



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM PLANTAS MEDICINAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

NATHALIA SANTOS CARVALHO

EFEITO PROTETOR DA SINVASTATINA NA LESÃO GÁSTRICA
INDUZIDA POR ALENDRONATO EM RATOS

TERESINA

2017

NATHALIA SANTOS CARVALHO

**EFEITO PROTETOR DA SINVASTATINA NA LESÃO GÁSTRICA
INDUZIDA POR ALENDRONATO EM RATOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde/Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para aprovação no mestrado em farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. JAND VENES ROLIM MEDEIROS

TERESINA

2017

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

C331e Carvalho, Nathalia Santos.
Efeito protetor da sinvastatina na lesão gástrica induzida por
alendronato em ratos / Nathalia Santos Carvalho. – 2017.
95 f.: il.

Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Farmacologia,
Universidade Federal do Piauí, 2017.

“Orientação: Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros”.

1. Estatina. 2. Bifosfato. 3. Dano Gástrico. 4. Antioxidante.
5. Anti-inflamatório. I. Título.

CDD 613.2

NATHALIA SANTOS CARVALHO

**EFEITO PROTETOR DA SINVASTATINA NA LESÃO GÁSTRICA
INDUZIDA POR ALENDRONATO EM RATOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde/Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para aprovação no mestrado em farmacologia.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros
Universidade Federal do Piauí – UFPI (Orientador)

Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Filgueiras
Universidade Federal do Piauí – UFPI

Prof. Dr. Moisés Tolentino Bento da Silva
Universidade Federal do Piauí – UFPI

À Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada. Aos meus pais Aparecida e Raimundo, ao meu irmão Matheus e ao meu namorado Diego, meus amores, minha família, minha base.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela força e coragem para a concretização desse objetivo, por me levantar nos momentos de fraqueza e guiar os caminhos que me levaram a essa conquista.

Aos meus pais Aparecida e Nonato e ao meu Irmão Matheus Pelo apoio e confiança incondicional, por sempre estarem ao meu lado acreditando em meu potencial.

Ao meu namorado, companheiro e melhor amigo de todas as horas, Diego. Por toda a força, incentivo e encorajamento durante a escrita deste trabalho e por sua paciência e compreensão nos momentos de ausência.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jand-Venes Rolim Medeiros, pelos conselhos, pela orientação, pelo conhecimento compartilhado e até pelas broncas que se faziam necessárias, reconheço que sua confiança e apoio foram essenciais para minha formação e irei levar os ensinamentos aprendidos por toda a minha jornada profissional.

Ao corpo docente do programa de pós-graduação em Farmacologia – UFPI, que fez parte da minha caminhada neste tempo de mestrado, fonte de conhecimento inestimável. Nas palavras de Isaac Newton “Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos gigantes”.

Aos integrantes do LAFFEX, companheiros de pesquisa e amigos, que tornam os experimentos agradáveis, divertidos, que transmitem e trocam conhecimento e experiências e que me fazem a cada dia e a cada conquista ter mais orgulho de poder fazer parte da história deste laboratório.

Aos meus companheiros da turma de mestrado, só nós sabemos a luta de pagar 10 disciplinas em um semestre, as noites mal dormidas, as conversas únicas no whatsapp, o desespero de ter 3 seminários seguidos, em especial aos meus companheiros Irismara e Antônio Carlos, minhas duplas de seminário e infindáveis discussões de vias farmacológicas.

Aos membros da banca, Dr. Marcelo Filgueiras e Dr. Moisés Tolentino, por atenderem ao convite para participar da banca examinadora, disponibilizando de seu tempo para ler e avaliar meu trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Ainda não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, já não sou mais o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

A literatura já vem reportando que a sinvastatina (SIN), uma estatina comumente prescrita por seus efeitos no tratamento da hipercolesterolemia, possui efeito protetor em modelos de úlcera gástrica induzidos por etanol e indometacina. Entretanto, a ação gastroprotetora da SIN no modelo de lesão gástrica induzida por alendronato (ALD) permanece inexplorado. O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito protetor da SIN no dano gástrico ocasionado pelo tratamento com ALD em ratos. No método, ratas foram pré-tratadas com salina ou SIN (20 ou 60 mg/Kg v.o), após 1 hora foi administrado ALD (50 mg/Kg v.o). A SIN foi administrada uma vez ao dia durante 7 dias e a partir do 4º dia o ALD começou a ser administrado uma vez ao dia durante 4 dias. No último dia de tratamento, 4 horas após a administração do ALD, os animais foram eutanaziados, seus estômagos removidos e os danos gástricos foram mensurados. Amostras dos estômagos imediatamente após a remoção foram fixadas em formalina 10% para subsequente avaliação histopatológica. Outras amostras retiradas do estômago foram estocadas e congeladas em -80 °C para posteriores mensurações dos níveis de glutathiona (GSH), malondialdeído (MDA), citocinas e da atividade da mieloperoxidase (MPO). Um terceiro grupo foi utilizado para mensuração de muco e secreção. Como resultados, o pré-tratamento com SIN preveniu os danos gástricos macro e microscópicos induzidos pelo tratamento com ALD, aumentou os níveis de GSH e diminuiu os níveis de MDA, bem como também os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) e a atividade da MPO. O pré-tratamento com SIN também preservou os níveis de muco e reduziu a secreção ácida gástrica. Em conclusão, nosso trabalho evidencia o efeito protetor da SIN sobre a lesão gástrica induzida por ALD por meio da manutenção da integridade da mucosa, redução da secreção ácida gástrica e da inibição da migração neutrofílica e do estresse oxidativo.

Palavras-chave: estatina; bifosfonato; dano gástrico; antioxidante; anti-inflamatório.

ABSTRACT

It has been reported that simvastatin, a statin commonly prescribed for lower serum cholesterol, has gastroprotective effects in indomethacin and ethanol-induced gastric ulcers. However, the effects of simvastatin on alendronate-induced gastric mucosal injury remain unexplored. This study investigated the use of simvastatin for the treatment of alendronate-induced gastric ulcers in rats. Female rats were pretreated with saline or simvastatin (20 and 60 mg/kg p.o.). After 1 h, the rats received alendronate (50 mg/kg p.o.). Simvastatin was administered once daily for 7 days, and from the fourth day of simvastatin treatment, alendronate was administered once daily for 4 days. On the final day of treatment, 4 h after alendronate administration, animals were euthanized, their stomachs were removed, and gastric damage was measured. Samples of the stomach were fixed in 10% formalin immediately after their removal for subsequent histopathological assessment. Unfixed samples were weighed, frozen at -80 °C until assayed for glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), and cytokine levels and myeloperoxidase (MPO) activity. A third group was used to measure mucus and gastric secretion. Results Pretreatment with simvastatin prevented alendronate-induced macroscopic gastric damage and reduced the levels of MDA and GSH, TNF- α and IL-1 β , MPO activity, and mucus levels, in the stomach. Conclusions This study demonstrates the protective effects of simvastatin against alendronate-induced gastric ulceration. Maintenance of mucosal integrity, inhibition of neutrophil activity, and reduced oxidative stress associated with decreased gastric acidity may explain the gastroprotective effects of simvastatin.

Keywords: statin; biphosphonate; gastric damage; antioxidant; anti-inflammatory.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AINE's – Anti-inflamatórios Não Esteroidais
- ALD – Alendronato
- AMPc – Adenosina Monofostato Cíclico
- ANOVA – Análise de Variância
- ATP – Adenosina Trifosfato
- BMP - Proteína Morfogenética Óssea
- BSA – Albumina de Soro Bovino
- CCK – Colecistokinina
- CD-14 – Cluster of differentiation
- COX – Ciclooxigenase
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DNA – Ácido Desoxirribonucléico
- DTNB – Ácido Ditio-Nitrobenzóico
- EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- ELISA – Ensaio de Imunoabsorbância Ligado a Enzima
- eNOS – Óxido Nítrico Sintase Endotelial
- EROS – Espécies Reativas do Oxigênio
- FDA - Food and Drug Administration
- GSH – Glutathiona
- GSH-px – Glutathiona Peroxidase
- GSSG – Glutathiona Reduzida
- H⁺ – Íons Hidrogênio
- H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
- H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico
- HCl – Ácido Clorídrico
- HDL – High-density Lipoprotein
- H&E – Hematoxilina e Eosina
- HMG-CoA – 3-Hidroxi-3-Metil-Glutaril Coenzima A
- HTAB – Hexa-Decil-Trimetil-Amônio
- IGF- I - Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
- IL-1 β – Interleucina- 1beta
- iNOS – Óxido Nítrico Sintase Induzida
- KCl – Cloreto de Potássio
- LDL – Low-density lipoprotein
- MDA – Malondialdeído
- MPO – Mieloperoxidase
- NaOH – Hidróxido de Sódio
- NO – Óxido Nítrico
- nNOS – Óxido Nítrico Sintase Neuronal
- O₂⁻ - ânion Superóxido
- OB – Osteoblastos
- OC – Osteoclastos

- OH – Hidroxila
- PBS – Tampão Fosfato salino
- PG – Prostaglandinas
- PGE2 – Prostaglandina E2
- PGI2 – Prostaciclina
- PGF2 α – Prostaglandina F2 alfa
- PKA – Proteína Kinase A
- RENAME – Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
- SIN – Sinvastatina
- SUS – Sistema Único de Saúde
- SOD – Super Óxido Dismutase
- TCA – Ácido Tricloroacético
- TFG- β – Fator de transformação do crescimento beta
- TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa
- VCAM-I – Moléculas de Adesão Celular Vascular I
- VLDL – Very-low-density lipoprotein

Lista de tabelas

TABELA 1 – MICROSCOPIA DO EFEITO PROTETOR DA SIN EM DANOS GÁSTRICOS INDUZIDOS POR ALD.	47
TABELA 2 – EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM SIN SOBRE A SECREÇÃO ÁCIDA GÁSTRICA.	52

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DAS DIVISÕES ANATÔMICAS DO ESTOMAGO.	17
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS CÉLULAS PRESENTES NA GLÂNDULA GÁSTRICA.	18
FIGURA 3 – ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA SECREÇÃO DE ÁCIDO GÁSTRICO PELA CÉLULA PARIETAL GÁSTRICA.	20
FIGURA 4 – SISTEMA ANTIOXIDANTE	24
FIGURA 5 – MECANISMOS DE DEFESA E AGENTES AGRESSORES DA MUCOSA GÁSTRICA.	25
FIGURA 6 – ESTRUTURA QUÍMICA DO PIROFOSFATO E DOS BIFOSFONATOS.	28
FIGURA 7 – ESTRUTURAS REPRESENTATIVAS DE VARIAÇÕES QUÍMICAS DOS COMPOSTOS BIFOSFONATOS.	29
FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DE AÇÃO DOS BIFOSFONATOS NA MATRIZ ÓSSEA.	30
FIGURA 9 – FÓRMULA MOLECULAR E ESTRUTURAL DO ÁCIDO ALENDRÔNICO E DO ALENDRONATO DE SÓDIO.	31
FIGURA 10 – MECANISMO DE AÇÃO DAS ESTATINAS NA VIA DO MEVALONATO.	36
FIGURA 11 – REPRESENTAÇÃO QUÍMICA DA SINVASTATINA.	37
FIGURA 12 – EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM SIN NO DANO GÁSTRICO INDUZIDO POR ALD.	45
FIGURA 13 – ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS E HISTOPATOLÓGICAS NA MUCOSA GÁSTRICA (AUMENTO: 20X).	46
FIGURA 14 – EFEITO DA SIN NA CONCENTRAÇÃO DE GSH E NOS NÍVEIS DE MDA, EM RATOS COM LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ALD.	48
FIGURA 15. AÇÃO DA SIN NA ATIVIDADE DA MPO NA INJURIA GÁSTRICA INDUZIDA POR ALD.	49
FIGURA 16. EFEITOS DA SIN NA REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS TNF- A E IL-1β EM RATOS COM DANOS GÁSTRICOS INDUZIDOS POR ALD.	50
FIGURA 17 – EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM SIN NA GASTROPROTEÇÃO ATRAVÉS DA QUANTIFICAÇÃO DE MUÇO NO ESTOMAGO COM LESÕES INDUZIDAS PELO ALD.	51

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1.	ANATOMIA E FISILOGIA GÁSTRICA.....	17
2.2.	FISILOGIA DA SECREÇÃO ÁCIDA GÁSTRICA	18
2.3.	MECANISMOS DE DEFESA DA MUCOSA GÁSTRICA.....	20
2.3.1.	Secreção de muco e bicarbonato.....	20
2.3.2.	Prostaglandinas	21
2.3.3.	Fluxo sanguíneo gástrico.....	22
2.3.4.	Óxido nítrico	22
2.3.5.	Defesas antioxidantes da mucosa gástrica	23
2.4.	ÚLCERA GÁSTRICA.....	24
2.5.	BIFOSFONATOS.....	26
2.5.1.	Problemática: Patologias relacionadas à reabsorção óssea	26
2.5.2.	Aspectos gerais dos bifosfonatos.....	27
2.5.3.	Estrutura química dos bifosfonatos	27
2.5.4.	Mecanismo de ação dos bifosfonatos.....	29
2.5.5.	Alendronato de sódio.....	31
2.5.5.1.	Propriedades farmacológicas do alendronato	32
2.5.5.2.	Ulceração gástrica associada ao tratamento crônico com alendronato.....	33
2.6.	ESTATINAS.....	34
2.6.1.	Problemática: Doenças relacionadas aos altos níveis de colesterol – LDL no organismo.....	34
2.6.2.	Aspectos gerais das estatinas.....	34
2.6.3.	Mecanismo de ação das estatinas.....	35
2.6.4.	Sinvastatina	36
2.6.4.1.	Ação gastroprotetora e benefícios na remodelação óssea da SIN	37
3.	OBJETIVOS.....	39
3.1.	OBJETIVO GERAL	39
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4.	METODOLOGIA.....	40
4.1.	MATERIAIS.....	40
4.2.	ANIMAIS	40
4.3.	EFEITO DA SIN NO DANO GÁSTRICO INDUZIDO POR ALD.....	40
4.4.	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	41
4.5.	ANÁLISES DAS CONCENTRAÇÕES DE GSH.....	41

4.6.	CONCENTRAÇÃO DOS NÍVEIS DE MDA.....	42
4.7.	ATIVIDADE DA MPO	42
4.8.	MENSURAÇÃO DE CITOCINAS	42
4.9.	DETERMINAÇÃO DE MUCO GÁSTRICO.....	43
4.10.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTISECRETORA.....	43
4.11.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
5.	RESULTADOS	45
5.1.	EFEITO DA SIN VASTATINA NO DANO GÁSTRICO INDUZIDO POR ALENDRONATO	45
5.2.	NÍVEIS DE GSH E MDA	48
5.3.	ATIVIDADE DA MPO NA INJURIA GÁSTRICA INDUZIDA POR ALD.....	49
5.4.	NÍVEIS DE CITOCINAS (TNF- α E IL-1 β) DURANTE A INJURIA GÁSTRICA OCASIONADA POR ALD	50
5.5.	EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO DA SIN PELA DA DETERMINAÇÃO DE MUCO GÁSTRICO E SECREÇÃO ÁCIDA GÁSTRICA NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ALD.	51
6.	DISCUSSÃO	53
7.	CONCLUSÕES.....	60

1. INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma das doenças ósseas mais conhecidas no mundo, sendo caracterizada pela baixa densidade de mineralização e posterior deterioração da microarquitetura, levando a fragilidade dos ossos e ao aumento na propensão de fraturas (RAISZ, 2005). Os bifosfonatos, como o alendronato (ALD), o clodronato, o etidronato, o pamidronato e o tiludronato, são as drogas mais comumente prescritas para o tratamento de várias desordens ósseas, incluindo a doença de Paget, a osteolite e a osteoporose, além de também serem utilizadas para aumentar a reabsorção em casos de prevenção de algumas dessas doenças (FLEISCH, 1997). Entretanto, essas drogas têm sido bastante relacionadas com graves distúrbios gastrointestinais, como desconfortos abdominais, dor, diarreia e ulceração no esôfago, estômago e intestino delgado (CHESTNUT et al., 1995; LICHTENBERGER et al., 2000).

As estatinas são uma classe de drogas bastante utilizadas na prática clínica para diminuir as concentrações de lipoproteínas carreadoras de colesterol no plasma sanguíneo. Estas têm sido associadas com vários efeitos pleiotrópicos, incluindo efeitos benéficos nos ossos por sua interferência no metabolismo e redução da sinalização proteica, sendo esta importante na regulação da atividade de osteoclastos e na expressão do gene da proteína-2 morfogênica dos ossos (VAN BEEK et al., 1999; MUNDY et al., 1999., TSARTSALIS et al., 2012). Além disso, estudos já têm demonstrado que os riscos de fraturas diminuem acentuadamente em pessoas que fazem uso de algum tipo de estatina (MEIER et al., 2000; WANG et al., 2000).

A Sinvastatina (SIN) é uma estatina comumente prescrita, apresentando além de seus efeitos hipocolesterolêmicos, também atividade anti-inflamatória (SCALIA et al., 2001; PRUEFER et al., 1999) e antioxidante (UNGUREANO et al., 2003). A literatura também tem estabelecido que a SIN possui efeitos gastroprotetores em modelos de ulceração gástrica induzidos por etanol (TARIQ et al., 2007) e indometacina (HEEBA et al., 2009).

Como já disposto, a ulceração gástrica tem sido um efeito adverso comumente associado ao uso crônico de ALD, porém apresentando mecanismos diferentes dos descritos tanto para o etanol quanto para os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE's), visto que os efeitos do ALD no trato

gastrointestinal têm sido atribuídos principalmente a aderência da droga na superfície da mucosa, causando assim, lesões no antro que podem posteriormente se desenvolverem para um quadro ulcerativo na região (SILVA et al., 2014).

Destarte, devido à falta de uma terapia eficaz para a gastropatia advinda do tratamento crônico com ALD e os poucos estudos acerca dos mecanismos envolvidos em sua toxicidade, e ainda levando em conta que o efeito da SIN na injúria da mucosa gástrica ocasionada pelo uso de ALD permanece inexplorada, fornece-se então evidências para a realização deste trabalho, que pode apresentar justificativas para o uso de estatinas no tratamento de úlceras gástricas induzidas por bifosfonatos.

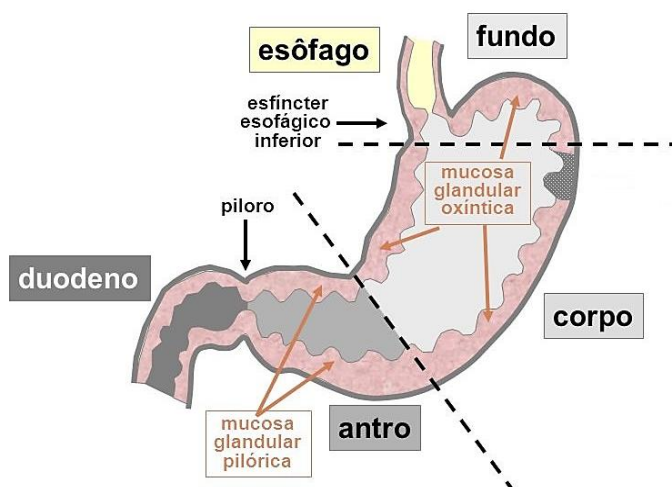
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ANATOMIA E FISIOLOGIA GÁSTRICA

O processo de digestão alimentar é realizado durante a passagem do alimento por todo o trato gastrointestinal, seguindo etapas funcionais em cada segmento. O estômago de forma particular atua como um reservatório alimentar com capacidade média de 1.200 a 1.500 ml, podendo por meio de distensão chegar a acomodar até 3.000 ml. Durante o período de armazenamento exerce funções relacionadas ao processamento mecânico e químico dos alimentos para formação do quimo, controlando a passagem do mesmo para o intestino (ABBAS et al., 2005).

De forma anatômica, pode-se dividir o estômago em 3 partes: fundo, corpo e antro pilórico, sua limitação se dá pelo esfíncter esofágico inferior ou cárdia na porção superior e pelo esfíncter pilórico ou piloro na porção inferior do órgão (Figura 1) (HOGBEN et al., 1974).

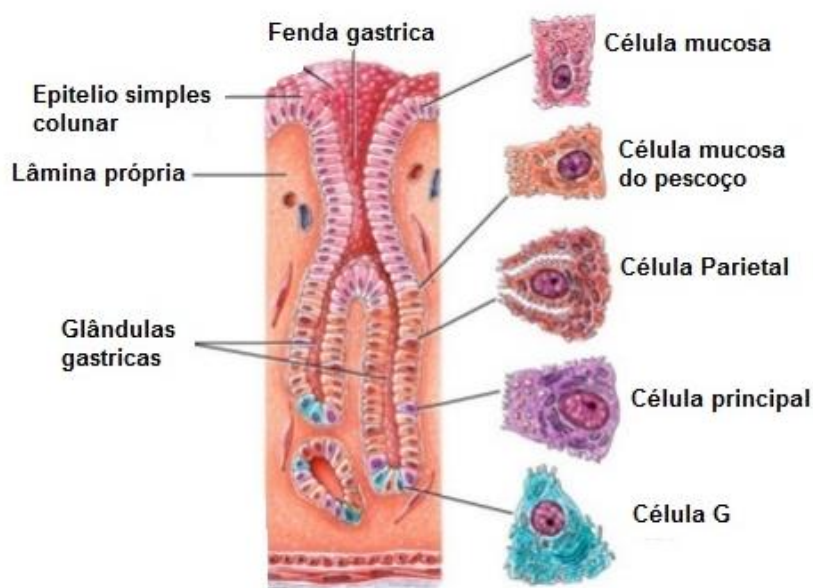
Figura 1 – Representação das divisões anatômicas do estômago.



A mucosa do estômago possui variações de composição celular e funcional glandular dependente de sua região anatômica (figura 1). A mucosa constituinte do corpo e do fundo gástrico, é a principal responsável pela secreção de ácido clorídrico (HCl), denominada como mucosa oxíntica, e é constituída por células parietais (oxínticas) – secretoras de ácido, células principais – produtoras de pepsinogênio, células D – produtoras de somatostatina e células do tipo enterocromafins – liberadoras de histamina

(figura 2). Já na região do antro, encontra-se a mucosa pilórica que apesar de compartilhar grande parte da composição da mucosa oxíntica, diferencia-se desta por não apresentar células parietais, mas sim células G – produtoras de gastrina (LUCEY; YAMADA, 1989; SCHUBERT; PEURA, 2008). A parte mais superficial da mucosa gástrica é recoberta de células mucosa superficiais e células mucosa do pescoço glandular que produzem e liberam muco protegendo o epitélio contra o suco gástrico e outros possíveis agentes nocivos (BI; KAUNITZ, 2003).

Figura 2 – Representação esquemática das células presentes na glândula gástrica.



2.2. FISILOGIA DA SECREÇÃO ÁCIDA GÁSTRICA

O estômago secreta diariamente cerca de 2,5 litros de suco gástrico. Este ambiente ácido auxilia no processo de digestão facilitando a quebra de proteínas e potencializando a absorção de ferro, cálcio e vitaminas, além de também possuir importante papel dentro do mecanismo de defesa da mucosa, atuando contra agentes infecciosos na região (SCHUBERT; PEURA, 2008).

A secreção de ácido gástrico é um processo regulado por múltiplos fatores relacionados de forma geral com a via neuronal (acetilcolina), parácrina (histamina) e endócrina (gastrina) (KONTUREK, et al., 2004). Essas vias possuem receptores específicos na membrana das células parietais (M_3 , H_2 e CCK_2 respectivamente), que ativam a enzima $H^+ K^+ - ATPase$, mais conhecida

como bomba de prótons (figura 3), responsável pelos processos que levarão a secreção do ácido gástrico principalmente na região do corpo e do fundo do estômago (AIRES, 2008).

O estímulo gerado para que seja ativada a bomba de prótons pode ocorrer tanto pela concentração de cálcio intracelular que atua na liberação de gastrina e acetilcolina, como também pela elevação dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) que através da fosforilação de proteínas efetoras na célula parietal conduz a liberação de histamina (SCHUBERT, 2005; BRUNTON et al., 2010).

A acetilcolina liberada pelas fibras vagais pós-ganglionares estimula de forma direta a liberação de ácido gástrico por meio da ativação de seu receptor colinérgico M_3 específico na membrana de células parietais (MERCER; ROBINSON, 2008).

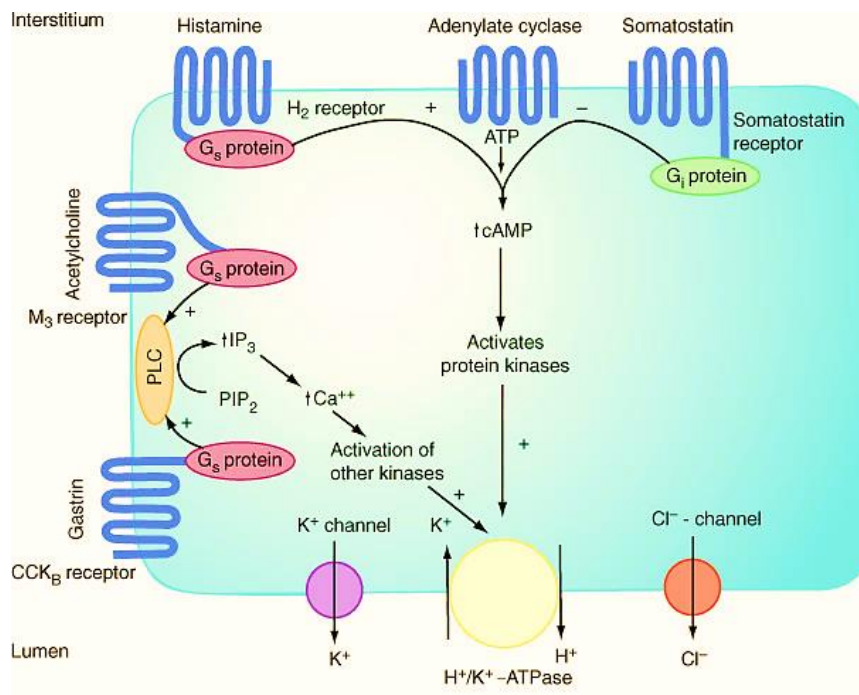
A histamina é estocada principalmente por células do tipo eterocromafins, quando liberada atua em seus respectivos receptores do tipo H_2 , aumentando os níveis de AMPc com consequente ativação da proteína Kinase A (PKA), esta via estimula a bomba de prótons e a consequente liberação de ácido gástrico. A ação da histamina também ocorre por meio da inibição de somatostatina, inibindo a liberação de gastrina com consequente inibição da secreção de ácido, realizando importante retroalimentação negativa na região (ROULEAU et al., 2004; JAIN et al., 2007).

A gastrina, hormônio sintetizado pelas células G atuam de duas principais formas: ativando receptores do tipo colecistocinina 2 (CCK_2) de células do tipo eterocromafins, que estimulam a via de cálcio intracelular, levando a liberação de histamina que como já disposto, atua em células paracrinas liberando ácido gástrico e de forma menos intensa, porém não menos importante, a gastrina também pode atuar de forma direta em seus receptores presentes na membrana das células parietais, também induzindo a bomba de prótons e a secreção ácida gástrica (MERCER; ROBINSON, 2008).

Apesar da importância funcional do ácido gástrico para os processos digestivos e para a proteção do trato gástrico, disfunções nos processos de regulação podem ocasionar o desenvolvimento de úlceras pépticas, sendo desta forma essencial que haja um equilíbrio entre a secreção do ácido e os

mecanismos protetores da mucosa, para que a mesma permaneça intacta frente a exposição a possíveis agentes agressores (LU & GRAHAM, 2006).

Figura 3 – Ilustração esquemática da secreção de ácido gástrico pela célula parietal gástrica.



2.3. MECANISMOS DE DEFESA DA MUCOSA GÁSTRICA

Mediante a exposição do ambiente gástrico a uma série de agentes agressores tanto do ambiente externo quanto por fatores internos, a mucosa gástrica apresenta mecanismos defensivos para buscar a manutenção de sua integridade. Dentre as linhas de defesa podemos destacar a secreção de muco e bicarbonato, a microcirculação gástrica, defesas antioxidantes, manutenção de grupos sulfídricos, a liberação de óxido nítrico (NO) e a manutenção de prostaglandinas (PG) (BRZOZOWSKI et al., 2005; GUYTON; HALL, 2006).

2.3.1. Secreção de muco e bicarbonato

A primeira barreira de proteção gástrica é formada pela secreção de muco, bicarbonato e fosfolipídios que atuam na defesa de fatores tanto exógenos quanto endógenos. O muco caracteriza-se como uma substância viscosa, sendo constituído principalmente de glicoproteínas, mucina e água. É

secretado pelas células secretoras de muco, estimuladas pelos hormônios gastrina e secretina, pelas prostaglandinas e agentes colinérgicos (ALLEN; FLEMSTRÖN, 2005). Esse muco secretado no lúmen recobre toda a superfície do estômago, tendo como funções a retenção de água, lubrificação do epitélio gástrico, redução da difusão de íons H^+ da luz para a membrana das células parietais, controle da colonização bacteriana e também possui importante participação na eliminação de radicais livres devido a sua propriedade antioxidante (REPETTO; LLESUY, 2002; WALLACE, 2008).

O íon bicarbonato é secretado pelas células epiteliais gástricas e retido pelo muco, sendo então, a partir dessa conjugação formado um gradiente de pH neutro na superfície do lúmen gástrico protegendo a mucosa contra a acidez do ambiente. Essa interação muco – bicarbonato também previne a penetração de pepsina no epitélio (LAINE et al., 2008). A regulação fisiológica da liberação de bicarbonato é mediada principalmente pelas prostaglandinas (DEFONESKA; KAUNITZ, 2010). Fatores que interfiram na disponibilidade fisiológica de muco e bicarbonato podem aumentar substancialmente a vulnerabilidade da mucosa ao ácido do ambiente, podendo ocasionar o surgimento de injúrias gástricas (WALLACE; GRANGER, 1996).

2.3.2. Prostaglandinas

Derivadas da cascata do ácido araquidônico, as PG possuem papel crucial na linha de defesa da mucosa gástrica. Os fosfolipídios de membrana sofrem processo de hidrólise por meio da ação da fosfolipase A_2 , fornecendo assim ácido araquidônico no citoplasma celular a partir do qual as isoformas das ciclooxygenases (COX) sintetizam as PG (GUDIS; SAKAMOTO, 2005).

A isoforma COX-1 relaciona-se com a síntese dos subtipos prostaglandina E_2 (PGE_2) e prostaciclina I_2 (PGI_2) que são produzidas na região do estômago e atuam na manutenção da integridade da mucosa como inibidores da secreção ácida gástrica, aumento da secreção de muco – bicarbonato, regulação do fluxo sanguíneo, aumento de componentes sulfídricos e auxílio da restituição epitelial (BRZOZOWSKI et al., 2005; MARTIN; WALLACE, 2006).

A importância das PG na linha de defesa da mucosa gástrica é evidenciada por trabalhos com drogas de inibição da produção das mesmas,

como os AINE's, o tratamento crônico com esse tipo de medicamento e a consequente inibição da síntese de PG relacionam-se de forma direta com o surgimento de ulcerações gástricas (SILVA et al., 2012; KANBAYASHI; KONISHI, 2015).

2.3.3. Fluxo sanguíneo gástrico

O fluxo sanguíneo na região da mucosa gástrica atua na regulação de fatores importantes contra agentes lesivos, por meio da remoção de substâncias tóxicas na região subepitelial, além de realizar o suprimento de oxigênio e nutrientes essenciais para a manutenção da integridade da camada de muco – bicarbonato (SZABO, 1991).

Em situação de exposição da mucosa a fatores agressivos o fluxo sanguíneo é aumentado fazendo com que haja remoção e/ou diluição do ácido na mucosa (LAINE et al., 2008). O controle desses processos é mediado pelas PG, sendo também em parte atribuído a ação do NO (CORUZZI et al., 2000).

2.3.4. Óxido nítrico

O NO em sua forma constitutiva vem sendo apontado como importante mediador nos mecanismos de defesa gástrica. Sua síntese se dá através da NO síntase (NOS) utilizando como substratos o O₂ e a L-arginina (UCHIDA et al., 2001). Há três isoformas de NO síntase: a isoforma induzida - iNOS, expressa em resposta a estímulos patológicos e duas isoformas constitutivas eNOS - endotelial e a nNOS – neuronal presentes e atuantes em condições fisiológicas normais. A isoforma constitutiva atua na mucosa aumentando o fluxo sanguíneo e a produção de muco, bem como também promovendo a inibição da aderência neutrofílica em células endoteliais (CORUZZI et al., 2000). Trabalhos também têm associado a redução ácida gástrica a ação do NO (KIM; KIM, 2006).

Estados inflamatórios associados ao excesso na síntese de iNOS têm sido ligados ao aumento na permeabilidade do epitélio bem como também na redução da barreira formada por muco, tornando o ambiente mais susceptível a ação de agente agressores, desta forma os efeitos do NO envolvidos na região da mucosa gástrica podem estar condicionados aos níveis de produção, ao tipo

sintetizado e ao estado fisiológico das células do epitélio gástrico (SHAH et al., 2004).

2.3.5. Defesas antioxidantes da mucosa gástrica

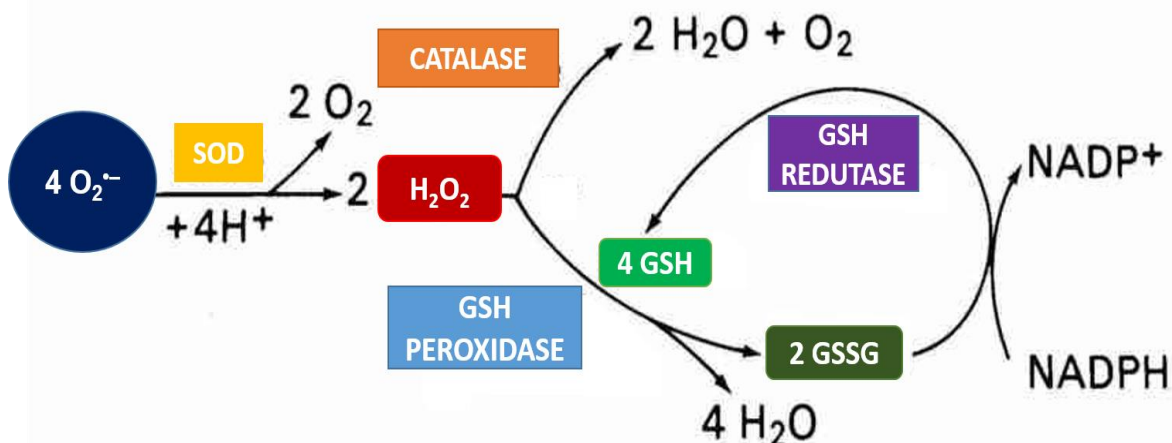
Os agentes antioxidantes endógenos merecem importante destaque na linha de defesa gástrica, estes atuam como sequestradores de espécies reativas de oxigênio (EROS) que são produzidos naturalmente por meio de processos fisiológicos. Entretanto em condições patológicas sua síntese é substancialmente aumentada, desequilibrando a homeostase do organismo. As EROS são altamente reativas e sua interação com componentes essenciais do organismo causam desordens celulares (MCCORD; FRIDOVICH, 1969; CNUBBEN et al., 2001). O excesso de radicais livres no organismo é confrontado por agentes antioxidantes produzidos pelo corpo ou adquiridos na dieta (BARREIROS et al., 2006)

O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é uma das primeiras EROS produzidas, sendo sintetizado principalmente na região mitocondrial, entretanto devido à alta reatividade deste ânion, as mitocôndrias apresentam grande concentração de enzimas superóxido dismutase (SOD), que convertem o superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um produto menos reativo frente as outras moléculas orgânicas, mas que participa ativamente no processo de estresse oxidativo pela facilidade de atravessar a membrana da célula e gerar radicais hidroxila em seu interior. O radical hidroxila é altamente reativo e atua principalmente em lipídeos, proteínas e açúcares, no entanto, sua alta reatividade confere tempo de vida curta a molécula sendo esta rapidamente degradada pelos agentes antioxidantes (VOGT, 1995; LARSON, 1997).

Os agentes antioxidantes do organismo atuam enzimaticamente por meio das superóxidos dismutases, catalases e da glutathione peroxidase (GSH-Px), ou de forma não enzimática a exemplo da glutathione (GSH) que atua por meio de ligação direta com o radical livre impedindo a ação deletéria nos componentes celulares, e assim funciona como um “varredor” de EROS (figura 4) (BARREIROS et al., 2006). A interação da GSH em conjunto com a GSH-Px no processo enzimático promove redução do peróxido de hidrogênio em água, acompanhada da conversão da GSH em sua forma reduzida para sua forma oxidada – GSSG que ao final do processo é convertida novamente em GSH

por meio da ação enzimática da Glutathione redutase (KWIECIEN et al., 2002). Em condições de estresse oxidativo, para manter o balanço redox, a GSSG é exportada da célula por proteínas transportadoras dependentes de ATP, desta forma, em condições severas de estresse oxidativo ocorre a diminuição dos níveis de GSH (CNUBBEN et al., 2001; DICKINSON; FORMAN, 2002).

Figura 4 – Sistema antioxidante



Legenda: No esquema a participação de importantes enzimas de defesa antioxidante do organismo. Adaptado de PROCTOR; REYNOLDS, 1984.

Estudos têm evidenciado que os altos níveis de glutathione no ambiente gástrico têm importante papel como agente gastroprotetor devido ao seu potencial antioxidante (SANDOR et al., 1995; ALTINKAYNAK et al., 2003). Desta forma a manutenção da homeostase da mucosa gástrica e sua consequente integridade dependem de forma direta da estabilidade dos níveis dos agentes antioxidantes que combatem o excesso de radicais livres e neutralizam os danos ocasionados pelos produtos dos mesmos (SHIRIN et al., 2001).

2.4. ÚLCERA GÁSTRICA

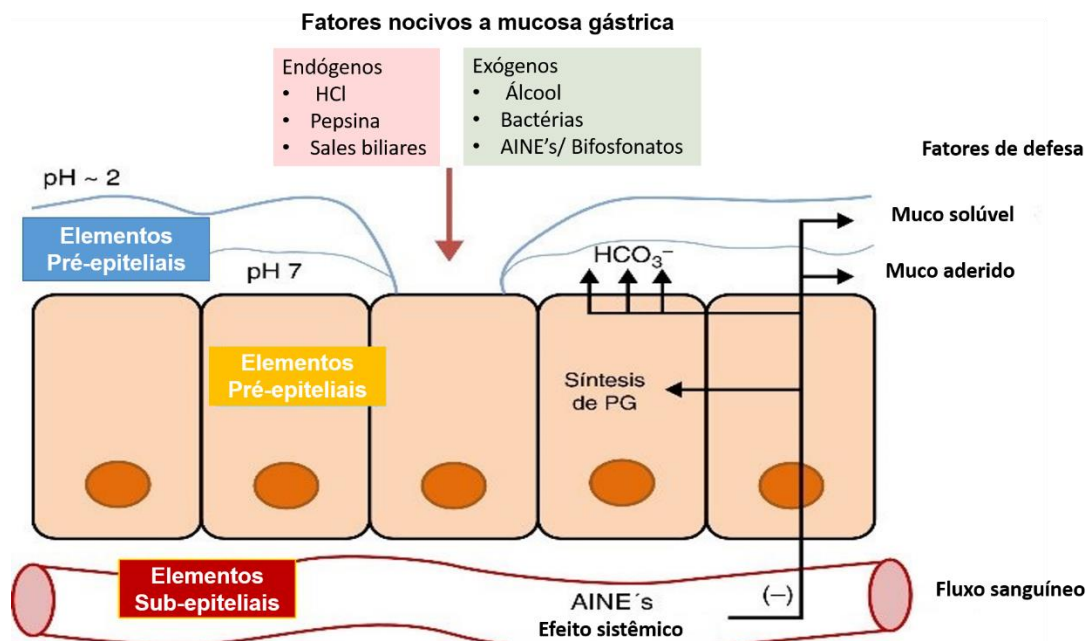
A úlcera gástrica pode ser definida como lesões na região do estômago, compreendendo diâmetro inferior a 4 cm e caracterizando-se histologicamente pelo rompimento das células que formam a camada mucosa, podendo em casos mais graves chegar a região da submucosa. O surgimento dessa injúria é atribuído ao desequilíbrio da ação de agentes agressores e dos componentes da barreira de defesa, tornando a mucosa exposta a ação do ácido gástrico (RAMAKRISHNAN; SALINAS, 2007; AIRES, 2008).

As úlceras gástricas podem ser classificadas como ulceração aguda ou crônica, sendo o primeiro caso caracterizado como inflamação ativa, com infiltrado neutrofílico e hemorragia na superfície da mucosa. Já os casos de úlceras crônicas apresentam uma mucosa com vários graus de injúria e agregados linfóides na região (MARTINS, 2005).

Mesmo com a significativa redução da incidência desta patologia sendo observada nas últimas décadas, a úlcera gástrica ainda é tida como uma das patologias de maior ocorrência em âmbito mundial, representando um importante problema no cenário clínico, principalmente considerando os casos de morbimortalidade atribuídos a situações mais graves, relacionadas com sangramento e perfuração do órgão (SUNG et al., 2010).

A etiologia da ulceração gástrica está relacionada com uma série de fatores (figura 5), destacando-se a infecção por *Helicobacter pylori*, o tratamento crônico com AINE's, álcool, tabagismo, estresse, fatores genéticos, tratamentos a longo prazo com bifosfonatos, entre outros (KURATA; NOGAWA., 1997; NATALE et al., 2004; SILVA et al., 2014).

Figura 5 – Mecanismos de defesa e agentes agressores da mucosa gástrica.



Adaptado e modificado de CASASOLA (2015).

O desequilíbrio entre os mecanismos de defesa da mucosa gástrica e a ação de agentes agressores ocasiona um cenário propício para o surgimento de lesões na mucosa. Desta forma, é de grande importância a manutenção dos

diversos processos pelo qual o organismo promove e mantém a proteção e integridade do trato gástrico contra fatores nocivos sejam estes de ordem exógena ou endógena no organismo (WALLACE; MA, 2001).

2.5. BIFOSFONATOS

2.5.1. Problemática: Patologias relacionadas à reabsorção óssea

A reabsorção óssea é um mecanismo de compensação, responsável por elevar os níveis de íons cálcio no líquido extracelular através da ação de osteoclastos, a fim de manter as funções essenciais do organismo. Entretanto a manutenção deste processo em situações de desordem patológica crônica leva a uma considerável perda da densidade mineral na região, tornando o osso poroso e mais propenso a fraturas caracterizando a instauração da osteoporose (GUYTON; HALL, 2006).

A osteoporose vem sendo descrita como um dos principais problemas de saúde pública em âmbito mundial, tanto por conta dos prejuízos sociais e psicológicos ao paciente e aos familiares, quanto também por conta dos gastos econômicos durante o tratamento da patologia (LINDSAY R. et al., 2001). É mais frequentemente diagnosticada em mulheres, entretanto as taxas de mortalidade provenientes de fraturas osteoporóticas são mais altas no público masculino (WHO, 2007).

Outros estados patológicos também são associados ao aumento da reabsorção óssea no organismo, como a doença de Paget, uma desordem óssea localizada, monostótica ou poliestótica que resulta na anormalidade da arquitetura óssea, na qual há uma substituição da correta organização do osso por uma estrutura desorganizada, aumentada, enfraquecida e deformada (BANDEIRA et al., 1999). O tratamento crônico com glicocorticóides também podem ser destacados, já que pode ocasionar a instauração do quadro de osteoporose secundária (WEINSTEIN, 2011). Metástases osteolíticas relacionadas com algumas neoplasias também associam desordens de remodelação óssea (GUISE et al., 2010).

O principal tratamento das patologias citadas é a terapêutica farmacológica, com o uso principalmente de fármacos da classe dos bifosfonatos, que através de seus efeitos sobre mediadores da reabsorção

aumenta a densidade mineral óssea dos pacientes melhorando a qualidade de vida dos mesmos (DRAKE et al., 2008).

2.5.2. Aspectos gerais dos bifosfonatos

A síntese dos bifosfonatos iniciou-se na metade do século XIX, sendo primariamente utilizados como anticorrosivos e agentes preventivos da deposição de carbonato de cálcio em encanamentos. Estudos posteriores comprovariam os efeitos benéficos dos bifosfonatos no organismo, agindo no controle da formação do fosfato de cálcio e na inibição da reabsorção óssea (CASTRO et al., 2004). Em 1967, era desenvolvido o etidronato, o primeiro bifosfonato de origem terapêutica para patologias relacionadas ao remodelamento ósseo (FLEISCH, 1998).

Nas últimas décadas os bifosfonatos têm assumido papel crucial no tratamento de doenças osteometabólicas, atuando diretamente em células osteoclasticas e alterando seu metabolismo, tendo por consequência a diminuição dos processos de reabsorção na matriz óssea mineralizada, aliviando dores, lesões e faturas ósseas e levando o paciente a melhorar sua qualidade de vida (ROSEN et al., 2001; ROELOFS et al., 2006).

Por suas propriedades terapêuticas, esta classe medicamentosa tem sido referência no tratamento da osteoporose, na hipercalcemia maligna, doença de Paget, osteogênese imperfeita infantil e em outras desordens de origem osteometabólica (GREENBERG, 2004; WOO et al., 2006).

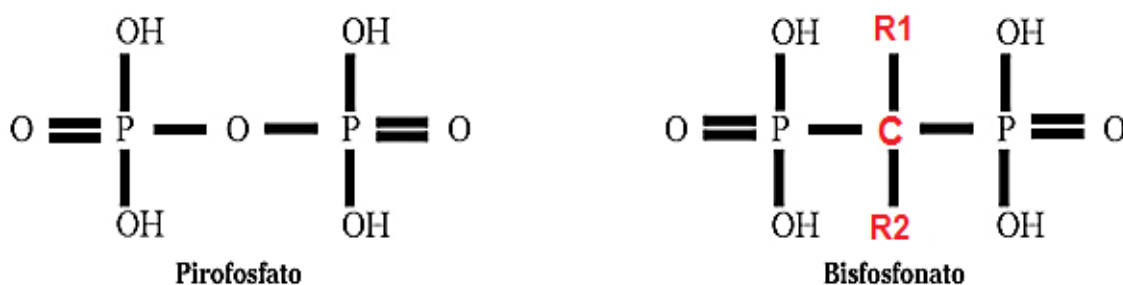
2.5.3. Estrutura química dos bifosfonatos

Os bifosfonatos são análogos sintéticos dos pirofosfatos inorgânicos, moléculas fisiologicamente formadas que participam da regulação da remodelação óssea. O pirofosfato (figura 6) é composto por dois grupos fosfato interligados por um oxigênio na parte central (P – O – P), entretanto esta molécula sofre rápida hidrólise enzimática, sendo ineficaz para o tratamento de doenças ósseas, já que não possuem resistência quando administradas por via oral. Assim, os bifosfonatos apesar de sua semelhança estrutural com o pirofosfato, diferenciam-se por apresentar dois grupos fosfato ligados covalentemente a uma molécula de carbono (P – C – P) tornando a molécula estável e resistente a hidrólise/degradação das enzimas do trato

gastrointestinal e apresentando uma meia vida biológica maior e assim viabilizando seu uso na terapêutica (DANNEMANN et al., 2006; ROELOFS et al., 2006).

Nas moléculas dos bifosfonatos (figura 6), também encontram-se duas cadeias laterais ligadas ao carbono central, denominadas R1 e R2. A cadeia lateral R1 associada com um grupo hidroxila (OH), confere maior afinidade na interação da molécula com o mineral ósseo, já a conformação da cadeia R2 relaciona-se com a atividade biológica da molécula, como a potência e a seletividade farmacológica (CASTRO et al., 2004).

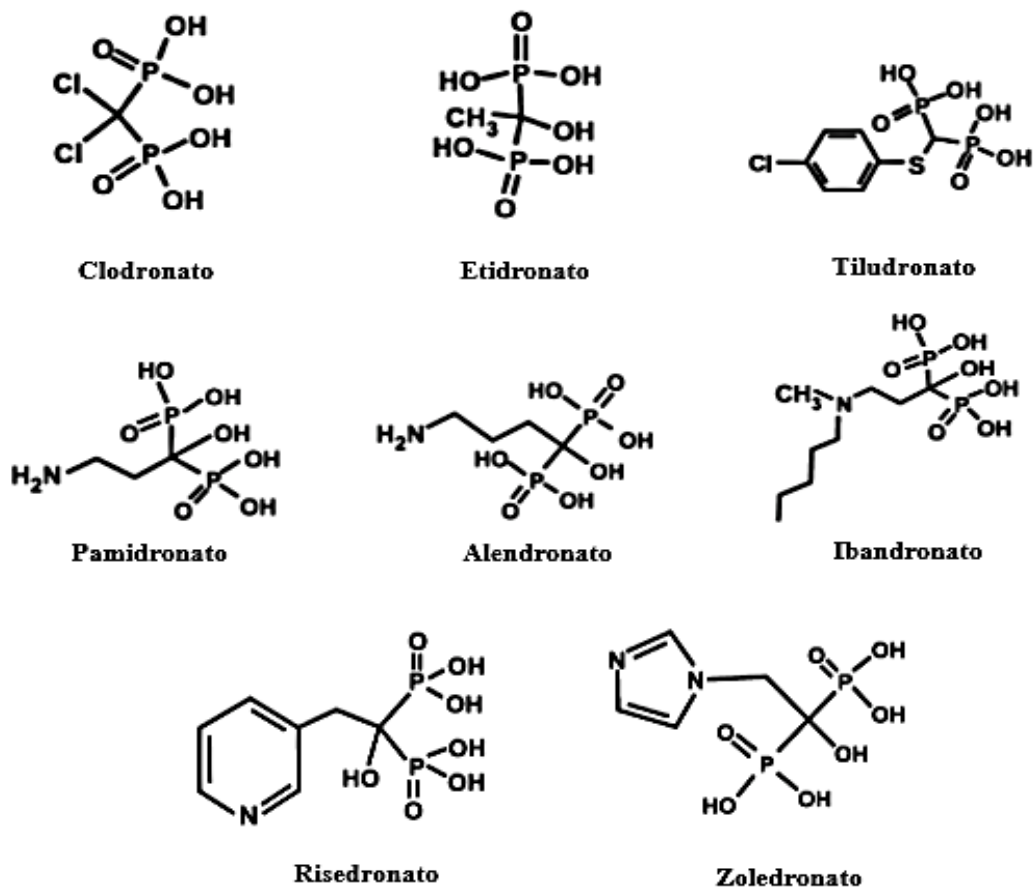
Figura 6 – Estrutura química do pirofosfato e dos bifosfonatos.



Legenda: Destaque em vermelho para o carbono central ligado as cadeias laterais (R1 e R2) na molécula dos bifosfonatos.

De acordo com os substituintes das cadeias laterais R1 e R2 do carbono central (figura 6) a afinidade óssea e o perfil terapêutico variam sistematicamente. Desta forma divide-se os bifosfonatos em dois grupos: a primeira geração que devido sua estrutura simples desempenha fracas ações no processo de reabsorção óssea, seus principais representantes são o etidronato, clodronato e o tiludronato. A segunda geração, os aminobifosfonatos, possui um lado alifático contendo uma ligação nitrogenada, correspondem ao pamidronato, ao ALD e ao zolendronato. Este último com dois átomos de nitrogênio é o mais potente da segunda geração (TENENBAUM et al., 2002). A molécula de nitrogênio na estrutura química dos aminobifosfonatos confere maior tempo de vida do fármaco no organismo, tornando seu efeito mais longo e conseqüente conferindo maior potência em relação aos bifosfonatos de primeira geração (figura 7) (BELL; BELL, 2008).

Figura 7 – Estruturas representativas de variações químicas dos compostos bifosfonatos.



Legenda: Em ordem crescente de afinidade aos cristais de hidroxiapatite da superfície óssea e de potencial inibitório de reabsorção óssea pelos osteoclastos: clodronato < etidronato < tiludronato < pamidronato < alendronato < ibandronato < risedronato < zoledronato. Adaptado de RUSSELL et al., 2008.

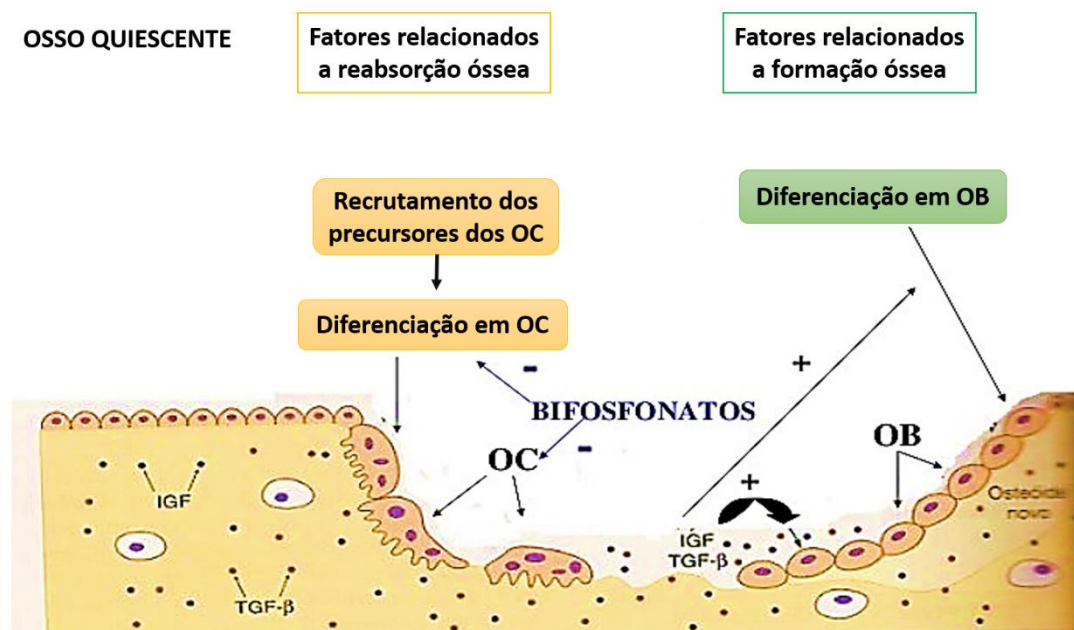
Os bifosfonatos apresentam alta carga e volume molecular, dessa forma sua penetração na membrana celular é limitada, havendo por consequência baixa absorção do fármaco na região intestinal. Apresenta alta afinidade pelo mineral ósseo e a porção que não se liga ao cálcio é excretada inalterada. Sua meia vida é variável de acordo com sua estrutura bioquímica (DANNEMANN et al., 2006).

2.5.4. Mecanismo de ação dos bifosfonatos

De maneira geral os bifosfonatos reduzem a reabsorção óssea inibindo o recrutamento e induzindo a apoptose de osteoclastos. Adicionalmente os bifosfonatos também estimulam a atividade dos osteoblastos, que atuam

através de importantes fatores de crescimento como o TGF- β (Fator de transformação do crescimento beta) e o IGF- I (Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1), além de outros peptídeos que além de atuarem na formação óssea também impedem a apoptose osteoblástica (HILL; ORTH, 1998; SANTINI et al., 2003). Entretanto, os fármacos de primeira e segunda geração apresentam diferentes mecanismos moleculares de ação (figura 8) (TOUSSAINT et al., 2009).

Figura 8. Representação esquemática do mecanismo de ação dos bifosfonatos na matriz óssea.



Legenda: OC = Osteoclastos, OB = Osteoblastos.

Os bifosfonatos de primeira geração inicialmente são internalizados pelos osteoclastos, assim, são metabolizados dentro das células formando análogos citotóxicos de ATP (metileno), que se acumulam no citoplasma dos osteoclastos e inibem as atividades dependentes de ATP, tendo como resultado final deste processo a morte celular programada (apoptose) (IDRIS et al., 2008; ROELOFS et al., 2006).

Os bifosfonatos de segunda geração também são internalizados pelos osteoclastos, entretanto, bloqueiam a via do mevalonato por meio da inibição da enzima farnesil difosfato sintetase, responsável pelo controle da síntese de lipídios isoprenóides, comprometendo o transporte vesicular intracelular, desta forma vias de sinalização impróprias induzem a apoptose da célula. (MERIGO

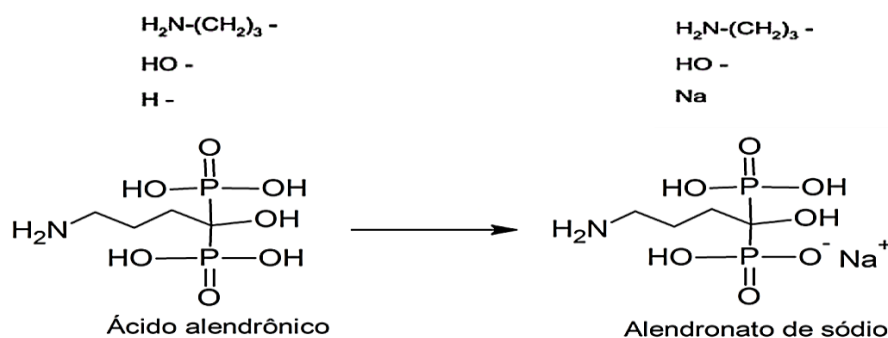
et al., 2006; IDRIS et al., 2008). Ambos mecanismos de ação promovem inibição direta da reabsorção óssea realizada pelos osteoclastos.

2.5.5. Alendronato de sódio

O ALD é um aminobifosfonato que apresenta potente inibição da reabsorção osteoclástica (AZUMA et al., 1995). Começou a ser implementado no tratamento da osteoporose no início da década de 90 em pacientes de alto risco e sendo posteriormente aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) no tratamento da osteoporose pós-menopausa. É o fármaco de primeira escolha também no tratamento da osteoporose em homens e doença de Paget (LASSETER et al., 2005). Entre a classe de bifosfonatos, o ALD destaca-se como um dos mais potentes e seguros (GREY; REID; 2006).

Possui estrutura análoga ao pirofosfato. É primariamente produzido como sal monossódico do ácido alendrônico ($C_4H_{13}NO_7P_2$) e comumente disponibilizado em sua forma sólida tri-hidratada ($C_4H_{12}NNaO_7P_2 \cdot 3H_2O$). Sua composição com dois grupos fosfóricos confere acidez à molécula e um grupo amina confere basicidade (figura 9), assim, o alendronato de sódio apresenta um comportamento anfótero (BUDAVARI et al., 1996).

Figura 9 – Fórmula molecular e estrutural do ácido alendrônico e do alendronato de sódio.



No Brasil o ALD é disponibilizado em comprimidos de alendronato monossódico nas doses de 5, 10, e 70 mg por comprimido, havendo também sua formulação genérica na dose de 70 mg com custo próximo a 1/3 relativo ao fármaco padrão (ANVISA, 2009). O ALD segue sendo o único bifosfonato incluído na lista de medicamentos e insumos de componentes básicos da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) e disponibilizado

pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para o tratamento da osteoporose (BRASIL, 2015).

2.5.5.1. Propriedades farmacológicas do alendronato

A posologia usual do ALD no tratamento da osteoporose é de 10 mg/dia, para pacientes de ambos os gêneros, sendo em alguns casos recomendada a dosagem de 70 mg/semana, sendo ambas as dosagens terapeuticamente equivalentes (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2008).

Seguindo a característica geral dos bifosfonatos, o ALD é também pouco absorvido no trato gastrointestinal, sendo sua absorção ainda mais prejudicada quando realizada concomitantemente com alimentos (BERRUTI et al., 2001). Em contrapartida, devido sua alta afinidade pela matriz óssea, cerca de 50% do fármaco absorvido consegue se fixar na região óssea, e devido sua liberação estar condicionada com o índice de remodelação óssea o ALD apresenta uma taxa de meia vida longa no tecido ósseo, chegando a um prazo de até 10 anos para que haja sua completa eliminação. A porção do fármaco que não é absorvida na matriz óssea é eliminada de forma inalterada pela urina (GANGULI et al., 2002; NEVES et al., 2002).

O tratamento com ALD exige algumas medidas importantes que asseguram a máxima eficácia do medicamento, sendo assim para que o medicamento seja diretamente e rapidamente conduzido ao estômago é importante a ingestão de um copo cheio de água filtrada, diminuindo assim o potencial de irritação na região do esôfago e também fazendo um intervalo de 30 minutos antes das refeições bem como da administração de outro medicamento. Adicionalmente é indicado que o paciente não deite neste período de 30 minutos após a ingestão do ALD (KHAPRA; ROSE, 2006).

A interrupção do tratamento com ALD não determina a suspensão imediata do efeito terapêutico na matriz óssea. Estudos realizados evidenciaram que a interrupção de um tratamento de 3-5 anos mantém a eficácia anti-fratura por pelo menos um a dois anos com a manutenção da força e saúde dos ossos (WATTS et al., 2010).

2.5.5.2. Ulceração gástrica associada ao tratamento crônico com alendronato

Dados extraídos de trabalhos pré-clínicos e clínicos mostram que bifosfonatos que apresentam cadeias laterais amino primárias, como o ALD e o pamidronato possuem alto potencial para indução de lesões gástricas, sendo este o efeito colateral mais comum associado ao tratamento prolongado com bifosfonatos e caracterizando-se sintomaticamente por dor e desconforto na região abdominal (MACONI; BIANCHI, 1995; THOMSON et al., 2002). O mecanismo pelo qual o ALD induz o surgimento de lesões no trato gástrico ainda não é completamente esclarecido.

Estudos propõem que a injúria promovida pelo ALD relaciona-se com a ação direta do fármaco na mucosa gástrica ocasionando um aumento da vulnerabilidade do epitélio a agentes agressores (OHASHI et al., 2009). Essa propriedade de irritação gástrica por ação tóxica do ALD pode ser em parte atribuída a sua capacidade de se associar aos fosfolipídios de membrana e romper a permeabilidade da barreira de muco e bicarbonato que formam a primeira linha de defesa da mucosa gástrica (COSTA et al., 2013).

Também já tem sido demonstrado que o aumento de espécies reativas do oxigênio e a instauração do processo de peroxidação lipídica contribuem para com os processos de injúria do tecido gástrico decorrentes do uso de ALD (SENER et al., 2005). O decurso desta gastropatia também é acompanhado por infiltração neutrofílica e edema subepitelial associado ao aumento de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) (COSTA et al., 2013).

Estudos ainda evidenciam o potencial de inibição da geração de NO pelo ALD (SILVA et al., 2014). O NO possui importante papel na integridade da mucosa do estômago, além de também possuir importante papel na motilidade gástrica através das isoformas nNOS e eNOS. A inibição da ação dessas enzimas pode ocasionar distúrbios no fluxo sanguíneo e na secreção ácida gástrica, propiciando o surgimento de ulcerações pépticas (CORUZZI et al., 2000; SILVA et al., 2014).

Assim, avaliando o alto potencial do ALD na terapêutica de doenças relacionadas com distúrbios osteometabólicos e sua possível relação com lesões gástricas, evidencia-se a necessidade de alternativas terapêuticas que aumentem os benefícios ao paciente, sejam estes por meio da potencialização

dos efeitos benéficos do tratamento, ou pela diminuição dos efeitos adversos ocasionados pelo uso crônico com o medicamento.

2.6. ESTATINAS

2.6.1. Problemática: Doenças relacionadas aos altos níveis de colesterol – LDL no organismo.

Pequenas quantidades de colesterol são necessárias e suficientes para o funcionamento adequado do organismo, fornecendo energia, substratos para síntese hormonal e servindo de suporte estrutural para órgãos e tecidos. Entretanto quando essas taxas se tornam elevadas podem se acumular nas artérias prejudicando o fluxo sanguíneo (CARRAGETA, 2006).

Como o colesterol é relativamente insolúvel em água, formam ligações com proteínas para que possam circular no ambiente plasmático, formando assim lipoproteínas que se diferenciam quanto suas respectivas composições e densidades podendo ser classificadas em HDL (High-density lipoprotein), LDL (Low-density lipoprotein) e VLDL (Very-low-density protein) (GUYTON, 2006). As HDL são conhecidas como “bom colesterol” por transportarem o colesterol para o fígado, onde ocorre a metabolização do mesmo. Já o LDL possui denominação de “mal colesterol” por formarem placas nas artérias, prejudicando o fluxo sanguíneo e aumentando substancialmente os riscos de aterosclerose (KWITEROVICH; 2000).

2.6.2. Aspectos gerais das estatinas

No ano de 1971, Akira Endo em meio a suas pesquisas com antibióticos acidentalmente observou que os fungos com o qual trabalhava eram capazes de sintetizar um potente inibidor da produção de colesterol. Esse composto denominado como mevastatina foi então analisado e isolado, entretanto apresentava alta toxicidade, não podendo ser empregado na prática terapêutica (ENDO; 1976). Mas a partir da mevastatina foi gerada a molécula matriz das estatinas, sendo a lovastatina a primeira a ser lançada no ano de 1987 (ENDO; 1992).

Atualmente as estatinas constituem a classe de medicamentos mais potentes e eficazes na redução dos níveis de LDL (RANG; DALE, 2006). Podem também atuar diminuindo os níveis de triglicerídeos e aumentando os

níveis de HDL no organismo (LINARELLI; POTT, 2008). Sete estatinas são disponibilizadas comercialmente na terapêutica, sendo elas a SIN, artovastatina, fluvastatina, lavastatina, pravastatina, rosuvastatina e pitavastatina, diferenciando-se entre si devido a seus aspectos farmacocinéticos tais como absorção, biodisponibilidade, excreção e solubilidade (GINTER; SIMKO, 2009).

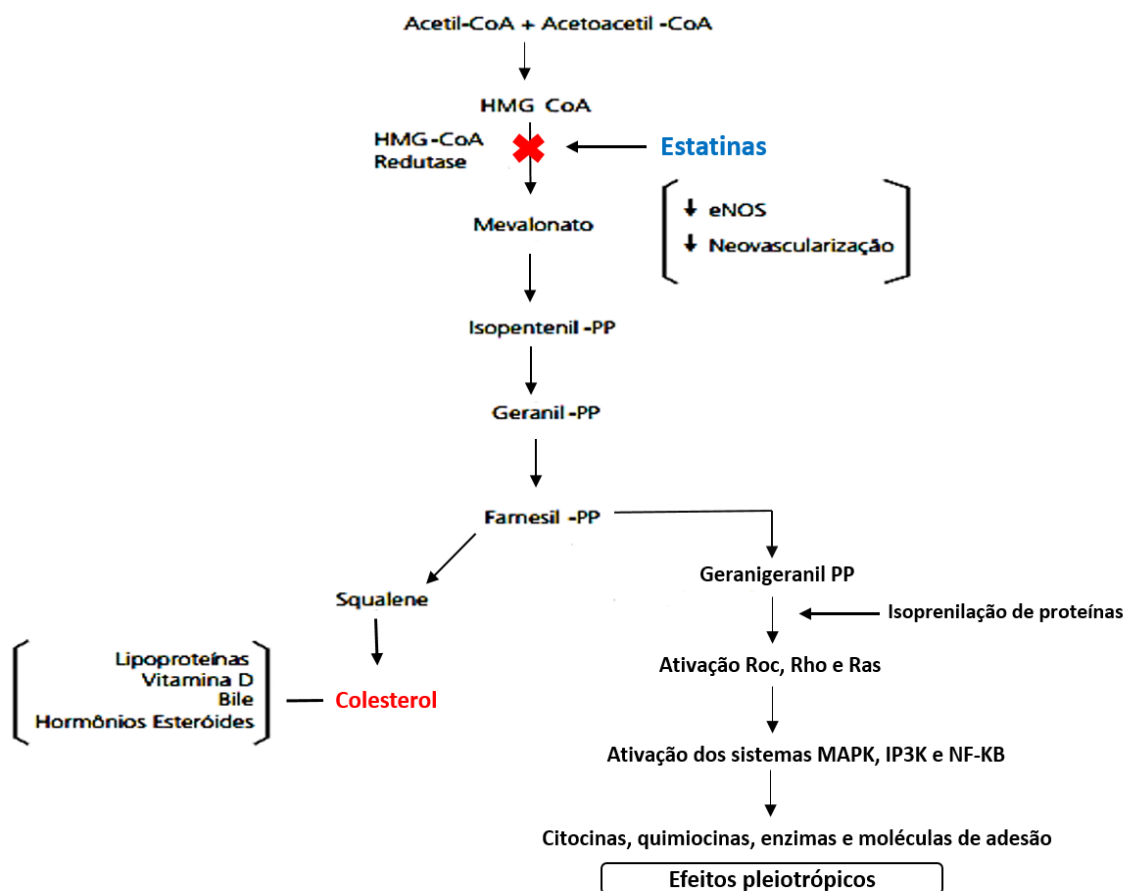
2.6.3. Mecanismo de ação das estatinas

A biossíntese de colesterol no organismo inicia-se a partir da formação de 3hidroxi-3metil-glutaril-Coenzima-A (HMG-CoA) pela associação de três moléculas de acetil-coenzima A. A enzima HMG-CoA redutase realiza a catalisação da conversão de HMG-CoA em mevalonato, etapa importante do processo que terá como produto final o colesterol. Desta forma, a HMG-CoA redutase representa um importante alvo farmacológico de hipolipêmicos (VAN DER MOST et al., 2009).

As estatinas atuam inibindo reversível e competitivamente a HMG-CoA redutase (figura 10), resultando assim em um aumento dos receptores de superfície específicos de LDL que irão se ligar a LDL circulante e aumentar a taxa de depuração das mesmas, diminuindo suas concentrações plasmáticas no organismo e limitando a velocidade de biossíntese de colesterol no fígado (STANCU; SIMA 2001).

Adicionalmente, o efeito das estatinas em inibir a enzima HMG-CoA redutase acaba também interferindo na síntese de isoprenóides que constituem cerca de 2% do total de proteínas celulares (figura 10), envolvidas em várias vias de sinalização que participam de uma série de funções relacionadas a imunomodulação, caracterizando assim os efeitos pleiotrópicos de caráter anti-inflamatório desses fármacos (MIHOS et al., 2011).

Figura 10 – Mecanismo de ação das estatinas na via do mevalonato.



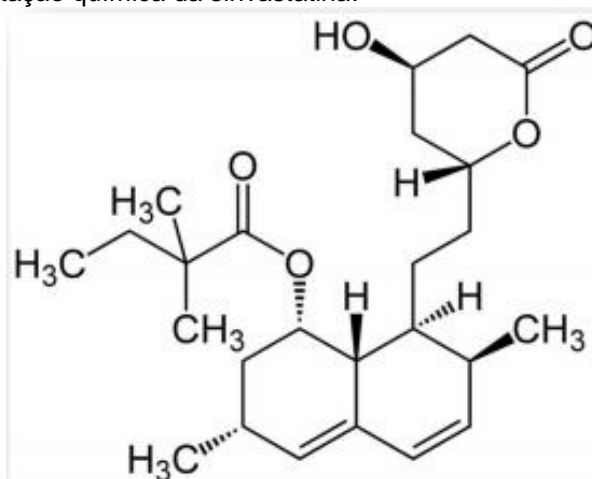
Legenda: Como as estatinas inibem a enzima HMG-CoA redutase, responsável por converter o HMG-CoA em mevalonato, ocorre não somente a redução da produção intracelular de colesterol, como também a produção de isoprenóides. Adaptado de LIAO (2005).

Apesar de todas as estatinas apresentarem de forma geral o mesmo mecanismo de ação, existem diferenças consideráveis entre os componentes dessa classe quanto a eficácia da redução lipídica, seletividade e propriedades físico-químicas (SHITARA; SUGIYAMA, 2006).

2.6.4. Sinvastatina

A SIN (Figura 11) é um fármaco representante da classe das estatinas, prescrita para o tratamento de dislipidemia com objetivo principal de reduzir os níveis de LDL e triglicerídeos no plasma sanguíneo. É um composto derivado da modificação química da lovastatina apresentando forma molecular $C_{25}H_{38}O_5$, com baixa solubilidade em meio aquoso e alta permeabilidade intestinal (AMIDON, 1995).

Figura 11 – Representação química da sinvastatina.



É administrada oralmente como um pró-fármaco em sua forma inativa lactona e hidrolisada no trato gastrointestinal em seu corresponde ativo β hidroxiácido. Sendo metabolizada tanto no fígado quanto no intestino, seus metabolitos são eliminados na secreção biliar ou da corrente sanguínea para o intestino (NEUVONEM et al., 2008; RANG; DALE, 2007). Possui baixa biodisponibilidade, sendo que apenas 5% da sua dose via oral permanece na sua forma livre no plasma e 95% se liga a proteínas plasmáticas, seu mecanismo de transporte está diretamente relacionado as concentrações do fármaco por ocorrer através de difusão passiva na membrana (MIRANDA et al., 2011).

A SIN é o fármaco de primeira escolha para o tratamento de pacientes com hipercolesterolemia primária, sendo também bastante utilizada como método preventivo de doenças cardiovasculares (MAURO; MACDONALD 1991; PEDERSEN; TOBERT; 2004) contempla a lista do RENAME, sendo classificada como hipolipemiante simples e distribuído na forma de comprimido nas doses de 10, 20 e 40 mg (BRASIL, 2014).

2.6.4.1. Ação gastroprotetora e benefícios na remodelação óssea da SIN

Estudos têm apontado efeitos benéficos da SIN relacionados com o potencial de atuar no auxílio do reparo ósseo, apresentando efeitos positivos no tratamento da osteoporose (LUPATTELLI et al., 2004; PARK 2009; PRICE

et al., 2013). Entretanto o mecanismo pelo qual as estatinas atuam no auxílio do reparo ósseo ainda não é bem esclarecido.

Um dos fatores atribuídos a essa ação seria a melhoria da vascularização pela diminuição de placas ateroscleróticas nos vasos, já que o suprimento sanguíneo é um fator importante no processo de neoformação óssea (HORIUCHI; MAEDA, 2006).

Estudos também têm relacionado a ação da SIN na remodelação óssea ao aumento da síntese osteoblástica e inibição da ação osteoclástica, que se daria pelo aumento da atividade da proteína morfogenética óssea (BMP) por meio da antagonização da via TNF- α /RAS-RHO mitogênica ativadora da proteína Kinase que inibe a ação da BMP (MUNDY et al., 1999).

Além dos efeitos benéficos nos ossos a SIN também tem demonstrado potencial efeito gastroprotetor em modelos de lesão induzidos por AINE's, etanol e estresse (TARIQ et al., 2007; HEEBA et al., 2009; MOTTELEB; HASAN 2011). O mecanismo pelo qual as estatinas agem exercendo efeito gastroprotetor também encontra-se pouco elucidado dentro da literatura, entretanto trabalhos tem apontado para a atividade antioxidante, a diminuição da liberação de ácido e o aumento da produção de muco, além também dos efeitos anti-inflamatórios por meio da inibição de citocinas pró-inflamatórias como os principais alvos das estatinas na proteção da mucosa gástrica contra agente lesivos (SHÖNBECK; LIBBY, 2004; TARIQ et al., 2007; HEEBA et al., 2009).

Assim, destacando os potenciais terapêuticos das estatinas ligados aos efeitos benéficos na reparação óssea e na proteção da mucosa gástrica e relacionando-os com as gastropatias induzidas pelo tratamento crônico de doenças osteometabólicas com bifosfonatos, sugere-se um estudo entre o sinergismo de ambas as classes farmacológicas, destacando que ainda não há trabalhos que demonstrem os possíveis efeitos gastroprotetores das estatinas em modelos de lesões gástricas induzida por bifosfonatos, entretanto estudos já demonstram resultados positivos com terapias combinando as propriedades anabolizantes ósseas da SIN e o potencial antirreabsortivo ósseo do ALD (PRICE et al., 2013).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- ✓ Avaliar o efeito protetor da SIN na lesão gástrica induzida por ALD em ratos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar o efeito do pré-tratamento com a SIN na lesão gástrica macroscópica induzida por ALD;
- ✓ Descrever as alterações histopatológicas na mucosa gástrica após a lesão induzida por ALD e o efeito do pré-tratamento com a SIN;
- ✓ Investigar os possíveis mecanismos antioxidantes envolvidos na atividade antiulcerogênica da SIN;
- ✓ Verificar a ação anti-inflamatória da SIN no estômago por meio da dosagem de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL1- β);
- ✓ Avaliar o potencial anti-inflamatório da SIN por meio da atividade da MPO;
- ✓ Determinar a influência da SIN na secreção de muco e ácido gástrico no estômago;

4. METODOLOGIA

4.1. MATERIAIS

A SIN foi adquirida pela Sigma Aldrich (St.Louis , MO , EUA). O ALD foi manipulado a partir da substância pura, alendronato de sódio (Farmafórmula® , Fagron , Brasil). A dissolução do ALD foi feita em DMSO 2% e todas as outras drogas foram dissolvidas em solução salina. Os outros produtos químicos utilizados no presente trabalho foram de grau analítico e obtidos a partir de fornecedores comerciais padrão.

4.2. ANIMAIS

Ratas da linhagem Wistar, pesando entre 100-150 g, foram obtidas do departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram alojados em gaiolas, em ambiente com temperatura controlada (12 h de luz/12 h no escuro). Os mesmos tiveram acesso livre à água e dieta padrão. Os animais foram privados de alimento durante 18 horas antes do início do experimento, continuando sob livre acesso à água. Todos os tratamentos, procedimentos e protocolos experimentais usados nesse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Piauí (Protocolo n ° 0068/14).

4.3. EFEITO DA SIN NO DANO GÁSTRICO INDUZIDO POR ALD

Os animais foram inicialmente pré-tratados com veículo (salina) ou SIN (20 ou 60 mg/Kg) via oral (v.o), protocolo adaptado de HEEBA et al., (2009). Após 1 hora, o ALD (50 mg/Kg) foi administrado também oralmente, seguindo protocolo adaptado de SILVA et al., (2014). O grupo controle recebeu apenas salina. A SIN foi administrada uma vez ao dia, durante sete dias e a partir do 4º dia o ALD começou a ser administrado 30 min. após a administração da SIN, durante 4 dias. No último dia de tratamento, 4 horas após a administração do ALD, os animais foram eutanaziados e seus estômagos removidos. O dano gástrico foi mensurado utilizando um programa planimétrico computacional (Image J® Software), as amostras retiradas do estômago foram imediatamente fixadas em formalina 10% para subseqüentes análises histopatológicas. Outras amostras foram estocadas e congeladas sob

-80° C, para posteriores análises dos níveis de GSH (SEDLAK; LINDSAY, 1968), MDA (MIHARA; UCHIYAMA, 1978), MPO (BRADLEY et al., 1982) e níveis de citocinas (CUNHA et al., 1993).

4.4. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Para avaliação histológica, as amostras de estômago foram fixadas em solução de formalina 10% e mantidas durante 24 horas. Após a fixação, as amostras foram transferidas para uma solução de álcool 70%. O material foi, em seguida, embebido em parafina e seccionado. Secções de 4 mm de espessura foram desparafinizadas, corados com hematoxilina e eosina (H&E) e, em seguida analisada sob um microscópio de luz por um patologista experiente, sem conhecimento dos tratamentos previamente descritos. As amostras foram avaliadas de acordo com os critérios descritos (LAINE; WEINSTEIN, 1988). As amostras foram avaliadas de acordo com os seguintes parâmetros: perda de células epiteliais (score 0-3), edema na mucosa superior (score 0-4), danos hemorrágicos (scores 0-4) e presença de células inflamatórias (score 0-3), resultando em um score total máximo de 14.

4.5. ANÁLISES DAS CONCENTRAÇÕES DE GSH

A concentração de GSH em amostras de tecidos do estômago foi analisada de acordo com o método descrito por SEDLAK; LINDSAY (1968). Para determinação dos níveis de grupos sulfidrílicos não-protéicos, amostras entre 50 - 100 mg da mucosa gástrica dos animais foi homogeneizada na concentração de 1ml de EDTA 0.02M para cada 100mg de tecido. Alíquotas de 400µL do homogenato foram misturadas em 320µL de água destilada e 80µL de ácido tricloroacético (TCA) 50% para que ocorresse a precipitação de proteínas. Os tubos com o material foram centrifugados por 15 minutos a 3.000 rpm/4°C. Em seguida, 400µL do sobrenadante foi adicionado a 800µL de tampão Tris 0,4M (pH 8.9) e 20µL de ácido ditio-nitrobenzoico DTNB (reagente de Ellman) 0,01M. A mistura foi então agitada por 3 minutos e a absorbância e foi lida a 412nm em espectrofotômetro. As concentrações de grupos sulfidrílicos não-protéicos foram expressas em µg/g de tecido.

4.6. CONCENTRAÇÃO DOS NÍVEIS DE MDA

Os níveis de MDA foram determinados pelo método de MIHARA; UCHIYAMA (1978), baseado na reação com o ácido tiobarbitúrico. Amostras do estômago foram homogeneizadas com KCl gelado 1,15% para preparar 10% de homogenato. 0.5ml desse homogenato foi pipetado dentro de um tubo de centrifuga de 10 ml com 3ml de ácido fosfórico (H₃PO₄) (1%) e 1ml de uma solução aquosa de ácido tiobarbitúrico aquoso (0.6%). Os tubos foram aquecidos por 45 minutos em um banho de água fervendo e a mistura reacional foi então resfriada em um banho de água gelada, seguida da adição de 4ml de n-butanol. Os conteúdos foram misturados por 40 segundos com um misturador "vortex", centrifugados a 1200 x g por 10 minutos e a absorbância da camada orgânica foi mensurada em 520 e 535nm no espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em mmol/g de tecido.

4.7. ATIVIDADE DA MPO

A atividade da mieloperoxidase (MPO) foi medida de acordo com o método previamente descrito por BRADLEY et al., (1982). Amostras de tecido do estômago foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 6,0), com brometo de hexa-decil-trimetil-amonio (HTAB) 0,5%, na proporção de 1 ml/100 mg de tecido. O homogenato foi então centrifugado a 4500 rpm durante 20 min a 4° C. O sobrenadante então foi misturado com dihidrocloridrato de o-dionisidina e 1 % de peróxido de hidrogênio para que houvesse uma reação. A atividade de MPO na reação foi analisada através da medição da absorbância a 450 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram então expressos como unidade de MPO por mg de tecido (UMPO/mg de tecido). A unidade da atividade de MPO foi definida pela conversão de 1 μmol de H₂O₂ em água em 1 min a 22 ° C.

4.8. MENSURAÇÃO DE CITOCINAS

Os níveis de TNF-α e IL-1β foram determinados utilizando ensaio de imunabsorbância ligado a enzima (ELISA), como previamente descrito por CUNHA et al., (1993). Uma placa de microtitulação foi incubada a 4° C durante toda a noite com um anticorpo policlonal para TNF-α ou IL- 1β (4 μg/ml) DuoSet

ELISA Development kit R&D Systems. Os locais de ligação adicionais na superfície da placa foram bloqueados por incubação dos poços com PBS contendo albumina de soro bovino (BSA) a 2% durante 90 min a 37 ° C. Em seguida, as amostras de teste e cada amostra padrão foram adicionadas em várias diluições, postas em duplicata e incubadas a 4 ° C durante 24 h. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com tampão (0,01 M de fosfato, 0,05 M de NaCl, 0,1% de Tween 20, pH 7,2). Após a lavagem das placas, foi adicionado 50 µL de biotilado policlonal de ovelha anti TNF- α , ou anti IL-1 β (diluição de 1:1000 em tampão de ensaio contendo 1% de BSA. Foi feita então outra incubação à temperatura ambiente durante 1 h. Logo depois as placas foram lavadas e 50 µl de peroxidase adivinda de conjugado de rábano silvestre na proporção de 1: 5000 foi adicionado a todos os poços, após 15 min. as placas foram lavadas e o reagente de cor o-fenileno-diamina (40 µg/poço) foi adicionado. Depois de 15 min em um ambiente escuro com temperatura de 37 ° C, a reação da enzima foi interrompida com H₂SO₄ (1 M) e a absorbância foi lida a 490 nm. Os resultados de ELISA foram expressos como pictogramas de cada citocina por mililitro (pg/ml).

4.9. DETERMINAÇÃO DE MUCO GÁSTRICO

Amostras de tecido gástrico foram coletadas e transferidas para solução de alcian blue 1% (0,16 M de sacarose em 0,05 M acetato de sódio, pH 5,8). O excesso do corante no tecido foi removido com lavagem em uma solução de 0,25 M de sacarose. O complexo muco - corante foi então extraído, colocando o tecido em 0,5 M de MgCl₂ durante 2 horas. O extrato do corante foi misturado com éter dietílico, centrifugado a 1.400g durante 10 min e a absorbância foi medida a 598 nm. A quantidade de alcian blue extraída (µg/g de tecido) foi então calculada utilizando uma curva padrão (CORNE et al., 1974).

4.10. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTISECRETORA

Para a avaliação da atividade secretora, inicialmente os animais foram igualmente divididos em 5 grupos (n=5). Após 24 horas de jejum, os animais foram anestesiados utilizando quetamina (50 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg), em seguida foi realizada uma incisão na região abdominal, o estômago foi exposto

e então realizada a ligação do piloro. Imediatamente depois os animais receberam os tratamentos por via intraduodenal de acordo com os seguintes grupos: solução salina (0,5 ml/kg); alendronato (50 mg/kg); SIN (60 mg/kg) + ALD 50 mg/kg); histamina (5 mg/kg); e ranitidina (5 mg/kg). Após as administrações os abdômens foram suturados. Foram mantidas quatro horas de observação e monitoramento contínuo seguido da eutanásia dos animais utilizando uma dose letal da combinação de anestésicos (quetamina e xilazina). Os estômagos então foram removidos e abertos e o conteúdo gástrico recolhido. O volume final e o pH foram determinados imediatamente após a lavagem da mucosa do estômago com 2 ml de água destilada. A acidez total do suco gástrico foi titulada com NaOH 0,01N, utilizando 2% de fenolftaleína como indicador (SHAY, 1945).

4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

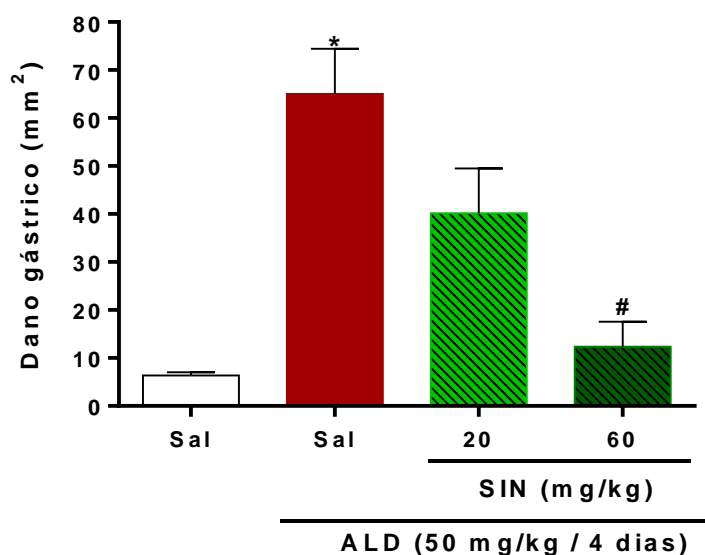
Todos os valores foram expressos como média \pm S.E.M. As análises foram determinadas através do teste de análise de variância (ANOVA) e teste de Student-Newman-Keuls para determinar significância estatística das diferenças entre os grupos. Para a avaliação histológica, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. EFEITO DA SINVASTATINA NO DANO GÁSTRICO INDUZIDO POR ALENDRONATO

Neste estudo, nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento com SIN (60 mg/kg) administrada oralmente, preveniu os danos gástricos macroscópicos induzidos por ALD (Figura 12). Além disso, observou-se os danos ocasionados por ALD tanto na região do antro como no corpo do estômago, sendo estes danos principalmente na superfície epitelial. A exposição crônica da mucosa gástrica de ratos ao ALD produziu danos generalizados tanto no epitélio quanto na superfície luminal, sendo estes, recobertos por restos celulares (Figura 13C).

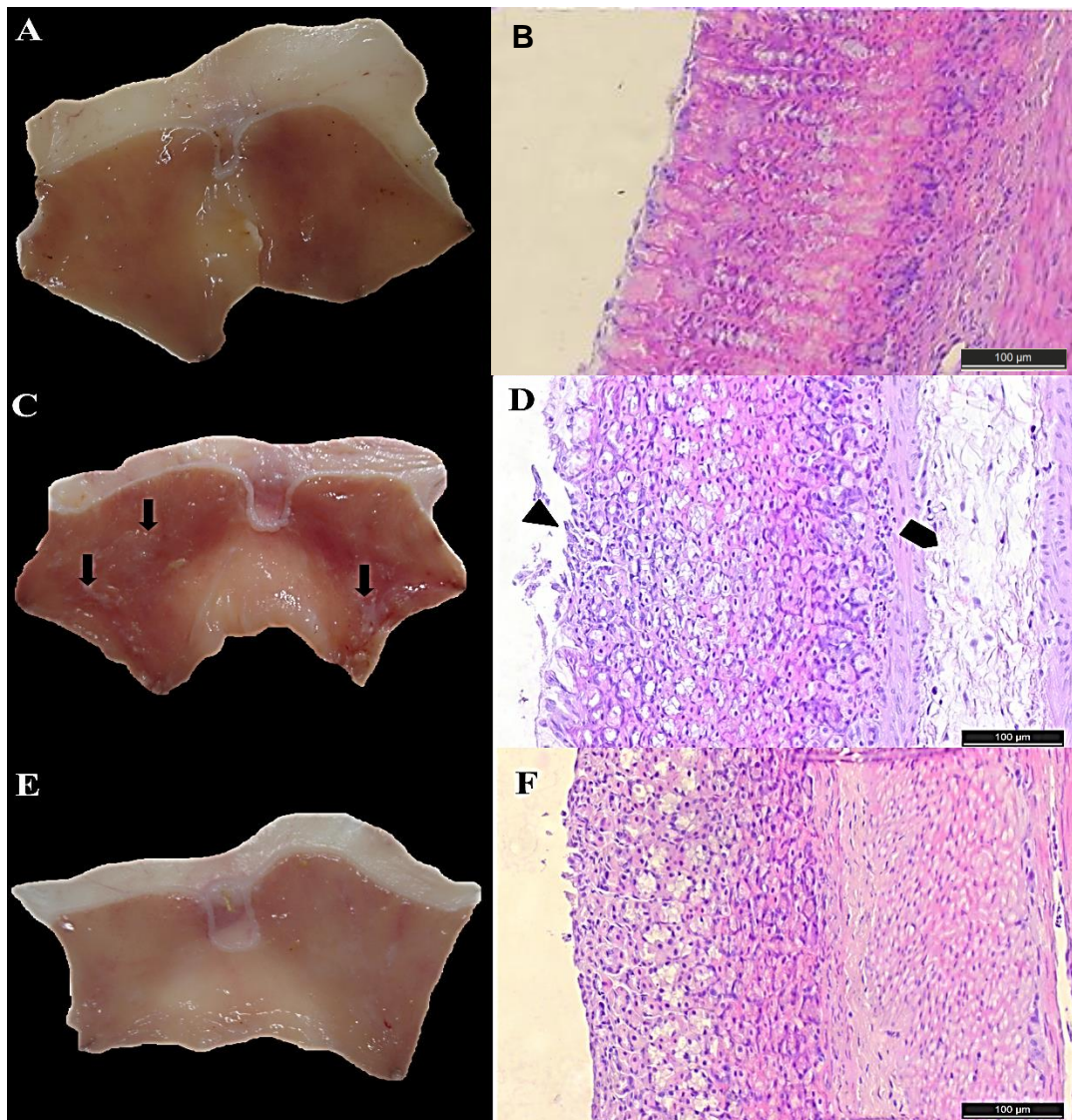
Figura 12 – Efeito do pré-tratamento com SIN no dano gástrico induzido por ALD.



Legenda: Após 4 dias de administração com ALD foi observado intensos danos na mucosa gástrica dos animais. O tratamento com SIN (60mg/kg v.o) durante 7 dias mostrou significativa ($^{\#}p < 0.05$) melhora nos danos gástricos macroscópicos. As lesões gástricas macroscópicas foram determinadas 4 h após a administração de ALD no quarto dia. Os dados são expressos \pm S.E.M com 5-6 ratos por grupo. *P < 0.05 vs. grupo salina, $^{\#}P < 0.05$ vs. grupo alendronato, testes de one-way ANOVA e Newman-Keuls.

Os resultados da análise microscópica indicaram que a administração de ALD induziu alterações na região gástrica caracterizadas por hemorragia intensa, edema, perda de células epiteliais e células inflamatórias (Figura 13C, D; Tabela 1). Entretanto, nas ratas pré-tratadas com SIN observou-se significativa diminuição dessas alterações tanto a níveis macro quanto microscópicos (Figura 13E, F; Tabela 1).

Figura 13 – Alterações macroscópicas e histopatológicas na mucosa gástrica (aumento: 20X).



Legenda: (A – B) Grupo controle salina, evidenciando a integridade da mucosa gástrica. (C) ALD (50 mg/kg v.o), evidencia-se danos generalizados no epitélio e superfície luminal recoberta por detritos celulares (indicados pelas setas). (D) A análise microscópica indica que a administração com ALD na superfície da região glandular gástrica levou a perda de células epiteliais (indicada pelas setas) e edema (indicado pelo pentágono). (E – F) o tratamento com SIN (60mg/kg v.o) mostrou redução das lesões macro e microscópicas induzidas pelo ALD.

Tabela 1 – Microscopia do efeito protetor da SIN em danos gástricos induzidos por ALD.

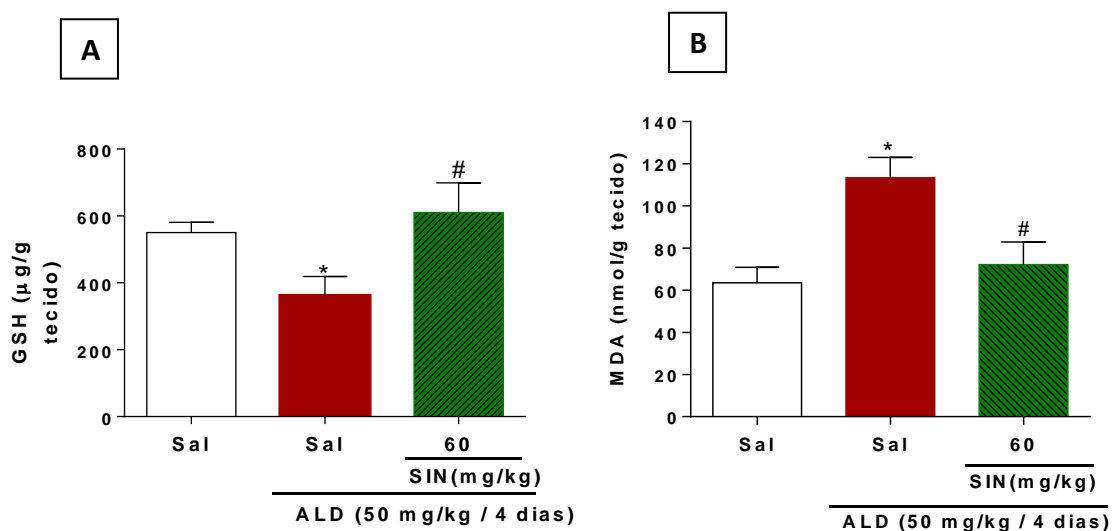
Grupo experiment.	Dano Hemorrágico (escore 0–4)	Edema (escore 0–4)	Perda de células epiteliais (escore 0–3)	Células inflamatórias (escore 0–3)	Total (escore 0–14)
Salina	0	0	0 (0-1)	0	0 (0-1)
ALD	3 (2-4) [*]	2 (0-3) [*]	2 (0-3) [*]	2 (0-2) [*]	7 (2-12) [*]
SIN + ALD	1 (0-2) [#]	0 (0-1) [#]	1 (0-2) [#]	0 (0-1) [#]	3 (0-6) [#]

Os dados apresentados são medianas com os scores mínimos e máximos indicados entre parênteses. Teste não paramétrico de Kruskal - Wallis, seguido do teste de Dunn foram usados para as comparações múltiplas na avaliação histológica. * P < 0,05 quando comparado com o grupo controle, [#]P < 0,05 quando comparado com o grupo ALD.

5.2. NÍVEIS DE GSH E MDA

O tratamento com ALD diminuiu significativamente as concentrações de GSH ($361,3 \pm 57,82 \mu\text{g/g}$ de tecido) com um concomitante aumento dos níveis de MDA no tecido gástrico dos ratos ($113,3 \pm 9,66 \text{ nmol/g}$ de tecido) quando comparado aos animais do grupo controle que receberam tratamento com salina (* $P < 0,05$), como mostrado na figura 14. O pré-tratamento com a SIN aumentou significativamente os níveis de GSH endógeno ($610,0 \pm 88,49 \mu\text{g/g}$ de tecido) inibindo os efeitos oxidantes ocasionados pelo ALD ($\#P < 0,05$) e reduzindo também de forma significativa a concentração de MDA ($\#P < 0,05$). O pré-tratamento apenas com SIN não apresentou alterações significante nos níveis de GSH E MDA quando comparado com o grupo salina.

Figura 14 – Efeito da SIN na concentração de GSH e nos níveis de MDA, em ratos com lesões gástricas induzidas por ALD.

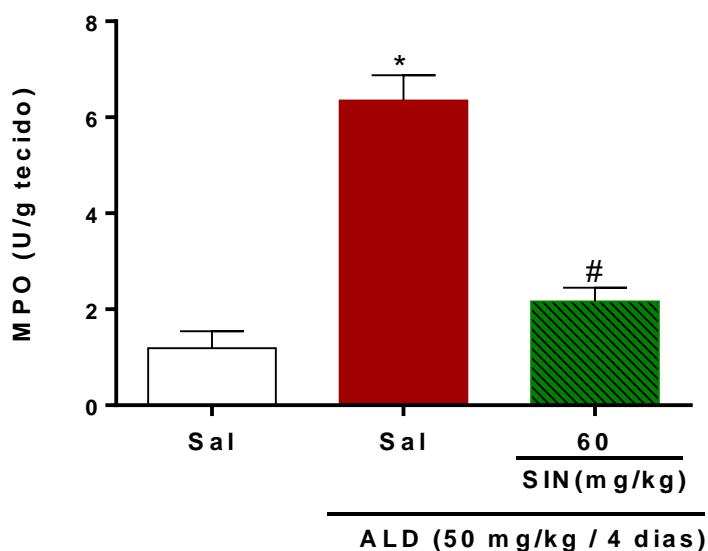


Legenda: A. Administração de ALD promoveu uma diminuição nas concentrações de GSH na mucosa gástrica, este efeito foi revertido significativamente ($\#P < 0,05$) quando os animais foram pré-tratados com SIN. B. O ALD promoveu um aumento nos níveis de MDA no tecido gástrico, no entanto, SIN preveniu significativamente ($\#P < 0,05$) este efeito. Os resultados são expressos com média \pm S.E.M. $n=5-6$ ratos por grupo. * $P < 0,05$ quando comparado com controle salina. $\#P < 0,05$ quando comparado com o grupo ALD. Análise de variância e teste de Newman-Keuls foram utilizados para a avaliação.

5.3. ATIVIDADE DA MPO NA INJURIA GÁSTRICA INDUZIDA POR ALD

A partir dos nossos dados observamos que a atividade da MPO no grupo controle salina é de $1,2 \pm 0,35$ U/mg de tecido, já nos grupos que receberam tratamento com ALD os níveis de MPO aumentaram significativamente ($6,3 \pm 0,52$ U/mg de tecido) em relação ao grupo salina (* $P < 0,05$). Entretanto os grupos que receberam tratamento com SIN exibiram significativa diminuição nos níveis da atividade de MPO ($2,1 \pm 0,28$ U/mg de tecido) em comparação com o grupo tratado com ALD (# $P < 0,05$). Estes dados demonstram que a SIN pode reduzir a infiltração neutrofílica nas lesões gástricas ocasionadas por ALD (Figura 15).

Figura 15. Ação da SIN na atividade da MPO na injuria gastrica induzida por ALD

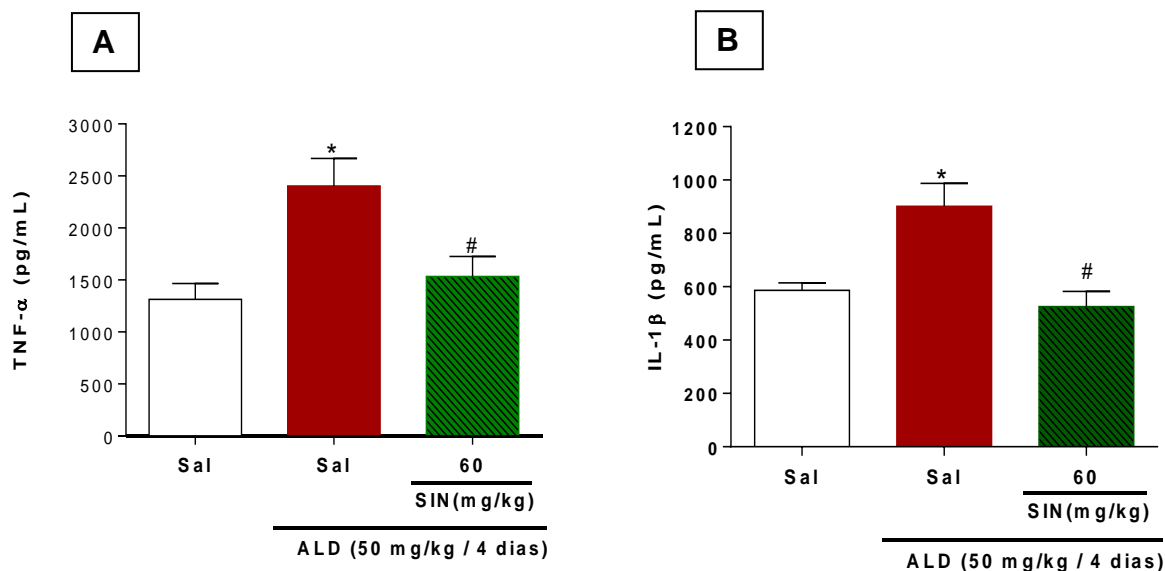


Legenda: O grupo controle foi tratado apenas com salina. O tratamento com SIN causou redução na atividade da MPO gerado pela ação do ALD. Os resultados são expressos com média \pm S.E.M. $n=5-6$ ratos por grupo. * $P < 0,05$ quando comparado com controle salina. # $P < 0,05$ quando comparado com o grupo ALD. Análise de variância e teste de Newman-Keuls foram utilizados para a avaliação.

5.4. NÍVEIS DE CITOCINAS (TNF- α E IL-1 β) DURANTE A INJURIA GÁSTRICA OCASIONADA POR ALD

No grupo salina os níveis de TNF- α e IL-1 β foram de 1313.0 ± 154.61 e 586.6 ± 28.08 pg/ml, respectivamente. A mensuração dos níveis dessas citocinas no grupo que recebeu apenas ALD foi de 2405.0 ± 264.02 e 901.1 ± 86.73 pg/ml, respectivamente, este resultado é significativamente mais alto quando comparado ao grupo salina (* $P < 0.05$). O grupo tratado com SIN claramente demonstrou significativa redução nos níveis de ambas as citocinas com valores de 1535.0 ± 192.61 para TNF- α e 525.7 ± 56.82 para IL-1 β ($\#P < 0.05$). Estes resultados demonstram que a SIN reduz os níveis de citocinas do tipo IL-1 β e TNF- α em danos gástricos ocasionados por ALD (Figura 16).

Figura 16. Efeitos da SIN na redução dos níveis de citocinas TNF- α e IL-1 β em ratos com danos gástricos induzidos por ALD.

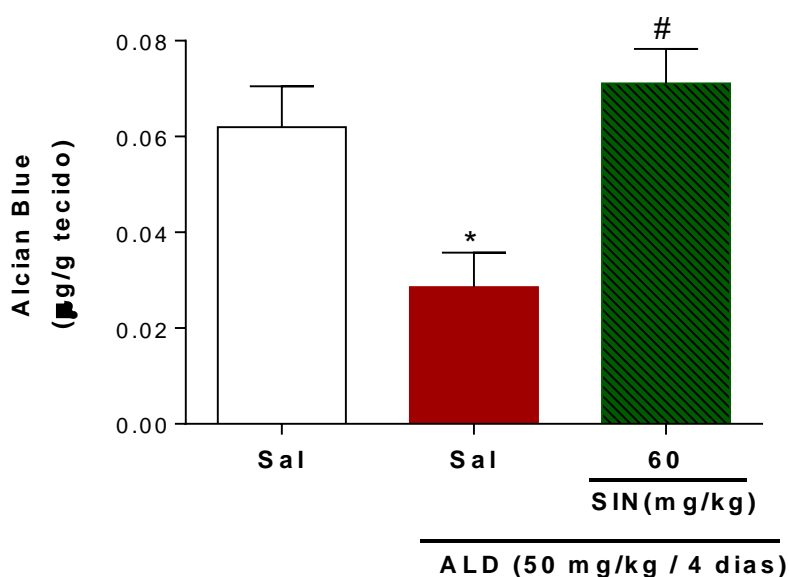


Legenda: O tratamento com SIN diminuiu significativamente ($P < 0,05$) os níveis de TNF- α e IL-1 β (A e B, respectivamente). O grupo controle foi tratado apenas com salina. Os resultados são expressos com média \pm S.E.M. $n=5-6$ ratos por grupo. * $P < 0,05$ quando comparado com controle salina. # $P < 0,05$ quando comparado com o grupo ALD. Análise de variância e teste de Newman-Keuls foram utilizados para a avaliação.

5.5. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO DA SIN PELA DA DETERMINAÇÃO DE MUÇO GÁSTRICO E SECREÇÃO ÁCIDA GÁSTRICA NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ALD.

A injúria ocasionada por ALD diminuiu significativamente a quantidade de muco aderido na mucosa gástrica quando comparado ao grupo salina. O pré-tratamento com SIN reverteu o efeito do ALD. Assim, evidencia-se que a SIN significativamente afeta os níveis de muco aderente no estômago quando comparado ao grupo tratado com ALD (Figura 17).

Figura 17 – Efeito do pré-tratamento com SIN na gastroproteção através da quantificação de muco no estomago com lesões induzidas pelo ALD.



Legenda: Os resultados são expressos com média \pm S.E.M. com $n=5-7$ ratos por grupo. * $P < 0,05$ quando comparado com controle salina. # $P < 0,05$ quando comparado com o grupo alendronato. Análise de variância e teste de Newman-Keuls foram utilizados para a avaliação.

A tabela 2 mostra a mensuração do conteúdo gástrico após a ligadura do piloro. O ALD significativamente aumentou os níveis de secreção ácida gástrica (764.0 ± 41.63), quando comparado ao grupo controle salina (449.1 ± 32.55) (* $P < 0.05$). No grupo pré-tratado com SIN os níveis de secreção gástrica diminuíram consideravelmente (512.2 ± 28.71) (# $P < 0.05$) quando comparado com o grupo em que foi administrado somente ALD, demonstrando assim a ação antissecretora da SIN. O pH da secreção gástrica também foi analisado, entretanto não foi observada nenhuma alteração significativa entre os grupos. Adicionalmente, o total dos níveis de ácido do grupo em que foi administrado apenas ALD, aumentou significativamente comparado ao grupo controle ($9.2 \pm$

0.60, 6.1 ± 0.50 , respectivamente) (*P < 0.05). No grupo pré-tratado com SIN o total da acidez gástrica foi significativamente reduzido (5.9 ± 0.51) quando comparado com o grupo que recebeu somente ALD (#P < 0.05).

Tabela 2 – Efeito do pré-tratamento com SIN sobre a secreção ácida gástrica.

Grupo experimental (n=5)	Volume (μ l)	pH	Acidez Total (mEq[H ⁺]/l/4 h)
Salina	449 ± 32.5	1.5 ± 0.3	6.1 ± 0.5
ALD	$764 \pm 41.6^*$	1.1 ± 0.5	$9.2 \pm 0.6^*$
SIN + ALD	$512 \pm 28.7^\#$	1.2 ± 0.3	$5.9 \pm 0.5^\#$
Histamina	$988 \pm 61.3^*$	1.2 ± 0.3	$12 \pm 0.8^*$
Ranitidina	$261 \pm 22.5^*$	2.6 ± 0.9	$2.1 \pm 0.3^*$

Parâmetros de mensuração para o conteúdo gástrico após o teste de ligadura do piloro.

Os resultados são expressos com média \pm S.E.M. com n=5-7 ratos por grupo.

*P < 0,05 quando comparado com controle salina.

^\#P < 0,05 quando comparado com o grupo ALD.

6. DISCUSSÃO

A osteoporose é um distúrbio osteometabólico determinada principalmente pela desmineralização óssea. Entre suas principais manifestações estão as fraturas de vertebrae, fêmur e antebraço. Esta patologia além de prejuízos físicos também acarreta em impactos financeiros e psicossociais nos mais variados âmbitos de vida do indivíduo (LINDSAY R. et al., 2001).

Atualmente os bifosfonatos têm sido a classe de drogas selecionada de forma primária para o tratamento da osteoporose, devido aos seus efeitos de inibição tanto da absorção osteoclástica quanto da mineralização óssea (FISHER et al., 2010). O ALD é um aminobifosfonato de segunda geração e seu uso no tratamento da osteoporose traz significantes resultados na inibição da progressão da doença (HADDAD et al., 2015). Entretanto, o tratamento crônico com este fármaco tem sido associado a danos ulcerativos no trato gastrointestinal, sendo um fator limitante no tratamento da osteoporose (GRAHAM; MALATY, 1999; SILVA et al., 2014).

As estatinas constituem a classe de medicamentos mais potente na redução dos níveis de LDL-C (SPOSITO et al., 2007) e adicionalmente, estudos prévios têm estabelecido os benefícios das estatinas nos ossos (JADHAV; JAIN, 2006; TSARTSALIS et al., 2012). Atualmente esta classe medicamentosa tem sido descrita como ideal para compor a família das drogas utilizadas no tratamento contra a osteoporose devido a seus potenciais tanto anabólicos quanto antirreabsortivos ósseos (UZZAN et al., 2007). Estudos também apontam os benéficos efeitos da SIN na proteção gástrica (HEEBA et al., 2009). Entretanto, os efeitos protetores das estatinas na toxicidade gastrointestinal associada ao uso de bifosfonatos ainda não foi esclarecida. Assim, no presente estudo, o efeito da SIN foi estudado na injúria gástrica induzida por ALD em ratas.

Nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento com SIN reduz significativamente a gastropatia induzida por ALD, sendo consistente com outros estudos que reportam que a administração oral de SIN atenua lesões gástricas induzidas por etanol e AINE's (TARIQ et al., 2007; HEEBA et al., 2009). Em conjunto esses resultados destacam o importante papel das

estatinas na proteção gástrica. Entretanto os mecanismos envolvidos no efeito gastroprotetor da SIN ainda não foram completamente elucidados.

De acordo com a análise dos dados pode-se confirmar que a administração de ALD em altas concentrações causam graves danos gástricos macroscópicos, tanto no corpo quanto na região antral do estômago, sendo estes danos mais evidentemente encontrados na superfície epitelial do estômago, esta injúria é caracterizada por danos generalizados no epitélio com a superfície recoberta por restos celulares, desenvolvendo-se posteriormente para ulcerações revestidas por uma “capa esbranquiçada”. Administrações orais crônicas de ALD também podem ocasionar lesões hemorrágicas na mucosa estomacal. Estes dados podem ser apoiados com base em análises histopatológicas que revelam aspectos de edema, aumento no número de células inflamatórias e perda de células epiteliais (SILVA et al., 2014; COSTA et al., 2013; NICOLAU et al., 2013).

O mecanismo pelo qual o ALD e outros bifosfonatos causam injúria na mucosa gástrica ainda não tem sido bem esclarecido. Entretanto, sabe-se que danos na mucosa induzidos por ALD ocasionam a acumulação neutrofílica e edema na região sub-epitelial da mucosa e estes eventos têm sido descritos com importante papel no desenvolvimento das ulcerações (COSTA et al., 2013). De fato, a “capa esbranquiçada” que recobre a mucosa danificada é composta principalmente de células inflamatórias e substâncias do tipo fibrina (OHASHI et al., 2009). A infiltração neutrofílica na região gástrica é uma consequência da ativação do sistema imunológico inato, sendo estas as primeiras células a chegarem ao local da inflamação (BAYIR et al., 2006). No interior dos lisossomos das células neutrofílicas encontra-se a enzima MPO e através de estímulos de injúria no tecido essas células sofrem desgranulação liberando assim esta enzima no citoplasma. Desta forma, a MPO pode ser utilizada como importante marcador da infiltração neutrofílica tecidual (KRAWISZ et al., 1984).

Em nosso trabalho através do ensaio de MPO demonstramos que a SIN diminui os níveis da enzima induzida por ALD, sugerindo assim que o efeito gastroprotetor da SIN pode depender da sua capacidade de inibir a infiltração neutrofílica no local da injúria. Nossos dados então corroboram com

o resultado descrito por MATLOUB et al., (2012) que também demonstrou a redução da resposta neutrofílica mediante administração oral de SIN em modelo de lesão gástrica induzida por AINE's.

Durante a instauração do processo inflamatório a resposta fisiológica relaciona-se com a liberação de uma gama de mediadores pró-inflamatórios advindos de uma cascata de eventos mediados por células inflamatórias, incluindo mastócitos e neutrófilos. Em meio a esses mediadores as citocinas surgem na região da mucosa gástrica regulando a resposta imune e desempenhando importante papel em sua defesa, sendo o TNF- α e a IL1- β importantes na instauração da inflamação e acompanhados pela infiltração neutrofílica na injúria gástrica (KONTUREK et al., 2000; KAUR et al., 2014)

Nossos resultados mostraram que a administração de SIN reduz os níveis de TNF- α e IL1- β . De fato, vários estudos já têm mostrado que os bifosfonatos interferem na migração celular nos sítios de inflamação e que este efeito protetor pode ser associado com a diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e as IL1- β e IL- 6 (SILVA et al., 2014; THIEABAND et al., 1997; YAMAGUCHI et al., 2000). De forma similar, estudos têm reportado que os efeitos anti-inflamatórios das estatinas possuem efeito inibidor em mediadores inflamatórios como as interleucinas, interferon- γ , citocinas e ciclooxigenase do tipo 2 (WEITZ-SCHMIDT et al., 2002; SHÖNBECK; LIBBY, 2004). Múltiplas linhas também evidenciam que a SIN pode influenciar a expressão de moléculas de adesão celular vascular I (VCAM-I) e CD-14 (induz a infiltração de células mononucleares), resultando em benefícios durante os processos inflamatórios.

As espécies reativas do oxigênio possuem um papel vital na indução dos danos gástricos através de uma grande diversidade de agentes (VAANANENN et al., 1991; YOSHIKAWA et al., 1993). Têm-se também descrito que a peroxidação lipídica mediada por EROS tem tido um importante papel em lesões gástricas induzidas por indometacina, sendo este fato comprovado por meio de resultados que mostram que a indometacina aumenta a peroxidação lipídica e diminui os níveis de GSH. Este efeito pode ser induzido tanto por erosões gástricas quanto por apoptose mediada por fragmentação no DNA (YOSHIKAWA et al., 1993; CHATTOPADHYAY et al., 2006). Também se tem sugerido que oxigênios derivados de radicais livres podem contribuir para

lesões na mucosa gástrica induzidas por ALD (SILVA et al., 2014; SENER et al., 2004; SENER et al., 2005). Entretanto o mecanismo pelo qual o ALD gera os ERO's ainda não é bem elucidado. Na realidade, neutrófilos migrantes e ativos induzidos por ALD são uma potencial fonte de metabólitos do oxigênio que podem contribuir para o surgimento de injúrias na mucosa gástricas. Além disso, o ALD também aumenta os níveis de TNF- α que também participa aumentando a infiltração neutrofílica que como já colocado contribui para a geração de EROS (WALLACE et al., 1990). Outros autores têm relatado que a gravidade de lesões gástricas induzidas pelo ALD foi reduzida pelo tratamento com alopurinol, sugerindo assim o envolvimento da produção de oxirradicais nesta patogênese (OHASHI et al., 2008). Assim, evidencia-se que a resposta ulcerogênica no antro está relacionada com a disfunção de mecanismos anti-oxidantes.

Estas observações são consistentes com nossos resultados, mostrando que o ALD diminui os níveis de GSH e aumenta os níveis de MDA e mostrando também a reversão desses efeitos pela administração de SIN. Este aumento na peroxidação lipídica pode ser devido, em parte, pela geração de radicais livres advindos de neutrófilos e pelo efeito tóxico direto do ALD na superfície da mucosa.

Já tem sido bem estabelecido a importância da GSH para a proteção gástrica contra agentes lesivos (SZABO et al., 1981). Substâncias contendo radicais sulfídricos protegem a mucosa gástrica de forma similar as prostaglandinas. Um exemplo pode ser dado pelos bloqueadores de grupos sulfídricos tais como dietilmaleato e iodoacetamida que revertem o efeito gastroprotetor da PGF 2α . Assim, o aumento nos níveis de GSH relacionam-se com a redução da lesão gástrica induzida por etanol, sendo por meio de inativação de ERO's e/ou produtos da peroxidação lipídica (SZABO et al., 1981; SZABO et al., 1992). Desta forma, é possível que a SIN diminua o estado redox da gastropatia induzida por ALD, podendo este ser um dos mecanismos pelo qual a mesma exerça seu efeito protetor gástrico, ou seja, através da redução da peroxidação lipídica induzida por ALD na mucosa.

O muco é um componente de suma importância na linha de defesa da mucosa gástrica. O mesmo é constituído essencialmente de água e glicoproteínas, aderido na superfície do trato gástrico e possuindo aspecto

viscoso e elástico (LAINE et al., 2008). Sua composição glicoproteica fornece subsídios para o sequestro de radicais livres na região. Além disso, essa barreira física de muco tem papel essencial contra danos mecânicos no epitélio gástrico pois além de proteger a região contra o ácido gástrico e outros agentes lesivos, também fornece um microambiente quando a área se encontra já lesionada, permitindo uma rápida reestruturação da mesma (WALLACE, 2001; WALLACE, 2008). A avaliação da proteção gástrica mediada pelo muco é realizada através da quantificação de sua ligação ao Alcian Blue, um corante que apresenta especificidade para mucinas ácidas (CORNE et al., 1974).

Os danos no estômago induzidos por bifosfonatos também é acompanhada pela ruptura da barreira na mucosa, levando a um retorno da difusão de prótons de hidrogênio na região (KANATSU et al., 2004). A propriedade tóxica irritante do ALD é, em parte, atribuída a habilidade dos bifosfonatos de se associarem quimicamente e desestabilizar os fosfolípidios de membrana, o que resulta numa rápida interrupção da barreira hidrofóbica destes tecidos (LICHTENBERGER et al., 2000). No presente estudo, confirmamos que o ALD reduz significativamente a produção de muco gástrico quando comparado ao grupo controle negativo, ao passo que o pré-tratamento com SIN aumenta de forma significativa a quantidade de muco aderido na parede gástrica. Pode-se assim associar o efeito gastroprotetor da SIN com a estimulação da secreção de muco e bicarbonato e por consequência obter-se o potencial antioxidante do muco. TARIQ et al., (2007) também demonstrou que a atividade anti-ulcerogênica da SIN foi associada com significativa atenuação dos efeitos adversos do etanol no muco aderido à parede gástrica.

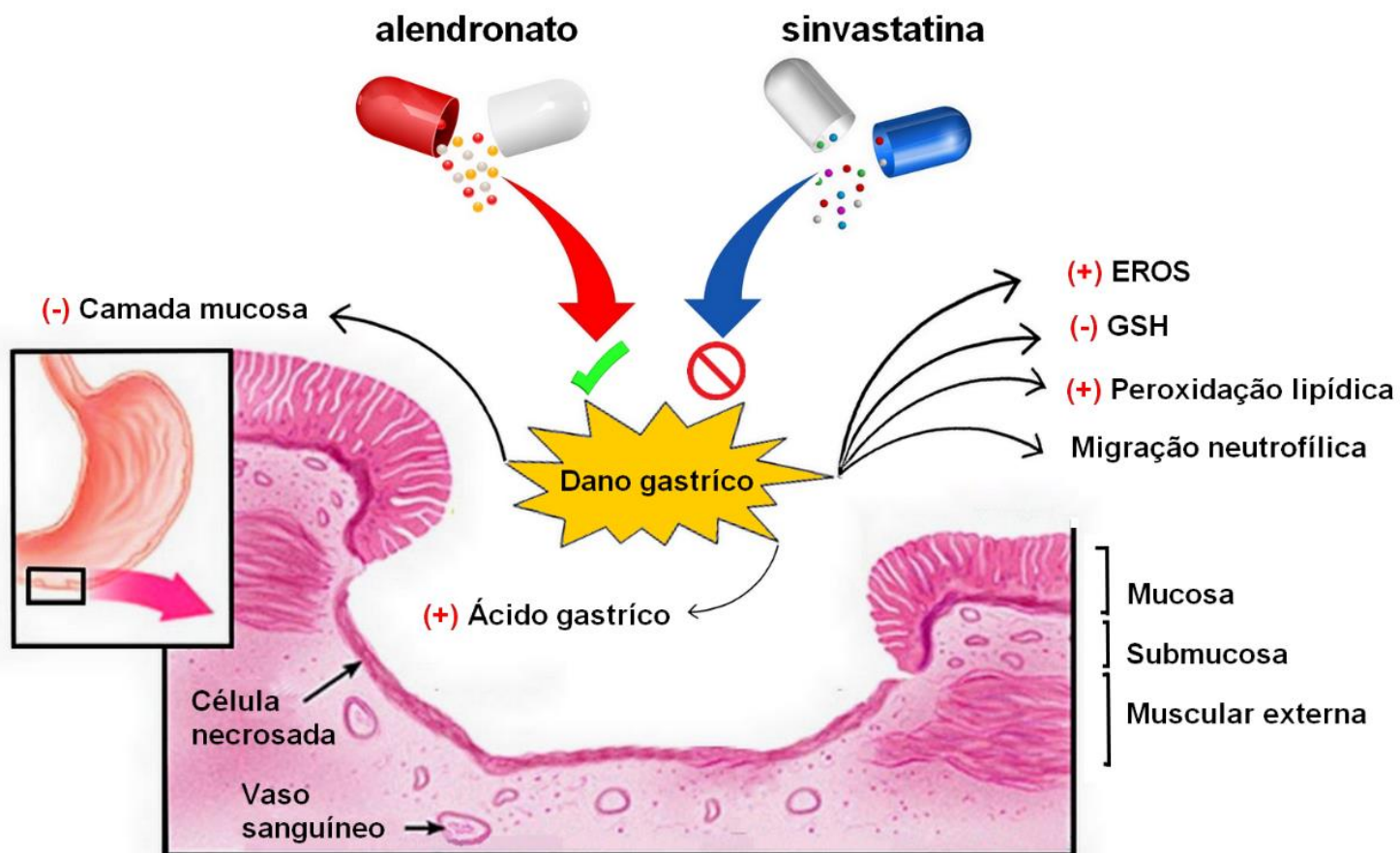
O ácido gástrico compõe importantes funções, além de facilitar o processo digestivo, também evita a proliferação de microorganismos no trato gastrointestinal. Entretanto, desequilíbrios homeostáticos ocasionados por diversos fatores podem levar a desregulação da liberação de ácido, levando-o a tornar-se agora um agente agressor na mucosa (SCHUBERT; 2005). Através do método de ligadura do piloro, é possível analisar as ações tanto do ALD quanto da SIN sobre a atividade secretora de HCl no estômago.

Já demonstrou-se em outros trabalhos o potencial do ALD em aumentar significativamente a acidez gástrica quando administrado por via oral, podendo este aumento na acidez ser devido à irritação tóxica local (SENER et al.,

2005). Sob condições de pH muito baixo (<2), o ALD encontra-se na forma ácida, sendo conhecido por ser mais irritante do que o sal de sódio (PETER et al., 2002). Nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento com a SIN reduziu a acidez total e este efeito talvez possa contribuir para sua atividade anti-ulcerogênica. Sugere-se assim, que pelo aumento do pH gástrico a SIN pode prevenir a conversão do ALD para sua forma ácida, diminuindo assim o efeito danoso do ácido livre na mucosa gástrica. Essa evidência baseia-se em estudos que indicam que a gastroproteção realizada pela SIN pode ser devido a sua capacidade de diminuir a acidez estomacal (TARIQ et al., 2007). É válido ressaltar que este efeito pode vir a ser associado ao aumento do óxido nítrico endógeno induzido pela SIN (DOBRUCKI et al., 2001; JIANG et al., 2004). De fato, parece ser um consenso que o NO inibe a secreção ácida basal estimulada sob várias condições em diferentes espécies animais (KIM; KIM 1996). Recentemente, trabalhos realizados por nosso grupo demonstrou que a eNOS e a iNOS previnem os danos gástricos induzidos por ALD e alterações no esvaziamento gástrico em ratos (COSTA et al., 2013; SILVA et al., 2014).

Em resumo, nossos resultados indicam que a SIN previne os danos gástricos induzidos por ALD diminuindo de forma direta os danos oxidativos e a peroxidação lipídica, bem como também pela inibição da infiltração neutrofilica. A manutenção dos níveis de muco e a diminuição da secreção ácida gástrica também são fatores importantes deste efeito gastroprotetor. Essas observações fornecem subsídios para a possibilidade do uso da SIN na prevenção contra danos gástricos induzidos pelo tratamento crônico com ALD.

Com base em nossos resultados sugerimos a seguinte esquematização do efeito protetor da SIN na lesão gástrica induzida por ALD em ratos.



7. CONCLUSÕES

- ✓ A SIN apresentou atividade gastroprotetora no modelo de lesão gástrica induzida por ALD em ratas.
- ✓ A gastroproteção da SIN pode ser confirmada através de análise dos parâmetros histológicos que evidenciaram diminuição de edema, hemorragia e infiltrado inflamatório induzidos por ALD.
- ✓ A SIN atenuou a depleção de GSH e reduziu a formação de MDA no modelo de lesão gástrica induzida por ALD, indicando ação antioxidante como parte do seu mecanismo de ação.
- ✓ O pré-tratamento com SIN também mostrou eficiência em diminuir parâmetros inflamatórios, por meio da diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e da redução da atividade da enzima MPO.
- ✓ O mecanismo de gastroproteção da SIN também envolve a diminuição da secreção ácida gástrica e a manutenção da camada mucosa do epitélio gástrico.

LISTA DE REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K. et al. **Robbins & Cotran patologia: bases patológicas das doenças**. 8º edição. Brasil: Elsevier, 2005.
- AIRES, M. **Sistema Digestivo**. In: **D. L. Sanioto, Fisiologia**. 4º edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- ALBERTS, A. W. et al. Mevinolin: A highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 77, n. 7, p. 3957-3961, 1980.
- ALLEN, A. Structure and function of gastrointestinal mucus: Physiology of the gastrointestinal tract. **J Int Med**, v. 5, p. 617-619, 1981.
- ALLEN, A.; FLEMSTROM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 288, n. 1, p. C1-19, 2005.
- ALTINKAYNAK, K. et al. Effect of nimesulide, rofecoxib and celecoxib on gastric tissue glutathione level in rats with indomethacin-induced gastric ulcerations. **Pol J Pharmacol**, v. 55, p. 645–648, 2003.
- AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharm Res**, v. 12, n. 3, p. 413-20, 1995.
- AZUMA, Y. et al. Alendronate distributed on bone surfaces inhibits osteoclastic bone resorption in vitro and in experimental hypercalcemia models. **Bone**, v.16, n. 2, p. 235-45, 1995.
- BAYIR, Y. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil infiltration in rats by constituent diffractaic acid. **Phytomedicine**, v. 13, n. 8, p. 584-590, 2006.
- BARREIROS, A. L. B. S. et al. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BANDEIRA, F. et al. Paget's disease of bone Characteristics of 49 patients from a single institution in Recife, PE, Brazil. **J Bone Miner Res**, v.14, (suppl. 1), S539, 1999.
- BELL, B. M.; BELL, R. E. Oral bisphosphonates and dental implants: a retrospective study. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 66, n. 5, p. 1022-1024, 2008.
- BERRUTI, A. et al. Metabolic bone disease induced by prostate cancer: rationale for the use of bisphosphonates. **J Urol**, v. 166, n. 6, p. 2023-2031, 2001.
- BI, L.C.; KAUNITZ, J.D. Gastroduodenal mucosal defense: an integrated protective response. **Curr Opin Gastroenterol**, v.19, p. 526–532, 2003.

- BOONYAPAKORN, T. et al. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: prospective study of 80 patients with multiple myeloma and other malignancies. **Oral Oncol**, v. 44, n. 9, p. 857-869, 2008.
- BRACHT, L. et al. Effects of simvastatin, atorvastatin, ezetimibe, and ezetimibe? simvastatin combination on the inflammatory process and on the liver metabolic changes of arthritic rats. **Basic Clin Pharmacol**, v. 26, n. 6, p. 722–734, 2012.
- BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**. v. 60, n. 3, p. 618–622, 1982.
- BRUNTON, L. et al. **Farmacoterapia da acidez gástrica, úlceras épticas e doença do refluxo gastroesofágico**. 11^a Ed. Rio de Janeiro. 2010.
- BRZOZOWSKI, T. et al. Comparison of prostaglandin and cimetidine in protection of isolated gastric glands against indomethacin injury. **J Physiol Pharmacol**, v. 56, n. 5, p. 75-88, 2005.
- BUDAVARI, S. et al. **The Merck Index: Chemicals, drugs and biologicals**. 12^o edição, Whitehouse Station: Merck & Co Inc, 1996.
- CASTRO, L. F. et al. Bifosfonatos (BFs) como transportadores osteotrópicos no planejamento de fármacos dirigidos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 3, p. 456-460, 2004.
- CARRAGETA, M. Tudo o que se deve saber sobre o colesterol. **Clube Rei Coração**. v.10, p. 3-7, 2006.
- CHATTOPADHYAY, I. et al. Indomethacin inactivates gastric peroxidase to induced reactive-oxygen-mediated gastric mucosal injury and curcumin protects it by preventing peroxidase inactivation and scavenging reactive oxygen. **Free Radic Biol Med**, v. 40, n.8, p. 1397–1408, 2006.
- CHESNUT, C. H. et al. Alendronate treatment of the postmenopausal osteoporotic woman: effect of multiple dosages on bone mass and bone remodeling. Esophagitis associated with the use of alendronate. **N Engl J Med**, v. 335, p. 1016-1021, 1995.
- CNUBBEN, N. H. et al. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 10, n. 4, p. 141-52, 2001.
- CORNE, S. J.; MORRISSEY, S. M.; WOODS, R. J. Proceedings: a method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. **J Physiol**, v. 242, n.2, p. 116-117, 1974.
- CORUZZI, G. et al. Antisecretory and gastroprotective activities of compounds endowed with H₂ antagonistic and nitric oxide (NO) donor properties. **J Physiol Paris**, v. 94, n. 1, p. 5-10, 2000.
- Costa N. R. et al. Role of soluble guanylate cyclase activation in the gastroprotective effect of the HO-1/CO pathway against alendronate-induced gastric damage in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 700, p. 51–59, 2013.

- CUNHA, F. Q. et al. Blockade by fenspiride of endotoxin-induced neutrophil migration in the rat. **Eur J Pharmacol**, v. 238, n. 1, p. 47–52, 1993.
- MOTTELEB, D. M. A.; HASAN, M. M. Gastroprotective effect of simvastatin against experimentally induced gastric ulcers in rats: Role of ATP-sensitive K⁺ channels. **J Am Sci**, v. 7, n.7, p. 760-768, 2011.
- DANNEMANN, C.; ZWAHLEN, R.; GRATZ, K. W. Clinical experiences with bisphosphonate induced osteochemonecrosis of the jaws. **Swiss Med Wkly**, v. 136, n. 31-32, p. 504-509, 2006.
- DEFONESKA, A.; KAUNITZ, J. D. Gastroduodenal mucosal defense. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 26, n. 6, p. 604-610, 2010.
- DE GROEN, P. et al. Esophagitis associated with the use of alendronate. **Am J Med**, v. 29, p. 144–152, 1995.
- DICKINSON, D. A.; FORMAN, H. J. Cellular glutathione and thiols metabolism. **Biochem Pharmacol**, v. 64, n. 5-6, p. 1019-1026, 2002.
- DOBRUCKI, L. et al. Statinstimulated nitric oxide release from endothelium. **Med Sci Monit**, v. 7, n. 4, p. 622–627, 2001.
- DRAKE, M. T.; CLARKE, B. L.; KHOSLA, S. Bisphosphonates: Mechanism of Action and Role in Clinical Practice. **Mayo Clin Proc**, v. 83, n. 9, p. 1032-1045, 2008.
- ENDO, A. The discovery and development of HMG – CoA reductase inhibitors. **J Lipid Res**, v. 33, n. 11, p. 1569-82,1992.
- ENDO, A., KURODA, M., Y, TSUJITA. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. **J. Antibiot**, v.29, p.1346-1348, 1976.
- FARWELL, W. R. et al. The association between statins and cancer incidence in a veterans population. **J Natl Cancer Inst**, v. 100, n. 2, p. 134-139, 2008.
- FISHER, A. et al. Bisphosphonate use and hip fracture epidemiology: ecologic proof from the contrary. **Clin interv aging**, v. 19, n. 5, p. 355–362, 2010.
- FLEISCH, H. **Bisphosphonates in Bone Disease: From the Laboratory to the Patient**. 4^o ed. New York:The Parthenon Group, 1997.
- FLEISCH, H. Bisphosphonates: mechanisms of action. **Endocr Rev**, v. 19, n. 1, p. 80-100, 1998.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, Projeto de Orientação do Alendronato de Sódio. Disponível em:
<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm082421.pdf> Acesso em: 15 de janeiro de 2017.

- GANGULI, A. et al. The interactions of bisphosphonates in solution and as coatings on hydroxyapatite with osteoblasts. **J Mater Sci Mater Med**, v. 13, n. 10, p. 923-31, 2002.
- GINTER, E., SIMKO, V. Statins: the drugs for the 21st century? **Bratisl Lek Listy**, v. 110, n. 10, p. 664-668, 2009.
- GRAHAM, D. Y., MALATY, H. M. Alendronate gastric ulcers. **Alimente pharmacol ther**, v. 13, n. 4, p. 515-519, 1999.
- GREENBERG, M. S. **Intravenous bisphosphonates and osteonecrosis**. In: Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. United States, 2004.
- GREY A., REID I. R. Differences between the bisphosphonates for the prevention and treatment of osteoporosis. **Ther Clin Risk Manag**, v.2, n.1, p.77-86, 2006.
- GUDIS, K., SAKAMOTO, C. The role of cyclooxygenase in gastric mucosal protection. **Dig Dis Sci**, v. 50 Suppl 1, p. S16-S23, 2005.
- GUISE, T. A., BRUFISKY, A., COLEMAN, R. E. Understanding and optimizing bone health in breast cancer. **Curr. Med. Res. Opin. London**, v. 26, Suppl. 3, p. 3-20, 2010.
- GUYTON, A. C., HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. Ed. Elsevier Brasil, 2006.
- HADDAD, P. T., SALAZAR, M.; HERNANDES, L. Histomorphometry of the organic matrix of the femur in ovariectomized rats treated with sodium alendronate. **Rev Bras Ortop**. v. 50, n. 1, p. 100–104, 2015.
- HEEBA, G. H., HASSAN, M. K. A., AMIN, R.S. Gastroprotective effect of simvastatin against indomethacin-induced gastric ulcer in rats: role of nitric oxide and prostaglandins. **Eur J Pharmacol**. v.60, n. 7, p. 188–193, 2009.
- HILL, P. A. Bone remodelling. **Br J Orthod**, v. 25, n. 2, p. 101-107, 1998.
- HORIUCHI, N., MAEDA, T. Statins and bone metabolism. **Oral Dis**, v. 12, n. 2, p. 85-101, 2006.
- HOGBEN, C. A. M. et al. Quantitative histology of gastric mucosa: Man, dog, cat, guinea, pig, and frog. **Gastroenterology**, v. 67, n. 6, p. 1143-1154, 1974.
- IDRIS, A. I. et al. Aminobisphosphonates cause osteoblast apoptosis and inhibit bone nodule formation in vitro. **Calcif Tissue Int**, v. 82, n. 3, p. 191-201, 2008.
- JADHAV, S. B., JAIN, G. K. Statins and osteoporosis: new role for old drugs. **J Pharm Pharmacol**, v. 58, p. 3–18, 2000.
- JAIN, K. S. et al. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. **Bioorg Med Chem**, v. 15, n. 3, p. 1181-205, 2007.
- JAMES, K., LIAO, A. N. D., ULRICH, L. Pleiotropic effects of statins. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 45, p. 89-118, 2005.

- JIANG, J. L. et al. Effect of simvastatin on endothelium-dependent vaso-relaxation and endogenous nitric oxide synthase inhibitor. **Acta Pharmacol Sin**, v. 25, n. 7, p. 893–901, 2004.
- KANATSU, K. et al. Mucosal irritative and healing impairment action of risedronate in rat stomachs: comparison with alendronate. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 19, n. 5, p. 512-520, 2004.
- KANBAYASHI, Y., KONISHI, H. Predictive Factors for NSAIDs-related Gastrointestinal Toxicity: Can COX-2 Selective Inhibitor Prevent it? **Hepatogastroenterology**, v. 62, n. 140, p. 787-789, 2015.
- KAUR, M., et al. Role of endogenous mediators in peptic ulcer- a review on strategies of pathogenesis and ulcer healing. **J Pharm Pharm Sci**, v. 3, n. 11, p. 336-349, 2014.
- KHAPRA, A. P., ROSE, S. Drug injury in the upper gastrointestinal tract: effects of alendronate. **Gastrointest Endosc Clin N Am**, v. 16, n. 1, p. 99-110, 2006.
- KIM, H., KIM, K. H. Effects of a nitric oxide donor and nitric oxide synthase inhibitors on acid secretion of isolated rabbit gastric glands. **Pharmacology**, v. 53, n. 6, p. 331-339, 1996.
- KONTUREK, P. C. H. et al. Activation of genes for superoxide dismutase, interleukin-1 β , tumor necrosis factor α and intercellular adhesion molecule-1 during healing of ischemia – reperfusion gastric injury. **Scand J Gastroenterol**, v. 35, n. 5, p. 452-463, 2000.
- KONTUREK, P. C., KONTUREK, S. J., OCHMANSKI, W. Neuroendocrinology of gastric H⁺ and duodenal HCO₃ secretion: the role of brain-gut axis. **Eur J Pharmacol**, v. 499, n. 1-2, p. 15-27, 2004.
- KRAWISZ, J. E., SHARON, P., STENSON, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. **Gastroenterology**. v. 87, n. 6, p. 1344-1350, 1984.
- KURATA, J H., NOGAWA AKI N. M.S. Meta-analysis of Risk Factors for Peptic Ulcer: Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs, Helicobacter pylori, and Smoking. **J Clin Gastroenterol**. v. 24, n. 1, p. 2-17, 1997.
- KWIECIEN, S., BRZOZOWSKI, T., KONTUREK, S. J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. **J Physiol Pharmacol**, v. 53, n. 1, p. 39-50, 2002.
- KWITEROVICH, P. O. JR. The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: a current review. **Am J Cardiol**, v. 21, n. 86, p.5L-10L, 2000.
- LASSETER, K. C. et al. Pharmacokinetic considerations in determining the terminal elimination half-lives of bisphosphonates. **Clin Drug Investig**, v. 25, n. 2, p. 107-114, 2005.

- LAINE, L., TAKEUCHI, K., TARNAWSKI, A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. **Gastroenterology**, v. 135, n. 1, p. 41-60, 2008.
- LAINE, L., WEINSTEIN, W. M., Histology of alcoholic hemorrhagic "gastritis": a prospective evaluation. **Gastroenterology**. v. 94, n. 6, p. 1254-1262, 1998.
- LARSON, A. L. **Naturally Occurring Antioxidants**. 1° edição, Nova York, editora Lewis Publisher, 1997.
- LEWIN, T. M. et al. Acyl-CoA synthetase isoforms 1, 4, and 5 are present in different subcellular membranes in rat liver and can be inhibited independently. **J Biol Chem**, v. 276, p. 24674-24679, 2001.
- LICHTENBERGER, L. M. et al. Effect of bisphosphonates on surface hydrophobicity and phosphatidylcholine concentration of rodent gastric mucosa. **Dig Dis Sci**, v. 45, n. 9, p. 1792–1801, 2000.
- LINDSAY, R. et al. Risk of New Vertebral Fracture in the Year Following a Fracture. **JAMA**. v. 285, n. 3, p. 320-323, 2001.
- LINARELI, M. C. B., POTT, J. R. H. Estatinas: uma revisão sobre aspectos vasculares. **Am J Med sci**, v. 17, n. 1, p. 43-52, 2008.
- LUCEY, M. R., YAMADA, T. Biochemistry and physiology of gastrointestinal somatostatin. **Dig. Dis. Sci**, v. 34, n. 3, p. 5S-13S, 1989.
- LU, H., GRAHAM, D.Y. New development in the mechanistic understanding of peptic ulcer diseases. **Drug Discov Today**, v.3, n.4, p. 431-437, 2006.
- LUPATTELLI G. et al. Simvastatin increases bone mineral density in hypercholesterolemic postmenopausal women. **Metabolism**. v. 53, n. 6, p. 744-748, 2004.
- MACONI, G., BIANCHI PORRO, G. Multiple ulcerative esophagitis caused by alendronate. **Am J Gastroenterol**, v. 90, n. 10, p. 1889-1890, 1995.
- MARTIN, G. R., WALLACE, J. L. Gastrointestinal inflammation: a central component of mucosal defense and repair. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 231, n. 2, p. 130-137, 2006.
- MARTINS, A. P. Regimes terapêuticos para a úlcera péptica. **Laboratory Investigation**, v. 21, p. 431-444, 2005.
- MAURO, V. F., MACDONALD, J. L. Simvastatin: a review of its pharmacology and clinical use. **DICP**, v. 25, n. 3, p. 257-264. 1991.
- MCCORD, J. M., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **J Biol Chem**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.
- MATLOUB, S. Y. N., MANNA, M. J., HUSSEIN, K. G. Simvastatin and rosuvastatin in the protection against nsaid induced gastric mucosal injury in rats & role of their antioxidant activity. **IRJP**. v. 3 n. 2, p. 121-124, 2012.

- MEIER, C. R. et al. HMG CoA reductase inhibitors and the risk of fractures. **JAMA**. v. 283, p. 3205-3210, 2000.
- MERCER, D. W., ROBINSON, E. K. “**Stomach**” In: **Townsend C.M.** 18^o edição. Philadelphia: Saunders, 2008.
- MERIGO, E. et al. Bone necrosis of the jaws associated with bisphosphonate treatment: a report of twenty-nine cases. **Acta Biomed**, v. 77, p. 109-117, 2006.
- MIHARA, M., UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal Biochem**, v. 86, n. 1, p. 271-278, 1978.
- MIHOS, C. G., SANTANA O. Pleiotropic effects of the HMG-CoA reductase inhibitors. **J Gen Med**, v. 4, p. 261-271, 2011.
- MIRANDA, H. F. et al. Antinociception and Anti-Inflammation Induced by Simvastatin in Algesiometric Assays in Mice. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v.109, p. 438-442, 2011.
- MUNDY, G. et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. **Science**. v. 286, p. 1946-1949,1999.
- NATALE, G. et al. Mechanisms of gastroprotection by lansoprazole pretreatment against experimentally induced injury in rats: role of mucosal oxidative damage and sulfhydryl compounds. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.15, n. 195, p. 162-172, 2004.
- NEUVONEN, P. J., BACKMAN, J. T., NIEMI, M. Pharmacokinetic comparison of the potential over-the-counter statins simvastatin, lovastatin, fluvastatin and pravastatin. **Clin Pharmacokinet**, v. 47, n.7, p. 463-474, 2008.
- NEVES, M. et al. Synthesis, characterization and biodistribution of bisphosphonates Sm-153 complexes: correlation with molecular modeling interaction studies. **Nucl Med Biol**, v. 29, n. 3, p. 329-338, 2002.
- NICOLAU, L. A. D. et al. The hydrogen sulfide donor, Lawesson’s reagent, prevents alendronate-induced gastric damage in rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 46, n. 8, p. 708-714, 2013.
- OHASHI, Y. et al. Induction of antral ulcers by alendronate, a nitrogen-containing bisphosphonate, in rat stomachs. **Gastroenterology**, v. 51, n.3, p. 196-203, 2012.
- OHASHI, Y. et al. Antral ulcers induced by alendronate, a nitrogen-containing bisphosphonate, in rat stomachs-prophylactic effect of rebamipide. **J Physiol Pharmacol**, v. 60, n. 3, p. 85-93, 2009.
- ORWOLL, E. et al. Alendronate for the treatment of osteoporosis in men. **N Engl J Med**, v. 343, n. 9, p. 604-610, 2000.
- PAPAPETROU, P. D. Bisphosphonate-associated adverse events. **Hormones (Athens)**, v. 8, n. 2, p. 96-110, 2009.

- PARFITT, K., MARTINDALE, W. **Martindale: The complete drug reference**. London, UK: Pharmaceutical, 2002.
- PARK, J. B. The use of simvastatin in bone regeneration. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 14, n. 9, p. 485-488, 2009.
- PEDERSEN, T. R., TOBERT, J. A. Simvastatin: a review. **Expert Opin Pharmacother**, v. 5, n.12, p.2583-2596, 2004.
- PETER, C. P., HANDT, L. K., SMITH, S. M. Esophageal irritation due to alendronate sodium tablets. **Dig Dis Sci**, v. 43, n.9, p.1998-2002, 2002.
- POTRICH, F. B. et al. Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.: involvement of the antioxidant system. **J Ethnopharmacol**, v. 130, n. 1, p. 85-92, 2010.
- PRICE, U. et al. Effects of local simvastatin-alendronate conjugate in preventing periodontitis bone loss. **J Periodontal Res**, v. 48, n. 5, p. 541-548, 2013.
- PRUEFER, D., SCALIA, R., LEFER, A. M. Simvastatin inhibits leukocytes-endothelial cell interactions and protects against inflammatory processes in normocholesterolemic rats. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 19, n. 12, p. 2894-2900, 1999.
- RAISZ, L. G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. **J Clin Invest**, v. 15, p. 3318-3325, 2005.
- RAMAKRISHNAN, K., SALINAS, R. C. Peptic ulcer disease. **Am Fam Physician**, v. 76, n. 7, p. 1005-12, 2007.
- RANG, H.P. et al. **Farmacologia**, Elsevier, 6^a ed. 2007.
- REPETTO, M. G., LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, n. 5, p. 523-534, 2002.
- ROELOFS, A. J. et al. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. **Clin Cancer Res**, v. 12, n. 20, p. 6222s-6230s, 2006.
- ROSEN, L. S. et al. Zoledronic acid versus pamidronate in the treatment of skeletal metastases in patients with breast cancer or osteolytic lesions of multiple myeloma: a phase III, double-blind, comparative trial. **Cancer J**, v.7, n. 5, p. 377-387, 2001.
- ROULEAU, A. et al. Cloning and expression of the mouse histamine H3 receptor: evidence for multiple isoforms. **J Neurochem**, v. 90, n. 6, p. 1331-338, 2004.
- SANDOR, Z. et al. Stimulation of mucosal glutathione and angiogenesis: new mechanisms of gastroprotection and ulcer healing by sucralfate. **Scand J Gastroenterol**, v 2, p. 1019-1021, 1995.
- SANTINI, D. et al. The antineoplastic role of bisphosphonates: from basic research to clinical evidence. **Ann Oncol**, v. 14, n. 10, p. 1468-76, 2003.

- SCALIA, R. et al. Simvastatin exerts both anti-inflammatory and cardioprotective effects in apolipoprotein E-deficient mice. **Circulation**. v.103, n. 21, p. 2598-2603, 2001.
- SAGER, P. T. et al. Effect of coadministration of ezetimibe and simvastatin on high-sensitivity C-reactive protein. **Am J Cardiol**. v. 92, n. 12, p. 1414-1418, 2003.
- SCHONBECK, U., LIBBY, P. Inflammation, immunity, and HMG-CoA reductase inhibitors: statins as antiinflammatory agents? **Circulation**. v. 109, n.21, p. 1118-1126, 2006.
- SCHUBERT, M.L. Gastric secretion. Current Opinion. **Curr Opin Gastroenterol**. v. 30, n.6, p. 636-643, 2005.
- SCHUBERT, M.L., PEURA, D.A. Control of gastric acid secretion in health and disease. **Gastroenterology**. v. 134, n. 7, p. 1842-1860, 2008.
- SEDLAK, J., LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, v. 25, n. 1, p. 192-205, 1968.
- SENER, G. et al. Gastroprotective effect of leukotriene receptor blocker montelukast in alendronate-induced lesions of the rat gastric mucosa. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. v. 72, n. 1, p. 1-11, 2005.
- SENER, G. et al. Protective effect of melatonin and omeprazole against alendronat-induced gastric damage. **Dig Dis Sci**. v. 50, n. 8, p. 1506-1512, 2005.
- SENER, G. et al. Octreotide ameliorates alendronate-induced gastric injury. **Peptides**. v. 25, n. 1, p. 115-121, 2004.
- SHAH, V. et al. Nitric oxide in gastrointestinal health and disease. **Gastroenterology**, v. 126, n. 3, p. 903-13, 2004.
- SHAY, H. A. Simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. **Gastroenterology**, v. 5, p. 43-61, 1945.
- SHIRIN, H. et al. Helicobacter pylori decreases gastric mucosal glutathione. **Cancer Lett**, v. 164, n. 2, p. 127-133, 2001.
- SHITARA, Y., SUGIYAMA, Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3- methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: Drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. **Pharmacol Ther**. v. 112, n.1, p. 71-112, 2006.
- SCHÖNBECK, U., LIBBY, P. Inflammation, immunity, and HMG-CoA reductase inhibitors: statins as antiinflammatory agents? **Circulation**. v. 1, n. 109 p.18-26, 2004.

- Silva RO. et al. A Sulfated-Polysaccharide Fraction from Seaweed *Gracilaria birdiae* Prevents Naproxen-Induced Gastrointestinal Damage in Rats. **Marine Drugs**, v.10, n.12, p. 2618-2633, 2012
- SILVA, R. O. et al. Alendronate induces gastric damage by reducing nitric oxide synthase expression and NO/cGMP/K(ATP) signaling pathway. **Nitric Oxide**. v. 40, p. 22-30, 2014.
- SPOSITO, A. C. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arq Bras Cardiol**. v. 88, n. 1, p. 1-18, 2007.
- STANCU, C., SIMA, A. Statins: mechanism of action and effects. **J Cell Mol Med**, v. 5, n.4, p. 378-387, 2001
- STEIN, E. A. Management of dyslipidemia in the high-risk patient. **Am Heart J**, v.144, p. 43-50, 2002.
- SUNG, J. J. et al. Causes of mortality in patients with peptic ulcer bleeding: a prospective cohort study of 10,428 cases. **Am J Gastroenterol**, v. 105, n. 1, p. 84-89, 2010.
- SZABO, S. et al. Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. **Gastroenterology**, v. 88, n. 1 Pt 2, p. 228-36, 1985.
- SZABO, S. Mechanisms of gastric mucosal injury and protection. **J Clin Gastroenterol**, v. 13, p. 21S-34S, 1991.
- SZABO, S., NAGY, L., PLEBANI, M. Glutathione, protein sulfhydryls and cysteine proteases in gastric mucosal injury and protection. **Clin Chim Acta**. v. 206, n. 1-2, p. 95-105, 1992.
- SZABO, S., TRIER, J. S., FRANKEL, P. W. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. **Science**. v. 214, n. 4517, p. 200-202, 1981.
- TARIQ, M. et al. Gastric antisecretory and antiulcer effects of simvastatin in rats. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 22, n. 12, p. 2316-23, 2007.
- TARIQ, M., KHAN, H. A. protective effect of the HO-1/CO pathway against alendronate-induced gastric damage in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 700, p. 51-59, 2013.
- TENENBAUM, H. C. et al. Bisphosphonates and periodontics: potential applications for regulation of bone mass in the periodontium and other therapeutic/diagnostic uses. **J Periodontol**, v. 73, n. 7, p. 813-22, 2002.
- THIEBAUD, D. et al. An in vitro and in vivo study of cytokines in the acute-phase response associated with bisphosphonates. **Calcif Tissue Int**. v. 61, n. 5, p. 386-392, 1997.

- THOMSON, A. B. et al. Risedronate Endoscopy Study Group. 14 day endoscopy study comparing risedronate and alendronate in postmenopausal women stratified by Helicobacter pylori status. **J Rheumatol**, v. 29, p. 1965-1974, 2002.
- TOUSSAINT, N. D., ELDER, G. J., KERR, P. G. Bisphosphonates in chronic kidney disease; balancing potential benefits and adverse effects on bone and soft tissue. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 4, n. 1, p. 221-233, 2009.
- TSARTSALIS AN. et al. Statins, bone formation and osteoporosis: hope or hype? **Hormones**. v. 11, n. 2, p. 126-39, 2012.
- UCHIDA, M. et al. Nitric oxide donating compounds inhibit HCl-induced gastric mucosal lesions mainly via prostaglandin. **Jpn J Pharmacol**, v. 85, n. 2, p. 133-8, 2001.
- UNGUREANO, D. et al. Evaluation of simvastatin antioxidant effects. **Rev Med Chir Soc Med Nat**, v. 107, n. 1, p. 66-71, 2003.
- UZZAN, B. et al. Effects of statins on bone mineral density: a meta-analysis of clinical studies. **Bone**. v. 40, n. 6, p. 1581-1587, 2007.
- VAANANENN, P. M., MEDDING, J.B., WALLACE, J.L. Rol of oxygen derived free radicals in indomethacin-induced gastric injury. **Am J Physiol**, v. 261, n.3, p. G470–G475, 1991.
- VALCHEVA-KUZMANOVA, S. et al. Effect of Aronia melanocarpa fruit juice on indomethacin-induced gastric mucosal damage and oxidative stress in rats. **Exp Toxicol Pathol**, v. 56, n. 6, p. 385-392, 2005.
- VAN BEEK, E. et al. The role of geranylgeranylation in bone resorption and its suppression by bisphosphonates in fetal bone explants in vitro: a clue to the mechanism of action of nitrogen-containing bisphosphonates. **J Bone Miner Res**, v. 14, p. 722-729, 1999.
- VAN DER MOST, P. J. et al. Statins: mechanisms of neuroprotection. **Prog Neurobiol**, v. 88, n. 1, p.64-75, 2009.
- VOGT, W. Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. **Free Radic Biol Med**, v. 18, n. 1, p. 93-105, 1995.
- WALLACE, J. L. et al. N-bisphosphonates cause gastric epithelial injury independent of effects on the microcirculation. **Aliment Pharmacol Ther**. v. 13, n. 12, p. 1675-1682, 2000.
- WALLACE, J. L., GRANGER, D. N. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. **Faseb j**, v. 10, n. 7, p. 731-40, 1996.
- WALLACE, J.L., KEENAN, C.M., GRANGER, D.N. Gastric ulceration induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is a neutrophil dependent process. **Am J Physiol**. v. 259, n. 3, p. G462-G467, 1990.

WALLACE, J. L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? **Physiol Rev**, v. 88, n. 4, p. 1547-65, 2008.

WALLACE, J. L., MA, L. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. **Exp Biol Med**, v. 226, n. 11, p. 1003-1015, 2001.

WANG, P. S. et al. J.HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of hip fractures in elderly patients. **JAMA**, v. 283 n. 24 p. 3211-3216, 2000.

WATTS, N. B., DIAB, D. L. Long-term use of bisphosphonates in osteoporosis. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 95, n. 4, p. 1555-1565, 2010.

WEITZ, S. G. Statins as anti-inflammatory agents. **Trends Pharmacol Sci**, v. 23, n.10, p. 482-487, 2002.

WEINSTEIN, R.S. Clinical practice. Glucocorticoid-induced bone disease. **N. Engl. J. Med., Boston**, v. 365, no. 1, p. 62-70, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION Assessment of osteoporosis at the primary health care level. Summary report of a WHO scientific Group, 2007.

WOO, S. B., HELLSTEIN, J. W., KALMAR, J. R. Narrative [corrected] review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. **Ann Intern Med**, v. 144, n. 10, p. 753-61, 2006.

YAMAGUCHI, K. et al. Involvement of interleukin-1 in the inflammatory actions of aminobisphosphonates in mice. **Br J Pharmacol**. v. 130, n.7, p. 1646-1654, 2000.

YOSHIKAWA, T. et al. Role of active oxygen, lipid peroxidation and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats. **Gut**. v. 34, n. 6, p. 732-737, 1993.

ANEXO A

Artigo publicado com os dados referentes ao trabalho apresentado

Protective Effects of Simvastatin Against Alendronate-Induced Gastric Mucosal Injury in Rats

Nathalia S. Carvalho¹ · Mônica M. Silva² · Renan O. Silva³ · Lucas A. D. Nicolau³ · Thiago S. L. Araújo² · Douglas S. Costa¹ · Nayara A. Sousa² · Luan K. M. Souza² · Pedro M. G. Soares³ · Jand Venes R. Medeiros^{1,2,4}

Received: 13 July 2015 / Accepted: 17 September 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract

Background It has been reported that simvastatin, a statin commonly prescribed for its anti-inflammatory and antioxidant effects, has gastroprotective effects in indomethacin and ethanol-induced gastric ulcers. However, the effects of simvastatin on alendronate-induced gastric mucosal injury remain unexplored.

Aim This study investigated the use of simvastatin for the treatment of alendronate-induced gastric ulcers in rats.

Methods Female rats were pretreated with vehicle or simvastatin (20 and 60 mg/kg p.o.). After 1 h, the rats received alendronate (50 mg/kg p.o.). Simvastatin was administered once daily for 7 days, and from the fourth day of simvastatin treatment, alendronate was administered once daily for 4 days. On the final day of treatment, 4 h after alendronate administration, animals were euthanized, their stomachs were removed, and gastric damage was measured. Samples of the stomach were fixed in 10 % formalin immediately after their removal for subsequent histopathological assessment. Unfixed samples were weighed, frozen at -80°C until assayed for glutathione

(GSH), malondialdehyde (MDA), and cytokine levels and myeloperoxidase (MPO) activity. A third group was used to measure mucus and gastric secretion.

Results Pretreatment with simvastatin prevented alendronate-induced macroscopic gastric damage and reduced the levels of MDA and GSH, TNF- α and IL-1 β , MPO activity, and mucus levels, in the stomach.

Conclusions This study demonstrates the protective effects of simvastatin against alendronate-induced gastric ulceration. Maintenance of mucosal integrity, inhibition of neutrophil activity, and reduced oxidative stress associated with decreased gastric acidity may explain the gastroprotective effects of simvastatin.

Keywords Simvastatin · Biphosphonate · Gastric damage · Antioxidant · Anti-inflammatory

Abbreviations

ALD	Alendronate
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
GSH	Glutathione
IL	Interleukin
MDA	Malondialdehyde
MPO	Myeloperoxidase
NO	Nitric oxide
SIM	Simvastatin
TNF	Tumor necrosis factor

Background

Osteoporosis is the most widespread bone disease, characterized by low bone mineral density and deterioration of bone microarchitecture leading to bone fragility fractures

✉ Jand Venes R. Medeiros
jandvenes@ufpi.edu.br

¹ Post Graduation Program in Pharmacology, Medicinal Plant Research Center (NPPM), Federal University of Piauí, Teresina, PI, Brazil

² Post Graduation Program in Biotechnology, Biotechnology and Biodiversity Center Research (BIOTEC), Federal University of Piauí, Parnaíba, PI, Brazil

³ Laboratory of Pharmacology of Inflammation and Cancer (LAFICA), Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

⁴ BIOTEC/LAFFEX/UFPI, Av. São Sebastião, no. 2819, Parnaíba, PI CEP 64202-020, Brazil

[1]. Currently, bisphosphonates, including alendronate (ALD), clodronate, etidronate, pamidronate, and tiludronate, are the most commonly prescribed drugs for the treatment of various bone diseases, including Paget's disease, osteolytic bone metastases, and osteoporosis, and also for enhanced bone resorption [2]. However, these drugs are associated with several gastrointestinal disturbances, such as abdominal discomfort, pain, diarrhea, and ulcers of the esophagus, stomach, or small intestine [3, 4].

Recently, statins, a class of drugs used worldwide to lower plasma concentrations of cholesterol-carrying lipoproteins [5], were found to be associated with various pleiotropic effects including improvement of bone health owing to their interference with bone metabolism, reduction in signal proteins regulating osteoclast activity [6], and upregulation of the expression of bone morphogenetic protein-2 gene as demonstrated in rat bone tissue [7]. Furthermore, studies have found that the risk of fractures markedly reduces in people using statins [8, 9].

Simvastatin (SIM) is a commonly prescribed statin with anti-inflammatory [10, 11] and antioxidant effects [12]. The literature has also established that SIM has gastroprotective effects in indomethacin and ethanol-induced gastric ulcers [13, 14]. However, chronic use of ALD, a frequently used bisphosphonate, also is associated with gastric ulcers via mechanisms differing from those of NSAIDs and ethanol. Adverse effects of ALD in the upper gastrointestinal tract have been attributed, in many cases, to adherence of the drug to the mucosal surface, causing lesions in the antrum that subsequently develop into ulcers (with white cap) [15, 16]. However, the effect of SIM on gastric mucosal injury induced by ALD has remained unexplored.

Owing to the lack of an effective therapy for gastropathy caused by ALD, few studies on the mechanisms involved in its toxicity, influence of interaction between ALD and SIM on the outcome, particularly in patients taking both agents simultaneously, the evidence presented in this work may provide a rationale for use of statins in the treatment of gastric ulcers induced by ALD.

Methods

Reagents

SIM was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). ALD sodium was purchased from Farmafórmula[®], Fagron (São Paulo, Brazil). ALD was dissolved in 2 % DMSO prior to use. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers and dissolved in saline before use.

Animals

Female rats (Wistar strain, 100–150 g) were obtained from the Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará. The animals were housed in cages in a temperature-controlled environment under a 12 h light/12 h dark cycle and had constant access to drinking water and standard pellet diet. The animals were deprived of food for 18–24 h before the experiment, but had free access to water. All animal treatments and surgical procedures were performed in accordance with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) and were approved by the local ethics committee (Protocol No. 0067/10).

Effect of Simvastatin on Alendronate-Induced Gastric Damage

The animals were initially pretreated with vehicle (0.9 % saline) or SIM (20 and 60 mg/kg) orally. After 1 h, ALD (50 mg/kg) was administered by gavage. The control group received only saline. SIM was administered once daily for 7 days, and, beginning on the fourth day, ALD was administered once daily for 4 days. On the last day of treatment, 4 h after ALD administration, pylorus ligation was performed to determine the gastric acidity. In other groups, the animals were *ethanized* and their stomachs removed. Gastric damage was measured using a computer planimetry program (ImageJ software, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Samples of the stomach were fixed in 10 % formalin immediately after their removal for subsequent histopathological assessment. Unfixed samples were then weighed, frozen, and stored at -80°C until assayed for glutathione (GSH) levels [17], malondialdehyde (MDA) concentration [18], myeloperoxidase (MPO) activity [19], and cytokine levels [20].

Histological Evaluation of Gastric Damage

For histological evaluation, stomach samples were fixed in 10 % formalin solution where they remained for 24 h. After fixation, the samples were transferred to a solution of 70 % alcohol. The material was then embedded in paraffin and sectioned. Sections (4 μm thick) were deparaffinized, stained with hematoxylin and eosin (H&E), and then examined under a light microscope by an experienced pathologist who was blinded to the treatment. The specimens were assessed according to the criteria previously described [21] and were assigned scores according to the following parameters: epithelial cell loss (a score of 0–3), edema in the upper mucosa (a score of 0–4), hemorrhagic damage (a score of 0–4), and the presence of inflammatory

cells (a score of 0–3), yielding a maximum possible score of 14.

Glutathione Assay

The GSH levels in the segmented stomach tissue were measured using the method previously described [17]. The results were expressed as micrograms of GSH per gram of tissue ($\mu\text{g/g}$).

Malondialdehyde Assay

Lipid peroxidation was estimated by measuring the concentration of MDA in the homogenate from each gastric sample according to the method previously described [18], which is based on a reaction with thiobarbituric acid. MDA concentrations are expressed as nanomoles per gram of tissue (nmol/g).

Myeloperoxidase Activity

MPO activity, an index of polymorphonuclear cell accumulation into various tissues including the gastrointestinal tract, was measured according to the method previously described [19]. The results were reported as the MPO units per mg (UMPO/mg) of tissue. A unit of MPO activity was defined as that sufficient for converting 1 μmol of H_2O_2 to water in 1 min at 22 °C.

Cytokine Measurements

The levels of tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-1 β were determined by using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), as previously described [20]. ELISA results were expressed as pictograms of each cytokine per milliliter reaction mixture (pg/ml).

Determination of Gastric Mucus

The gastric tissues were collected and transferred to 1 % Alcian blue solution (0.16 M sucrose in 0.05 M sodium acetate, pH 5.8). Excess dye was removed by washing the tissue with 0.25 M sucrose solution. The mucus–dye complex was extracted by placing the tissue in 0.5 M MgCl_2 for 2 h. This extract was mixed with diethyl ether, centrifuged at 1400 g for 10 min, and the absorbance was measured at 598 nm [22]. The quantity of extracted Alcian blue ($\mu\text{g/g}$ of tissue) was then calculated using a standard curve.

Anti-secretory Study

To evaluate secretory activity, the animals were treated according to the method described above. On the last day

of treatment, 4 h after ALD administration, pylorus ligation was performed. After 4 h of continuous observation and monitoring, the animals were killed using a lethal dose of a combination of anesthetics, ketamine, and xylazine. Their stomachs were immediately opened, and the gastric content was collected. The final volume and pH were determined immediately after washing the stomach mucosa with 2 ml of distilled water. The total acidity of gastric juice was titrated with 0.01 N NaOH, using 2 % phenolphthalein as an indicator [23].

Statistical Analysis

All values are expressed as mean \pm SEM. ANOVA, and a Student–Newman–Keuls test was used to determine statistical significance of differences between groups. For histological assessment, the Kruskal–Wallis nonparametric test was used, followed by Dunn’s test for multiple comparisons. Differences were considered to be significant when $P < 0.05$.

Results

Effect of Simvastatin on Alendronate-Induced Gastric Damage

In this study, our results showed that pretreatment with SIM (60 mg/kg) administered orally prevented ALD-induced macroscopic gastric damage (Fig. 1). Furthermore, we observed that ALD damaged both the corpus and the antral mucosa of the stomach, and this damage was mostly surface epithelial injury. The chronic exposure of the rat gastric mucosa to ALD for 4 days produced widespread damage to the epithelium, and the luminal surface was covered with cellular debris (Fig. 2c). The results of microscopic analysis indicated that ALD administration induced alterations in the gastric region characterized by intense hemorrhage, edema, epithelial cell loss, and inflammatory cells (Fig. 2d; Table 1). These changes were observed to be significantly reduced in rats treated with SIM (Fig. 2e, f; Table 1).

GSH and MDA Levels

Treatment with ALD significantly decreased GSH concentrations ($361.3 \pm 57.82 \mu\text{g/g}$ tissue) along with a concomitant increase in the levels of gastric tissue MDA ($113.3 \pm 9.66 \text{ nmol/g}$ tissue) in the stomachs of rats compared to control rats receiving saline treatment ($*P < 0.05$), as shown in Fig. 3. Pretreatment with SIM significantly increased the levels of endogenous antioxidant GSH ($610.0 \pm 88.49 \mu\text{g/g}$ tissue), restoring the

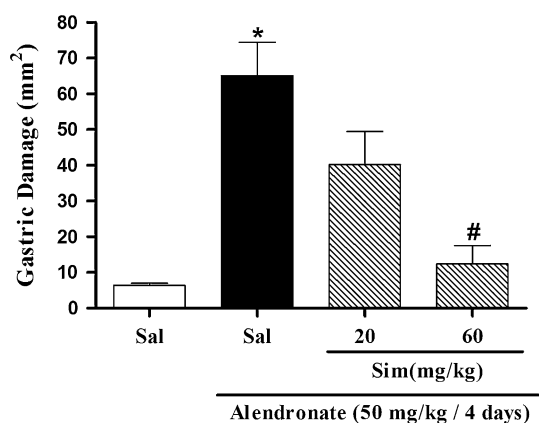


Fig. 1 Effect of simvastatin pretreatment on alendronate-induced gastric damage. After 4 days of alendronate administration, the gastric mucosa of the control rats was intensely damaged. Treatment with simvastatin (60 mg/kg, p.o.) for 7 days significantly ($P < 0.05$) improved macroscopic gastric damage. Macroscopic gastric lesions were determined 4 h after alendronate administration on the fourth day. Data are expressed as the mean \pm SEM of five–six rats per group. * $P < 0.05$ versus saline group; # $P < 0.05$ versus alendronate group, one-way ANOVA and Newman–Keuls test. ANOVA analysis of variance, SAL saline, SEM standard error of the mean, SIM simvastatin

effects caused by ALD ($^{#}P < 0.05$). The administration of SIM (72.2 ± 10.73 mmol/g tissue) also significantly reduced both the concentration of gastric mucosal MDA and the levels of lipid peroxidation caused by ALD ($^{#}P < 0.05$). Pretreatment with SIM alone has no significant effects about the levels of GSH and MDA when compared to saline group.

Myeloperoxidase Activity During Gastric Injury Alendronate

From our data, we observe that the MPO activity in the saline control group is 1.2 ± 0.35 U/mg tissue. Upon receipt of the ALD dose of 50 mg/kg, MPO levels are around 6.3 ± 0.52 U/mg tissue, a significantly different value compared to the saline group ($^{*}P < 0.05$). However, the group receiving treatment with SIM exhibited decreased MPO activity levels (2.1 ± 0.28 U/mg tissue), a significant difference compared to the group receiving the harmful agent ($^{#}P < 0.05$). This shows that SIM may reduce neutrophil infiltration in gastric lesions caused by ALD (Fig. 4).

Cytokine (TNF- α and IL-1 β) Levels During Gastric Injury Alendronate

Quantification data for the levels of pro-inflammatory cytokines at the ALD-induced lesion show that both cytokines exhibited low levels upon use of SIM. In the saline group, TNF- α and IL-1 β levels were 1313.0 ± 154.61 and

586.6 ± 28.08 pg/ml, respectively. Measured levels of TNF- α and IL-1 β in the group that received ALD were 2405.0 ± 264.02 and 901.1 ± 86.73 pg/ml, respectively, which is significantly increased compared to the saline group ($^{*}P < 0.05$). The groups treated with SIM clearly showed a significant reduction ($^{#}P < 0.05$) in the levels of the two cytokines, with TNF- α levels of 1535.0 ± 192.61 and IL-1 β levels of 525.7 ± 56.82 . This results shows that SIM is capable of reducing the levels of IL-1 β and TNF- α in the gastric damage caused by ALD (Fig. 5).

Determination of Gastric Mucus and Gastric Acid Secretion

The injury caused by ALD significantly decreased the amount of gastric mucus adherent to gastric mucosa when compared to the saline treatment. The pretreatment with SIM (60 mg/kg) reversed the effect of ALD ($^{*}P < 0.05$). Thus, SIM significantly affects the level of adherent mucus in the stomach as compared to the control group (Fig. 6).

Table 2 shows the measurements taken from the gastric contents after pylorus ligation test. ALD significantly increased the volume of gastric secretion compared to the control group (764.0 ± 41.63 , 449.1 ± 32.55 , respectively) ($^{*}P < 0.05$). In the group that was administered SIM (60 mg/kg) with ALD simultaneously, the gastric secretion levels decreased considerably when compared to the group that was administered ALD alone (512.2 ± 28.71) ($^{#}P < 0.05$), thus demonstrating the anti-secretory capability of SIM. The pH of gastric secretions was also measured, but no difference between groups was significant and all remained acidic. Meanwhile, the total acidity levels of the groups that were administered only ALD were significantly increased compared to the control group (9.2 ± 0.60 , 6.1 ± 0.50 , respectively). In the group that was administered SIM and ALD, the total gastric acidity was significantly reduced compared to the group receiving only ALD (5.9 ± 0.51 , $^{#}P < 0.05$).

Discussion

Previous studies have established the beneficial effects of statins on bone [24], and statins currently represent a near ideal candidate family of anti-osteoporotic drugs, due to their potential dual anabolic and anti-resorptive effects on bone [25]. However, the protective effects of statins on gastrointestinal toxicity associated with bisphosphonates have not yet been elucidated.

In the present study, the effect of SIM was studied on ALD-induced gastric injury in rats. Our finding that SIM-decreased ALD-induced gastropathy is consistent with those of other studies that reported that SIM-attenuated

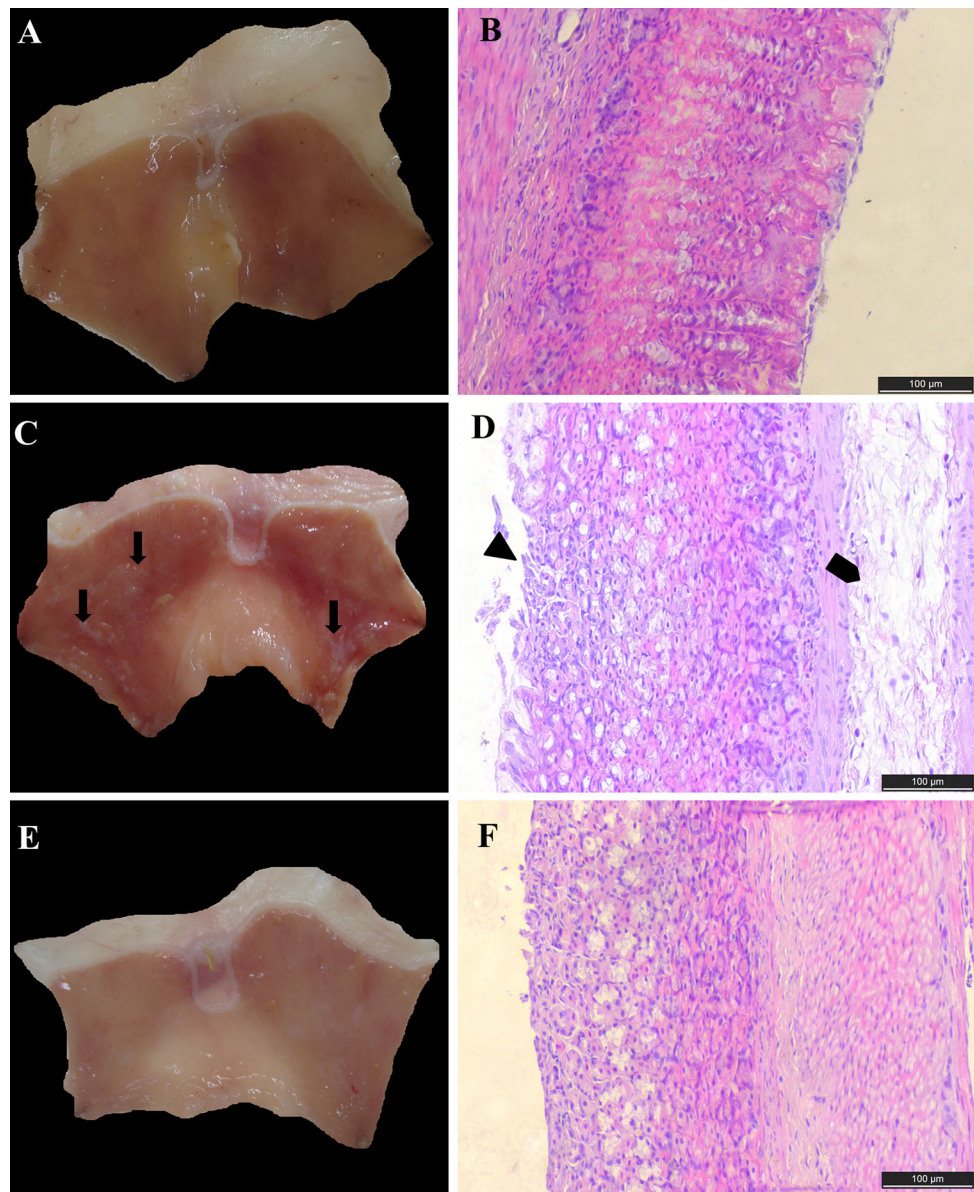


Fig. 2 Macroscopic and histopathological changes in the gastric mucosa ($\times 20$ magnification). **a, b** Control (saline) group showing gastric mucosal integrity. **c** Alendronate (50 mg/kg, p.o.) group showing widespread damage to the epithelium and cellular debris covering the luminal surface (indicated by *arrows*). **d** The microscopic analysis indicated that alendronate administration induced

lesions in the superficial gastric glandular region with epithelial cell loss (indicated by *arrowhead*) and edema (indicated by *pentagon*). **e–f** Treatment with simvastatin (60 mg/kg, p.o.) + alendronate (50 mg/kg, p.o.) reduced alendronate-induced macroscopic and microscopic lesions

NSAID and ethanol-induced gastropathies [13, 14]. Together, these findings highlight an important role of bisphosphonates in gastric protection.

Our results confirmed that ALD administration at high concentrations caused severe macroscopic gastric damage in both the corpus and antral mucosa of the stomach, and this damage was mostly localized to the epithelial surface. This injury is characterized by widespread damage to the epithelium, with the luminal surface covered in cellular debris subsequently developing into ulcers with a white cap.

Chronic oral administration of ALD also caused hemorrhagic lesions in the mucosa of the glandular stomach, indicating true ulcer formation, and this was also supported by the histopathological findings of edema, increased inflammatory cells, and epithelial cell loss [15, 16, 26].

The mechanism through which ALD and other bisphosphonates cause mucosal injury has not been clearly identified. However, ALD-induced neutrophil accumulation and subepithelial edema in the gastric mucosa have been shown to play major roles in the development of ulcers

Table 1 Protective effect of simvastatin in alendronate-induced microscopic gastric damage

Experimental group	Hemorrhagic damage (score 0–4)	Edema (score 0–4)	Epithelial cell loss (score 0–3)	Inflammatory cells (score 0–3)	Total (score 0–14)
Saline	0	0	0 (0–1)	0	0 (0–1)
Alendronate	3 (2–4) [#]	2 (1–3) [#]	2 (1–3) [#]	2 (1–2) [#]	7 (2–12)
Simvastatin + alendronate	1 (0–2) [*]	0 (0–1) [*]	1 (0–2) [*]	0 (0–1) [*]	3 (0–6) [*]

Data shown are medians with minimal and maximal scores shown in parentheses. Kruskal–Wallis nonparametric test, followed by Dunn's test, was used for multiple comparisons for histological assessment

* $P < 0.05$ when compared with alendronate group

$P < 0.05$ when compared with control group

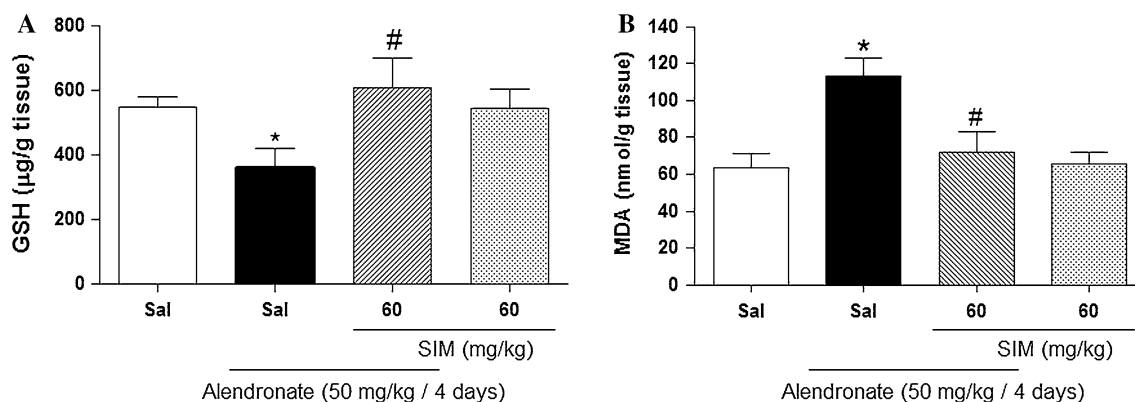


Fig. 3 Effect of simvastatin on glutathione (GSH) concentration and MDA levels in rats with alendronate-induced gastric damage. **a** Alendronate administration promoted a decrease in the GSH gastric concentration. This effect was reverted significantly when the animals were pretreated with simvastatin. **b** Alendronate promoted an increase in MDA gastric tissue levels; however, pretreatment with simvastatin

significantly prevented this effect. Results are expressed as the mean \pm SEM of at least five rats per group. * $P < 0.05$ versus saline group; # $P < 0.05$ versus alendronate group. ANOVA and Newman–Keuls test were used for evaluation. ANOVA analysis of variance, SAL saline, SEM standard error of the mean, SIM simvastatin

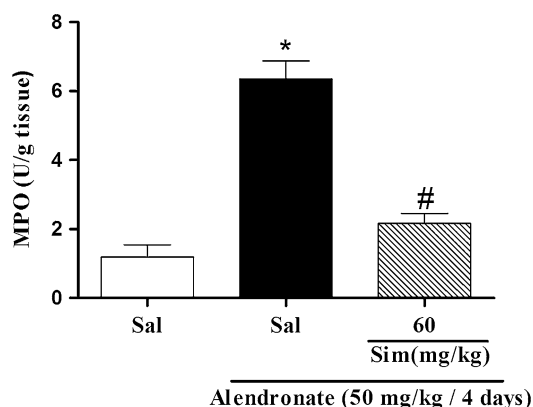


Fig. 4 Effect of simvastatin on the activity of myeloperoxidase (MPO) in gastric injury induced by alendronate. The control group was treated with saline only. The administration of simvastatin reduced alendronate-induced MPO activity. Results are expressed as the mean \pm SEM of at least five rats per group. * $P < 0.05$ versus saline group; # $P < 0.05$ versus alendronate group. ANOVA and Newman–Keuls test were used for evaluation. ANOVA analysis of variance, SAL saline, SEM standard error of the mean, SIM simvastatin

[27]. In fact, the white cap that covers the damaged mucosa is composed mainly of inflammatory cells and fibrin-like substances [28]. Other studies have reported that toxic effects of ALD in the stomach have been linked to a direct effect of this agent on the mucosal surface [28, 29]. Additionally, when ALD is applied to the gastric mucosa, it decreases transmucosal potential difference of the stomach, which is suggestive of a direct disruption of surface epithelial cells [30].

In our study, we demonstrated that SIM inhibited the ALD-induced elevation of MPO activity and the increased TNF- α and IL-1 β levels, suggesting that the gastroprotective effect of SIM may be dependent on its inhibitory effect on neutrophil infiltration and the neutrophil-associated TNF- α and IL-1 β response. In fact, several studies have shown that bisphosphonates interfere with cell migration at the site of inflammation, and this protective effect is associated with decreased production of pro-inflammatory cytokines, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 [15, 31, 32]. Similarly, studies have reported the anti-inflammatory effects of statins that have inhibitory effects on inflammatory mediators,

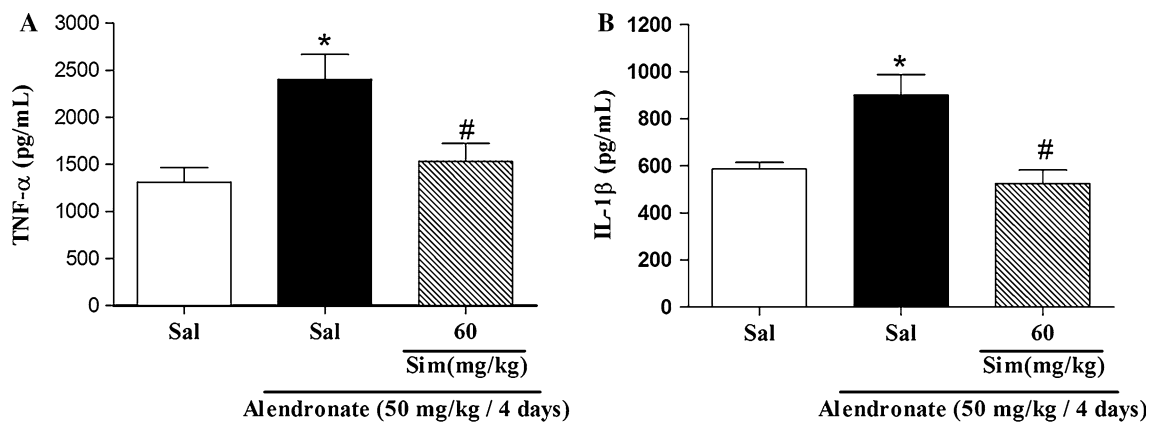


Fig. 5 Effect of simvastatin on the cytokine levels of tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-1 β in rats with alendronate-induced gastric damage. Treatment with simvastatin (60 mg/kg) decreased the levels of TNF- α and IL-1 β (a, b, respectively). The control group was treated with saline only. Results are expressed as

the mean \pm SEM of at least five rats per group. * $P < 0.05$ versus saline group; # $P < 0.05$ versus alendronate group. ANOVA and Newman–Keuls test were used for evaluation. ANOVA analysis of variance, SAL saline, SEM standard error of the mean, SIM simvastatin

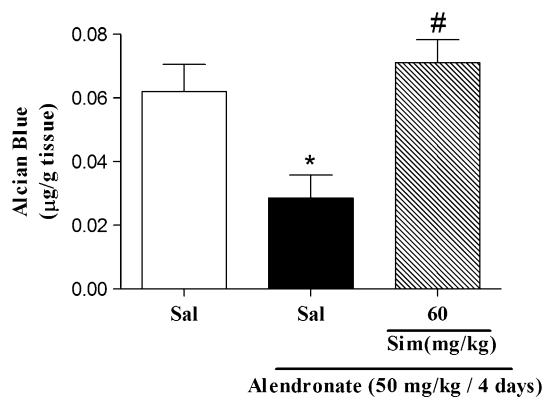


Fig. 6 Gastroprotective effect of simvastatin by evaluating levels of mucus in alendronate-induced stomach lesions. The animals were pretreated by gavage with simvastatin (60 mg/kg) or with saline solution and were administered alendronate (50 mg/kg) after 30 min. The control group was administered only saline. All drugs were administered once daily during the 4 days. Results are expressed as the mean \pm SEM of least five–seven animals per group. * $P < 0.05$ versus saline group; # $P < 0.05$ versus alendronate group. ANOVA and Newman–Keuls test were used for evaluation. ANOVA analysis of variance, SAL saline, SEM standard error of the mean, SIM simvastatin

such as ILs, interferon- γ , cytokines, and cyclooxygenase 2 [33, 34]. Multiple lines of evidence also indicate that SIM influences the expression of vascular cell adhesion molecule-I (VCAM-I) and CD14 (an inducer of mononuclear cell infiltration), resulting in additional benefits, including beneficial effects on inflammation [35, 36].

Reactive oxygen species (ROS) play a vital role in a variety of agents that induced gastric damage [37, 38]. It seems that the important primary factor in indomethacin-induced gastric damage is ROS-mediated lipid peroxidation. It was demonstrated that indomethacin causes increase in lipid peroxidation

and decrease in GSH peroxidase activity. This effect can induce gastric erosions and apoptosis by DNA fragmentation [38, 39]. Also, it has been suggested that oxygen-derived free radicals may contribute to ALD-induced gastric mucosal lesions [15, 40, 41]. However, the mechanism by which ALD generates ROS to cause mucosal damage has not yet been clarified. In fact, activated and migrating neutrophils induced by ALD are a potential source of oxygen metabolites that can contribute to gastric mucosal injury. ALD also increases the TNF- α level that causes neutrophil infiltration and activation to generate ROS [42]. Other authors verified that severity of gastric lesions induced by ALD was reduced by treatment with allopurinol, suggesting the involvement of oxyradical production in this pathogenesis [43]. Thus, it seems that the ulcerogenic response in the antrum is related to the dysfunction of the anti-oxidative mechanism.

These observations are consistent with our finding that ALD decreased GSH levels and increased MDA levels, and SIM reversed these damaging effects. This increase in lipid peroxidation may be due partly to the free radicals generated by neutrophils and direct toxic effects of ALD on the mucosal surface. It is well established that GSH is important for gastric protection against aggressive agents [44]. Substances containing sulfhydryl radicals protect the gastric mucosa in a manner similar to that of prostaglandins (PGs) and that sulfhydryl group blockers, such as diethylmaleate and iodoacetamide, reverse the gastroprotective effect of PGF2a. GSH administration also decreases ethanol-induced gastric damage by inactivating ROS and products of lipid peroxidation [44, 45]. Therefore, it is possible that SIM might decrease redox state in ALD-induced gastropathy. Thus, the mechanism through which SIM exerts its gastroprotective effect appears to involve reduction in ALD-induced lipid peroxidation in the gastric mucosa.

Table 2 Effect of pretreatment with simvastatin on gastric acid secretion

Experimental group	Volume (μ l)	Ph	Total acidity (mEq [H ⁺]/l/4 h)
Saline	449 \pm 32.5	1.5 \pm 0.3	6.1 \pm 0.5
Alendronate	764 \pm 41.6*	1.1 \pm 0.5	9.2 \pm 0.6*
Simvastatin	498 \pm 16.9	1.6 \pm 0.5	6.0 \pm 0.2
Simvastatin + alendronate	512 \pm 28.7 [#]	1.2 \pm 0.3	5.9 \pm 0.5 [#]

Data shown are mean \pm SEM of 5–7 rats

* $P < 0.05$ when compared with saline group

[#] $P < 0.05$ when compared with alendronate group

The bisphosphonate-induced damage in the stomach also is accompanied by disruption of the mucosal barrier, leading to hydrogen proton back-diffusion into the mucosa [30]. The topical irritant property of ALD is, in part, attributable to the ability of bisphosphonates to chemically associate with and destabilize the surface lining of phospholipids, resulting in a rapid disruption of the hydrophobic barrier of these tissues [46]. In this study, we confirmed that ALD significantly reduced gastric mucus production when compared with that observed for the negative control, whereas pretreatment with SIM significantly increased the amount of adherent mucus in the gastric mucosa wall. Similarly, Tariq et al. [13] demonstrated that anti-ulcer activity of SIM was associated with significant attenuation of adverse effects of ethanol on gastric wall mucus.

ALD is known to significantly increase gastric acidity when administered orally, and this increased acidity may be owing to the local irritation caused by ALD [47]. At very low pH conditions (pH < 2), ALD is in the acid form, which is known to be more irritating than the sodium salt [48]. Our results showed that SIM pretreatment reduced the total acidity and gastric pH, and these effects may contribute to their anti-ulcer activity. Therefore, by increasing the gastric pH, SIM may have prevented the ALD sodium from being converted to the acid form, thus decreasing the damaging effect of the free acid on gastric mucosa. Other studies indicate that SIM-induced gastroprotective effects may be attributed to its ability to reduce acidity [13], and this effect may be associated with an increase in endogenous nitric oxide production induced by SIM [49, 50]. In fact, the consensus seems to be that NO inhibits acid secretion under basal and stimulated conditions in several animal species [51–53], and recently, we demonstrated that eNOS- and iNOS-derived NO prevents ALD-induced gastric damage [15] and alterations in gastric emptying in rats [54].

Conclusions

In conclusion, the findings of this study clearly demonstrate the protective effects of SIM against ALD-induced gastric ulceration. Maintenance of mucosal integrity, inhibition of

neutrophil activity, and reduced oxidative stress associated with decreased gastric acidity explain the gastroprotective effects of SIM. These properties of SIM warrant its safe use as an anti-hyperlipidemic drug, for gastroprotective effects, or for the improvement of bone health in combination with bisphosphonates.

Acknowledgments The authors gratefully acknowledge the financial support from National Counsel of Technological and Scientific Development—CNPq (Brazil) and Research Foundation for the State of Piauí—FAPEPI.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest None.

Ethical standard All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.

References

1. Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest.* 2005;15:3318–3325.
2. Fleisch H. *Bisphosphonates in Bone Disease: From the Laboratory to the Patient.* New York: The Parthenon Group; 1997: 32–163.
3. Chestnut CH, McClung MR, Ensrud KE, et al. Alendronate treatment of the postmenopausal osteoporotic woman: effect of multiple dosages on bone mass and bone remodeling. *Am J Med.* 1995;29:144–152.
4. Groen PC, Lubbe DF, Hirsch LJ, et al. Esophagitis associated with the use of alendronate. *N Engl J Med.* 1996;335:1016–1021.
5. Stein EA. Management of dyslipidemia in the high-risk patient. *Am Heart J.* 2002;144:43–50.
6. Beek E, Lowik C, Pluijm G, et al. The role of geranylgeranylation in bone resorption and its suppression by bisphosphonates in fetal bone explants in vitro: a clue to the mechanism of action of nitrogen-containing bisphosphonates. *J Bone Miner Res.* 1999; 14:722–729.
7. Mundy G, Garrett R, Harris S, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science.* 1999;286: 1946–1949.
8. Meier CR, Schlienger RG, Kraenzlin ME, et al. HMG CoA reductase inhibitors and the risk of fractures. *JAMA.* 2000; 283:3205–3210.
9. Wang PS, Solomon DH, Mogun H, et al. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of hip fractures in elderly patients. *JAMA.* 2000;283:3211–3216.

10. Scalia R, Gooszen ME, Jones SP, et al. Simvastatin exerts both anti-inflammatory and cardioprotective effects in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2001;103:2598–2603.
11. Pruefer D, Scalia R, Lefer AM. Simvastatin inhibits leukocytes–endothelial cell interactions and protects against inflammatory processes in normocholesterolemic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:2894–2900.
12. Ungureanu D, Filip C, Artenie A, Artenie R. Evaluation of simvastatin antioxidant effects. *Rev Med Chir Soc Med Nat*. 2003;107:66–71.
13. Tariq M, Khan HA, Elfaki I, et al. Gastric antisecretory and antiulcer effects of simvastatin in rats. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22:2316–2323.
14. Heeba GH, Hassan MKA, Amin RS. Gastroprotective effect of simvastatin against indomethacin-induced gastric ulcer in rats: role of nitric oxide and prostaglandins. *Eur J Pharmacol*. 2009;607:188–193.
15. Silva RO, Lucetti LT, Wong DVT, et al. Alendronate induces gastric damage by reducing nitric oxide synthase expression and NO/cGMP/KATP signaling pathway. *Nitric Oxide*. 2014;40:22–30.
16. Costa NRD, Silva RO, Nicolau LA, et al. Role of soluble guanylate cyclase activation in the gastro protective effect of the HO-1/CO pathway against alendronate-induced gastric damage in rats. *Eur J Pharmacol*. 2013;700:51–59.
17. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*. 1968;25:192–205.
18. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*. 1978;86:271–278.
19. Bradley PP, Christensen RD, Rothstein G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood*. 1982;60:618–622.
20. Cunha FQ, Boukili MA, Motta JI, Vargaftig BB, Ferreira SH. Blockade by fenspiride of endotoxin-induced neutrophil migration in the rat. *Eur J Pharmacol*. 1993;238:47–52.
21. Laine L, Weinstein WM. Histology of alcoholic hemorrhagic “gastritis”: a prospective evaluation. *Gastroenterology*. 1988;94:1254–1262.
22. Corne SJ, Morrissey SM, Woods RJ. Proceedings: a method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. *J Physiol*. 1974;242:116–117.
23. Shay H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterology*. 1945;5:43–61.
24. Jadhav SB, Jain GK. Statins and osteoporosis: new role for old drugs. *J Pharm Pharmacol*. 2006;58:3–18.
25. Uzzan B, Cohen R, Nicolas P, et al. Effects of statins on bone mineral density: a meta-analysis of clinical studies. *Bone*. 2007;40:1581–1587.
26. Nicolau LAD, Silva RO, Damasceno SRB, et al. The hydrogen sulfide donor, Lawesson's reagent, prevents alendronate-induced gastric damage in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2013;46:708–714.
27. Wallace JL, Dickey M, Mcknight W, et al. N-bisphosphonates cause gastric epithelial injury independent of effects on the microcirculation. *Aliment Pharmacol Ther*. 1999;13:1675–1682.
28. Ohashi Y, Aihara E, Takasuka H, Takahashi K, Takeuchi K. Antral ulcers induced by alendronate, a nitrogen-containing bisphosphonate, in rat stomachs—prophylactic effect of rebamipide. *J Physiol Pharmacol*. 2009;60:85–93.
29. Wallace JL, Ma L. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. *Exp Biol Med*. 2001;226:1003–1015.
30. Kanatsu K, Aihara E, Okayama M, Kato S, Takeuchi K. Mucosal irritative and healing impairment action of risedronate in rat stomachs: comparison with alendronate. *J Gastroenterol Hepatol*. 2004;19:512–520.
31. Thiebaud D, Sauty A, Burckhard A, et al. An in vitro and in vivo study of cytokines in the acute-phase response associated with bisphosphonates. *Calcif Tissue Int*. 1997;61:386–392.
32. Yamaguchi K, Motegi M, Iwakura Y, Endo Y. Involvement of interleukin-1 in the inflammatory actions of aminobisphosphonates in mice. *Br J Pharmacol*. 2000;130:1646–1654.
33. Weitz-Schmidt G. Statins as anti-inflammatory agents. *Trends Pharmacol Sci*. 2002;23:482–487.
34. Schönbeck U, Libby P. Inflammation, immunity, and HMG-CoA reductase inhibitors: statins as antiinflammatory agents? *Circulation*. 2004;109:II18–II26.
35. Sager PT, Melani L, Lipka J, et al. Effect of coadministration of ezetimibe and simvastatin on high-sensitivity C-reactive protein. *Am J Cardiol*. 2003;15:1414–1418.
36. Bracht L, Barbosa CP, Caparroz-Assef SM, et al. Effects of simvastatin, atorvastatin, ezetimibe, and ezetimibe+ simvastatin combination on the inflammatory process and on the liver metabolic changes of arthritic rats. *Basic Clin Pharmacol*. 2012;26:722–734.
37. Vaananen PM, Medding JB, Wallace JL. Role of oxygen derived free radicals in indomethacin-induced gastric injury. *Am J Physiol*. 1991;261:G470–G475.
38. Yoshikawa T, Naito Y, Kishi A, et al. Role of active oxygen, lipid peroxidation and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats. *Gut*. 1993;34:732–737.
39. Chattopadhyay I, Bandyopadhyay U, Biswas K, Maity P, Banerjee RK. Indomethacin inactivates gastric peroxidase to induced reactive-oxygen-mediated gastric mucosal injury and curcumin protects it by preventing peroxidase inactivation and scavenging reactive oxygen. *Free Radic Biol Med*. 2006;40:1397–1408.
40. Sener G, Paskaloglu K, Kapucu C, Cetinel S, Contuk G, Ayanoglu-Dulger G. Octreotide ameliorates alendronate-induced gastric injury. *Peptides*. 2004;25:115–121.
41. Sener G, Kapucu C, Cetinel S, Cikler E, Ayanoglu-Dulger RG. Gastroprotective effect of leukotriene receptor blocker montelukast in alendronate-induced lesions of the rat gastric mucosa. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005;72:1–11.
42. Wallace JL, Keenan CM, Granger DN. Gastric ulceration induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is a neutrophil dependent process. *Am J Physiol*. 1990;259:G462–G467.
43. Ohashi Y, Aihara E, Amagase K, Takeuchi K. Induction of antral ulcers by alendronate, a nitrogen-containing bisphosphonate, in rat stomachs (abstract). *Gastroenterology*. 2008;134:A-237.
44. Szabo S, Trier JS, Frankel PW. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. *Science*. 1981;214:200–202.
45. Szabo S, Nagy L, Plebani M. Glutathione, protein sulfhydryls and cysteine proteases in gastric mucosal injury and protection. *Clin Chim Acta*. 1992;206:95–105.
46. Lichtenberger LM, Romero JJ, Gibson GW, Blank MA. Effect of bisphosphonates on surface hydrophobicity and phosphatidylcholine concentration of rodent gastric mucosa. *Dig Dis Sci*. 2000;45:1792–1801.
47. Sener G, Goren FO, Ulosoy NB, Ersoy Y, Arbak S, Dulger GA. Protective effect of melatonin and omeprazole against alendronate-induced gastric damage. *Dig Dis Sci*. 2005;50:1506–1512.
48. Peter CP, Handt LK, Smith SM. Esophageal irritation due to alendronate sodium tablets. *Dig Dis Sci*. 2002;43:1998–2002.
49. Dobrucki LE, Kalinowski L, Dobrucki IT, Malinski T. Statin-stimulated nitric oxide release from endothelium. *Med Sci Monit*. 2001;7:622–627.
50. Jiang JL, Jiang DJ, Tang YH, Li NS, Deng HW, Li YJ. Effect of simvastatin on endothelium-dependent vaso-relaxation and endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *Acta Pharmacol Sin*. 2004;25:893–901.

51. Kim H, Kim KH. Effects of a nitric oxide donor and nitric oxide synthase inhibitors on acid secretion of isolated rabbit gastric glands. *Pharmacology*. 1996;53:331–339.
52. Kato S, Kitamura M, Korolkiewicz RP, Takeuchi K. Role of nitric oxide in regulation of gastric acid secretion in rats: effects of NO donors and NO synthase inhibitor. *Br J Pharmacol*. 1998;123:839–846.
53. Berg A, Redeen S, Ericson AC, Sjöstrand SE. Nitric oxide—an endogenous inhibitor of gastric acid secretion in isolated human gastric glands. *BMC Gastroenterol*. 2004;4:1–9.
54. Silva RO, Bingana RD, Soares PMG, Souza MHL, Medeiros JVR. The role of nitric oxide in alendronate-mediated acceleration of gastric emptying and gastrointestinal transit in rats. *Afr J Pharm Pharmacol*. 2015;9:307–312.

ANEXO B

Artigo publicado com os dados referentes a um projeto paralelo durante o mestrado.

Research Article

Gastroprotective Properties of Cashew Gum, a Complex Heteropolysaccharide of *Anacardium occidentale*, in Naproxen-Induced Gastrointestinal Damage in Rats

Nathalia S. Carvalho,¹ Mônica M. Silva,² Renan O. Silva,³ Lucas A. D. Nicolau,¹ Francisca Beatriz M. Sousa,² Samara R. B. Damasceno,³ Durcilene A. Silva,² André L. R. Barbosa,^{1,2} José Roberto S. A. Leite,^{1,2} and Jand Venes R. Medeiros^{1,2*}

¹Post-Graduation Program in Pharmacology, Federal University of Piauí, Teresina, PI, Brazil

²Post-Graduation Program in Biotechnology, Biotechnology and Biodiversity Center Research (BIOTEC), Federal University of Piauí, 64204-260, Parnaíba, PI, Brazil

³Post-Graduation Program in Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

Strategy, Management and Health Policy				
Enabling Technology, Genomics, Proteomics	Preclinical Research	Preclinical Development Toxicology, Formulation Drug Delivery, Pharmacokinetics	Clinical Development Phases I-III Regulatory, Quality, Manufacturing	Postmarketing Phase IV

ABSTRACT Long-term use nonsteroidal anti-inflammatory drug is associated with gastrointestinal (GI) lesion formation. The aim of this study was to investigate the protective activity of cashew gum (CG), a complex heteropolysaccharide extracted from *Anacardium occidentale* on naproxen (NAP)-induced GI damage. Male Wistar rats were pretreated with vehicle or CG (1, 3, 10, and 30 mg/kg, p.o.) twice daily for 2 days; after 1 h, NAP (80 mg/kg, p.o.) was administered. The rats were euthanized on the 2nd day of treatment, 4 h after NAP administration. Stomach lesions were measured using digital calipers. The medial small intestine was used for the evaluation of macroscopic lesion scores. Samples of the stomach and the intestine were used for histological evaluation, and assays for glutathione (GSH), malonyldialdehyde (MDA), and myeloperoxidase (MPO). Additional rats were used to measure gastric mucus and secretion. Pretreatment with CG reduced the macroscopic and microscopic damage induced by NAP. CG significantly attenuated NAP-induced alterations in MPO, GSH, and MDA levels. Furthermore, CG returned adherent mucus levels to normal values. These results suggest that CG has a protective effect against GI damage via mechanisms that involve the inhibition of inflammation and increasing the amount of adherent mucus in mucosa. Drug Dev Res 73 : 143–151, 2015. © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: Anacardiaceae; polysaccharide; antioxidant; nonsteroidal anti-inflammatory drugs

INTRODUCTION

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are a major class of drug widely used as anti-inflammatory, antipyretic, and analgesic agents. However, chronic treatment with NSAIDs is associated with several adverse effects [Wallace et al., 2000; Tanaka et al., 2001]. Naproxen (NAP), a commonly prescribed NSAID, is often associated with gastric and enteropathic lesions [Aadland et al., 1987] a property attributed to factors that include neutrophil

*Correspondence to: Jand Venes Rolim Medeiros, LAF-FEX/BIOTEC/UFPI, Av. São Sebastião, n° 2819, CEP 64202-020, Parnaíba, PI, Brazil. E-mail: jandvenes@ufpi.edu.br

Received 20 February 2015; Accepted 26 March 2015

Funding: National Council of Technological and Scientific Development—CNPq (Brazil) and Research foundation for the State of Piauí—FAPEPI.

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/ddr.21250

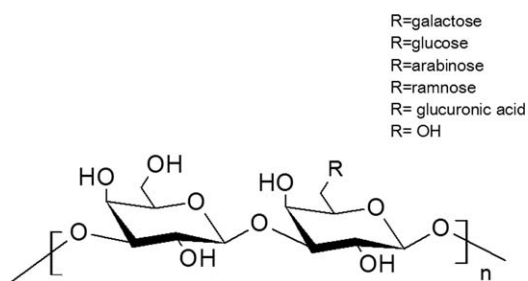


Fig. 1. Chemical composition of CG.

activation, deficiency of endogenous prostaglandins (PGs), and increased production of oxygen free radicals [Tanaka et al., 2001]. These findings have stimulated considerable research into the discovery and development of new therapeutic substances that have a reduced incidence of adverse effects.

In recent years, there has been a renewed focus on natural products as potential therapeutics. Of particular interest is cashew gum (CG), a natural product derived from the *Anacardium occidentale* L. tree, a member of the family *Anacardiaceae*, which is abundant in northeastern Brazil. CG can be extracted by making incisions in the trunk or the branches of trees and is a nontoxic acidic polysaccharide (PLS) complex, composed of a main β -galactose (1 \rightarrow 3) chain with branches of β -galactose (1 \rightarrow 6) and terminal residues of glucuronic acid, arabinose, rhamnose, 4-O-methylglucuronic acid, xylose, glucose, and mannose (Fig. 1) [De Paula et al., 1998]. It exhibits anti-inflammatory activity and has potential curative properties [Schirato et al., 2006] attracting considerable interest as it is inexpensive to produce and is biodegradable [Gyedu-Akoto et al., 2008].

PLSs have a number of biological properties, including antinociceptive [Yuvaraj et al., 2013], anti-inflammatory [Batista et al., 2014], and gastroprotective activities [Silva et al., 2012]. However, no studies to date have linked the therapeutic potential of CG to gastrointestinal (GI) tract disorders associated with NSAID use. Thus, the aim of this study was to investigate the protective effect of CG on NAP-induced GI damage in rats.

METHODS AND MATERIALS

Drugs and Chemicals

NAP, carboxymethylcellulose (CMC), omeprazol, histamine, and ranitidine were purchased from Sigma Chemical (Saint Louis, MO). NAP was dissolved in 0.5% CMC w/v. CG was dissolved in 0.9% NaCl. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

Extraction of CG

Crude samples were collected from the trunk of *A. occidentale* trees found in the municipality of Ilha Grande de Santa Isabel, Piauí, Brazil and purified as a sodium salt using as previously described with adaptations [De Paula et al., 1998]. After purification, samples of CG were solubilized in ultrapure water under stirring for 2 h and filtered through sintered glass under vacuum. CG contain edgalactose (59.4%) as major component as well as glucose (6.4%), arabinose (5.3%), rhamnose (2.4%), and glucuronic acid (13.5%) [Araújo et al., 2012].

Animals

Male Wistar rats, weighing 100–150g were obtained from the Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará. All animals were housed in temperature-controlled rooms and received water and food ad libitum. The animals were deprived of food for 18–24 h before the experimentation, but had free access to water. All surgical procedures and animal treatments were conducted in accordance with the *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (National Institutes of Health, Bethesda, MD) and were approved by the local ethics committee (Protocol No. 0066/10).

Effect of CG on NAP-Induced Gastrointestinal Damage

Rats were pretreated with 0.5% CMC (vehicle) or CG (CG: 1, 3, 10, and 30 mg/kg) twice per day (at 09:00 and 21:00) for 2 days. One hour after CG administration, NAP (80 mg/kg, p.o.) was administered (at 10:00 and 22:00) for 2 days as described with modifications [Silva et al., 2012]. Control groups received only vehicle or vehicle + NAP. The rats were killed on the second day, 4 h after NAP treatment. The stomachs were promptly excised, opened along the greater curvature, and washed with 0.9% saline. GI damage was measured using digital calipers (Mitutoyo). To study intestinal damage the abdomens were opened, and after identification of the intestine, a 5-cm portion of the medial small intestine was removed, washed with 0.9% saline, and pinned onto a wax block for the evaluation of macroscopic damage by the criteria described by Morris et al. [1989]. All scoring of damage was performed in a randomized manner by a blinded observer. Samples of the stomachs and small intestine were fixed in 10% formalin immediately after removal for subsequent histological evaluation. Others samples were then weighed, frozen, and stored at -70°C until assayed for

measurement of glutathione (GSH) levels [Sedlak and Lindsay, 1968], malonyldialdehyde (MDA) concentration [Mihara and Uchiyama, 1978], and myeloperoxidase (MPO) activity [Bradley et al., 1982].

Histological Evaluation of Gastric Damage

For histological evaluation, stomach samples were fixed in 10% formalin solution for 24 h. After fixation, samples were transferred to a solution of 70% alcohol. The material was then embedded in paraffin and sectioned; 4-mm thick sections were deparaffinized, stained with hematoxylin and eosin (H & E), and then examined under a light microscope by an experienced pathologist without knowledge of the treatments. Specimens were assessed according to the criteria described by Laine and Weinstein [1988].

Intestinal Morphometric Analysis

Morphometric analysis was performed using slides stained with H & E on a light microscope equipped with a high-resolution Leica DFC 320 digital camera (Wetzlar, Germany) connected to a computer with an image capture program, as described [Silva et al., 2012]. An Average of 8–10 different linear measurements of crypt depth and villus height were recorded. The height of the villus was measured from the top to the bottom, corresponding to the junction of the crypt and villus. The depth of the crypts was defined as the invagination between adjacent villi.

GSH Levels

Concentrations of GSH in samples of the stomach and small intestine tissues were estimated as described by Sedlak and Lindsay [1968]. A segment from each organ was homogenized in 5 mL of cold 0.02 M Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) solution (1 mL per 100 mg/tissue). Aliquots (400 μ L) of the tissue homogenate were mixed with 320 mL of distilled water and 80 mL of 50% (w/v) trichloroacetic acid in glass tubes and centrifuged at 3000 rpm for 15 min. Next, 400 μ L of each supernatant was mixed with 800 μ L of Tris buffer (0.4 M, pH 8.9) and 20 mL of 0.01 M 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). The samples were stirred for 3 min and assayed on a spectrophotometer at 412 nm. GSH concentration was determined using a reduced GSH standard curve, which was generated in parallel. The results are expressed as micrograms of GSH per gram of tissue.

MDA Concentration

MDA levels in the homogenate from each group were measured as described by Mihara and

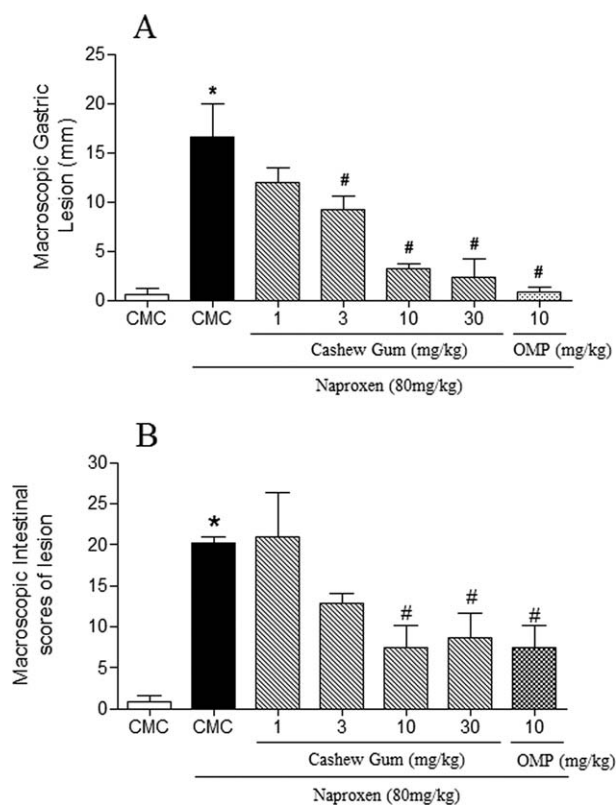


Fig. 2. Effect of CG (10 mg/kg) extracted from *A. occidentale*, on NAP-induced gastric (A) and intestinal damage (B). Rats were treated by gavage with CMC: control, CG (1, 3, 10 and 30 mg/kg), or omeprazole (10 mg/kg) twice daily at 12 hourly intervals for two days. After 30 min, NAP (80 mg/kg) was administered by gavage. Data are presented as mean \pm Standard error of the mean (SEM) of 5–7 rats per group. Results were analyzed by ANOVA followed by Newman-Keuls as the post hoc test. Significant differences: * $P < 0.05$ vs. CMC group; # $P < 0.05$ vs. NAP group.

Uchiyama [1978], which is based on reaction with thiobarbituric acid. Fragments of the gastric mucosa and small intestine (100–150 mg) were homogenized with cold 1.15% KCL to prepare 10% homogenates. Briefly, 250 μ L of each homogenate was added to 1.5 mL of 1% phosphoric acid (H_3PO_4) and 0.5 mL of 0.6% tert-butyl alcohol (aqueous solution). Then, this mixture was stirred and heated in a boiling water bath for 45 min. The mixture was cooled immediately in an ice water bath followed by the addition of 4 mL of n-butanol. This mixture was shaken and the butanol layer separated by centrifugation at $1200 \times g$ for 10 min. Optical density was determined at 535 and 520 nm, and the optical density difference between the two determinations was calculated as the tert-butyl alcohol value. MDA concentrations were expressed as millimoles per gram of tissue.

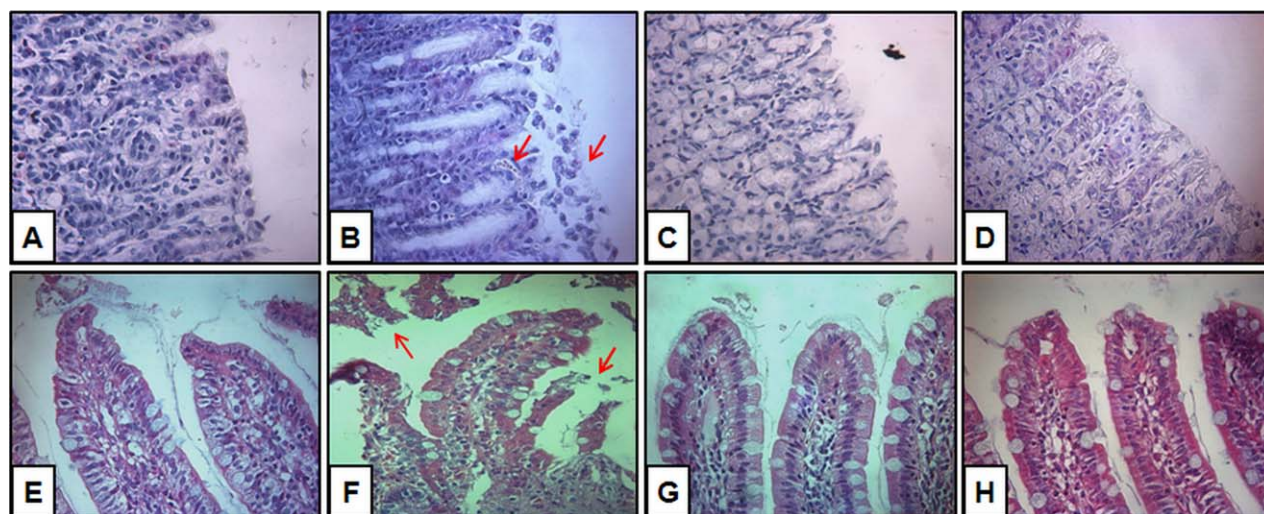


Fig. 3. Photomicrographs of gastric mucosa and medial intestine (magnification, 400 \times): (A) and (E) show the effects of CMC: control in gastric mucosa and medial intestine, respectively. (B) and (F) show the gastric mucosa and medial intestine, respectively, and disruption of the superficial region of the gastric gland with epithelial cell loss and intense hemorrhage in rats treated with NAP (80 mg/kg, p.o., twice daily for two days). (C) and (G) show the gastric mucosa and medial intestine, respectively, and preservation of the gastric mucosa in rats treated with NAP + CG (10 mg/kg). (D) and (H) show the gastric mucosa and medial intestine, respectively, and preservation of the gastric mucosa of rats treated with NAP + omeprazole (10 mg/kg). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com].

MPO Activity

MPO is an enzyme found primarily in neutrophil azurophilic granules and has been used extensively as a biochemical marker for granulocyte infiltration into various tissues, including the GI tract. The extent of neutrophil accumulation in the gastric mucosa and small intestine was measured by assaying MPO activity [Bradley et al., 1982]. Briefly, 50–100 mg of tissue was homogenized in 1 mL of potassium buffer with 0.5% of hexadecyltrimethylammonium bromide per 50 mg of tissue. The homogenate was centrifuged at 40,000 \times g for 7 min at 4 $^{\circ}$ C. MPO activity in the resuspended pellet was assayed by measuring the change in absorbance at 450 nm using o-dianisidine dihydrochloride and 1% hydrogen peroxide. Results were reported as MPO units per mg of tissue. A unit of MPO activity was defined as that converting 1 mmol of hydrogen peroxide to water in 1 min at 22 $^{\circ}$ C.

Gastric Acid Secretion

First, pylorus ligation was performed under inhalation anesthesia, and CMC and CG (10 mg/kg, i.p.) were administered. In another group, gastric acid secretion in pylorus-ligated mice was induced by histamine (5 mg/kg, i.p.) or ranitidine (5 mg/kg, i.p.). After 4 h, animals were sacrificed by deep inhalation anesthesia, the stomachs were opened, and the gastric contents were collected. The final volume and

pH were directly determined after washing the mucosal side of the stomach with 2 mL of distilled water. Total acidity of the gastric juice was titrated with 0.01 N NaOH, using 2% phenolphthalein as an indicator [Shay et al., 1945].

Measurement of the Amount of Mucus Adhered to the Gastric Wall

The mucus adhering to the gastric wall in the NAP-induced damage model was determined as described by Corne et al., [1974]. Glandular segments from the stomachs were collected and weighed. Each segment was transferred to 1% Alcian blue solution (0.16 M sucrose in 0.05 M sodium acetate, pH 5.8). Excess dye was removed by washing the segments with 0.25 M sucrose solution. The mucus dye complex was extracted by placing the segments in 0.5 M MgCl₂ for 2 h. The dye extract was mixed with diethyl ether, centrifuged at 1400 \times g for 10 min, and absorbance of the supernatants was measured at 598 nm. The quantity of extracted Alcian blue (mg/g of glandular tissue) was then calculated using a standard curve for Alcian blue.

Statistical Analysis

Data were reported as either means \pm SEM or median, as appropriate. Analysis of Variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls test was used to compare means and Kruskal-Wallis

TABLE 1. Effect of CG 10 mg/kg Extracted from *A. occidentale* L. on NAP-Induced Microscopic Gastric Damage

Experimental group (N = 5)	Hemorrhagic damage (score, 0–4)	Edema (score, 0–4)	Epithelial cell loss (score, 0–3)	Inflammatory cells (score, 0–3)	Total (score, 0–14)
CMC	0 (0–1)	0	0	0	0
NAP	2 (2–3)	2 (2–3)	3 (2–3)	2 (2–3)	9 (9–11)
NAP + CG (10 mg/kg)	1 (0–2)	1 (0–1)*	0 (0–1)*	0 (0–1)*	3 (0–5)*
Omeprazole	0 (0–1)*	0 (0–1)*	0 (0–1)*	0 (0–1)*	1 (0–4)*

Data shown are expressed as mean \pm SEM ($n = 5$).

* $P < 0.05$ vs. NAP group; # $P < 0.05$ vs. CMC group. Analysis of variance (ANOVA) and Newman-Keuls test.

nonparametric test, followed by Dunn's test to compare medians; $P < 0.05$ was defined as statistically significant.

RESULTS

Macroscopic Evaluation

We confirmed that treatment of rats with NAP for two days led to the formation of severe macroscopic gastric and intestinal lesions (16.55 ± 3.455 mm and 18.33 ± 1.308 mm lesion scores, respectively). Our results show that CG prevented NAP-induced macroscopic GI damage in a dose-dependent manner (Fig. 2). The maximal effective dose of CG was 10 mg/kg, which led to 81% and 59% lesion inhibition in the stomach and medial intestine, respectively. As a 10 mg/kg dose of CG afforded the most protection against gastric lesions induced by NAP, this dose was used to study the possible mechanisms of action involved in CG-mediated gastroprotection.

Microscopic Evaluation

The gastroprotective effect of 10 mg/kg CG was confirmed by histological analysis (Fig. 3 and Table 1). Microscopic analysis revealed that NAP increased hemorrhagic damage, edema, epithelial cell loss, and inflammatory cell infiltration. In contrast, pretreatment with CG significantly decreased inflammatory cell infiltration, edema formation, and the epithelial cell loss induced by NAP (Fig. 3 and Table 1). Significant villi shortening (Fig. 4A) and increased crypt depth (Fig. 4B) were observed in the medial intestine of rats treated with NAP (80 mg/kg, p.o.) twice daily for two days. However, when rats were pretreated with CG, we observed a complete reversal of these morphometric alterations in the medial intestine (Fig. 4A, B). Thus, analysis of macroscopic and microscopic findings revealed an excellent correlation, confirming the efficacy of CG.

Biochemical Analyses

We observed significantly increased levels of MPO in the stomach (12.34 ± 2.424 U/mg tissue) and the medial intestine (24.89 ± 5.842 U/mg tissue) of NAP-treated rats as compared with the control group

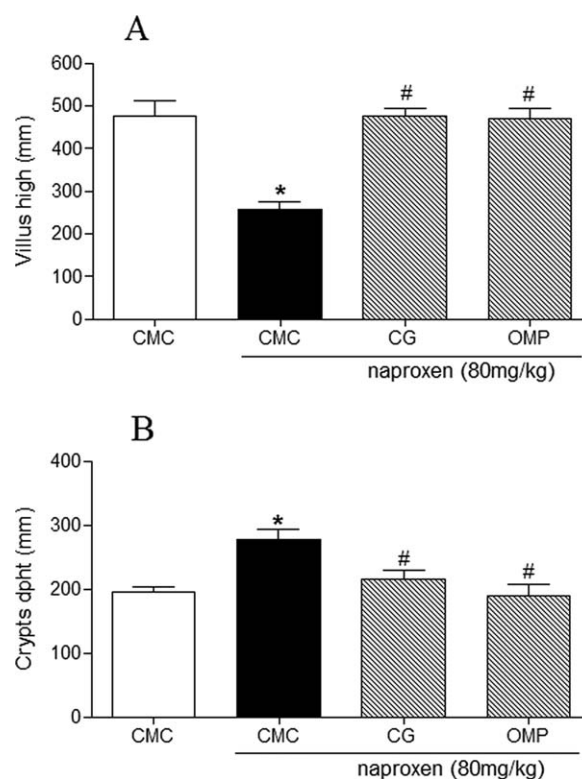


Fig. 4. Morphometric analyses of the medial intestine tissues in rats ($n = 6$) treated with NAP alone or NAP + CG. Rats were treated by gavage with CMC: control or CG (10 mg/kg) twice daily at 12 hourly intervals for two days. After 30 min, NAP (80 mg/kg) was administered by gavage. On the second day, 4 h after NAP administration, rats were euthanized, and segments of the medial intestine were collected for the measurement of villus height (A) and crypt depth (B). Results were analyzed by ANOVA followed by Newman-Keuls as the post hoc test. Significant differences: * $P < 0.05$ vs. control group; # $P < 0.05$ vs. NAP group.

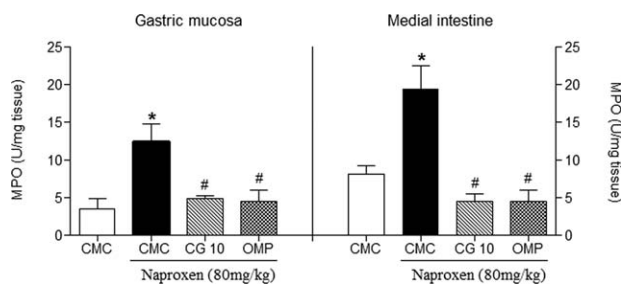


Fig. 5. Effect of the CG extracted from *A. occidentale* on gastric MPO activity in a rat model of NAP-induced GI damage. Rats were treated by gavage with CMC: control, CG (10 mg/kg), or omeprazole (10 mg/kg) twice daily at 12 hourly intervals for two days. After 30 min, NAP (80 mg/kg) was administered by gavage. Data are presented as mean \pm SEM of 5–7 rats per group. Results were analyzed by ANOVA followed by Newman-Keuls as the post hoc test. Significant differences: * $P < 0.05$ vs. control group; # $P < 0.05$ vs. NAP group.

(Fig. 5 and Table 2). However, pretreatment with 10 mg/kg CG attenuated the NAP-induced increase in MPO activity in both the stomach (4.906 ± 0.3453 U/mg tissue) and the intestine (4.526 ± 1.013 U/mg of tissue, $n = 5$). Therefore, CG may protect the GI tract by reducing the recruitment of leukocytes, thereby hindering superoxide anion production.

Compared with untreated controls, NAP reduced GSH levels (76.79 ± 11.70 mg/g tissue) and increased the concentration of gastric mucosal MDA (157.3 ± 18.10 nmol/g tissue) in the stomachs of rats exposed to the NSAID (Figs. 6 and 7, respectively). Pretreatment with CG (10 mg/kg) reversed the effects of NAP and returned GSH levels (189.5 ± 8.170 mg/g tissue) and gastric mucosal MDA concentrations (80.80 ± 5.374 nmol/g tissue) to values similar to those observed in control rats (Fig. 4). A similar finding was observed in the medial intestine.

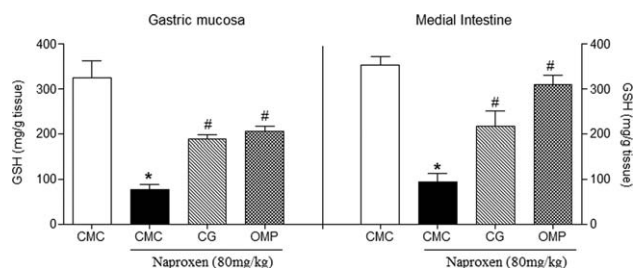


Fig. 6. Effect of the CG (10 mg/kg) extracted from *A. occidentale* on GSH levels in rats with NAP-induced GI damage. Rats were treated by gavage with CMC: control, CG (10 mg/kg), or omeprazole (10 mg/kg) twice daily at 12 hourly intervals for two days. After 30 min, NAP (80 mg/kg) was administered by gavage. Data are presented as mean \pm SEM of 5–7 rats per group. Results were analyzed by ANOVA followed by Newman-Keuls as the post hoc test. Significant differences: * $P < 0.05$ vs. control group; # $P < 0.05$ vs. NAP group.

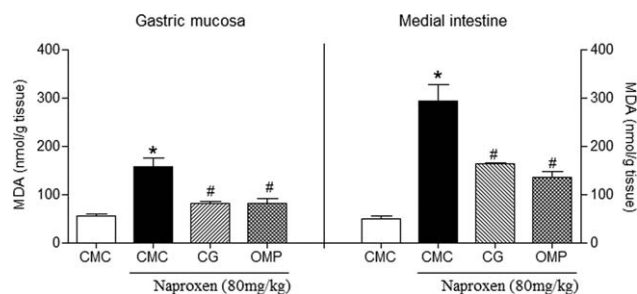


Fig. 7. Effect of the CG (10 mg/kg) extracted from *A. occidentale* on malondialdehyde (MDA) concentration in rats with NAP-induced GI damage. Rats were treated by gavage with CMC: control, CG (10 mg/kg), or omeprazole (10 mg/kg) twice daily at 12 hourly intervals for two days. After 30 min, NAP (80 mg/kg) was administered by gavage. Data are presented as mean \pm SEM of 5–7 rats per group. Results were analyzed by ANOVA followed by Newman-Keuls as the post hoc test. Significant differences: * $P < 0.05$ vs. control group; # $P < 0.05$ vs. NAP group.

Compared with GSH levels and MDA concentrations in the NAP group (93.13 ± 20.04 mg/g tissue and 292.7 ± 34.51 nmol/g tissue, respectively), rats pretreated with CG (10 mg/kg) showed inhibition of GSH level depletion (217.7 ± 32.97 mg/g tissue) and reduction in MDA concentration (162.5 ± 2.681 nmol/g tissue) in the small intestine (Figs. 6 and Table 2). These results suggested that the gastroprotective effect of CG involves aspects of oxidative stress and its blockade.

Physiological Analysis

As presented (Table 3), NAP decreased the amount of adherent gastric mucus (0.0224 ± 0.0057 $\mu\text{g/g}$ tissue) when compared with the CMC control group. However, pretreatment with CG (10 mg/kg) inhibited this effect of NAP and returned adherent gastric mucus values to 0.0652 ± 0.0127 $\mu\text{g/g}$ tissue. Therefore, CG-pretreatment returned mucus levels to values similar to those observed in control rats.

No changes in biochemical parameters of gastric secretion, for example, volume, pH, and total acidity, were observed between controls and rats pretreated with CG (10 mg/kg). In contrast, the histamine-2 receptor antagonist, ranitidine, reduced gastric juice volume, and increased total acidity compared with rats that received CMC (Table 3).

DISCUSSION

NSAIDs are an important class of drugs, and widely prescribed for patients because of their anti-inflammatory, antipyretic, and analgesic properties. However, chronic use of NSAIDs can lead to serious damage to the GI tract. The mechanism by which

TABLE 2. Effects of CG (10 mg/kg) Extracted from *A. occidentale* L. on MPO, GSH, and MDA levels in NAP-induced GI Damage

Tissue	Experimental group	GSH ($\mu\text{g/g}$ tissue)	MDA (nmol/g tissue)	MPO (U/mg tissue)
Gastric	CMC	318.7 \pm 16.8	55.1 \pm 4.6	3.5 \pm 1.3
	CMC + NAP	76.7 \pm 11.7*	157.3 \pm 18.1*	12.3 \pm 2.4*
	CG + NAP	189.5 \pm 8.1**	80.8 \pm 5.3**	4.9 \pm 0.3**
	Omeprazole	203.2 \pm 9.6**	82.2 \pm 9.4**	4.5 \pm 1.4**
Intestinal	CMC	345.4 \pm 9.6	48.6 \pm 6.6	7.4 \pm 0.5
	CMC + NAP	98.7 \pm 11.8*	292.7 \pm 34.5*	19.6 \pm 3.4*
	CG + NAP	204.3 \pm 16.9**	162.5 \pm 2.6**	4.5 \pm 0.5**
	Omeprazole	307.9 \pm 8.9**	135.1 \pm 12.2**	4.6 \pm 0.8**

Data shown are expressed as mean \pm SEM ($n = 5$).

* $P < 0.05$ vs. CMC group; ** $P < 0.05$ vs. NAP group. ANOVA and Newman-Keuls test.

NSAIDs cause GI damage is thought to be via non-specific inhibition of cyclooxygenase (COX)-mediated PG synthesis in the mucosa [McCarthy, 1992]. PLSs extracted from natural compounds have been the subject of several studies because of their biological potential, that includes anticoagulant, antiviral, anti-inflammatory, and gastroprotective effects [Wijesekara et al., 2010; Jiao et al., 2011]. Therefore, we chose to investigate the potential gastroprotective effects of CG, a PLS extracted from *A. occidentale*, against NAP-induced damage.

NAP, a commonly prescribed NSAID, is associated with abdominal discomfort, gastric lesions, and gastric ulceration [Aadland et al., 1987]. Our experimental data confirm that oral administration of NAP results in macroscopic and microscopic gastric injuries, as evidenced by edema, epithelial cell loss, inflammatory cell infiltration, and hemorrhage. However, pretreatment with CG elicited protection against NAP-induced macroscopic and microscopic gastric damage; all parameters of inflammation measured were decreased, an observation consistent with earlier reports that demonstrate gastroprotective actions of other PLSs [Silva et al., 2011; Damasceno et al., 2013].

Chronic use of NSAIDs may cause intestinal damage, characterized by mucosal ulceration, perforation, and hemorrhage [Langman et al., 1985]. Intestinal lesions induced by NSAID are associated with an increased risk of small bowel permeability, intestinal strictures, and ulcers. Furthermore, these changes may be accompanied by increased intestinal motility, enterobacterial invasion, and epithelial permeability, eventually resulting in macroscopic and microscopic injury [Takeuchi and Satoh, 2010]. Consistent with previous findings [Silva et al., 2012], this results confirm that administration of NAP caused macroscopic lesions and morphometric alterations with shortening of the villi and increased crypt depth. In contrast, pretreatment with CG prevented NAP-induced GI damage and reversed morphometric alterations in the medial intestine. These results confirm the protective effect of CG against NAP-induced GI damage.

In GI injury induced by NSAIDs, infiltration of neutrophils is considered a crucial step as it may lead to disturbances in the microcirculation and production of free radicals that are toxic to the mucosa [Zhang et al., 2008]. MPO is an enzyme marker of inflammation and neutrophil infiltration that is

TABLE 3. Effects of CG (10 mg/kg) Extracted from *A. occidentale* L. on the Amount of Mucus Adhering to the Gastric Wall and Gastric Acid Secretion

Experimental group ($N = 5$)	Levels of mucus ($\mu\text{g/g}$ tissue)	Volume (μl)	pH	Total acid (mEq[H ⁺]/l/4 h)
NAP	0.022 \pm 0.005	–	–	–
CMC	0.081 \pm 0.0074	492 \pm 20.4	1.7 \pm 0.5	5.6 \pm 0.8
CG (10 mg/kg)	0.065 \pm 0.012*	512 \pm 65.9	1.5 \pm 0.5	6.0 \pm 0.4
Histamine	–	1149 \pm 100.2**	1.2 \pm 0.2	11 \pm 0.5**
Ranitidine	–	233 \pm 59.5**	3.1 \pm 0.7	2.0 \pm 0.3**

Data shown are expressed as mean \pm SEM ($n = 5$).

* $P < 0.05$ vs. NAP group; ** $P < 0.05$ vs. CMC group. ANOVA and Newman-Keuls test.

elevated under ulcerated conditions and reduced during the healing process [Souza et al., 2004]. We found that the concentration of MPO in gastric mucosa and in medial intestine of rats increased concomitantly with the occurrence of injury induced by administration of NAP. Pretreatment with CG markedly reduced GI injury by decreasing levels of MPO. Thus, the suppression of neutrophil infiltration into the GI mucosa may contribute to the protective effect of CG against NAP-induced lesions. Other studies have demonstrated that PLSs are involved in the prevention of oxidative stress, with their anti-inflammatory properties are achieved by inhibiting neutrophil infiltration, as shown in rats with GI damage induced by ethanol or NSAIDs [Zhou et al., 2009].

GI diseases, including damage induced by NSAIDs, involve oxidative stress produced via the generation of free radicals and lipid peroxidation [Demir et al., 2003]. The local generation of oxygen-derived free radicals such as superoxide (O_2^-) and hydroxyl radicals (OH^-), and other cytotoxic oxygen metabolites, may result in GI mucosal bleeding and ischemia-reperfusion injury [Parks et al., 1982]. However, complex antioxidant systems like radical scavengers and inhibitors of free radical production help prevent oxidative damage caused by high concentrations of free radicals [Mahmood et al., 2009]. We analyzed two important markers of oxidative stress, namely GSH and malondialdehyde (MDA), a metabolite of the process of lipid peroxidation. GSH is a tripeptide (L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine) that acts mainly as an endogenous antioxidant [Lushchak, 2012]. We found that the gastroprotective effects of CG were accompanied by a decrease in oxidative stress in the GI tract namely decreased MDA and increased GSH. Our findings are consistent with previous reports that demonstrate PLSs possess antioxidant activity and can protect the gastric mucosa against oxidative damage following NAP administration [Paiva et al., 2011]. PLSs can act as free-radical scavengers and antioxidants, and this mechanism plays an important role in preventing free-radical-induced oxidative damage [Wang et al., 2009]. Our results suggest that the gastroprotective effects of CG are secondary to a decrease in the production of free radicals, which provides further evidence for possible antioxidant properties of PLSs. Therefore, PLSs obtained from CG may be a source for potential therapeutics that inhibit the damage caused by excessive free radicals.

Gastric acid production and mucous secretion are important factors underlying homeostatic balance and responsible for maintaining the integrity of the

GI mucosa. Impairment of gastric homeostasis can lead to mucosal erosion and ulceration [Robert, 1979]. Some studies show that development of NSAID-induced gastric mucosal injury involves an increase in gastric acid secretion and inhibition of mucus synthesis. This damaging effect is due to a decline in the levels of mucosal PGs [Laine et al., 2008]. In our experiments using 4-h pylorus-ligated rats, CG failed to modify gastric secretory volume and total acidity in the stomach, opening the possibility of gastroprotection to some other mechanism. Our finding that CG pretreatment increased the amount of mucus in the gastric mucosa wall may also be important as the gastric mucus coat is considered important both in preventing damage to the gastric epithelium, as well as in facilitating its repair [Wallace and Whittle, 1986].

In conclusion, our results indicate that CG has gastroprotective effects against NAP-induced GI damage. In addition, the mechanism of GI protection may be related to increases in adherent gastric mucus and to decreases free radical production and lipid peroxidation. CG may offer an attractive new treatment strategy for preventing NSAID-induced GI lesions in patients.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the financial support from National Counsel of Technological and Scientific Development – CNPq (Brazil) and Research foundation for the State of Piauí – FAPEPI. This work also was supported by dissertation grant (M.Sc. thesis of Nathalia S Carvalho) from Federal University of Piauí, Brazil. The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

- Aadland E, Fausa O, Vatn M, Cohen H, Quinlan D. 1987. Protection by misoprostol against naproxen-induced gastric mucosal damage. *Am J Med* 8:37–49.
- Araújo IMS, Zampa MF, Moura JB, Santos JR Jr, Eaton P, Zucolotto V, Veras LMC, Paula RCM, Feitosa JPA, Leite JRSA, et al. 2012. Contribution of the cashew gum (*Anacardium occidentale*, L.) for development of layer-by-layer. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 4:1588–1593.
- Batista JA, Dias EG, Brito TV, Prudêncio RS, Silva RO, Ribeiro RA, Souza MH, de Paula RC, Feitosa JP, Chaves LS, et al. 2014. Polysaccharide isolated from *Agardhiella ramosissima*: Chemical structure and anti-inflammation activity. *Carbohydr Polym* 99:59–67.
- Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G. 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 78: 206–209.

- Corne SJ, Morrissey SM, Woods RJ. 1974. Proceedings: a method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. *J Physiol* 242:116–117.
- Damasceno SRB, Rodrigues JC, Silva RO, Nicolau LAD, Chaves LS, Freitas ALP, Souza MHL, Barbosa ALR, Medeiros J-VR. 2013. Role of the NO/KATP pathway in the protective effect of a sulfated-polysaccharide fraction from the algae *Hypnea musciformis* against ethanol-induced gastric damage in mice. *Braz J Pharmacog* 23:320–328.
- Demir S, Yilmaz M, Koseoglu M, Akalin N, Aslan D, Aydin A. 2003. Role of free radicals in peptic ulcer and gastritis. *Turk J Gastroenterol* 14:39–43.
- De Paula RCM, Healthy F, Budd PM. 1998. Characterization of *Anacardium occidentale*: exudate polysaccharide. *Polym Int* 45: 27–35.
- Gyedu-Akoto E, Oduro I, Amoah FM, Oldham JH, Ellis WO, Opoku-Ameyaw K, Asante F, Bediako S. 2008. Quality estimation of cashew gum in the production of chocolate pebbles. *Afr J Food Sci* 2:16–20.
- Jiao G, Yu G, Zhang J, Ewart HS. 2011. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Mar Drugs* 9:196–223.
- Laine L, Takeuchi K, Tamawski A. 2008. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterology* 135:41–60.
- Laine L, Weinstein WM. 1988. Histology of alcoholic hemorrhagic-gastritis: A prospective evaluation. *J Gastroenterol* 94: 1254–1262.
- Langman MJS, Morgan L, Worrall A. 1985. Use of anti-inflammatory drugs by patients admitted with small or large bowel perforations and hemorrhage. *Br Med J* 290:347–349.
- Lushchak VI. 2012. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J Amino Acids* 2012:1–26.
- Mahmood K-AS, Ahmed JH, Jawad AM. 2009. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), free radicals and reactive oxygen species (ROS): a review of literature. *Med J Basrah University* 27:46–53.
- McCarthy DM. 1992. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: the clinical dilemmas. *Scand J Gastroenterol* 192:9–16.
- Mihara M, Uchiyama M. 1978. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86:271–278.
- Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. 1989. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *J Gastroenterol* 96:795–803.
- Paiva AAO, Castro AJG, Nascimento MS, Will LSEP, Santos ND, Araújo RM, Xavier CAC, Rocha FA, Leite EL. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory effect of polysaccharides from *Lobophora variegata* on zymosan-induced arthritis in rats. *Int Immunopharmacol* 11:1241–1250.
- Parks DA, Bulkeley GB, Granger DN, Hamilton SR, McCord JM. 1982. Ischemic injury in the cat small intestine: role of superoxide radicals. *Gastroenterology* 82:9–15.
- Robert A. 1979. Cytoprotection by Prostaglandins. *Gastroenterology* 77:761–767.
- Schirato GV, Monteiro FMF, Silva FO, Filho JLL, Leão AMAC, Porto ALF. 2006. The polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. in the inflammatory phase of the cutaneous wound healing. *Cienc Rural* 36:149–154.
- Sedlak J, Lindsay RH. 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 24:1992–2005.
- Shay M, Kamarov SA, Fels D, Meranze D, Gruenstein H, Siplet H. 1945. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rats. *J Gastroenterol* 5:43–61.
- Silva RO, Santana APM, Carvalho NS, Bezerra TS, Oliveira CB, Damasceno SRB, Chaves LS, Freitas ALP, Soares PMG, Souza MHL, et al. 2012. A sulfated-polysaccharide fraction from seaweed *Gracilaria birdiae* prevents naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. *Mar Drugs* 10:2618–2633.
- Silva RO, Santos GMP, Nicolau LAD, Lucetti LT, Santana APM, Chaves LS, Barros FCN, Freitas ALP, Souza MHL, Medeiros J-VR. 2011. Sulfated-polysaccharide fraction from red algae *Gracilaria caudata* protects mice gut against ethanol-induced damage. *Mar Drugs* 9:2188–2200.
- Souza MHL, Lemos HP, Oliveira RB, Cunha FQ. 2004. Gastric damage and granulocyte infiltration induced by indomethacin in tumour necrosis factor receptor 1 (TNF-R1) or inducible nitric oxide synthase (iNOS) deficient mice. *Gut* 53:791–796.
- Takeuchi K, Satoh H. 2010. Measurement of small intestinal damage. *Curr Protoc Toxicol* 21:21–27.
- Tanaka A, Araki H, Komoike Y, Hase S, Takeuchi K. 2001. Inhibition of both COX-1 and COX-2 is required for development of gastric damage in response to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Physiol* 95:21–27.
- Wallace LJ, Whittle BJ. 1986. Role of mucus in the repair of gastric epithelial damage in the rat. Inhibition of epithelial recovery by mucolytic agents. *Gastroenterology* 91:603–611.
- Wallace JL, Mcknight W, Reuter BK, Vergnolle N. 2000. NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *J Gastroenterol* 119:706–714.
- Wang Y, Wang M, Ling Y, Fan W, Wang Y, Yin H. 2009. Structural Determination and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of cultured *Cordyceps sinensis*. *Am J Chin Med* 37:977–989.
- Wijesekera I, Pangestuti R, Kim S-K. 2010. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydr Polym* 84:14–22.
- Yuvaraj N, Kanmani P, Satishkumar R, Paari A, Pattukumar V, Arul V. 2013. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Sargassum wightii* and *Halophila ovalis* sulfated polysaccharides in experimental animal models. *J Med Food* 16:740–748.
- Zhang X, Tajima K, Kageyama K, Kyoji T. 2008. Irsogladine maleate suppresses indomethacin-induced elevation of proinflammatory cytokines and gastric injury in rats. *World J Gastroenterol* 14:4784–4790.
- Zhou S, Zhang B, Liu X, Teng Z, Huan M, Yang T, Yang Z, Jia M, Mei Q. 2009. A new natural *Angelica* polysaccharide based colon-specific drug delivery system. *J Pharmaceut Sci* 98:4756–4768.

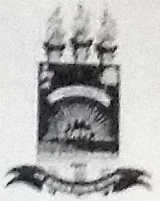
ANEXO C

Parecer do comitê de ética em experimentação animal



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



Teresina, 24 de Outubro de 2014.

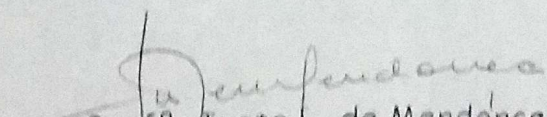
Ilmo.

Prof. Dr. JAND VENES ROLIM MEDEIROS
Departamento: Biotecnologia- CMRV_ Parnaíba /UFPI

Senhor Pesquisador,

Em reunião na presente data (24 de Outubro de 2014), a Comissão de Ética e Experimentação no Uso de Animais em Pesquisa, da Universidade Federal do Piauí, analisou e **Aprovou** no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, sob o número **068/14**, o projeto de pesquisa intitulado "**Prospecção farmacológica de moléculas biologicamente ativas extraídas de produtos naturais- ênfase no potencial terapêutico**", sob a sua responsabilidade. Informamos que este projeto tem Período de Vigência de Dezembro/2014 à Dezembro/2020, e serão usados 340 Camundongos isogênicos (machos e fêmeas) e 320 Ratos isogênicos (machos e fêmeas). Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEEA/UFPI, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei Nº 11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,


Prof^a. Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora