* on experimentally induced burn. *Burns*, 36(2):277-283, 2010.

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

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

GOMORI, G. A rapid one-step trichrome stain. *Am J Clin Path*, 20:661-664, 1950.

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

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

HOU, W. & SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. *Curr Op Gastroenterol*, 22:593–598, 2006.

HU, X. & BEETON, C. Detection of Functional Matrix Metalloproteinases by Zymography. *J. Vis. Exp.* (45), e2445, 2010. doi:10.3791/2445.

HUANG, W.; MISHRA, V.; BATRA, S. et al. Phorbol ester promotes histone H₃-Ser10 phosphorylation at the LDL receptor promoter in a protein kinase C-dependent manner. *J Lipid Res*, 45(8):1519-1527, 2004.

HUNT, R. H. Review article: the unmet needs in delayed-release proton-pump inhibitor therapy in 2005. *Alimentary Pharmacology Therapy*. V. 22, p. 10–19.

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

JAIN, R. N.; BRUNKAN, C. S.; CHEW, C. S.; SAMUELSON, L. C. Gene expression profiling of gastrin target genes in parietal cells. *Physiol Genomics*, 24(2):124-132, 2006.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LAMOREAUX, W.; FITZGERALD, M. E. C.; REINER, A. et al. Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro. *Microvasc Res*, 55:29-42, 1998.

LEMOS, F.O., FERREIRA, L. A., CARDOSO, V. N., CASSALI, G.D., SALAS, C. E., LOPES, M. T. Skin-healing activity and toxicological evaluation of a proteinase fraction from *Carica candamarcensis*. *Eur. J. Dermatol.*, 5:722-730, 2011.

LEMPINEN, M.; INKINEN, K. WOLFF, H. & AHONEN, J. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in indomethacin-induced rat gastric ulcer. *Eur Surg Res*, 32(3):169-76, 2000.

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

LEONG, R.W. Differences in peptic ulcer between the East and the West. *Gastroenterol Clin North Am*, 38:363-379, 2009.

LEONG, R.W.; CHAN, F.K.L. Duodenal ulcer. Encyclopedia of gastroenterology. 1^a Ed. Memphis: Academic Press, 2004.

LIANG, C.; PARK, A.Y.; GUAN, J. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, 2:329-333, 2007.

LIEBMANN, C. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signaling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell Signal*, 13(11): 777-785, 2001.

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

MACFARLANE, S. R.; SEATTER, M. J.; KANKE, T. et al. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Res*, 53(2):245-282, 2001.

MADDALA, R.; REDDY, V. N.; EPSTEIN, D. L.; RAO, V. Growth factor induced activation of Rho and Rac GTPases and actin cytoskeletal reorganization in human lens epithelial cells. *Mol Vision*, 9:329-336, 2003.

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

MCCAWLEY, L. J. & MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biology*, 13:534-540, 2000.

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

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

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

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

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

MITRA, S. K.; HANSON, D. A.; SCHLAEPFER, D. D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(1):56-68, 2005.

MORGAN, C. & NIGAM, Y. Naturally derived factors and their role in the promotion of angiogenesis for the healing of chronic wounds. *Angiogenesis*, 16(3):493-502, 2013.

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

MURPHY, A. N. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. *J Cell Physiol*, 157(2):351-358, 1993.

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

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

NAPOLITANO, L. Refractory Peptic Ulcer Disease. *Gastroenterol Clinics of North America*, 38:267-288, 2009.

NEW, D. C. & WONG, Y. H. Molecular mechanisms mediating the G protein-coupled receptor regulation of cell cycle progression. *J Mol Signal*, 26:1-15, 2007.

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

NUR AZLINA, M. F.; KAMISAH, Y. CHUA, K. H. & QODRIYAH, H. M. S. Tocotrienol attenuates stress-induced gastric lesions via activation of prostaglandin and upregulation of COX-1 mRNA. *Evid Based Complement Alternat Med.*, 2013. doi: 10.1155/2013/804796.

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

OGISO, H.; ISHITANI, R.; NUREKI, O. et al. Crystal structure of the complex of the human Epidermal Growth Factor and receptor extracellular domains. *Cell*, 110: 775-787, 2002.

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

OKOLOBA, A. B.; OBATERU, O. A.; BOJUWOYE, M. O. Helicobacter pylori eradication therapy: A review of current trends. *Niger Med J*, 54(1):1-4, 2013.

OSAKI, L. H & GAMA, P. MAPKs and Signal Transduction in the Control of Gastrointestinal Epithelial Cell Proliferation and Differentiation. *Int J Mol Sci*, 14:10143-10161, 2013.

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

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

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

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

POUYSSÉGUR, J.; VOLMAT, V; LENORMAND, P. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol*, 64(5-6):755-63, 2002.

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

RIENTO, K. & RIDLEY, A. J. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nature Rev Mol Cell Biol*, 4(6):446-456, 2003.

ROJIANI, M. V.; SIEMANN, D. W.; ROJIANI, A. M. Cell Proliferation Index Determination by Immunohistochemical Detection of hCDC47 Protein. *Applied Immunohist Mol Morphol*, 18(3):278-282, 2010.

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

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

SAKURAI, T.; TAMURA, K. & KOGO, H. Vascular endothelial growth factor increases messenger RNAs encoding cyclooxygenase-II and membrane-associated prostaglandin E synthase in rat luteal cells. *J Endocrinol*, 183:527-533, 2004.

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

SAZONOVA, O. V.; BLISHCHENKO, E.Y.; TOLMAZOVA, A.G. et al. Stimulation of fibroblast proliferation by neokytorphin requires Ca influx and activation of PKA, CaMK II and MAPK/ERK. *FEBS J*, 274: 474-484, 2007.

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

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

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. *Curr Opin in Gastroenterol*, 27:536–542, 2011.

SCHULTZ, G. S. & WYSOCKI, A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Rep Reg*, 17: 153–162, 2009.

SHAHIN, M.; KONTUREK, J. W.; POHLE, T. et al. Remodeling of extracellular matrix in gastric ulceration. *Microsc Res Technique*, 53:396-408, 2001.

SHARMA, A. V.; GANGULY, K; PAUL, S. et al. Curcumin heals indomethacin-induced gastric ulceration by stimulation of angiogenesis and restitution of collagen fibers via VEGF and MMP-2 mediated signaling. *Antiox Redox Signal*, 16(4): 351-362, 2012.

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

ARAUJO E SILVA, A. C.; LEMOS, F. O.; GOMES, M. T. R.; SALAS, C. E.; LOPES, M. T. P. Role of gastric acid inhibition, prostaglandins and endogenous sulphhydryls on the gastroprotective effect of a proteolytic fraction from *Vasconcellea cundinamarcensis* latex. *J Pharm Pharmacol*, no prelo, 2014.

SILVA, A. C. A.; LEMOS, F. O.; FIGUEIREDO, C. et al. Evaluation of the gastric antiulcer activity of a proteolytic fraction from *Carica candamarcensis* latex. In: 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, Copenhagen. *Basic & Clinical Pharmacol & Toxicol*, 107(S1):162-692, 2010.

STOSSEL, T. P. On the crawling of animal cells. *Science*, 260(5111):1086-94, 1993.

SWARNAKAR, S.; GANGULY, K.; KUNDU, P. et al. Curcumin regulates expression and activity of matrix metalloproteinases 9 and 2 during prevention and healing of indomethacin-induced gastric ulcer. *J Biol Chem*, 280(10):9409-9415, 2005.

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

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

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

TARNAWSKI, A. S. & AHLUWALIA, A. Molecular mechanisms of epithelial regeneration and neovascularization during healing of gastric and esophageal ulcers *Curr Med Chem*, 19:16-27, 2012.

TARNAWSKI, A.; SZABO I. L.; HUSAIN, S. S.; SOREGHAN, B. Regeneration of gastric mucosa during ulcer healing is triggered by growth factors and signal transduction pathways. *J Physiol Paris*, 95(1-6):337-344, 2001.

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

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

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

TOI, M.; MATSUMOTO, T.; BANDO, H. Vascular endothelial growth factor: its Prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Lancet Oncol*, 2(11):667-673, 2001

VAN CORVEN, E.J.; HORDIJK, P.L.; MEDEMA, R.H. et al. Pertussis toxin-sensitive activation of p21ras by G protein-coupled receptor agonists in fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 1257-1261, 1993.

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

VILLALBA, M. I. C.; LEMOS, F. O.; TAGLIATI, C. A. et al. Avaliação Toxicológica de fração proteolítica com atividade cicatrizante obtida do látex de *C. canadamarcesis*. In: Livro de

resumos do XXXIX Congresso Brasileiro de farmacologia e Terapêutica Experimental, 2007, p. 529.

VIANA, C. T. R. *Avaliação da atividade antitumoral e imunomodulatória de fração proteolítica do látex de Carica candamarcensis Hook 1835 em modelo de carcinoma de Ehrlich*. 2010. 104 f. (Dissertação de mestrado em Fisiologia e Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

VILLALBA, M. I. C. *Avaliação de parâmetros toxicológicos da fração P1G10 , obtida do látex de Carica candamarcensis*. 2010. 100 f. (Dissertação de mestrado em Farmacologia e Fisiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

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

WALLACE, J. L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? *Physiol Rev*, 88:1547-1565, 2008.

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

WANG, H.; UBL, J. J.; STRICKER, R. & REISER, G. Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways. *Am. J. Physiol Cell Physiol*, 283: C1351–C1364, 2002.

WANG, H.; KEISER, J. A. Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: Role of flt-1. *Circ Res*, 83:832-840, 1998.

WONG, W.M.; PLAYFORD, R.J.; WRIGHT, N.A. Peptide gene expression in gastrointestinal mucosal ulceration: ordered sequence or redundancy? *Gut*, 46:286-292, 2000.

YUAN, Y.; PADOL, I. T.; HUNT, R. H. Peptic ulcer disease today. *Nature Clin Prac Gastroenterol Hepatol*, 3:80-89. 2006.

Tabela 2 - Primers utilizados para a PCR quantitativa

Gene alvo	Seqüência (5' para 3') Sense	Seqüência (5' para 3') Antisense
EGF	GAC AAC TCC CCT AAG GCT TA	CAT GCA CAC GCC ACC ATT GAG GCA GTA CCC ATC GTA CGA
FGF	ATC ACT TCG CTT CCC GCA CTG	GCC GTC CAT CTT CCT TCA TAG
VEGF	ACA GAA GGG GAG CAG AAA GCC CAT	CGC TCT GAA CAA GGC TCA CAG T
COX-1	GGC GTT GCT CAT CCA TCT ACT C	AGC ATC TGT GAG CAG TAC CGG
COX-2	TTT GTT GAG TCA TTC ACC AGA CAG AT	ACG ATG TGT AAG GTT TCA GGG AGA AG
MMP2	GGC TTC CTC TGG TG	TCG TAG TTG GTT GTG GTT GC
TIMP2	AAA GCA GTG AGC GAG AAG GAG GTG	GGG TCC TCG ATG TCA AGA AAC TC
βACT	TTG TAA CCA ACT GGG ACG ATA TGG	TAC CTT GAT CTT CAT GGT GCT AGG

10. ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

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

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

CERTIFICATE

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

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

Belo Horizonte, 24 de Abril de 2008.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

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