



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**FERNANDO PEREIRA BESERRA**

**DETERMINAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS  
NO EFEITO ANTIULCEROGÊNICO, ANTIDIARREICO E ANTI-  
INFLAMATÓRIO DA "INSULINA VEGETAL" (*Cissus sicyoides*  
Linneu) EM MODELOS ANIMAIS**



Botucatu – SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**FERNANDO PEREIRA BESERRA**

**DETERMINAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS  
NO EFEITO ANTIULCEROGÊNICO, ANTIDIARREICO E ANTI-  
INFLAMATÓRIO DA “INSULINA VEGETAL” (*Cissus sicyoides*  
Linneu) EM MODELOS ANIMAIS**

**ORIENTADORA: PROF. ADJ. CLÉLIA AKIKO HIRUMA LIMA**

**CO-ORIENTADORA: PROF. LÚCIA REGINA MACHADO DA ROCHA**

Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu UNESP, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (área de concentração: Farmacologia).

**Botucatu – SP**

**2014**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Beserra, Fernando Pereira.

Determinação dos mecanismos de ação envolvidos no efeito antiulcerogênico, antidiarreico e anti-inflamatório da “Insulina Vegetal” (*Cissus sicyoides* Linneu) em modelos animais / Fernando Pereira Beserra. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Clélia Akiko Hiruma-lima

Coorientador: Lucia Regina Machado da Rocha

Capes: 21006008

1. Agentes anti-inflamatórios. 2. Plantas medicinais - Uso terapêutico. 3. Úlceras. 4. Diarréia.

Palavras-chave: Anti-inflamatório; Antidiarreico; Antiulcerogênico; *Cissus sicyoides* L.; Planta medicinal.

## **BANCA EXAMINADORA**

---

### **1º. Titular/ Presidente**

Profa. Dra Clélia Akiko Hiruma-Lima (UNESP/Botucatu)

---

### **2º. Titular**

Profa. Dra. Elisângela Elena Nunes Carvalho (UFLA/Lavras)

---

### **3º. Titular**

Profa. Dra Cláudia Helena Pelizzon (UNESP/Botucatu)

**Auxílio Financeiro:**

**Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**

**BIOTA- FAPESP/SP**



**DEDICATÓRIA**

*“Você pode dizer adeus a sua família e a seus amigos e afastar-se milhas e milhas e, ao mesmo tempo, carregá-los em seu coração, em sua mente, em seu estômago, pois você não apenas vive no mundo, mas o mundo vive em você.”*

*(Frederick Buechner)*

*Dedido este trabalho...*

*... Em primeiro lugar a cada um dos ratos e camundongos que tiveram suas vidas sacrificadas em prol da nobre tentativa de se obter novos medicamentos que amenizem e curem as mazelas da humanidade.*

*... À minha família, em especial meu pai, minha mãe e meu irmão, o “alicerce” que me ampara em todos os momentos da minha vida, que mesmo à distância, no decorrer desta caminhada, se fizeram presentes, pelo amor, carinho e incentivo.*

*... Aos amigos que eu tanto estimo, sejam eles de Gurupi, Palmas, Goiânia, os amigos queridos da minha turma de graduação, os mais novos amigos que fiz durante o mestrado em Botucatu e outras amizades que eu fiz nessas andanças por aí, eu dedico este trabalho também a vocês!*

*... Aos meus inúmeros professores, desde o “Pré-escolar” em especial a Profa. Maria do Carmo Lisboa (por ter me ensinado as primeiras letras) até a orientadora do mestrado (Profa. Clélia), sou grato imensamente pela transmissão de conhecimento e sabedoria. Este trabalho também é dedicado a vocês!*

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, fonte de toda a sabedoria, energia cósmica universal, criador e Senhor da minha vida, aquele que encarnado em Cristo, demonstra que somente o amor pode transformar conhecimento e inteligência em sabedoria. A Ele toda honra!

À **toda minha família**, expressão maior desse amor sábio de Deus em minha vida, em especial aos meus pais **Jucelino** e **Maria de Carmo**, os quais nunca mediram esforços para propiciar tão grande riqueza na minha vida, a educação. E também meu irmão **Leonardo Bezerra** pela força e estímulo durante toda a minha vida.

À **Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima**, (orientadora) pelo voto de confiança, mesmo sem me conhecer previamente, já que vim de tão longe (Gurupi-TO). Agradeço de coração pela orientação, pelos ensinamentos, e até mesmo pelos puxões de orelha! Obrigado por confiar em meu trabalho e capacidade mesmo sem eu ter uma produção acadêmica anterior, pelo esforço ao meu orientar diante das muitas atividades que desenvolve, e por sempre ter encontrado uma hora pra me atender e orientar.

À **Profa. Dra. Lúcia Regina Machado da Rocha**, (co-orientadora) por disponibilizar seu laboratório para a realização de experimentos, pelos ensinamentos e observações didáticas que tanto contribuíram para a realização deste trabalho.

À **Profa. Dra. Anne Lígia Dokkedal (UNESP-Bauru)**, e seu aluno de doutorado **Luiz Leonardo Saldanha (UNESP-Bauru)**, pela análise fitoquímica da planta (*Cissus sicyoides*), objeto de estudo neste trabalho.

Aos **inúmeros professores dos Departamentos de Farmacologia e Fisiologia** que muito contribuíram para a minha formação, em especial, **o Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi** e aos seus alunos pela disponibilidade de materiais e de equipamentos do Laboratório de Fitomedicamentos e auxílio nos experimentos. Agradeço também **o Prof. Dr. André Sampaio Pupo** e em especial, seu aluno de doutorado **Luiz Ricardo de Almeida Kiguti** pelos ensinamentos, orientação, auxílio e disponibilidade do laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular do Departamento de Farmacologia para realização dos experimentos de contração intestinal *in vitro*. Não poderia deixar de mencionar **o Prof. José Buratini Junior**, e toda sua equipe de laboratório por tantas vezes terem cedido equipamentos ou materiais para execução de alguns experimentos, em especial, as grandes amizades feitas neste laboratório, são elas, **Déborah (Débrinha), Paula (Paulinha), Fernanda e Cinthia**.

À **Profa. Dra. Elisângela Elena Nunes Carvalho (UFLA-Lavras)**, por ter me apresentado o mundo da pesquisa durante a minha graduação. Foi professora, orientadora, conselheira (mãezona), pessoa com quem tive oportunidade e o privilégio de compartilhar experiência, sabedoria e humildade, sendo de grande peso em minha vida profissional. A você minha admiração e gratidão.

**Aos companheiros e colegas de laboratório**, parceiros desta longa jornada, pessoas que convivi durante estes dois anos de mestrado, olha quanta gente: **Catarine (Cat)**, **Flávia (Kalose)**, **Larissa (Lari)**, **Célio (Celião)**, **Ellen**, **Raquel (Pocotó)**, **Juliana (Jú)**, **Patrícia (Mazzolin)**, **Celi (Gira)**, **Tamires (Tami)**, a **Rosanna (Pepeô)**, **Stefanni (Waka ou Garbosa)**, **Vinícius (Garbosão)**, **Vitor (Garbosinho)**, **Julia (Vitamina)**, **Edlaine**, **Fernanda (Foguenta)**, **Katharine**, **Laísa**, **Vânia**, **Maycon**, **Juan (Peruano)**, **Luíza**, **Ivanna (Chilena)**, Ufa!!! quase dei um “piripaque” com tanto nome... opa, falando em piripaque, me lembrei da **Bruna “Piripaki”!!!** hahaha... Agradeço por escutarem os meus problemas, compartilharem dificuldades e tornarem o ambiente de trabalho mais agradável, principalmente nos feriados e finais de semana marcantes fazendo experimentos.

Agradeço em especial aqueles que se tornaram grandes amigos, as alunas de doutorado **Catarine**, **Flávia** e a **Dra. Raquel**, estas pessoas me deram total apoio desde o meu primeiro dia no laboratório, principalmente a **Catarine** pelo apoio, dúvidas, e ajudas para a prova de mestrado, e até mesmo por ter sido a primeira pessoa que dançou forró “pé-de-serra” (hahahaha inesquecível) comigo em Botucatu. A **Flávia** primeiramente pela amizade e parceria, depois pelo seu bom humor e as risadas infinitas, sempre alegre mesmo quando tudo parecia complicado (Armaria-mãinhaa), contagiante nas diversas músicas ~~desafinadas~~ cantadas e em suas ultras “incríveis-invenções-didáticas” que por muitas vezes me ensinou em experimentos. Em pleno século XX (~~Tá velha hein?~~) nascem pessoas assim como você, espetacular... Obrigado mesmo! A **Dra. Raquel** pela amizade, ~~churrascos~~, apoio em tantos experimentos, ideias e sugestões nos caminhos direcionados deste trabalho, principalmente na parte de diarreia, o qual contribuiu bastante para tal. É digna de minha admiração e respeito. A **Larissa**, amiga-irmã, companheira não só de mestrado, mas também da vida botucatuense, dos ~~rolézinhos~~, da “comida japa”, dos almoços, ~~baladas~~, e etc... hahahaha. Longos 2 anos de meio de convivência, que apesar de todas as ~~briga~~ e desentendimentos as vezes (Afinal, vc me ama Lari? hahahaha), seus defeitos e qualidades, acima de tudo seu empenho, dedicação e comprometimento, me ensinou e ajudou muito em praticamente todos os experimentos, assim

como o coleguismo em quase todos nos congressos. Obrigado também pelas inúmeras caronas. E, por fim, o **Dr. Hélio** “Pom-pom”, o Kushima, nosso pai, o salvador da pátria, e ~~“cara dos caras”~~, obrigado por toda a sua disposição e generosidade em ajudar/ensinar, apesar de todo o seu conhecimento e habilidade, sempre se mostrou humilde, e realmente é a prova de que é possível ter títulos acadêmicos, e mesmo assim continuar a ser humano como você é, Parabéns cara, te admiro!!!

**Aos funcionários do Departamento de Fisiologia (Luciana, Tardivo, Janete e Juliano)** pelos auxílios gerais durante o projeto. Em especial, quero agradecer a amizade da **Lilian**, a sua ajuda durante todo esse tempo, seu belo trabalho, sua eficiência em manter o biotério limpo, enfim... além do Seu Júnior (ex-bioterista) também pelo empenho e trabalho desenvolvido durante a época em que trabalhou no biotério.

**Aos membros da banca examinadora**, pelo interesse, disposição e as valiosas sugestões que muito servirão para o crescimento deste trabalho.

**Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação**, por resolverem toda a parte burocrática relacionada a relatórios, documentos, elaboração de bancas, matrícula em disciplinas, sorteio de aulas e entre outros.

**Agradeço de forma geral aos inúmeros amigos**, que por sinal, agradeço a Deus por fazer sempre grandes amizades por onde passo. Faço das palavras de *Epicuro, 341-270 a.C.* as minhas *“De todos os bens que a sabedoria nos faculta como meio de obter a nossa felicidade, o da amizade é de longe o maior”*.

**Aos amigos da República Vende-4**, não poderiam ficar de fora dessa lista de agradecimentos, afinal foram aqueles que me acolheram desde o primeiro dia em que cheguei em Botucatu. Durante 1 ano esses caras se tornaram praticamente a minha família num lugar onde eu simplesmente não conhecia ninguém, e com certeza ajudaram a me tornar outra pessoa, e bem melhor, diga-se de passagem. Obrigado mesmo galera! Agradeço também aos companheiros e **amigos da atual república (República Mato-Minas)** sem citar nomes, todos vocês sabem que direta ou indiretamente ajudaram-me a vencer esta etapa da minha vida. Claro que não posso esquecer-me da **Jaqueline (Jaque)**, nossa colaboradora e “mãezona”, que convive diariamente conosco, cuidando e se importando sempre, seja através dos serviços domésticos prestados, ou até mesmo num simples conselho dado ou preocupação demonstrada através de ligações, mensagens “sms” (como nos tempos remotos) e até mesmo as mensagens usadas nos tempos atuais, o “Uátizape” (por que não? Tá pensando o quê?)

haha... Obrigado pela paciência, dedicação e principalmente pelas comidas deliciosas. Aôô mulher abençoada!

**Á todos os meus amigos do peito (Ariane (Sponja), Mário (Professor), Carla (Carlinha), Pedro (O mineiro-paulista), Ismael (Fio-de-Deus), Joyce (Ptsinha), Angie, Pri, Tadeu (Zocal), Rodolpho (Puff), Clau (Ketirá), Gued's (Tocadô-Chico-Bento), Tropeção (E aí já defendeu?), Sereia, Prosinha (carinha-bão!), Dudu, Róbitch (O cara das cobras), Terezinha (Anti-sertanejo), a Hanna Montana (A irmã do Prof. Robson, haha) e ao trio, Lays, Paula e Clara e entre muitos outros)** que também fiz em Botucatu... Foram 2 anos de grandes momentos inesquecíveis, de alegria, dos “churras” e violadas, apoio incondicional nos feriados e finais de semanas.

**Aos meus inúmeros amigos de Gurupi, Silvânia, Tyrza, Diane, Talyta, Daniel, Hellem, Karine, Ana Camila, Tia Karine, Iury, Rodrigo, Isabela, Nega Karol, Marcela, Daniela, Janilson, Renato, Guilherme, Elói, entre muitos outros)** que viram toda essa história surgir, e que me deram o incentivo necessário para eu chegar até aqui, que, apesar da distância, sempre há os reencontros, mostrando que amizade verdadeira permanece pra sempre. *“Aqueles que passam por nós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”* (Antoine de Sant-Exupery)

**Aos colegas de pós-graduação, Victor, José Sérgio, Adriana, Julianinha, Razza, Pati do Ciro, Pati Rio, Janahi e entre outros,** seja pelo coleguismo nas disciplinas cursadas ou até mesmo os cafezinhos compartilhados nas manhãs frias de Botucatu.

**À mãe CAPES** e também à **”bolsa-PAI”** ~~no final do mês~~, pelo auxílio e socorro financeiro respectivamente, e com isto tornarem possível a realização deste trabalho.

**OBRIGADO!!!**

*"É melhor tentar, ao invés de sentar-se e nada fazer; É melhor falhar, mas não deixar a vida passar; Eu prefiro na chuva caminhar, do que em dias tristes em casa me esconder; Prefiro ser feliz, embora louco, do que viver infeliz em são conformismo".*

*(Martin Luther King)*

## PRÓLOGO

O desenvolvimento do projeto de mestrado possibilitou a formação específica em farmacologia, com estudos direcionados para a caracterização de atividade farmacológica de produtos naturais no tratamento de úlcera péptica, diarreia e inflamação. Durante a execução do projeto de mestrado, foram realizadas outras atividades, no intuito de enriquecer a formação profissional e científica do aluno.

### **Trabalhos apresentados na forma de painel em eventos científicos**

- ➔ **Beserra, F. P.**; Périco, L. L.; Polo, C. M.; Lopes, J. A.; Saldanha, L. L.; Rocha, L. R. M.; Dokkedal, A. L.; Hiruma-Lima, C.A. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae) sobre os parâmetros bioquímicos em modelos agudos de úlcera gástrica, durante o XII Workshop da Pós-Graduação do Instituto de Biociências de Botucatu, 2013, Botucatu – SP, Brasil.
- ➔ **Beserra, F. P.**; Périco, L. L.; Lopes, J. A.; Nishijima, C. M.; Santos, R. C.; Saldanha, L. L.; Rocha, L. R. M.; Dokkedal, A. L.; Hiruma-Lima, C.A. From popular use to preclinical validation: a study of the anti-inflammatory Effect of hydroalcoholic extract from the leaves of *Cissus sicyoides* Linn. (Vitaceae) in rodents, durante 1ER. Congreso Internacional de Productos Fitofarmacéuticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos de Colombia, 2013, Bogotá – Colômbia.
- ➔ Saldanha, L. L.; **Beserra, F. P.**; Dokkedal, A. L. Contribution to the development of a phytotherapeutic: Identification of flavonoids and triterpenes from the leaves of *Cissus sicyoides* Linn. (Vitaceae), durante 1ER. Congreso Internacional de Productos Fitofarmacéuticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos de Colombia, 2013, Bogotá – Colômbia.
- ➔ **Beserra, F. P.**; Périco, L. L.; Santos, R. C.; Kushima, H.; Saldanha, L. L.; Rocha, L. R. M.; Dokkedal, A. L.; Hiruma-Lima, C.A. Efeito antidiarreico de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae) envolve alterações no trânsito e secreção intestinal, durante o I Simpósio Internacional de Práticas Integrativas e Complementares na Atenção Básica à Saúde. Faculdades de Ciências Farmacêuticas, 2013, Araraquara – SP, Brasil.

- Périco, L. L.; **Beserra, F. P.**; Lopes, J. A.; Heredia Vieira, S. C.; Vilegas, W.; Rocha, L. R. M.; Hiruma-Lima, C. A. Anti-edematogenic activity of hydroalcoholic extract from *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae): Role of PGE<sub>2</sub>. In: III International Symposium on Drug Discovery. Faculdades de Ciências Farmacêuticas, 2013, Araraquara – SP, Brasil.
- **Beserra, F. P.**; Périco, L. L.; Santos, R. C.; Saldanha, L. L.; Dokkedal, A. L.; Rocha, L. R. M.; Hiruma-Lima, C.A. Gastroprotective Effect of *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae) involves the participation of nitric oxide and increase gastric mucus secretion. In: III International Symposium on Drug Discovery. Faculdades de Ciências Farmacêuticas, 2013, Araraquara – SP, Brasil.
- Périco, L.L.; **Beserra, F. P.**; Ganev, E. G.; Heredia Vieira, S. C.; Vilegas, W.; Rocha, L. R. M.; Hiruma-Lima, C. A. Evaluation of the mechanisms of action involved in the gastroprotection of *Serjania marginata* in rodents, durante o 45° Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE), 2013, Ribeirão-Preto – SP, Brasil.
- **Beserra, F. P.**; Rodrigues, T. S.; Ganev, E. G.; Bonamin, F.; Saldanha, L. L.; Dokkedal, A. L.; Rocha, L. R. M.; Lima, C. A. H. Phytochemical screening of the hydroalcoholic extract of leaves of *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae) and its effect against gastrointestinal disorders in rodents, durante o 5<sup>th</sup> International Symposium of Post Graduation and Research (VSINPOSPq), 2012, Ribeirão-Preto – SP – Brasil.

#### **Trabalho apresentado na forma oral durante evento científico**

- **Beserra, F. P.**; Périco, L. L.; Lopes, J. A.; Nishijima, C. M.; Santos, R. C.; Saldanha, L. L.; Rocha, L. R. M.; Dokkedal, A. L.; Hiruma-Lima, C.A. From popular use to preclinical validation: a study of the anti-inflammatory Effect of hydroalcoholic extract from the leaves of *Cissus sicyoides* Linn. (Vitaceae) in rodents, durante 1ER. Congreso Internacional de Productos Fitofarmacêuticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacêuticos de Colombia, 2013, Bogotá – Colômbia.

- **Beserra, F. P.** Avaliação do potencial antiulcerogênico, cicatrizante e antidiarreico do extrato hidroalcoólico obtido a partir das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae), durante o III Simpósio de Farmacologia da Unesp – Botucatu, 2013, Botucatu – SP, Brasil.

### **Artigo Aceito para Publicação**

- Carvalho, K. I. M.; Bonamin, F.; Santos, R. C. dos.; Périco, L. L.; **Beserra, F. P.**; Sousa, D. P. de.; Barbosa Filho, J. M.; Rocha, L. R. M.; Hiruma-Lima, C. A. Geraniol — a flavoring agent with multifunctional effects in protecting the gastric and duodenal mucosa. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology JCR*, p. 1-6, 2013. **Fator de impacto: 2.147**

### **Participação em eventos científicos**

- 1er. Congreso Internacional de Productos Fitofarmacéuticos, 10/2013, Bogotá – Colômbia.
- III International Symposium on Drug Discovery – Unesp, 07/2013, Araraquara – SP, Brasil.
- XII Workshop da Pós-Graduação – Unesp, 06/2013, Botucatu – SP, Brasil.
- III Simpósio de Farmacologia da Unesp, 06/2013, Botucatu – SP, Brasil.
- 1º Simpósio Internacional de Práticas Integrativas e Complementares na Atenção Básica à Saúde (I SIPIC), 04/2013, Araraquara – SP, Brasil.
- 5<sup>th</sup> International Symposium of Post Graduation and Research (V SINPOSPq), 09/2012, Ribeirão-Preto – SP, Brasil.
- II Simpósio de Farmacologia da Unesp, 06/2012, Botucatu – SP, Brasil.
- XI Workshop da Pós-Graduação – Unesp, 05/2012, Botucatu – SP, Brasil.

### **Extensão Universitária**

- Monitor do curso “Reprodução de A a Z”, como parte das atividades do Programas de Extensão Universitária “Difundindo e Popularizando a Ciência na UNESP: Interação

entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico”, realizado no Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu, 01/2012, Botucatu – SP, duração de 48 horas.

- ➔ Monitor do curso “Investigando a vida das plantas”, como parte das atividades do Programas de Extensão Universitária “Difundindo e Popularizando a Ciência na UNESP: Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico”, realizado no Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu, 01/2013, Botucatu – SP, duração de 48 horas.

### **Cursos realizados**

- ➔ Mini-curso: Mini-curso: Inflamação, dor e novas perspectivas terapêuticas: Modelos experimentais, durante o XI Workshop da Pós-Graduação no Instituto de Biociências de Botucatu, 06/2013, Botucatu – SP, duração de 5 horas.
- ➔ Mini-curso: “Como escrever artigos científicos” no 5<sup>th</sup> International Symposium of Post Graduation and Research (V SINPOSPq), 09/2012, Ribeirão Preto – SP, duração de 4 horas.
- ➔ Palestra: Sequenciamento de nova geração e PCR em tempo real, 03/2012, na Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Botucatu – SP, com duração de 4 horas.
- ➔ Mini-curso: Quimioprevenção do câncer com produtos naturais, durante o XII Workshop da Pós-Graduação no Instituto de Biociências de Botucatu, 06/2013, Botucatu – SP, duração de 8 horas.

### **Disciplinas cursadas**

- ➔ Fundamentos sobre Ética e Prática na Experimentação Animal – **2 créditos**
- ➔ Redação e Metodologia Científica – **3 créditos**
- ➔ Farmacocinética – **5 créditos**
- ➔ Farmacodinâmica: Receptores e Interação Droga-Receptor – **3 créditos**
- ➔ Tópicos Especiais em Farmacologia - Métodos de Purificação e Análise de Produtos Naturais – **3 créditos**
- ➔ Farmacologia do Sistema Nervoso Autônomo Simpático – **3 créditos**
- ➔ Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico de Ciências e Biologia – **6 créditos**

## RESUMO

*Cissus sicyoides* (Linneu) pertencente à família Vitaceae é uma planta nativa do Caribe, América do Sul e especialmente no Brasil, onde é conhecida como “Insulina vegetal”. O chá das folhas desta espécie é utilizada popularmente como anti-inflamatório, anti-hipertensivo, antitérmico, antidiabético, antireumático, contra infecções respiratórias, dislipidemias, distúrbios gastrointestinais e indigestão, para anemia, acidente vascular cerebral, tremores e como ativador da circulação sanguínea. A análise fitoquímica das partes aéreas de *C. sicyoides* mostra a presença de flavonóides glicosilados, e várias atividades biológicas já foram descritas para esta espécie, dentre elas, atividade gastroprotetora do extrato metanólico de suas folhas. O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade antiulcerogênica do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. sicyoides* (EHCS), elucidar os mecanismos envolvidos no efeito antiulcerogênico, em processos inflamatórios e em modelos experimentais de diarreia em roedores. A administração oral do EHCS nas doses 250 e 500 mg/Kg protegeu a mucosa gástrica da ação dos agentes lesivos etanol e anti-inflamatório não esteroideal em ratos Wistar machos. O EHCS na menor dose efetiva (250 mg/Kg) não alterou os parâmetros bioquímicos do suco gástrico em modelo de ligadura do piloro e não preveniu a úlcera duodenal induzida por cisteamina hidrocloreídrica. Este extrato aumentou a quantidade de muco aderido à parede gástrica, restabeleceu o fluxo sanguíneo atuando como regulador na microcirculação e a ação gastroprotetora do extrato é dependente de óxido nítrico por atuação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), ao mesmo tempo que independe de grupamentos sulfidrila e receptores vanilóides. Este extrato possui propriedade antioxidante ao promover a proteção das lesões gástricas induzidas por isquemia-reperfusão, reduzindo a lipoperoxidação (LPO) da mucosa gástrica e a atividade da mieloperoxidase (MPO). Estes mesmos achados bioquímicos também foram observados nos modelos de indução de úlceras gástricas por etanol e indometacina. O EHCS não alterou o esvaziamento gástrico, mas retardou a motilidade gastrintestinal. Este extrato ainda apresentou uma potente atividade antimicrobiana frente a *Helicobacter pylori* confirmando ser promissor também no combate desta bactéria causadora de úlceras pépticas. Foi avaliado a toxicidade aguda do EHCS (5000 mg/Kg, p.o.) em dose única em camundongos de ambos os sexos, no qual não foram observados indícios de efeitos tóxicos agudos e sem alterações também na performance motora. O tratamento oral do EHCS produziu efeito antiedematogênico no modelo de edema de orelha induzido por xilol. No edema de orelha induzido pela aplicação tópica de ácido araquidônico, e no edema de pata induzido por carragenina, o EHCS apresentou expressivo efeito anti-inflamatório, sugerindo envolvimento via inibição da síntese de PGE<sub>2</sub> (Prostaglandina E<sub>2</sub>) pelo bloqueio de COX (ciclooxigenase) em ambos os modelos. Na diarreia induzida por óleo de rícino, o EHCS apresentou atividade antidiarreica, com comprovado envolvimento via inibição da síntese de PGE<sub>2</sub> na redução da secreção intestinal e, bloqueio dual de receptores muscarínicos e canais de Ca<sup>2+</sup>, mecanismo este relacionado à inibição do trânsito intestinal exercido pelo extrato. Estes resultados corroboram com a indicação popular de uso desta espécie como extrato efetivo no combate as úlceras, por envolver mecanismos de citoproteção, antioxidante, e regular a motilidade gastrintestinal, além de ser promissor para a utilização terapêutica na inflamação e distúrbio gastrintestinal como a diarreia.

**Palavras-chave:** *Cissus sicyoides* L.; Planta medicinal; Antiulcerogênico; Anti-inflamatório; Antidiarreico.

## ABSTRACT

*Cissus sicyoides* (Linneu) belongs to the Vitaceae family is a plant native to the Caribbean, South America and especially in Brazil, where it is known as "vegetable insulin". The tea from leaves of this species is popularly used as anti-inflammatory, anti-hypertensive, antipyretic, antidiabetic, antirheumatic, against respiratory infections, dyslipidemia, gastrointestinal disorders and indigestion, for anemia, cerebral tremors and as an activator of circulation blood. The phytochemical analysis of aerial parts of *C. sicyoides* showed predominantly the presence of glycosylated flavonoids and various biological activities have been described for this species, among them, gastroprotective activity of the methanol extract of its leaves. With these considerations, the aim of this study was to investigate the antiulcer activity of hydroalcoholic extract of *C. sicyoides* (HECS), as well as to elucidate the mechanisms involved in antiulcerogenic effect, inflammatory processes and in experimental models of diarrhea in rodents. The HECS in doses 250 and 500 mg/Kg protected the gastric mucosa from the damaging agents action, ethanol and anti-inflammatory non-steroidal when administered orally to male Wistar rats. The EHCS at the lowest effective dose (250 mg/Kg) didn't alter biochemical parameters of gastric juice in pylorus ligation model and did not prevent the duodenal ulcer induced by cysteamine hydrochlorídrica. This extract increased the amount of mucus adhered to the gastric wall, restored blood flow in the microcirculation acting as a regulator and gastroprotective activity of the extract is dependent on nitric oxide activity of the enzyme inducible nitric oxide synthase (iNOS), while independent groups of sulfhydryl and vanilloid receptors. This extract has antioxidant properties to promote the protection of gastric lesions induced by ischemia-reperfusion injury by reducing lipid peroxidation (LPO) and gastric mucosal myeloperoxidase (MPO) activity. These same biochemical findings were also observed in models of gastric ulcers induced by ethanol and indomethacin. The EHCS didn't alter gastric emptying, but slowed gastrointestinal motility. This extract also showed potent antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* confirming also be promising in combating this bacteria causing peptic ulcers. Was evaluated acute toxicity of EHCS (5000 mg / kg, po) as a single dose in mice of both sexes, in which no evidence of acute toxic effects and no changes were observed in motor performance also evaluated. Oral treatment of EHCS produced antiedematogenic effect on the ear edema induced by xylene model. In ear edema induced by topical application of arachidonic acid, and paw edema induced by carrageenan, the EHCS showed significant anti-inflammatory effect, suggesting involvement via inhibition of PGE<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub>) by blocking COX (cyclooxygenase) in both models. In the castor oil-induced diarrhea, the EHCS presented antidiarrheal activity with proven involvement via inhibition of PGE<sub>2</sub> in the reduction of intestinal secretion and dual blockade of muscarinic receptors and Ca<sup>2+</sup> channels, this mechanism related to the inhibition of intestinal transit exercised by extract. These results corroborate with the popular indication of this species as extract effective in combating ulcers, by engaging mechanisms of cytoprotective, antioxidant, and regulate gastrointestinal motility, besides to be promising for therapeutic use in inflammation and gastrointestinal disorders such as diarrhea.

**Key-words:** *Cissus sicyoides* L.; Medicinal plants; Antiulcerogenic; Anti-inflammatory, Anti-diarrheal.

**LISTA DE FIGURAS****CAPÍTULO 1**

<b>Figura 1:</b> Esquema da etiopatogenia da úlcera péptica.....	29
<b>Figura 2:</b> Fonte de radicais livres e sistema antioxidante endógeno.....	35
<b>Figura 3:</b> Sinais cardinais da inflamação.....	38
<b>Figura 4:</b> Alternativas terapêuticas para o tratamento da úlcera péptica.....	41
<b>Figura 5:</b> Partes aéreas de <i>C. sicyoides</i> L.....	47
<b>Figura 6:</b> Distribuição geográfica de <i>C. sicyoides</i> L.....	48
<b>Figura 7:</b> Estruturas químicas de flavonóides presentes em <i>C. sicyoides</i> L.....	49

**CAPÍTULO 2**

<b>Figura 1:</b> Identificação de compostos químicos no EHCS por HPLC-PDA-ESI-IT-MS. ....	77
<b>Figura 2:</b> Efeito gastroprotetor do EHCS (125, 250 e 500mg/Kg p.o.) frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos. ....	78
<b>Figura 3:</b> Efeito gastroprotetor do EHCS (125, 250 e 500mg/Kg p.o.) frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por indometacina em ratos .....	78
<b>Figura 4:</b> Efeito gastroprotetor do EHCS (250 mg/Kg p.o.) frente ao modelo de úlcera duodenal induzida por cisteamina em ratos.....	80
<b>Figura 5:</b> Efeito gastroprotetor do EHCS (250mg/Kg p.o.) frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por isquemia e reperfusão em ratos.....	81
<b>Figura 6:</b> Avaliação do efeito sistêmico de EHCS (250mg/Kg p.o.) frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol. ....	82
<b>Figura 7:</b> Avaliação do efeito sistêmico de EHCS (250mg/Kg p.o.) frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol. ....	82
<b>Figura 8:</b> Efeito de EHCS (250mg/Kg p.o.) sobre a secreção de muco gástrico frente ao modelo de ligadura do piloro em ratos Wistar machos. ....	83
<b>Figura 9:</b> Efeito de EHCS (250mg/Kg p.o.) sobre o fluxo sanguíneo gástrico frente ao modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em ratos Wistar machos.....	84

<b>Figura 10:</b> Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção efetuada de EHCS (250mg/Kg p.o.) frente ao modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em ratos Wistar machos.....	85
<b>Figura 11:</b> Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) e papel da NOS na gastroproteção efetuada de EHCS (250mg/Kg p.o.) frente ao modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em ratos Wistar machos.....	86
<b>Figura 12:</b> Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) e papel da iNOS na gastroproteção efetuada de EHCS (250mg/Kg p.o.) frente ao modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em ratos Wistar machos.....	87
<b>Figura 13:</b> Avaliação da participação dos receptores TRPV na gastroproteção efetuada pelo EHCS frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos Wistar machos pré-tratados com <i>Ruthenium red</i> .....	88
<b>Figura 14:</b> Efeito do EHCS (125, 250 e 500 mg/Kg p.o.) sobre a motilidade gastrointestinal em camundongos Swiss machos.....	92

### CAPÍTULO 3

<b>Figura 1:</b> Evolução do peso corporal (g) de camundongos fêmeas tratados com dose única do EHCS (5000mg/Kg, p.o.). Média do peso (g) dos animais monitorados durante 14 dias. ...	125
<b>Figura 2:</b> Evolução do peso corporal (g) de camundongos machos tratados com dose única do EHCS (5000mg/Kg, p.o.). Média do peso (g) dos animais monitorados durante 14 dias. ...	125
<b>Figura 3:</b> Avaliação do número de quedas dos camundongos tratados com EHCS (500 mg/Kg p.o.) no modelo de Rota Rod.....	127
<b>Figura 4:</b> Efeito do pré-tratamento oral com EHCS (125, 250 e 500 mg/Kg) no modelo de edema de orelha induzido por xilol. ....	127
<b>Figura 5:</b> Efeito do pré-tratamento oral com EHCS (125, 250 e 500 mg/Kg) no modelo de edema de orelha induzido por ácido araquidônico .....	128
<b>Figura 6:</b> Efeito do pré-tratamento oral com EHCS (125, 250 e 500 mg/Kg) no modelo de edema de pata induzido por carragenina. ....	129
<b>Figura 7:</b> Efeito do pré-tratamento oral com EHCS (125, 250 e 500 mg/Kg) na produção de PGE <sub>2</sub> no modelo de edema de orelha induzido por ácido araquidônico. ....	130
<b>Figura 8:</b> Efeito do pré-tratamento oral com EHCS (125, 250 e 500 mg/Kg) na produção de LTB <sub>4</sub> no modelo de edema de orelha induzido por ácido araquidônico .....	130

<b>Figura 9:</b> Efeito do EHCS (125, 250 e 500 mg/Kg p.o.) sobre o trânsito intestinal induzido por óleo de rícino em camundongos Swiss machos. ....	132
<b>Figura 10:</b> Efeito do EHCS (125, 250 e 500 mg/Kg p.o.) sobre a secreção de fluido intestinal induzido por óleo de rícino em camundongos Swiss machos. ....	132
<b>Figura 11:</b> Efeito do EHCS (500 mg/Kg p.o.) sobre o trânsito intestinal induzido por carbacol em camundongos Swiss machos.....	135
<b>Figura 12:</b> Efeito antiespasmódico do EHCS (75, 150, 300 e 500 µg/mL) sobre as contrações fásicas induzidas por carbacol em íleo isolado de camundongo <i>in vitro</i> .....	135
<b>Figura 13:</b> Efeito antiespasmódico do EHCS (75, 150, 300 e 500 µg/mL) sobre as contrações fásicas induzidas por KCl em íleo isolado de camundongo <i>in vitro</i> . ....	136
<b>Figura 14:</b> Efeito do EHCS (500 mg/Kg p.o.) sobre a secreção de fluido intestinal induzido por L-arginina em camundongos Swiss machos. ....	137
<b>Figura 15:</b> Efeito do EHCS (500 mg/Kg p.o.) sobre a secreção de fluido intestinal induzido por PG-E <sub>2</sub> em camundongos Swiss machos. ....	138

**LISTA DE TABELAS****CAPÍTULO 2**

<b>Tabela 1:</b> Avaliação do efeito antissecretor do EHCS (125, 250 e 500mg/Kg p.o.) administrado por via oral e intraduodenal em ratos Wistar machos.....	80
<b>Tabela 2:</b> Quantificação dos níveis de MPO, GSH e MDA em ratos Wistar machos pré-tratados com EHCS (125, 250 e 500mg/Kg p.o.) submetidos ao modelo de indução de úlcera gástrica por etanol.....	88
<b>Tabela 3:</b> Quantificação dos níveis de MPO e MDA em ratos Wistar machos pré-tratados com EHCS (125, 250 e 500mg/Kg p.o.) submetidos ao modelo de indução de úlcera gástrica por indometacina. ....	90
<b>Tabela 4:</b> Quantificação dos níveis de MPO, GSH e MDA em ratos Wistar machos pré-tratados com EHCS (250 mg/Kg p.o.) submetidos ao modelo de indução de úlcera gástrica por isquemia e reperfusão.....	91
<b>Tabela 5:</b> Avaliação do EHCS (125, 250 e 500 mg/Kg p.o.) sobre o esvaziamento gástrico de semi-sólidos em camundongos Swiss machos. ....	92

**CAPÍTULO 3**

<b>Tabela 1:</b> Relação entre o peso dos órgãos vitais e o peso corporal de camundongos Swiss machos e fêmeas tratados com EHCS (5000 mg/Kg) no modelo de toxicidade oral aguda...126	126
<b>Tabela 2:</b> Relação entre o peso dos órgãos reprodutivos e o peso corporal de camundongos Swiss machos e fêmeas tratados com EHCS (5000 mg/Kg) no modelo de toxicidade oral aguda.....	126
<b>Tabela 3:</b> Efeito do pré-tratamento oral de EHCS (125, 250 e 500 mg/Kg) sobre a diarreia aguda induzida em camundongos Swiss machos.. ....	131
<b>Tabela 4:</b> Avaliação do envolvimento com receptores opióides no trânsito intestinal em camundongos Swiss machos tratados oralmente com EHCS (500 mg/Kg ).....	133
<b>Tabela 5:</b> Avaliação do envolvimento com receptores $\alpha_2$ -adrenérgicos no trânsito intestinal em camundongos Swiss machos tratados oralmente com EHCS (500 mg/Kg ).....	134

**LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

AA	Ácido araquidônico
AC	Adenilato ciclase
ACh	Acetilcolina
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
CaCO <sub>3</sub>	Carbonato de cálcio
CagA	Citotoxina associada ao gene A
CAT	Catalase
CCD	Cromatografia de camada delgada de sílica gel
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
Cl <sup>-</sup>	Íons cloreto
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase tipo 1
COX-2	Ciclooxigenase tipo 2
DAINEs	Drogas anti-inflamatórias não esteroidais
DTNB	5,5' ditio-bis-2-ácido nitrobenzóico
d.C	Depois de Cristo
DDA	Doença diarréica aguda
EHCS	Extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Cissus sicyoides</i>
ERO	Espécies reativas de oxigênio
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GABA	Ácido gama aminobutírico
G <sub>i</sub>	Proteína inibitória
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
HCl	Ácido clorídrico
HCO <sup>3-</sup>	Bicarbonato
H <sub>2</sub>	Receptor de histamina tipo 2

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	Bomba de prótons
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HSP	Heat shock protein
HTAB	Brometo de hexadecil-trimetil-amônio
H <sup>+</sup>	Hidrogênio
IBP	Inibidores da bomba de prótons
IC <sub>50</sub>	Concentração inibotória para 50%
i.d	Intraduodenal
IL-1β	Interleucina - 1β
IL-6	Interleucina – 6
IL-8	Interleucina – 8
i.m	Intramuscular
I/R	Isquemia-reperfusão
Kg	Quilogramas
KCl	Cloreto de potássio
L	Litros
L-NAME	<i>N-nitro-L-arginina metil éster</i>
L-NIL	<i>L-Lysine- ω-acetamine dihydrochloride</i>
LOX	Lipoxigenase
LPO	Lipoperoxidação ou peroxidação lipídica
LTA <sub>4</sub>	Leucotrieno A <sub>4</sub>
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
LTC <sub>4</sub>	Leucotrieno C <sub>4</sub>
LTD <sub>4</sub>	Leucotrieno D <sub>4</sub>
MDA	Malondialdeído
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mm <sup>2</sup>	Milímetros quadrados
MIC	Concentração inibitória mínima
mPGES-1	PGE sintase de membrana-1

MPO	Mieloperoxidase
mRNA	RNA mensageiro
Na <sup>+</sup>	Íons sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase
NaOH	Hidróxido de sódio
NEM	N-etilmaleimida
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
eNOS	Óxido nítrico endotelial
iNOS	Óxido nítrico induzível
nNOS	Óxido nítrico neuronal
NOS	Óxido nítrico sintase
nm	Nanômetros
OMS	Organização Mundial de Saúde
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
OH <sup>-</sup>	Radical hidroxila
PAF	Fator de agregação plaquetário
PGs	Prostaglandinas
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina tipo E <sub>2</sub>
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidil inositol bifosfato
p.o.	<i>per os</i>
r.p.m	Rotações por minuto
s.c	subcutâneo
SHs	Compostos sulfidrílicos
-SH	Grupamento tiol
SOD	Superóxido dismutase
SST <sub>2</sub>	Receptor de somatostina do tipo 2
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TNF-α	Fator de necrose tumoral - α
TGI	Trato gastrointestinal

---

TRPV	Receptor de potencial transitório vanilóide
TRPV-1	Receptor de potencial transitório vanilóide 1
US\$	Dólar dos EUA
Vac A	Citotoxina de vacuolização do <i>H. pylori</i>
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
$\alpha$	alfa
$\beta$	beta
$\Delta$	delta
$\mu\text{g}$	Microgramas
$\mu\text{L}$	Microlitros
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
5-HT <sub>2</sub>	Receptor de serotonina do tipo 2
5-HT <sub>3</sub>	Receptor de serotonina do tipo 3
5-LOX	5-lipoxigenase

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
1.1 Úlceras pépticas .....	28
1.2 Considerações gerais sobre diarreia .....	35
1.3 Inflamação e mediadores inflamatórios.....	37
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>41</b>
2.1 Farmacoterapia das úlceras pépticas, diarreia e inflamação e suas limitações atuais. ....	41
2.2 Plantas medicinais como fonte de novos fármacos .....	44
2.3 <i>Cissus sicyoides</i> L.....	45
2.3.1 Descrição botânica.....	45
2.3.2 Descrição etnofarmacológica .....	48
2.3.3 Descrição fitoquímica.....	48
2.3.4 Descrição biológica .....	50
<b>3. HIPÓTESE.....</b>	<b>51</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>52</b>
4.1 Objetivo Geral .....	52
4.2 Objetivos Específicos .....	52
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>53</b>
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>63</b>
<b>ARTIGO 1 PARA PUBLICAÇÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>65</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>66</b>
<b>2. Material e Métodos.....</b>	<b>68</b>
<b>3. Resultados .....</b>	<b>77</b>
<b>4. Discussão .....</b>	<b>93</b>
<b>5. Conclusão .....</b>	<b>104</b>
<b>6. Referências .....</b>	<b>105</b>

---

<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>112</b>
<b>ARTIGO 2 PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	<b>113</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>114</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>115</b>
<b>2. Material e Métodos</b> .....	<b>117</b>
<b>3. Resultados</b> .....	<b>125</b>
<b>4. Discussão</b> .....	<b>138</b>
<b>5. Conclusão</b> .....	<b>147</b>
<b>6. Referências</b> .....	<b>147</b>
<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	<b>154</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>155</b>

## APRESENTAÇÃO

Esta dissertação foi elaborada na forma de capítulos que contem:

O **capítulo 1** contém uma abordagem ampla sobre as úlceras pépticas no que concerne a sua epidemiologia, relevância clínica, etiopatogenia, tratamento, bem como considerações gerais sobre os temas diarreia e inflamação. Na justificativa são abordados as problemáticas das opções terapêuticas existentes, o uso de plantas medicinais e informações gerais sobre o objeto de estudo (a espécie vegetal *Cissus sicyoides* L.), etnofarmacologia, fitoquímica, além de atividades biológicas já relatadas na literatura para esta espécie. Em síntese, neste capítulo encontra-se a introdução, justificativa, a hipótese e os objetivos (geral e específico) do estudo.

No **capítulo 2** encontra-se o trabalho: “Ação citoprotetora e antioxidante de *Cissus sicyoides* Linneu (Vitaceae) em modelos de úlceras gástricas em roedores: Papel da isoforma óxido nítrico sintase induzível (iNOS), muco gástrico e microcirculação local”. Este estudo mostra os resultados do efeito gastroprotetor do extrato em diversos modelos agudos de úlcera gástrica em ratos, bem como, elucidação de seus mecanismos de ação.

No **capítulo 3** encontra-se o trabalho: “Mecanismos farmacológicos envolvidos no efeito anti-inflamatório e antidiarreico de *Cissus sicyoides* Linneu (Vitaceae) em modelos animais”. Este estudo evidencia o efeito anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico de *C. sicyoides* através de modelos agudos de indução de edemas e mecanismos envolvidos neste efeito. Foi demonstrado também o efeito antidiarreico deste extrato, caracterizado pela redução do trânsito intestinal e da secreção intestinal induzida por óleo de rícino, além de mecanismos de ação envolvidos relacionados à atividade anti-inflamatória.

# **CAPÍTULO 1**

## **CONSIDERAÇÕES GERAIS**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Úlceras Pépticas*

O trato gastrointestinal (TGI) é um dos sistemas do organismo de fundamental importância, considerando sua função de provê-lo de água, eletrólitos e alimentos (Guyton e Hall, 2011). No entanto, devido sua comunicação com o meio externo, é frequentemente exposto a uma série de agressões que podem comprometer sua integridade e conseqüentemente sua função. Nesse sentido, sua rápida recuperação é essencial para assegurar sua vitalidade.

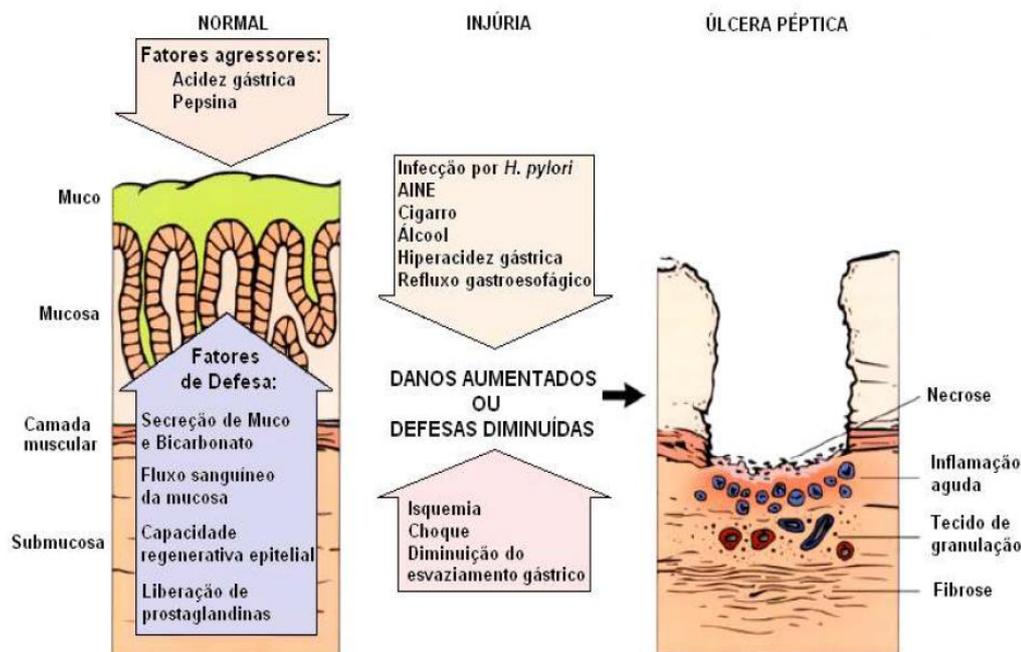
Dentre os distúrbios gastrointestinais mais frequentes da clínica médica, temos as úlceras pépticas, que são lesões crônicas provocadas devido à ação lesiva do ácido e pepsina sobre a mucosa gastroduodenal. As úlceras pépticas podem apresentar complicações severas como hemorragias, perfuração e raramente promove penetração nos órgãos retroperitoneais causando dores severas (Malfertheiner et al., 2009).

Essa enfermidade acomete um número considerável de pessoas no mundo inteiro e alguns autores a consideram como a nova “praga” do século XXI (O’Malley, 2003). A incidência mundial desta doença é estimada em 1.500 a 3.000 casos por 100.000 habitantes por ano (D’acampora et al., 2008). Nos EUA uma grande parcela da população é afetada, seis milhões de casos de úlcera péptica foram estimados, sendo que a cada ano 500.000 novos casos são registrados (Feinstein et al., 2010). No Brasil, apesar de ser uma doença extremamente freqüente, não se conhece de modo preciso sua real incidência, mas estima-se que varie de 1 a 20%, sobre a população (D’acampora et al., 2008).

As úlceras do trato gastrintestinal são lesões profundas na mucosa, atingindo tanto os componentes do tecido epitelial, como do tecido conjuntivo, incluindo miofibroblastos subepiteliais, células do músculo liso, vasos e nervos, podem ser destruídos (Milani e Calabrò, 2001). Apresentam-se de três formas: úlcera péptica (lesão situada tanto no estômago como no duodeno), úlcera duodenal (apenas no duodeno) e úlcera gástrica (somente no estômago). De acordo com Abitbol (2005), a forma duodenal da doença é a mais frequente, sendo que mais de 95% das lesões se localizam na primeira porção do duodeno, e 90% na região pilórica. No estômago, por sua vez, acometem mais comumente o antro (60%) e a junção do antro com o corpo na pequena curvatura (25%).

Segundo Szabo (1991), a lesão celular da mucosa gástrica pode ocorrer por causas adquiridas ou inatas. As causas mais comuns de lesão celular ocorrem por: hipóxia e isquemia (resultante da diminuição do fluxo sanguíneo, decréscimo da hemoglobina ou em decorrência da falha do sistema antioxidante endógeno); agentes químicos (eicosanóides, endotelinas, monoaminas, fármacos sintéticos ou substâncias químicas ingeridas voluntariamente como o etanol); agentes biológicos (vírus, bactérias, fungos, parasitas que desencadeiam reações imunológicas para a defesa do organismo, mas produzem radicais livres tóxicos contribuindo assim para a injúria tecidual); fatores físicos (estresse, temperaturas extremas, força mecânica) e por alterações genéticas.

Admite-se na atualidade que a úlcera péptica é uma doença multifatorial, resultante de um desequilíbrio entre os mecanismos de defesa e os fatores agressores da mucosa (Laine et al., 2008). Nesse contexto, a sobreposição dos fatores agressores aos mecanismos de defesa causa o enfraquecimento da mucosa, permitindo o contato do ácido e pepsina com o epitélio, originando as lesões ulcerosas (figura 1).



**Figura 1:** Esquema da etiopatogenia da úlcera péptica

**Fonte:** (Robbins e Cotran, 2005)

O consumo excessivo de álcool representa uma das principais causas de úlcera péptica no homem, provocando erosões hemorrágicas gástricas e gastrite caracterizada por edema,

hemorragia subepitelial, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias (Ko et al., 2004). Isso acontece porque ocorre uma liberação de mediadores vasoativos (leucotrienos e histamina), formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), resultando em peroxidação lipídica e, conseqüentemente, lesões gástricas (Repetto e Llesuy, 2002). O etanol também atua estimulando a liberação de endotelinas, que possuem ação vasoconstritora; na degranulação de mastócitos, aumentando a resposta inflamatória; inibindo a síntese de prostaglandinas (PGs); reduzindo a produção de muco; provocando danos no endotélio vascular da mucosa gástrica com redução do fluxo sanguíneo local e conseqüente aumento da produção de ERO e lipoperoxidação na mucosa gástrica (Pan et al., 2008).

A bactéria *Helicobacter pylori*, é também considerada uma das principais causas do desenvolvimento de úlcera péptica, sendo que mais de dois terços da população mundial está infectada (Malaty, 2007). Os principais mecanismos lesivos decorrente dessa infecção, inclui a produção de amônia, aumento da secreção ácida, desequilíbrio no balanço entre os hormônios gastrina/somatostatina, diminuição da secreção de muco e bicarbonato acompanhado de uma diminuição da viscosidade do muco, bem como, na produção de citotoxinas CagA e VacA que levam à um quadro inflamatório na mucosa (Konturek et al., 2002).

Outro grande fator que tem contribuído para o crescimento da incidência de úlceras gástrica e duodenal é o uso crônico de drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (AINEs) indicado na terapêutica de diversos distúrbios inflamatórios, como artrite reumatóide, osteoartrites e dor aguda (Kato et al., 2007). As lesões gástricas induzidas pelos AINEs ocorrem tanto por ação local quanto sistêmica (Wallace, 2008), sendo o último preponderante. A ação local é devido à presença do grupo carboxílico em sua estrutura, o que confere propriedade emulsificante, permitindo a essas drogas se associarem quimicamente aos fosfolípidios presentes na membrana, prejudicando a propriedade hidrofóbica da barreira, a fluidez dos lipídeos, a espessura da camada protetora, e permitindo a formação de poros. Esse quadro leva à retrodifusão do ácido, ocasionando morte celular por necrose e apoptose, e o surgimento de lesões ulcerosas pépticas (Darling et al., 2004; Lichtenberger et al., 2006). O efeito sistêmico é decorrente da propriedade que os AINEs possuem em suprimir a produção de prostaglandinas via inibição da atividade das enzimas ciclooxigenases (Wallace, 2008), ocasionar infiltração de neutrófilos (Konturek, 2002), comprometer o balanço de óxido nítrico (NO) (Konturek et al., 2002), e produzir estresse oxidativo (Utsumi et al., 2006).

A predisposição genética e fatores comportamentais como o estresse também sinalizam como facilitadores para o desenvolvimento da doença em estudo (Marques, 2002). O ritmo de vida acelerado e a frequente exposição às situações aversivas que acompanham o homem moderno ocasionam irritabilidade, ansiedade, impulsividade, dificuldade de concentração, perda ou excesso de apetite, depressão e pânico. Situações de estresse estimulam a glândula supra-renal a liberar adrenalina e cortisol. O excesso de adrenalina acarretará em vasoconstrição e estresse oxidativo, e o excesso de cortisol estimulará o aumento da secreção do ácido clorídrico e pepsinogênio e também diminuirá o muco protetor, acarretando na formação de injúrias gástricas (Marsolla, 2009).

Outras pesquisas também revelam que há relação entre o tabagismo com o desenvolvimento da doença péptica. Os efeitos nocivos do cigarro sobre a mucosa são atribuídos aos fatores vasculares (Hui et al., 1991), diminuição da síntese de PGs, redução do conteúdo de muco e dos níveis de glutathione (Wong et al., 2002), supressão da liberação de NO (Ma et al., 1999), aumento do recrutamento de neutrófilos no tecido gástrico, aumento da concentração de sais biliares, elevação dos níveis de vasopressina, aumento da produção de fator ativador de plaqueta endotelina (Maity et al., 2003; Deniz et al., 2009). Em adição, é sabido que o tabagismo também provoca potencialização do quadro ulcerativo causado por estresse, álcool, AINEs, e *H. pylori* (Maity et al., 2003).

É importante considerar que no dano epitelial ocorre uma cascata de eventos fisiológicos que culminam com o aumento da concentração de espécies reativas (estresse oxidativo). O estresse oxidativo é definido como sendo o resultado de uma produção exacerbada de espécies reativas, a partir de um desequilíbrio entre sistemas pró e antioxidante, com predomínio dos pró-oxidantes e conseqüente aumento da peroxidação lipídica local (Finkel e Holbrook, 2000; Schafer e Buettner, 2001; Droge, 2002; Vancini et al., 2005; Vasconcelos et al., 2007). A peroxidação lipídica também provoca danos às células gástricas, desencadeando processos oxidativos envolvidos no desenvolvimento de úlceras pépticas. Vários estudos têm demonstrado que as ERO estão envolvidas em diversos modelos de indução de úlceras pépticas, principalmente o modelo de isquemia, que produz as espécies reativas, seguida de reperfusão tecidual, promovendo lesões através do carreamento de espécies reativas para a mucosa gástrica (Ueda et al., 1989).

Porém, a mucosa gástrica apresenta mecanismos de defesa importantes que ajudam a evitar estes danos e dessa forma manter sua integridade através de diversos fatores, como

organização celular do epitélio e sua adequada reconstituição, fluxo sanguíneo, camada de muco e secreção de bicarbonato (barreira protetora à ação do ácido no lúmen do estômago), sistema antioxidante, síntese de PGs e NO (Garner et al., 1979; Whittle et al., 1981; Whittle et al., 1990).

A primeira linha de defesa contra agentes agressores endógenos e exógenos é uma barreira denominada muco-bicarbonato-fosfolípídeo, localizada entre o lúmen e o epitélio (Allen e Flemström, 2005). Esse muco é liberado por exocitose, estimulado pelos mesmos mediadores responsáveis pelo aumento da secreção ácida, principalmente a acetilcolina, liberada pelos terminais nervosos parassimpáticos próximos às glândulas gástricas (Kutchai, 2004). Além da secreção de muco e bicarbonato, outro fator relevante de proteção da barreira gástrica é o fluxo sanguíneo. Essa circulação de sangue envolvida na mucosa é essencial para o fornecimento de oxigênio e nutrientes, remoção de substâncias tóxicas, secreção de bicarbonato e participação da cicatrização na úlcera péptica (Kawano e Tsuji, 2000).

Outra linha de defesa da mucosa é a camada contínua de células epiteliais, que estão fortemente interconectadas formando uma barreira que previne a retro-difusão de ácido e pepsina (Allen e Flemström, 2005). Segundo revisão feita por Szabo (1991), as células epiteliais têm propriedades intrínsecas de proteção tanto por sua disposição anatômica quanto por sua constituição bioquímica. Segundo o autor, as junções fechadas e outras barreiras intercelulares controlam a passagem de agentes lesivos do lúmen para a mucosa, e para espaços intersticiais e submucosos. Agentes que conseguem atravessar estas junções ainda são barrados pela membrana celular das células gástricas, que são compostas por elevada concentração de fosfolípidios, restringindo a difusão de moléculas hidrofílicas, como o íon  $H^+$ .

Estudos também relatam a ação das proteínas de choque térmico na defesa epitelial – Heat shock protein (HSP) – que por estímulos estressantes como pH ácido, temperatura elevada, ou presença de espécies radicalares (Tanaka et al., 2007; Mauchley et al., 2010) impedem que as células entrem em apoptose, através da prevenção da desnaturação proteica intracelular, estabilizando filamentos de actina, e inibindo enzimas-chave envolvidas no processo de morte celular (Garrido et al., 2006; Laine et al., 2008).

Adicionalmente aos fatores funcionais, os humorais são componentes fundamentais no mecanismo de proteção gastrointestinal. As prostaglandinas são mediadores lipídicos sintetizados a partir do ácido araquidônico, pela ação das enzimas cicloxigenases (COX) e

liberadas por estímulos químicos ou mecânico (Botting, 2006). Essa substância endógena age por meio do estímulo da secreção de muco, bicarbonato e fosfolípido, aumento do fluxo sanguíneo da mucosa, além de acelerar o processo de restituição epitelial, bem como, a cicatrização da mucosa (Laine et al., 2008). O mecanismo de ação se dá principalmente pela ligação direta ao receptor EP<sub>3</sub>, que irá acoplar-se à proteína inibitória G<sub>i</sub>, atenuando a via da adenilato ciclase (AC) e consequentemente causando a supressão da acidez gástrica na célula parietal (Kato et al., 2007). Atay et al., (2000) atribui as PGs a capacidade de inibição da motilidade gástrica, inibição da secreção ácida gástrica, inibição da apoptose, inibição da ativação de mastócitos, e a diminuição da aderência leucocitária ao endotélio vascular. Em adição, Hawkey e Rampton (1985) sugerem que as prostaglandinas-E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) exercem proteção por aumentar tanto a secreção de muco e bicarbonato quanto à resistência de células epiteliais contra danos causados por citocinas, além de manter o fluxo sanguíneo da mucosa.

Um mediador endógeno considerado o principal inibidor fisiológico da secreção ácida, é a somatostatina, hormônio liberado pelas células D (Schubert e Peura, 2008). Esta substância age diretamente sobre o receptor SST<sub>2</sub> acoplado à proteína inibitória (G<sub>i</sub>) causando a diminuição dos níveis de AMPc e da atividade da adenilil ciclase e, por fim levando a inibição da secreção ácida (Schubert, 2003). Geralmente, no trato gastrointestinal, age também como um inibidor da secreção de outros hormônios (gastrina e secretina) (Katagiri et al., 2005), sendo estes também os responsáveis pela secreção de ácido gástrico.

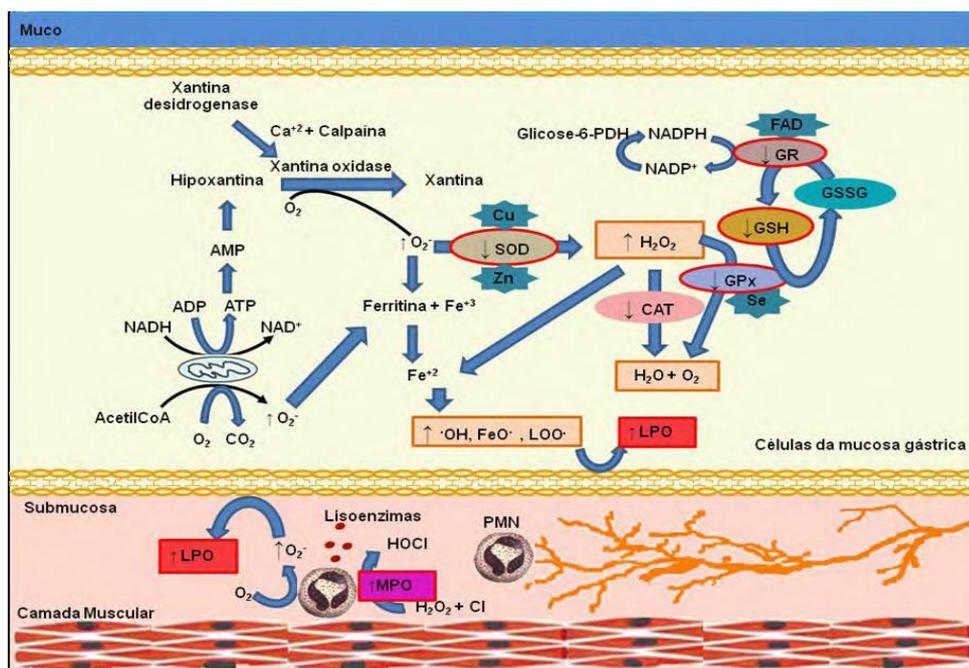
Outra molécula sinalizadora envolvida na proteção da mucosa é o NO, uma molécula gerada por uma família de enzimas conhecidas como óxido nítrico sintases (NOS). Neste sentido, três genes independentes codificam a NOS neuronal (nNOS) (Bedt et al., 1991), e a endotelial (eNOS) (Sessa et al., 1992), expressadas constitutivamente; e a induzida (iNOS), estimulada por processos imunológicos (Xie et al., 1992), as quais possuem a capacidade de gerar o NO por mecanismos regulatórios complementares e distintos. No estômago, o óxido nítrico (NO) está envolvido na integridade da barreira da mucosa gástrica junto com as PGs, pelo que se considera gastroprotetor e antioxidante ao regular a produção do ácido clorídrico, estimular a produção de muco gástrico, controlar o fluxo sanguíneo e prevenir a peroxidação lipídica pela captação de radicais livres (WAbdallah, 2010), além de acelerar o processo de cicatrização da mucosa (Yang et al., 2000).

Os compostos sulfidrílicos (SHs) também são moléculas envolvidas na citoproteção gástrica e estão abundantemente presente no muco gástrico e em diversas enzimas do sistema

antioxidante, onde desempenha um papel fundamental na manutenção da integridade gástrica, principalmente quando as ERO estão envolvidas em seu desenvolvimento (Kimura et al., 2001). Esses agentes ligam-se aos radicais livres formados durante este processo ou produzidos após exposição a agentes nocivos, protegendo assim a mucosa gástrica (Avila et al., 1996).

Somado a isso, o organismo ainda possui uma capacidade de defesa antioxidante do sistema gastrointestinal que envolve diversas enzimas captadoras de radicais livres (Figura 2), como a superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT), além de sistema secundário de defesa não enzimático representado por captadores de radicais livres de baixo peso molecular como tióis, glutathiona, vitamina E e C, carotenóides e metionina, que decompõem muitos desses agentes pró-oxidantes, limitando os prejuízos no tecido (Pohle et al., 2001; Pavlick et al., 2002; Thomas, 2000). O destaque é a Glutathiona, um tripeptídeo com alta capacidade doadora de elétrons (alto potencial redox negativo) devido ao grupamento tiol (-SH) na porção cisteína, combinado com uma alta concentração intracelular, resultando em um alto poder redutor. Características estas que, segundo Griffith e Mulcahy (1999), justificam sua potente atividade antioxidante e sua propriedade de cofator enzimático, importantes para regulação da atividade celular. De acordo com Meister e Anderson (1983), a Glutathiona está presente no organismo em duas formas; reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular.

São considerados bons antioxidantes, moléculas que sequestram radicais livres; quelam metais importantes no sistema redox, interagem ou regeneram outros antioxidantes, tem efeito positivo na expressão gênica, são absorvidos, podem se apresentar em concentrações consideráveis nos tecidos e fluidos biológicos agindo nos meios aquosos e hidrofóbicos (Valko et al., 2006).



**Figura 2:** Fontes de radicais livres e sistema antioxidante endógeno  
**Fonte:** Adaptado de Falcão, (2007).

Dentre os eventos fisiológicos que levam ao aumento da concentração de espécies reativas, tem destaque a resposta inflamatória aguda. Em geral, essa resposta é de curta duração e, além de uma reação local, ocorre também uma reação sistêmica, que tem por finalidade promover proteção aos tecidos, restringindo os danos no local afetado (Bilate, 2007). Vários mediadores participam ativamente dessa resposta inflamatória, dentre eles a Mieloperoxidase (MPO) uma enzima pró-oxidante que funciona como um marcador sensível e específico da inflamação aguda à medida que reflete a infiltração/agregação de neutrófilos, e está frequentemente aumentada em lesões ulcerosas (Dengiz et al., 2007; Guha et al., 2009).

## 1.2 Considerações gerais sobre diarreia

Além das úlceras pépticas, outro distúrbio bastante comum do trato gastrointestinal em países de desenvolvimento como o Brasil, é a diarreia. Desde a antiguidade, essa doença tem sido considerada um dos problemas de saúde mais importantes que afligem a humanidade, principalmente populações com baixo nível socioeconômico, países em desenvolvimento e de terceiro mundo. Globalmente, a diarreia foi estimada matar a cada ano cerca de 2,2 milhões de pessoas, sendo a maioria lactentes e crianças com idade inferior a 5 anos (Gutierrez et al., 2008). Em 2008 esse número foi estimado em 2,1 milhões de mortes relacionados à diarreia

(WHO, 2008). Aproximadamente 88% das mortes relacionadas com a diarreia são causadas devido ao saneamento inadequado e falta de higiene (Kosek et al., de 2003). Este distúrbio é considerado também uma das principais causas de retardo do crescimento e morte em recém-nascidos (Petri et al., 2008). Nos países mais pobres, a diarreia é a terceira causa mais comum de morte em crianças menores de 5 anos, ficando logo atrás das causas neonatais e da pneumonia (UNICEF, 2008).

No Brasil, segundo dados do DATASUS para o ano de 2009, a doença diarréica aguda (DDA) foi responsável por 7,2% das hospitalizações (Brasil, 2009a) e 2,5% das mortes em crianças abaixo dos 5 anos (Brasil, 2009b). Esses números talvez não reflitam a realidade do país, pois diarreia não faz parte do conjunto de doenças nacionais de notificação compulsória e seus números reais são pouco conhecidos, devido à subdiagnóstico da doença (Façanha e Pinheiro, 2005).

A diarreia é definida como um aumento no número de evacuações (3 ou mais/24 h), um aumento na fluidez das fezes e/ou a presença de sangue e muco nas mesmas (Mathan, 1998). O conteúdo líquido é o principal determinante do volume e consistência das fezes, refletindo um equilíbrio entre a entrada luminal (ingestão e secreção de água e eletrólitos) e a saída ao longo do trato gastrointestinal. Os mecanismos neurohumorais, os patógenos, além de medicamentos podem alterar estes processos, resultando em mudanças na secreção ou absorção de fluido pelo epitélio intestinal. A motilidade alterada também contribui de uma maneira geral para este processo, assim como a extensão da absorção paralela ao tempo de trânsito (Vitali et al., 2006). Assim, a viscosidade do bolo fecal depende basicamente da absorção de água e da intensidade da propulsão intestinal.

No processo diarreico observa-se uma redução da absorção ou uma hipersecreção de água juntamente com um aumento da motilidade intestinal, que reduz a solidez das fezes. Esta mudança no fluxo de água é basicamente devido a um aumento na secreção de íons cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) ou bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) e uma inibição na absorção de íons sódio  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  (Field e Semrad, 1993).

Muitos fatores podem ser responsáveis pelo aparecimento da diarreia, incluindo agentes infecciosos, toxinas, ansiedade, medicamentos, e etc. A diarreia também é um evento adverso relativamente frequente, contabilizando cerca de 7% das reações adversas de todas as drogas. Mais de 700 fármacos têm sido relatados como causadoras de diarreia, aqueles mais frequentemente envolvidos são os antimicrobianos, antiácidos contendo magnésio, produtos

contendo lactose ou sorbitol, análogos de prostaglandinas, colchicina, antineoplásicos, drogas antiarrítmicas e agentes colinérgicos (Chassany et al., 2000). Além disso, a diarreia é um sinal presente em muitas doenças, como a AIDS, por exemplo, que apresenta a prevalência da diarreia é de aproximadamente 50% dos casos (Bouchaud, 1996).

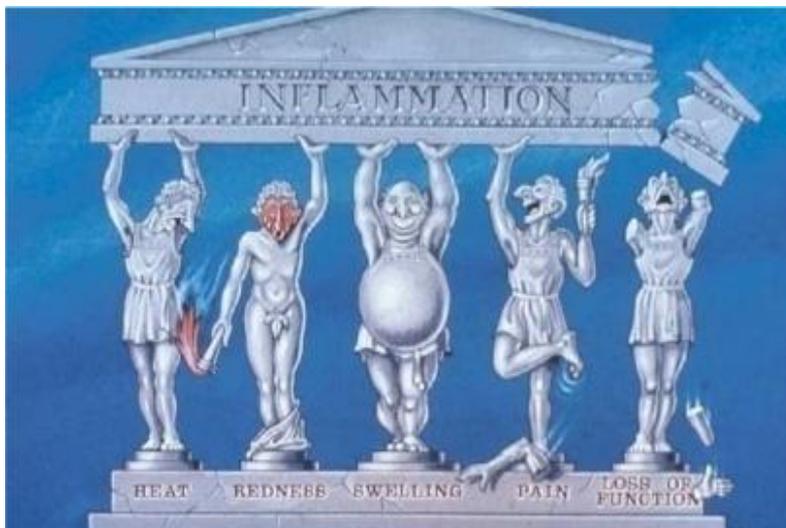
O maior risco da diarreia é a desidratação. O excesso de perda de água e eletrólitos nas fezes podem levar a desidratação, hiponatremia e hipocalcemia. No tratamento da diarreia secretória, a terapia de reidratação oral exerce importante papel sendo eficiente em mais de 90% dos casos com desidratação leve a moderada. Estudos da Organização Mundial de Saúde (OMS) têm demonstrado que a terapia de reidratação oral é efetiva no tratamento das diarreias (Martinez et al., 1988). Além disso, as condições sanitárias (ambiental e educacional) deficientes e a desnutrição predispõem principalmente as crianças a um grande risco para problemas de diarreia. A maior parte dos patógenos gastrointestinais são transmitidos por alimentos ou bebidas contaminadas com material fecal. Os patógenos habituais, como bactérias, vírus e protozoários, são os mais encontrados na maioria dos casos de diarreia aguda. Estes incluem *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Norovirus*, *Rotavirus*, *Giardia*, *Cryptosporidium* e *Entamoeba histolytica* (Gurgel, 2000). Para algumas pessoas são incapazes de digerir componentes de alguns alimentos, como os adoçantes artificiais e a lactose, apresentam episódios de diarreia (Pathela et al., 2006).

### ***1.3 Inflamação e mediadores inflamatórios***

A inflamação é a resposta fisiológica a um agente que possa causar lesão tecidual. Esse agente, que pode ser de natureza física (raios UV, traumas), química (toxinas e ozônio) ou biológica (bactérias, fungos e tecido necrótico), desencadeia o processo inflamatório que tem como função eliminar o causador do dano tecidual e reparar o tecido (Cotran et al., 1994; Barton, 2008).

A primeira descrição da inflamação é creditada ao romano A.C. Celsus no século I d.C., que documentou quatro sinais clínicos da inflamação, os chamados sinais cardinais: calor, rubor, edema e dor. No século XIX, o pesquisador Rudolf Virchow adicionou um quinto sinal, a perda de função. Até hoje são aceito esses cinco sinais cardinais para definir uma resposta inflamatória clássica (Figura 3) (Benaroyo, 1994; Scott et al., 2004). Porém, quando esta resposta não é modulada, ocorre a exacerbação do processo, e o quadro pode se

tornar crônico, culminando com a perda de função do tecido e diminuição da qualidade de vida do organismo (Gilroy et al., 2004).



**Figura 3:** Sinais cardinais da inflamação

**Fonte:** (Bogliolo e Luigi. Disponível em: <http://defesasnaoespecificas.blogspot.com.br/2012/12/resposta-inflamatoria.html>)

Em geral, as lesões teciduais desencadeiam uma reação inflamatória local através do recrutamento de leucócitos que liberam mediadores inflamatórios locais tais como: cininas (bradicinina e calidina), citocinas (interleucinas e fator de necrose tumoral), aminas (serotonina e histamina) e prostanóides (prostaglandinas, prostaciclina e leucotrienos). Esses mediadores são capazes de estimular e sensibilizar os nociceptores provocando a dor (Taiwo e Levine, 1991; Guieu et al., 1996; Millan, 1997; Millan, 1999).

Após o estímulo inflamatório local, as alterações vasculares iniciam-se imediatamente e desenvolvem-se durante as primeiras horas. Essas alterações consistem em vasodilatação, aumento de fluxo sanguíneo local, aumento de permeabilidade vascular e exsudação de plasma (Lima et al., 2007).

A vasodilatação e o extravasamento de fluidos são acompanhados pela marginação, rolamento, adesão e transmigração endotelial de leucócitos para a área lesada, sendo uma das características da resposta inflamatória associada também à dor (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004; Gossiau et al., 2011). Os leucócitos por sua vez liberam substâncias algigênicas, dentre elas a acetilcolina, bradicinina, histamina, serotonina, substância P, PGE<sub>2</sub>, Leucotrieno (LTB<sub>4</sub>), TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e adenosina monofosfato cíclico (AMPc). Essas substâncias sensibilizam os nociceptores que transmitem o impulso nervoso para o sistema nervoso

central e também liberam a substância P no sítio da inflamação, um neuropeptídeo que contém neurônios sensoriais de primeira ordem, estimula a vasodilatação juntamente com a continuidade do próprio processo inflamatório (Taiwo e Levine, 1991; Guieu et al., 1996; Calixto et al., 2001; Teixeira, 2001).

Outro mediador inflamatório liberado no local da inflamação é o NF- $\kappa$ B, um fator de transcrição gênica responsável por regular a produção de citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-6, iNOS, COX-2 e TNF- $\alpha$  (Barnes e Karin, 1997, Tak e Firestein, 2001). O TNF- $\alpha$  pode induzir a dor diretamente ou via estimulação da síntese de IL-1 $\beta$ , IL-6 e/ou IL-8 (Cunha et al., 2005). A interleucina IL-1 $\beta$  é conhecida pela modulação na excitabilidade neuronal via receptores TRPV-1 (receptor de potencial transitório vanilóide 1), canal de sódio, GABA (ácido gama aminobutírico) e NMDA (N-metil-D-aspartato) (Schafers e Sorkin, 2008). A fosforilação de receptores NMDA sinaliza a transmissão da dor, e essa fosforilação tem sido atribuída a citocina IL-1 $\beta$  (Brenner et al., 2004).

O ácido araquidônico (AA) tem papel fundamental na inflamação, pois serve de substrato para ação de diferentes enzimas que geram eicosanóides distintos, como prostaglandinas PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub>. O ácido araquidônico sofre ação da ciclooxigenase (COX) que se apresenta em duas principais isoformas: COX-1, a isoforma constitutiva, responsável pela produção de PGs que controlam os processos fisiológicos normais, e COX-2, isoforma induzida, tem a sua expressão ativada nos processos inflamatórios (Balsinde et al., 1998; Lages et al., 1998; Smith et al., 2000; Kummer e Coelho, 2002).

Dentre as PGs produzidas no processo inflamatório, a PGE<sub>2</sub> é essencial para o controle do fluxo sanguíneo e dilatação dos vasos. Trata-se de um prostanóide com inúmeras funções no organismo, entre elas, a regulação vascular, modulação das funções neuronais e renais, o processo de ovulação, a proteção da mucosa gástrica, a dor e inflamação (Samuelsson et al., 2007; Levy et al., 2001; Rocha et al., 2007; Wallace, 2008). A PGE<sub>2</sub>, produto da reação de metabolização do AA pela COX-2 catalisada pela mPGES-1 (PGE sintase de membrana-1) (Samuelsson et al., 2007), é responsável pela vasodilatação e pelo edema no processo inflamatório, e também age como um mediador lipídico importante no processamento dos sinais dolorosos periféricos ou centrais, uma vez que os receptores de PG são expressos nas fibras sensoriais (Zeilhofer e Brune, 2006).

Os leucotrienos são metabólitos oxigenados derivados do ácido araquidônico através da via da 5-lipoxigenase (5-LOX). A enzima 5-LOX em associação com a proteína de

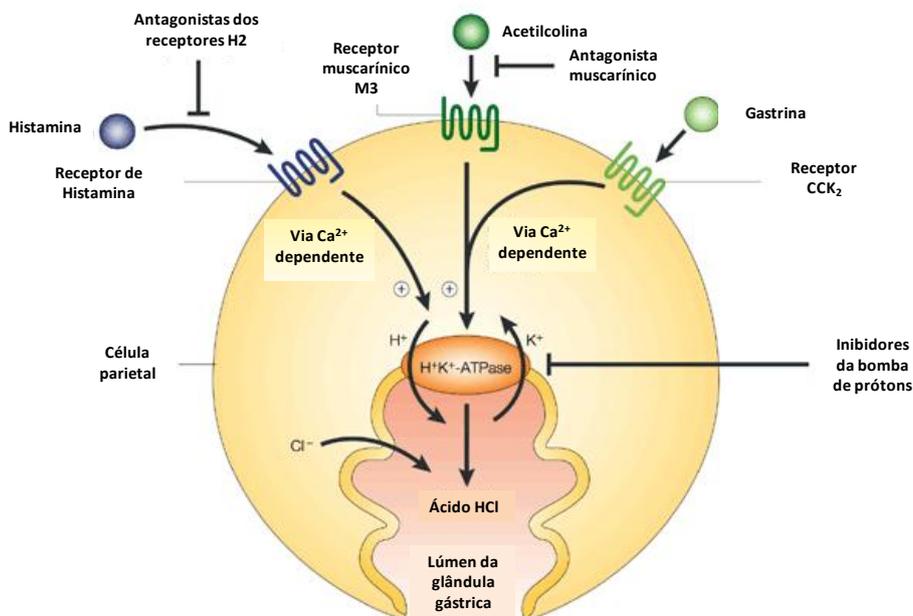
ativação (5-LAP), cataliza os primeiros dois passos de conversão do AA em leucotrieno A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>), que subsequentemente são metabolizados pela LTA<sub>4</sub>-hidrolase nos neutrófilos à LTB<sub>4</sub>, e pela LTC<sub>4</sub>-sintase nas plaquetas à LTC<sub>4</sub> (Lewis et al., 1990; Kumar et al., 2005). Eles são potentes mediadores inflamatórios, encontrados nos pulmões, nas plaquetas, nos mastócitos e nos leucócitos (neutrófilos e macrófagos), e estão envolvidos em diversos processos fisiopatológicos (Henderson, 1994, Eppler et al., 2007), além de atuarem como importante fator quimiotático tanto para neutrófilos quanto para macrófagos (Rang e Dale, 2007). O LTB<sub>4</sub> também modula a dor causando hiperalgesia (Guerrero et al., 2013).

Em geral, a resposta inflamatória está intimamente ligada ao processo de reparo através de uma série de eventos que tentam reparar e reconstruir o tecido danificado (Rocha et al., 2007). Sabe-se que falhas nestes processos, faz com que o processo inflamatório agudo persista, levando a um estado inflamatório crônico, o qual envolve a formação de granuloma, necrose e fibrose (Medzhitov, 2008). A persistência do processo inflamatório culmina no desenvolvimento de distúrbios complexos como as doenças autoimunes e cardiovasculares, síndrome metabólica, processos neurodegenerativos e câncer (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004; Murakami e Hirano, 2012).

## 2. JUSTIFICATIVA

### 2.1 Farmacoterapia da úlcera péptica, diarreia e inflamação e suas limitações atuais

Na tentativa de proteger a mucosa do ácido gástrico, aumentar a cicatrização e prevenir a recorrência da úlcera, a farmacoterapia utiliza diversas alternativas terapêuticas, entre elas estão, os fármacos que atuam na inibição da secreção de ácido gástrico por antagonizar os receptores de histamina  $H_2$  (cimetidina, ranitidina); os inibidores da bomba protônica (lanzoprazol, omeprazol); os que promovem aumento nos fatores protetores da mucosa e citoprotetores representados pelo sucralfato, misoprostol (análogo de  $PGE_2$ ) e a carbenoxolona atualmente utilizada como ferramenta farmacológica para a pesquisa pré-clínica (Mossner e Caca, 2005); aqueles que agem diminuindo a motilidade gastroduodenal e também a redução da secreção de ácido por antagonizar os receptores muscarínicos (pirenzepina); outros que atuam na neutralização da acidez por antiácidos, como o bicarbonato de sódio, hidróxido de alumínio, hidróxido de magnésio, entre outros (Jain et al., 2007); e os de ação antibacteriana (anti-*H.pylori*), através da redução da secreção ácida estomacal e citoproteção (Schoroeter et al., 2008). A figura 4 traz um esquema exemplificando estas alternativas terapêuticas para o tratamento da doença ulcerosa péptica.



**Figura 4:** Alternativas terapêuticas para o tratamento da úlcera péptica  
**Fonte:** (Adaptado de Olbe et al., 2003).

Um dos maiores problemas relativos aos tratamentos convencionais de úlcera péptica é a recorrência das lesões na mucosa. Esses fármacos são efetivos e comumente utilizados para tratar os sintomas, mas não garantem cura.

Embora a taxa de cicatrização da mucosa gástrica com a utilização de antagonistas  $H_2$  e inibidores da bomba de prótons, seja de 80-100%, depois de uma terapia de 4 semanas, a recorrência da úlcera dentro de 1 ano depois do término do tratamento está entre 40-80%, considerando que, estes são os medicamentos mais utilizados na atualidade para o tratamento de úlceras pépticas. Dados mostram que as úlceras cicatrizadas espontaneamente ou depois do uso de cimetidina (antagonista  $H_2$ ) são precariamente vascularizadas e têm de 2-3 vezes menos densidade de vasos sanguíneos novos do que no tecido normal, acreditando-se ser esta uma das razões da sua recorrência (Szabo e Vincze, 2000). Além do mais, estudos constataram que o uso prolongado de antagonistas  $H_2$  e inibidores da bomba de prótons podem aumentar o risco de desenvolvimento de câncer (Marcolin et al., 2004; Ue et al., 2007).

A reação inflamatória é um mecanismo de proteção do organismo contra agentes ofensores ou traumas, no entanto, em certas circunstâncias, essa resposta defensiva pode ser dirigida de forma inadequada a substâncias externas ou a tecidos do próprio organismo, podendo produzir danos. Nestas condições pode ser necessária a utilização de drogas anti-inflamatórias. A pesquisa de terapias para o tratamento da inflamação está direcionada a doenças como asma, artrite reumatóide, artrite psoriática, lúpus eritematoso sistêmico, doença de Crohn, esclerose múltipla e vasculite sistêmica (Gilroy et al., 2004).

Os glicocorticóides são potentes mediadores anti-inflamatórios endógenos que são liberados em poucos minutos na resposta ao estresse e a lesão tecidual como mecanismo de controle da severidade da resposta inflamatória (Gilroy, et al., 2004). Uma das formas pela qual os glicocorticóides inibem a produção de PGs é por meio da indução da síntese de lipocortina (ou anexina-1), que por sua vez atuam inibindo a fosfolipase  $A_2$ , a enzima que converte fosfolípídeos de membrana em ácido araquidônico (Flower e Rothwell, 1994). Além disto, os glicocorticóides também inibem a expressão gênica desta enzima contribuindo para a inibição da resposta inflamatória (Nakano e Arita, 1990).

Entretanto, a abordagem terapêutica mais comum para reduzir a inflamação envolve o uso de AINEs, como aspirina ou ibuprofeno (Kummer e Coelho, 2002; Basbaum, 2009; McGettigan e Henry, 2013).

Os AINEs apresentam atividade analgésica, antipirética e anti-inflamatória (Teixeira, 2001), e são capazes de reduzir a dor inflamatória e a hiperalgesia principalmente pela inibição da COX-1 e COX-2, envolvidas na síntese de prostaglandinas (Basbaum et al., 2009), produzindo alívio da dor por um período significativo (Katzung, 2007). Os AINEs ainda possuem mecanismos adicionais de ação, incluindo a inibição da quimiotaxia, produção de citocinas (Rhind et al., 2002), além de serem capazes de inibir a ação de mastócitos e bloquear a atuação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (Carr e Goudas, 1999).

As reações adversas provocadas pelos AINEs já são bem compreendidas, estando amplamente relacionadas com o mecanismo de ação descritas a seguir. A inibição da COX-1 leva ao aparecimento de efeitos gastrointestinais que podem variar de dispepsia a sangramentos do estômago e duodeno, ativação de doenças inflamatórias intestinais quiescentes e dano tecidual, como úlceras, no trato gastrointestinal. As úlceras gástricas são decorrentes do efeito tópico e sistêmico de alguns AINEs que promovem a alteração do pH, redução da secreção de muco e bicarbonato, alterações microvasculares e indução de infiltração leucocitária na mucosa gástrica (Wallace, 2008). Normalmente estes efeitos aparecem após um longo período de uso (Brenol et al., 2000), e podem ser agravados por fatores como estresse, alcoolismo, fumo e infecção por *H. pylori* (Konturek et al., 2005). Os danos no trato gastrointestinal, provocados pelos AINEs, podem ser reduzidos com a administração concomitante deste medicamento com inibidores da bomba de prótons (Rostom et al., 2009).

As drogas antidiarreicas reduzem as características da doença como a perda da consistência das fezes e o aumento da frequência de defecação e da massa fecal. Sua ação é produzida através de efeitos sobre o trânsito intestinal, o transporte da mucosa, ou o conteúdo da luz intestinal (Rang et al., 2006). Avanços terapêuticos têm incluído os antagonistas dos receptores da serotonina (5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub>), antagonistas do sistema calcicocalmodulina, agonistas dos receptores opióides sigma e o inibidor da encefalinase, racecadotril (Farthing, 2000). Existem também aqueles utilizados para aumentar a motilidade como a domperidona, a metoclopramida e a cisaprida, ou também diminuir a motilidade do intestino, assim como os opiáceos (loperamida) e os antagonistas dos receptores muscarínicos (atropina), porém todas possuem efeitos colaterais indesejáveis associados ao seu uso (Ghosh, 2005). A terapia de reidratação oral que tem tido grande importância no salvamento de vidas e continuam sendo

utilizadas (Schiller e Sellin, 2006), contudo, novos métodos para o tratamento da diarreia ainda estão sendo explorados (Schiller e Sellin, 2006).

Neste sentido, a OMS tem encorajado fortemente aos estudos para o tratamento e prevenção das doenças do trato digestório com o uso de práticas da medicina tradicional (Lutterodt, 1989) sendo as plantas medicinais, um dos mais promissores instrumentos desta prática para o combate destas doenças do TGI (Maikere-Faniyo et al., 1989; Almeida et al., 1995).

O grande objetivo dos pesquisadores na atualidade é a busca de fármacos mais eficazes, que apresentem menos efeitos colaterais e menos índices de recidivas que as drogas existentes no mercado e os produtos naturais são os principais alvos. Assim, extratos e princípios ativos originários de plantas podem levar ao desenvolvimento de novas drogas, sendo importante avaliá-los como alternativa às terapêuticas antiulcerogênica, antidiarreica e anti-inflamatória consagradas e que não são livres de efeitos adversos e/ou provocar recidivas.

## ***2.2 Plantas medicinais como fonte de novos fármacos***

As plantas são importantes fontes de produtos naturais biologicamente ativos e são consideradas um caminho promissor para a descoberta de novas substâncias. Pressões evolutivas induziram que as mesmas gerassem compostos de valor adaptativo, os metabólitos secundários. Sabe-se que muitas destas substâncias estão diretamente envolvidas em mecanismos que permitem à adequação da planta ao seu meio (Simões et al., 2004).

O aparecimento de metabólitos biologicamente ativos, segundo Rhodes (1994), é determinado por necessidades ecológicas e possibilidades biossintéticas, sendo que a co-evolução de plantas, insetos, microorganismos e mamíferos conduz a síntese de metabólitos secundários com funções de defesa ou atração, principalmente. Estes compostos podem proteger as plantas de fungos, viroses, insetos e predadores herbívoros (Nahrstedt, 1989; Harbone, 1990), ou ajudá-las na reprodução atraindo polinizadores. A imensa diversidade de espécies vegetais é um repositório invariável de compostos químicos incomuns, criando metabólitos secundários que são como impressões digitais individuais da espécie (Eisner, 1992).

Segundo Calixto et al. (2004), plantas e seus derivados apresentam uma variedade de ações terapêuticas e representam uma promissora área para busca de novas alternativas.

Nesse sentido, acredita-se que aliar o conhecimento popular ao científico em busca de novos medicamentos tem se tornado uma grande estratégia e um dos principais caminhos para o sucesso de pesquisas na área de plantas medicinais (Di Stasi e Hiruma-Lima, 2002).

De acordo com Decreto de nº.5813/2006 da Presidência da República do Brasil, que reporta a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos, a população brasileira deverá ter garantido o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos como opção terapêutica. Para viabilizar essa ação, é necessário promover o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e o fortalecimento da indústria nacional por meio de incentivos aos setores públicos e privados, universidades, centros de pesquisa e organizações não governamentais (Brasil, 2006).

No Brasil, a diversidade da flora é um potencial para gerar processos e produtos inovadores. De acordo com Barata (2005), houve um crescimento nas vendas de produtos fitoterápicos na taxa de 6% a 8% no país, enquanto o mercado de produtos sintéticos cresceu apenas 3% a 4%. No mercado mundial de fitomedicamentos e sintéticos a ordem de faturamento é US\$ 21,7 e 602 bilhões anuais, respectivamente, enquanto no Brasil, o mercado de fitomedicamentos situa-se próximo de US\$ 500 milhões (Barata, 2005; Takaki et al., 2007).

A OMS retrata que devido à pobreza ou a falta de acesso aos medicamentos modernos, cerca de 60 a 80% da população dos países em desenvolvimento dependem essencialmente das plantas para os cuidados primários com a saúde (Fabricant e Farnsworth, 2001).

Dessa forma, podemos afirmar que o desenvolvimento de fitoterápicos padronizados com eficácia e segurança comprovados de seu uso, constitui uma ferramenta importante para o elevado acesso da população aos medicamentos, assim como oferecer novas opções terapêuticas diante da problemática atual que são os efeitos colaterais abundantes apresentados pelos fármacos de origem sintética.

## **2.3 *Cissus sicyoides* L.**

### **2.3.1 *Descrição botânica***

De acordo com Lombardi (2000), a classificação taxonômica de *Cissus sicyoides* L. é:

- Reino: Plantae;
- Subreino: Traqueobionta (plantas vasculares);

- Superdivisão: Spermatophyta (plantas com sementes);
- Divisão: Magnoliophyta (plantas com flor);
- Classe: Magnoliopsida (dicotiledôneas);
- Subclasse: Rosidae;
- Ordem: Rhamnales. Incluem-se nesta ordem apenas 3 famílias:

Rhamnaceae, Vitaceae e Leaceae.

- Família: Vitaceae.

A família Vitaceae é de distribuição tropical e subtropical, incluindo cerca de 12 gêneros e 800 espécies. As espécies dessa família são lianas ou raramente ervas não escandentes ou arvoretas, geralmente com gavinhas opostas às folhas (representando inflorescências modificadas); as folhas são alternas, simples ou compostas, frequentemente palminérvias, muitas vezes com estípulas. Inflorescência cimosas ou paniculada, terminal, axilar ou oposta às folhas; flores normalmente pouco vistosas, bissexuadas ou unissexuadas, actinomorfas, diclamídeas; cálice quase sempre muito reduzido, 4-5-mero, gamossépalo, prefloração valvar ou aberta; corola 4-5-mera, dialipétala ou gamopétala (formando uma caliptra em *Vitis*); estames em número igual ao das pétalas, anteras rimosas, disco nectarífero ou glândulas nectaríferas isoladas presentes; ovário súpero, bilocular, placentação axial, 2 óvulos por lóculo. Fruto baga (Souza e Lorenzi, 2005).

O gênero *Cissus* (L.) é o maior da família Vitaceae, com cerca de 350 espécies. Na América do Sul esse é o único gênero de ocorrência natural, com exceção de uma única espécie do gênero *Vitis* que ocorre naturalmente no noroeste do continente sul-americano. *Cissus* é um gênero neotropical, ocorrendo principalmente na América do Sul. As espécies ocorrem em matas primárias, secundárias, cerrados, caatingas, campos, vegetações de altitude e litorânea (Lombardi, 2000).

*Cissus sicyoides* L. apresenta duas nomenclaturas, cuja sinonímia é denominada de *C. verticillata* (Lombardi, 2000).

Esta espécie é conhecida popularmente no Brasil principalmente como “insulina vegetal” (Oliveira, 2006), cortina japonesa, cortina de pobre, cipó-puçá, puçá (Barbosa et al., 2002), anil trepador, uva-brava, achite, caavurana-de-chuhan, tinta-dos-gentios e bejuco caro (Beltrame et al., 2001). Esta espécie é descrita como “herbácea escandente ou trepadeira, perene, vigorosa, com ramos e folhas um tanto carnosas, com gavinhas opostas às folhas e

raízes aéreas pêndulas, nativa da região norte do Brasil. Suas folhas são simples, membranáceas, de 4-7 cm de comprimento (Figura 5). As flores são pequenas, dispostas em inflorescência corimbiformes. O fruto é do tipo ovóide-globosa, de cor roxa escura, com polpa carnosa, contendo uma única semente de cerca de 6 mm de comprimento” (Braga, 1985; Lino, 2008).



**Figura 5.** Partes aéreas de *C. sicyoides* L.

**Fonte:** Plantamed, Disponível em: [http://botany.cs.tamu.edu/FLORA/perdeck/jam\\_094.jpg](http://botany.cs.tamu.edu/FLORA/perdeck/jam_094.jpg).

A espécie desenvolve-se em altitudes de 0 a 1800 m, florindo e frutificando ao longo de todo o ano. Distribui-se do México, Caribe e América do Sul, exceto no Chile e Argentina, conforme áreas pintadas no mapa, na figura 6 (Lombardi, 2000). No Brasil, a *C. sicyoides* é largamente encontrada na Caatinga (Cano e Volpato, 2004).



**Figura 6:** Distribuição geográfica de *C. sicyoides* L.  
**Fonte:** Disponível em: <http://www.tropicos.org>

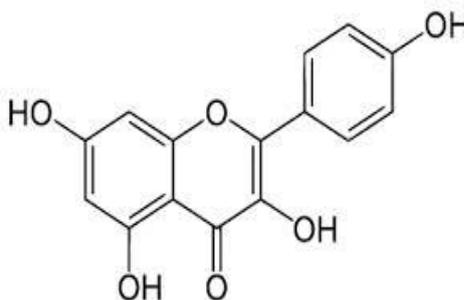
### 2.3.2 Descrição etnofarmacológica

Na literatura etnofarmacológica, o uso do chá de suas folhas é citado popularmente como anti-inflamatório, antihipertensivo, antitérmico, antidiabético, antireumático, antigripal, contra infecções respiratórias, dislipidemias, distúrbios gastrointestinais e indigestão, para anemia, acidente vascular cerebral, tremores e como ativador da circulação sanguínea (Barbosa et al., 2002; Van Den Berg, 1993; Beltrame et al., 2001; Agra et al., 2007; Ferreira et al., 2008). Em algumas regiões da Amazônia, o suco das folhas e ramos é empregado para o tratamento da epilepsia (Mors et al., 2000).

### 2.3.3 Descrição fitoquímica

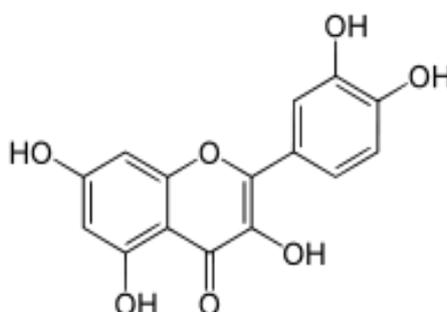
Análises fitoquímicas realizadas com a espécie vegetal *C. sicyoides* determinou a presença de cetoesteróides, carotenóides, vitamina E e alcalóides. Na fração acetato de etila, do extrato aquoso das folhas, foram isolados os flavonóides kaempherol (3,5,7-tri-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4h-1-benzopiran-4-ona), luteolina (2-(3,4-Di-hidroxifenil)-5,7-dihidroxi-4H-1-benzopiran-4-ona) e sulfato de 3`luteolina (Barbosa et al., 2002). Na análise por cromatografia de camada delgada de sílica gel (CCD) constata-se a ocorrência de quercetina

(2-(3,4-di-hidroxifenil)-3,5,7 trihidroxi-4H-1-benzopiran-4-ona) e kaempferol (Figura 7). O doseamento de flavonóides totais por espectroscopia no UV forneceu valores de 4,75% no vegetal seco, 3,8% no extrato aquoso, 3,6% no extrato fluido e 3,2% na tintura. Assim, pode-se propor a quercetina como marcador nas análises de controle de qualidade por CCD (Soares e Barbosa, 2007).



#### Kaempferol

(3,5,7-tri-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4h-1-benzopiran-4-ona),  
3,4',5,7-tetra-hidroxyflavona  
C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub> Peso molecular: 286,23  
C 62,94%, H 3,52%, O 33,54%



#### Quercetina

quercetina ((2-(3,4-Di-hidroxifenil)-5,7-di-hidroxi-4H-1-benzopiran-4-ona  
3,3',4',5,7-pentahydroxyflavona  
C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>  
Peso molecular: 302,23  
C 59,61%, H 3,34%, O 37,06%

**Figura 7:** Estruturas químicas de flavonóides presentes em *C. sicyoides* L.

**Fonte:** Google imagens

Na análise do extrato hidroalcoólico da planta inteira constatou-se a presença dos metabólitos secundários taninos, terpenos esteróides/triterpenóides e alcalóides (Dominici et al., 2003). Já das partes aéreas foram isoladas e identificadas as cumarinas 5,6,7,8-tetrahidroxicumarina-5β-xylopyranosideo e sabadina, os flavonóides Kaempferol 3-α-

ramínosídeo e quercetina 3- $\alpha$ -raminosídeo e os triterpenos esteroidais  $\beta$ -sitosterol, sitosterol- $\beta$ -D-glicopiranosídeo e antocianinas (Beltrame et al., 2002; Garcia et al., 1999).

#### **2.3.4 Descrição biológica**

Ensaio biológico realizado com a *C. sicyoides* mostrou atividade antidiabética com extrato aquoso (Viana et al., 2004) e extrato hidroalcoólico (Beltrame et al., 2001), atividade antialérgica (Quilez et al., 2004) e ação citostática (Saenz et al., 2000), efeito antinociceptivo e anti-inflamatório (Garcia, et al., 2000) e propriedade antifúngica (Silva et al., 2007). Os compostos  $\beta$ -sitosterol e sitosterol- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, obtidos a partir do extrato metanólico das partes aéreas de *C. sicyoides*, apresentaram atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis* com concentração inibitória mínima de 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente (Beltrame et al., 2002).

Em estudo desenvolvido pelo grupo em nosso laboratório de Ensaio Biológico com Produtos Naturais, o extrato metanólico das folhas de *C. sicyoides* apresentou atividade gastroprotetora em ratos e camundongos machos frente aos agentes lesivos como etanol, HCl/etanol e anti-inflamatório não-esteroidal, sendo essa atividade relacionada aos compostos sulfidrílicos e óxido nítrico, (Ferreira et al., 2008). Em continuidade aos estudos, a atividade gastroprotetora do extrato hidroalcoólico das folhas dessa espécie, bem como elucidação dos mecanismos envolvidos no efeito antiulcerogênico, além das atividades anti-inflamatória e antidiarreica investigados no atual trabalho.

### 3. HIPÓTESE

Levando-se em consideração que o estresse oxidativo participa da patogênese da ulcera péptica e que flavonóides em geral possuem capacidade de atenuar este processo, a hipótese a ser testada neste estudo é a de que o tratamento oral com o extrato hidroalcoólico das folhas de *C. sicyoides* (extrato rico em flavonóides) possa produzir efeitos **antioxidante e citoprotetor** e, dessa forma promover proteção da mucosa gástrica. Também acreditamos que este extrato possa exercer efeito **anti-inflamatório**, levando a uma redução na produção de prostanóides mensurados bioquimicamente, como PGE<sub>2</sub> e/ou LTB<sub>4</sub>, refletindo num possível efeito **antidiarreico**, também foco do estudo.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 *Objetivo Geral*

Investigar os mecanismos de ação antiulcerogênicos, anti-inflamatório e antidiarreico do extrato hidroalcoólico obtido a partir das folhas de *C. sicyoides*, contribuindo para o entendimento da fisiopatologia experimental dos distúrbios avaliados e uso racional dessa espécie vegetal.

### 4.2 *Objetivos Específicos*

- Avaliar o efeito da administração do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. sicyoides* sobre parâmetros de toxicidade aguda e comportamentais através do *screening* hipocrático;
- Realizar experimentos agudos de indução de úlceras pépticas *in vivo* que avaliem o potencial protetor e definição de melhor dose;
- Estudar os mecanismos de ação antiulcerogênicos, em modelos agudos de indução de úlceras gastroduodenais, que caracterizarão os efeitos: citoprotetor, antissecretório, antioxidante e/ou anti-inflamatório do extrato;
- Determinar o potencial efeito antiedematogênico e anti-inflamatório do extrato em modelo de inflamação aguda induzida pela carragenina, xilol e ácido araquidônico, e caracterização os mediadores envolvidos através de dosagens bioquímicas.
- Avaliar o potencial antidiarreico e caracterizar os mecanismos envolvidos neste efeito, e relacioná-los com os mecanismos envolvidos no efeito anti-inflamatório.
- Investigar o efeito antiespasmódico *in vitro* em íleo isolado de camundongos, de modo a justificar os mecanismos antidiarreicos envolvidos.

## 5. REFERÊNCIAS

- Abdallah, D. M. 2010. Nicotinamide alleviates indomethacin-induced gastric ulcers: A novel antiulcer agente. *European Journal of Pharmacology*, v. 627, p. 276-280.
- Agra, M. F.; Freitas, P. F.; Barbosa-Filho, J. M. 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17, n. 1, p. 114-140.
- Allen, A.; Flemström, G. 2005. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *American Journal Physiology - Cell Physiology*, v. 288, p. 1-19.
- Almeida, C. E.; Karnikowski, M. G.; Foletto, R.; Baldisserotto, B. 1995. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. *Rev. Saude Publica*, v. 29, p. 428-33.
- Atay, S.; Tarnawski, A.S.; Dubois, A. 2000. Eicosanoids and the stomach. *Prostaglandins & other Lipids Mediators*, v. 61, p. 105-124.
- Avilla, J. R., de la Lastra C. A.; Martin, M. J.; Motilva, V.; Luque I.; Delgado, D.; Esteban, J.; Herrerias J. 1996. Role of endogenous sulphhydryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. *Inflamm. Res.*, v, 45(2), p. 83-88.
- Balsinde J.; Balboa M. A.; Dennis E. A. 1998. Functional coupling between secretory phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 and its regulation by cytosolic group IV phospholipase A2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v.95, p. 7951-7956.
- Barata, L. E. S. 2005. Extracts for phytomedicine and phytocosmetic market. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, n.1. p. 25.
- Barbosa, W. L. R.; Santos, W. R. A.; Pinto, L. N.; Tavares, I. C. C. 2002. Flavonóides de *Cissus verticallata* e a atividade hipoglicemiante do chá de suas folhas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 12, supl., p.13-15
- Barnes, P. J.; Karin, M. 1997. Nuclear factor- $\kappa$ B—a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.*, v. 336, n. 15, p. 1066-1071.
- Barton, G. M. A. 2008. Calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J. Clin. Invest.* v. 118, p. 413-20.
- Basbaum, A.I.; Bautista, D. M.; Scherrer, G.; Julius, D. 2009. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, v. 139, n. 2, p. 267-84.
- Bedt, D.S.; Hwang, P. M.; Glatt, C. E.; Lowenstein, C.; Reed, R. R.; Snyder, S. H. 1991. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, v. 351, p. 714–718.
- Beltrame, F. L.; Pessini, G. L.; Doro, D. L.; Dias Filho, B. P.; Bazotte, R. B.; Cortez, D. A. G. 2002. Evaluation of the antidiabetic and antibacterial activity of *Cissus sicyoides*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 45, n.1. p. 1-5.
- Beltrame, F. L.; Sartoretto, J. L.; Bazotte, R. B.; Cuman, R. N.; Cortez Dag. 2001. Evaluation of the antidiabetic potential of *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). *Química Nova* v. 24. p. 783-785.
- Benaroyo, L. 1994. How do we define inflammation? *Schweiz. Rundsch. Med. Prax.* v.83, p. 1343-1347.
- Bilate, A. M. B. 2007. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações Terapêuticas. *Temas de reumatologia clínica*. v. 8. n. 2. p. 1-5.
- Bogliolo, J.; Luigi, O. Patologia. 1981. Disponível em: <http://defesasnaoespecificas.blogspot.com.br/2012/12/resposta-inflamatoria.html>. Acesso em: 29 dez. 2013.

Botting, R. M. 2006. Cyclooxygenase: past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927-2004). *Journal of Thermal Biology*, v. 31, p. 208-216.

Braga, R. 1985. Plantas do Nordeste especialmente do Ceará. Fortaleza: Imprensa Universitária.

Brasil. 2009a. Ministério da Saúde. Sistema de Informação Hospitalar: Morbidade Hospitalar do SUS. Brasília. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/nimg.def>>. Acesso em 29 dez. 2013.

Brasil. 2009b. Ministério da Saúde. Sistema de Informação sobre Mortalidade: Mortalidade Hospitalar do SUS MS/SUS/DASIS 2009. Brasília. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?idb2008/c06.def>>. Acesso em 29 dez. 2013.

Brasil. Presidência da República. Decreto no. 5813. de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 2006.

Bouchaud, O. 1996. Diarrhea in immune deficiency status. *Rev. Prat.*, v. 46, n. 2, p. 206-212.

Brenner, A. V.; Linet, M. D.; Shapiro, W. R.; Selker, R. G.; Fine, H. A. Black, P. M.; Inskip, P. D. 2004. Season of birth and risk of brain tumours in adults. *Neurology*. v. 63, p. 276-281.

Brenol, J. C. T.; Xavier, R. M.; Marasca, J. 2000. Antiinflamatórios não hormonais convencionais. *Rev. Bras. Med.*, p. 57.

Calixto, J. B., Campos, M. M., Otuki, M. F., Santos, A. R. 2004. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Medica*. 70, 93-103.

Calixto, J. B.; Cabrini, D. A.; Ferreira, J.; Campos, M. M. 2001. Inflammatory pain: kinins and antagonists. *Curr. Opin. Anesthesiol.*, v. 14 p. 519-526.

Carr, D. B.; Goudas, L. C. 1999. Acute pain. *Lancet*, v. 353, p. 2051-2058.

Chassany, O.; Michaux, A.; Bergmann, J. F. 2000. Drug-induced diarrhoea. *Drug Saf.*, v. 22, n. 1, p. 53-72.

Cotran, R. S.; Kumar, V.; Robbins, S. L. 1994. In: \_\_\_\_\_. Robbins-Pathologic Basis of Disease. 5º ed., Editora W.B. Saunders Company.

Cunha, T. M.; Verri, W. A.; Verri, Jr.; Silva, J. S.; Poole, S.; Cunha, F. Q.; Ferreira, F. H. 2005. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 102, n. 5, p. 1755-1760.

D'acampora, A. J. 2008. Perfil Epidemiológico Dos Pacientes Portadores De Úlcera Péptica Perfurada Atendidos No Centro Cirúrgico Do Hospital Florianópolis. *Rev. Med. Res.* vol., v. 10, n. 4, p. 138.

Darling, R. L.; Romero, J. J.; Dial, E. J.; Akunda, J. K.; Langenbach, R.; Lichtenberger, L. M. 2004. The effects of aspirin on gastric mucosal integrity, surface hydrophobicity, and prostaglandin metabolism in cyclooxygenase Knockout mice. *Gastroenterology*, v.127, p. 94-104.

Dengiz, G. O.; Odabasoglu F.; Halici, Z.; Cadirci, E.; Suleyman, H. 2007. Gastroprotective and Antioxidant Effects of Montelukast on Indomethacin-Induced Gastric Ulcer in Rats. *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 105, p. 94 – 102.

Deniz, M.; Sahin, H. H.; Tekin, S.; Yeşiller, M.; Ağaoğlu, B.; Cetinel, S.; Yeğen, B. Ç. 2009. Nicotine withdrawal alleviates acetic acid-induced gastric injury in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 27, p. 200-205.

Di Stasi, L. C. D.; Hiruma-Lima, C. A. 2002. Plantas medicinais na Amazônia. 2. ed. rev. e ampl. São Paulo: Universidade Estadual Paulista.

Dominici, A. J. C.; Rego, T. J. A.; Silva, A. Z.; Rocha, C. C.; Lima, E. B. 2003. Abordagem fitoquímica de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). In: *54º Congresso Nacional de Botânica*, Belém, PA.

Droge, W. 2002. Free radicals in the physiological of cell function. *Physiol. Rev.*, v.82, p. 47-95.

Eisner, T. 1992. Chemical prospecting: A proposal for action Ecology. Economics and Ethics: The broken circle, 196-202.

Eppler, A. R.; Kraeling, M. E.; Wickett, R. R.; Bronaugh, R. L. 2007. Assessment of skin absorption and irritation potential of arachidonic acid and glyceryl arachidonate using in vitro diffusion cell techniques. *Food Chem. Toxicol.*, v. 45, p. 2109-2117.

Fabricant, D. S., Farnsworth, N. R. 2001. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. *Environment Health Perspective*. v.109, p.69-75.

Façanha, M. C.; Pinheiro, A. C. 2005. Comportamento das doenças diarreicas agudas em serviços de saúde de Fortaleza, Ceará, Brasil, entre 1996 e 2001. *Cadernos de saúde pública*, Rio de Janeiro, v.21, n.1, p.49-54, jan./fev.

Falcão, H. S. 2007. Avaliação da atividade antiulcerogênica do extrato etanólico bruto e fase clorofórmica obtidos das partes aéreas de *Praxelis clematidea* (Griseb.) R. M. King & H. Robinson em modelos animais. 113p. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB.

Farthing, M. J. 2000. Diarrhoea: a significant worldwide problem. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 14, p. 65-69.

Feinstein, L. B.; Robert, C.; Holman, K, L.; Yorita, C.; Claudia, A.; Steiner, L. Swerdlow. 2010. Trends in hospitalizations for peptic ulcer disease. United States, 1998-2005. *Emerg. Infect. Dis.*, 16 (9): p1410-1418.

Ferreira, M. P.; Nishijima, C. M.; Seito, L. N.; Dokkedal, A. L.; Lopes-Ferreira, M.; Di Stasi, L. C.; Vilegas, W.; Hiruma-Lima, C. A. 2008. Gastroprotective effect of *Cissus sicyoides* (Vitaceae): Involvement of microcirculation, endogenous sulfhdryls and nitric oxide. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 117, p. 170-174.

Field, M.; Semrad, C. E. 1993. Toxigenic diarrreas, congenital transport. *Annual Review of Physiology*, v. 55, p. 631-655.

Finkel, T. e Holbrook, N. J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature (London, U.K)*, v. 408, p. 239.

Flower, R. J.; Rothwell, N. J. 1994. Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 15, p. 71-76.

Garcia, M.D.; Quílez, A. M.; Sáenz, M. T.; Martínez-Domínguez, M. E.; De la Puerta, R. 2000. Anti-inflammatory activity of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L., species used in the Caribbean traditional Medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. v.71, 395-400.

Garcia, M. D.; Saenz, M. T.; Puerta, R.; Quilez, A.; Fernadez, M. A. 1999. Antibacterial activity of *Agave intermixta* and *Cissus sicyoides*. *Fitoterapia*, v. 70, p. 71-73.

Garrido, C.; Brunet, M.; Didelot, C.; Zermati, Y.; Schmitt, E.; Kroemer, G. 2006. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell cycle*, v. 5, p. 2592-2601.

Garner, A.; Flemstrom, G.; Heylings, J. R. 1979. Effects of anti-inflammatory agents and prostaglandins on acid and bicarbonate secretions in the amphibian-isolated gastric-mucosa. *Gastroenterology*, v. 77, p. 451-457.

- Ghosh, M. N. 2005. Quantitative study of antagonists on isolated preparations. In 3<sup>rd</sup> Ed. *Fundamentals of experimental Pharmacology*, Kolkata, Hilton & Company. p. 121-133.
- Gilroy, D. W.; Newson, J.; Sawmynaden, P.; Willoughby, D. A.; Croxtall, J. D. 2004. A novel role for phospholipase A2 isoforms in the checkpoint control of acute inflammation. *Faseb. J.*, v. 18, p. 489-498.
- Gosslau, A.; Li, S.; Ho, C. T.; Chen, K. Y. Rawson, N. E. The importance of natural product characterization in studies of their anti-inflammatory activity. *Mol. Nutr. Food Res.*, v.55, p. 74–82. 2011.
- Griffith, O. W.; Mulcahy R. T. 1999. The enzymes of glutathione synthesis: gammaglutamylcysteine synthetase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, v. 73, p. 209-267.
- Guerrero, A. T.; Zarpelon, A. C.; Vieira, S. M.; Pinto, L. G.; Ferreira, S. H.; Cunha, F. Q.; Verri, W. A. Jr.; Cunha, T. M. 2013. The role of PAF/PAFR signaling in zymosan-induced articular inflammatory hyperalgesia. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, .38, p.51–59.
- Guha, P.; Dey, A.; Sarkar, B.; Dhyani, M. V.; Chattopadhyay, S.; Bandyopadhyay, S. K. 2009. Improved antiulcer and anticancer properties of a trans-resveratrol analog in mice. *J Pharmacol Exp Ther.*, 328: 1–10.
- Guieu, R.; Peragut, J. C.; Roussel, P.; Hassani, H.; Sampieri, F.; Bechis, G.; Gola, R.; Rochat, H. 1996. Adenosine and neuropathic pain. *Pain.* v. 68, p. 271-274, 1996.
- Gurgel, L. A.; Silva, R. M.; Santos, F. A.; Martins, D. T. O.; Mattos, P. O.; Rao, V. S. N. 2000. Studies on the antidiarrhoeal effect of Dragon's Blood from *Croton urucurana*. *Phytother. Res.*, v. 14, p. 1-4.
- Guyton, A. C.; Hall, J. E. 2011. Tratado de Fisiologia Médica. 12<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier.
- Gutierrez, R. M. P.; Mitchell, S.; Solis, R. V. 2008. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 117, p. 1–27.
- Hawkey, C. J., Rampton, D. S. 1985. Prostaglandins and the gastrointestinal mucosa: are they important in its function, disease, or treatment? *Gastroenterology*, 89(5): 1162-1188.
- Henderson, W. R. 1994. The role of leukotrienes in inflammation, *Anal. Int. Med.*, v.121, p. 684-697.
- Hui, W. M.; Joana, H.; Chen, B. W.; Cho, C. H.; Luk, C. T.; Lam, S. K. 1991. Nicotine induced gastric injury. A quantitative macroscopic and microscopic analysis of protective effects of sucralfate and feeding. *Gut*, v.32, p. 372.
- Jain, K. S.; Shan, A. K.; Bariwal, J.; Shelke, S. M., Kale, A. P.; Jagtapc, J. R.; Bhosale, A. V. 2007. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 15, p. 1181-1205.
- Katagiri, F.; Inoue, S.; Itoh, H.; Takevama, M. 2005. Omeprazole raises somatostatin and motilin in human plasma. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 28, n. 2, p: 370-373.
- Kato, S.; Ito, Y.; Nishio, H., Aoi, Y.; Amagase, K.; Tekeuchi, K. 2007. Increased susceptibility of small intestine to NSAID-provoked ulceration in rats with adjuvant-induced arthritis: Involvement of enhanced expression of TRL4. *Life Sciences*, v. 18, p. 1309-1316.
- Katzung, B. G. 2007. Farmacologia básica e clínica, 10<sup>a</sup> ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Kawano, S.; Tsuji, S. 2000. Role of Mucosal Blood Flow: A Conceptual Review In Gastric Mucosal Injury And Protection. *J Gastroent Hepat*, 15 (Suppl.):D1-D6.
- Kimura, M.; Goto. S.; Ihara, Y.; Wada, A.; Yahiro, K.; Niidome, T.; Aoygi, H.; Hirayama, T.; Kondo, T. 2001. Impairment of glutathione metabolism in human gastric

epithelial cells treated with vacuolating cytotoxin from *Helicobacter pylori*. *Microbial pathogenesis*, v. 31, p. 29-36.

Ko, J. K.; Cho, C. H.; Lam, S. K. 2004. Adaptative cytoprotection through modulation of nitric oxide in ethanol-evoked gastritis. *World Journal Gastroenterology*, v. 1, p. 2503-2508.

Konturek, P. C.; Konturek, S. J.; Czesnikiewicz, M.; Plonka, M.; Bielanski, W. 2002. Interaction of *Helicobacter pylori* (Hp) and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) on gastric mucosa and risk of ulcerations. *Medice Science Monitor*, v. 9, p. 197-209.

Konturek, S. J.; Konturek, P. C.; Brzozowski, T.; Konturek, J. W.; Pawlik, W. W. 2005. From nerves and hormones to bacteria in the stomach; Nobel prize for achievements in gastrology during last century. *J. Physiol. Pharmacol.*, v.56, p.07-530.

Kosek, M., Bern, C., Guerrant, R.L. 2003. The global burden of diarrheal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bulletin of the World Health Organization*. v.81, p.197-204.

Kumar, V; Abbas, A. K; Fausto, N. 2005. Robbins e Cotran: Patologia: Bases Patológicas das Doenças. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. p.145-66.

Kummer, C. L.; Coelho, T. C. R. B. 2002. Anti-inflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais. *Rev. Bras. Anestesiol.*, v.52, n.4, p. 498-512.

Kutchai, H. C. 2004. Secreções Gastrointestinais. In: Berne, R. M.; Levy, M. N.; Koeppen, B. M.; Stanton, B. A. *Fisiologia*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier. p. 601-632.

Lages, A. S.; Romeiro, N. C.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. 1998. Inibidores seletivos de prostaglandina endoperóxido sintase-2 (PGHS-2): nova estratégia para o tratamento da inflamação. *Quím. Nova*, v.21, n.6 , p. 761-771.

Laine, L.; Takeuchi, K.; Tarnawski, A. 2008. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterology*, 135:41-60.

Levy, B. D.; Clish, C. B.; Schmidt, B.; Gronert, K.; Serhan, C. N. 2001. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat. Immunol.*, v. 2, p. 612-619.

Lewis, R. A; Austen, K. F; Soberman, R. J. 1990. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway,. *N. Engl. J.Med*, v. 323, p.645-655.

Lichtenberger, L. M.; Zhou Y.; Dial, E. J.; Raphael, R. M. 2006. NSAID injury to the gastrointestinal tract: evidence that NSAIDs interact with phospholipids to weaken the hydrophobic surface barrier and induce the formation of unstable pores in membranes. *J. Pharmacology*, v. 58, p. 1421-1428.

Lima, R. R.; Costa, A. M. R.; Souza, R D.; Gomes-Leal, W. 2007. Inflamação em doenças neurodegenerativas. *Revista Paraense de Medicina.*, v. 21, n. 2, p. 29-33.

Lino, C. S. 2008. Efeitos antidiabético, antioxidante, analgésico e antiinflamatório da fração solúvel em metanol e tiramina isolados de *Cissus verticallata*. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza-CE.

Lombardi, J. A. 2000. Vitaceae-Generos Ampelocissus, Ampelopsis e Cissus. *Flora Neotropica*, Monograph 80, The New York Botanical Garden.

Lutterodt, G. D. 1989. Inhibition of gastrointestinal release of acetylcholine by quercetin as a possible mode of action of *Psidium guajara* leaf extracts in the treatment of acute diarrhoea disease, *J Ethnopharmacology*, v.23, p. 235-47.

Ma, L.; Chow, J. Y.; Liu, E. S.; Cho, C. H. 1999. Cigarette smoke and its extract delays ulcer healing and reduces NO synthase activity and angiogenesis in rat stomach. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*, v. 26, p. 828.

- Maikere-Fanyio, R.; Van Puyvelde, L.; Mutwewingabo, A. 1989. Study of Rwandese medicinal plants used in treatment of diarrhoea.; *J Ethnopharmacology*, v.26, p.101-109.
- Maity, P.; Biswas, K.; Roy, S.; Banerjee, R. K.; Bandyopadhyay, U. 2003. Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer: recent mechanistic update. *Molecular Cell Biochemistry*. 253 (1-2), 329-338.
- Malaty, H. M. 2007. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Best Practice Research Clinical Gastroenterology*. v. 21, n. 2, p. 205-214.
- Malfertheine, P., Chan, F. K. L., McColl, K. E. L. 2009. Peptic ulcer disease. *Lancet*, v. 374, p. 1449-1461.
- Marcolin, M. A.; Cantarelli, M. G.; Garcia Junior, M. 2004. Interações farmacológicas entre medicações clínicas e psiquiátricas. *Rev. Psiq. Clín.*, v. 31, 2, p.70-81.
- Marques, L. C.; Galvão, S. M.; Espínola, E.; Dias, R. F.; Mattei, R.; Oliveira, M. G.; de Araújo Carlini, E. L. 2004. Psychopharmacological assessment of *Pfaffia glomerata* roots (extract BNT-08) in rodents. *Phytother Res.*, v. 7, p. 566-72.
- Marsolla, P. 2009. Gastrite e úlceras. Disponível em: <http://www.webartigos.com/articles/29949/1/estresse-e-lesoesgastricas/pagina1.html>. Acesso em: 29 dez. 2013.
- Martinez, C. A.; Barua, D.; Merson, M. H. 1988. Control of diarrhoeal diseases. *World Health Stat. Q.*, v. 41, p. 74-81.
- Mathan, V. I. 1998. Diarrhoeal diseases. *British Medical Bulletin*, v. 54, p. 402-419.
- Mauchley, D.; Meng, X.; Johnson, T.; Teitelbaum, J.; Babu, A.; Fullerton, D. A.; Weyant, M. J. 2010. Heat shock protein 27: Induction by gastroduodenal reflux in vivo and augmentation of human esophageal mucosal cell growth in vitro. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, v. 139, n.4.
- McGettigan, P; Henry, D. 2013. Use of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs That Elevate Cardiovascular Risk: An Examination of Sales and Essential Medicines Lists in Low-, Middle-, and High- Income Countries. *Plos Medicine*, v.10, n. 2.
- Medzhitov, R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v. 454, n. 7203, p. 428-35.
- Meister, A; Anderson, M. E. 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 52, p. 711-760.
- Milani, S. E Calabrò, A. 2001. Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing. *Microsc. Res. Tech.*, 53: 360-371.
- Millan, M. J. 1999. The induction of pain: an integrative review. *Progr. Neurobiol.*, v. 57, n. 1, p. 164.
- Millan, M. J. 1997. The role of descending noradrenergic and serotonergic pathways in the modulation of nociception: focus on receptor multiplicity. In: Dickenson, A.; Besson, J. M. *The Pharmacology of Pain. Handbook of Experimental Pharmacology*, Berlin: Springer Verlag.
- Mors, W. B.; Rizzine, C. T.; Pereira, N. A. 2000. *Medicinal plants of Brazil*. Algonac, Michigan: Reference Publications.
- Murakami, M; Hirano, T. 2012. The molecular mechanisms of chronic inflammation development. *Front. immunol.*, v.3.
- Nakano, T.; Arita, H. 1990. Enhanced expression of group II phospholipase A2 gene in the tissues of endotoxin shock rats and its suppression by glucocorticoid. *FEBSL.*, v. 273 (1/2), p. 23-26.
- Nahrstedt, A. 1989. The significance of secondary metabolites for interaction between plants and insects. *Planta Medica* 55, 333-338.

Olbe, L.; Carlsson, L.; Lindberg, P. 2003. A proton-pump inhibitor expedition: the case histories of omeprazole and esomeprazole. *Nature Reviews Drug Discovery*. v.2, p.132-139.

O'Malley, P. 2003. Gastric ulcers and GERD: the new "plagues" of the 21<sup>st</sup> century update for the clinical nurse specialist. *Clinical Nurse Specialist*. v.17, p.286-289.

Pan, J. S.; He, S. Z.; Xu, H. Z. 2008. Oxidative stress disturbs energy metabolism of mitochondria in ethanol-induced gastric mucosa injury. *World J Gastroenterol*, 14:5857-5867.

Pathela, P.; Hasan, K. Z.; Roy, E.; Huq, F.; Siddique, A. K.; Sack, R. B. 2006. Diarrheal illness in a cohort of children 0-2 years of age in rural Bangladesh: I. Incidence and risk factors. *Acta Paediatrica*, v. 95, p. 430-437.

Pavlick, K.P.; Laroux, F.S.; Fuseler, J.; Wolf, R. E.; Gray, L.; Hoffman, J.; Grisham, M. B. 2002. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radic. Biol. Med.*, v.33, p.311-322.

Petri, W. A.; Miller, M.; Binder, H. J.; Levine, M. M.; Dillingham, R.; Guerrant, R. L. 2008. Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development. *Journal of Clinical Investigation* 118, 1277-1290.

Plantamed, *Cissus sicyoides* L. insulina-vegetal. Disponível em: [http://botany.cs.tamu.edu/flora/perdeck/jam\\_094.jpg](http://botany.cs.tamu.edu/flora/perdeck/jam_094.jpg). Acesso em: 29 dez. 2013.

Pohle, T.; Brzozowski, T.; Becker, J. C.; Van der Voort, I. R.; Markmann, A.; Konturek, S. J.; Moniczewski, A.; Domschke, W.; Konturek, J. W. 2001. Role of reactive oxygen metabolites in aspirin-induced gastric damage in humans: gastroprotection by vitamin C. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, v.15, p.677-687.

Quilez, A. M.; Saenz, M. T.; Garcia, M. D.; Puerta, R. 2004. Phytochemical analysis and anti-allergic study of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 56 (9), p. 1185-1189.

Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M. 2006. Farmacologia. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 19, p. 306-320.

Rang, H. P.; Dale, M. M.; J. M. 2007. Ritter.; Flower, R. Farmacologia, 6<sup>a</sup> ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Rhind, S. G.; Gannon, G. A.; Shephard, R. J.; Shek, P. N. 2002. Indomethacin modulates circulating cytokine responses to strenuous exercise in humans. *Cytokine*, v.19, p.153-158.

Repetto, M. G.; Llesuy, S. L. 2002. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 35, p. 523-534.

Rhodes, M. J. C. 1994. Physiological roles of secondary metabolites in plants: from progress, many outstanding problems. *Plant Molecular Biology*. 24, 1-20.

Robbins, L. S.; Cotran, S. R. 2005. Patologia. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier.

Rocha, A. P. C.; Kraychete, D. C.; Lemônica, L.; Carvalho, L. R.; Barros, G. A. M.; Garcia, J. B. S.; Sakata, R. K. 2007. Dor: Aspectos atuais de sensibilização periférica e central. *Rev. Bras. Anestesiol.* v.571, p. 94-105.

Rostom, A.; Muir, K.; Dube, C.; Lanás, A.; Jolicoeur, E.; Tugwell, P. 2009. Prevention of NSAID-related upper gastrointestinal toxicity: a meta-analysis of traditional NSAIDs with gastroprotection and COX-2 inhibitors. *Drug Healthcare Patient Safety*. v.1, p.47-71, 2009.

Samuelsson, B.; Morgenstern, R.; Jakobsson, P. J. 2007. Membrane Prostaglandin e synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacol Rev.*, v. 59, p.207-224.

- Schafer, F. Q.; Buettner, G. R. 2001. Free radical. *Biol. Med.*, v. 30, p. 1191.
- Sherwood, E. R.; Toliver-Kinsky, T. 2004. Mechanisms of the inflammatory response. *Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.*, v. 18, n. 3, p. 385-405.
- Schiller, L. R.; Sellin, J. H. 2006. Diarrhea. In: Feldman, M.; Friedman, L.; Brandt, L. J. Editors. *Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease*. 8th edition. Philadelphia: WB Saunders Co. p. 159-86.
- Schoroeter, G.; Chaves, L. L.; Engroff, P.; Faggiani, F. T. 2008. Estudo de utilização de anti-ulcerosos na população idosa de Porto Alegre, RS, Brasil. *Rev. HCPA*, v. 28, n. 2, p. 89-95.
- Schubert, M. L. Gastric secretion. 2003. *Curr. Op. Gastroenterol.*, v.19, p. 519- 525.
- Schubert, M. L.; Peura, D. A. 2008. Reviews in basic and clinical gastroenterology. *Gastroenterology*, v. 134, p.1842-1860.
- Scott, A.; Khan, K. M.; Duronio, V. 2004. What is "inflammation"? Are we ready to move beyond Celsus? *Br. J. Sports Med.* v. 38, p. 248-249.
- Sessa, W. C.; Harrison, J. K.; Barber, C. M.; Zeng, D.; Durieux, M. E.; D'Angelo, D. D.; Lynch, K. R.; Peach, M. J. 1992. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, v. 267, p. 15274-15276.
- Silva, L.; Carreira, R. C.; Oniki, G. H.; Agripino, D. G.; Young, M. C. M.; Ladeira, A. M. 2007. Crescimento e análise do potencial antifúngico em plantas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 9(1), p. 73-79.
- Simões C. M. O.; Schenkel E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A. 2004. Farmacognosia da planta ao medicamento. 5ªed. Porto Alegre/Florianópolis. p.424.
- Smith, W. L.; Dewitt, D. L.; Garavito, R. M. 2000. Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology. *Annu. Rev. of Biochem.*, v. 69, p. 145-182.
- Soares, D. C.; Barbosa, W. L. R. 2007. Obtenção do Perfil Cromatográfico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para a Detecção de Flavonóides como Marcadores nas Soluções Extrativas de *Cissus verticillata* L. *Revista Científica da UFPA*, v. 5. Disponível em <http://www.cultura.ufpa.br/rcientifica/cabecalho.php?conteudo=10.83>). Acesso em: 29 dez. 2013.
- Szabo, S. 1991. Mechanisms of gastric mucosal injury and protection. *Journal of Clinical Gastroenterology*, v.13: p.21-34.
- Szabo, S., Vincze, A. 2000. Growth factors in ulcer healing: lessons from recent studies. *Journal Physiology*. 94 (2), 77-81.
- Taiwo, Y. O.; Levine, J. D. 1991. Further confirmation of the role of adenylyl-cyclase and of cAMP dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. *Neurosci.*, v. 44, p.131-135.
- Tak, P. P.; Firestein, G. S. 2001. NF-κB: a key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Invest.*, v. 107, n. 1, p. 7-11.
- Takaki, E. Y.; Modesto J.; M. S.; Figueiredo, L. H. M. 2007. Proteção intelectual e análise de mercado da biodiversidade Brasileira. *Revista de Ciência Agrária*, n. 48, p.143-159.
- Tanaka, K.; Tsutsumi, S.; Arai, Y.; Hoshino, T.; Suzuki, K.; Takaki, E.; Ito, T.; Takeuchi, K.; Nakai, A.; Mizushima, T. 2007. Genetic evidence for a protective role of heat shock factor 1 against irritant-induced gastric lesions. *Mol Pharmacol*, v. 71, p. 985-993.
- Teixeira, M. J.; Souza, A. C. Anatomia e Fisiologia das vias nociceptivas e supressores da dor. In: Teixeira, M. J.; Figueiró, J. A. B. *Dor epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento*. 1ª ed. São Paulo: Ed Moreira Jr., 2001. p.14-40.

Thomas, M. J. 2000. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition.*, v.16, n.7-8, p.716-718.

Trópicos. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <http://www.tropicos.org>. Acesso em: 29 dez. 2013.

Ue, A. P. F.; Ikino, J. K.; Furlani, W. J.; Souza, P. K.; Rotta, O. 2007. Ginecomastia induzida por anti-histamínicos no tratamento da urticária crônica. *Anais Brasileiro de Dermatologia*, v. 82, n. 3, p: 253 – 256.

Ueda, S.; Yoshikawa, T.; Takahashi, S.; Ichikawa, H.; Yasuda, M.; Oyamada, H.; Tanigawa, T.; Sugino, S.; Kondo, M. 1989. Role of free radicals and lipid peroxidation in gastric mucosal injury induced by ischemia–reperfusion in rats. *Scand. J. Gastroenterol.* 162, 55–58.

Unicef. The United Nations Children’s Fund. 2009. World Health Organization. Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done. New York: UNICEF.

Utsumi, H.; Yasukawa, K.; Soeda, T.; Yamada, K.; Shigemi, R.; Yao, T.; Tsuneyoshi, M. 2006. Noninvasive mapping of reactive oxygen species by species by in vivo electron spin resonance spectroscopy in indomethacin-induced gastric ulcers in rats. *JPET*, v. 317, p. 228-235.

Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced câncer. *Chemico-Biological Interactions*, v. 160, p. 1-40.

Vancini, L. R.; Lira, C. A. B.; Aboulafia, J.; Nouailhetas, V. L. A. 2005. Radial livre, estresse oxidativo e exercício. Centro de estudos de fisiologia do exercício, São Paulo – UNIFESP, 1-10.

Van Den Berg, M. E. *Plantas Medicinais da Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático*. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1993.

Vasconcelos, S. M. L.; Goulart, M. O. F.; Moura, J. B. F.; Manfredini, V.; Benfato, M. F.; Kubota, L. T. 2007. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim. Nova*, v. 30, n. 5, p. 1323-1338.

Viana, G. S. B.; Medeiros, A. C.; Lacerda, A. M. R.; Leal, L. K. A. M.; Vale, T. G.; Matos, F. J. A. 2004. Hypoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. *BMC Pharmacology*, v.4, p.9-15.

Vitali, F.; Fonte, G.; Ssaija, A.; Tita, B. 2006. Inhibition of intestinal motility and secretion by extracts of *Epilobium* spp. in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 107, p. 342–348.

Wallace, J. L. 2008. Prostaglandins, NSAIDs, and Gastric Mucosal Protection: Why Doesn’t the Stomach Digest Itself? *Physiological Reviews*, v. 88, p. 1547-1565.

Whittle, B. J. R., Kauffman, G. L. e Moncada, S. 1981. Vasoconstriction with thromboxane A2 induces ulceration of the gastric mucosa. *Nature*, 292, 472-474.

Whittle, B. J. R., López–Belmonte, J., Moncada, S. 1990. Regulation of mucosal integrity by endogenous nitric oxide: interaction with prostanoids and sensory neuropeptides in the rat. *British Journal of Pharmacology*, v. 99, p. 607–611.

WHO (World Health Organization). 2008. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). AIDS Epidemic Update June 2008. Geneva: UNAIDS/WHO.

Wong, D.; Koo, M. W.; Shin, V. Y.; Liu, E. S.; Cho, C. H. 2002. Pathogenesis of nicotine treatment and its withdrawal on stress-induced gastric ulceration in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 484, p. 81.

Xie, Q. W.; Cho, H. J.; Calaycay, J.; Mumford, R. A.; Swiderek K. M.; Lee, T. D.; Ding, A.; Troso, T.; Nathan, C. 1992. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*, v. 256, p. 225–28.

Yang, L.; Wei-Ping, W.; Hong-Ying, W.; Chi-Hin, C. 2000. Intragastric administration of heparin enhances gastric ulcer healing through a nitric oxidized-dependent mechanism in rats. *Eur. J. Pharmacol*, 399:205-214.

Zeilhofer, H. U.; Brune, K. 2006. Analgesic strategies beyond the inhibition of cyclooxygenases. *Trends. Pharmacol. Sci.* v. 9, p.467-74.

## **CAPÍTULO 2**

**“Ação citoprotetora e antioxidante de *Cissus sicyoides* Linneu. (Vitaceae) em modelos agudos de úlceras gástricas em roedores: Papel da isoforma óxido nítrico sintase induzível (iNOS), muco gástrico e da microcirculação local”**

**ARTIGO 1 PARA PUBLICAÇÃO**

Formato: Phytomedicine – Original Papers

**“Ação citoprotetora e antioxidante de *Cissus sicyoides* Linneu. (Vitaceae) em modelos agudos de úlceras gástricas em roedores: Papel da isoforma óxido nítrico sintase induzível (iNOS), muco gástrico e da microcirculação local”**

Fernando Pereira Beserra<sup>a</sup>, Larissa Lucena Périco<sup>a</sup>, Flávia Bonamin<sup>a</sup>, Hélio Kushima<sup>b</sup>, Raquel de Cássio Santos<sup>a</sup>, Taís Maria Bauab<sup>c</sup>, Luiz Leonardo Saldanha<sup>d</sup>, Lúcia Regina Machado da Rocha<sup>a</sup>, Anne Lígia Dokkedal<sup>d</sup>, Clélia Akiko Hiruma-Lima<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Univ. Estadual Paulista-UNESP – Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, CEP: 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brasil*

<sup>b</sup> *Univ. Estadual Paulista-UNESP – Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, CEP: 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brasil*

<sup>c</sup> *Univ. Estadual Paulista-UNESP – Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, CEP: 14801-902, Araraquara, São Paulo, Brasil*

<sup>d</sup> *Univ. Estadual Paulista-UNESP – Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências, CEP: 17033-360, Bauru, São Paulo, Brasil*

## RESUMO

*Cissus sicyoides* L. (Vitaceae) é uma espécie utilizada no Caribe, América Central e no Brasil com fins medicinais. Uma de suas indicações populares é para o tratamento de gastrites e distúrbios do trato gastrointestinal. Foram realizados ensaios biológicos *in vivo* com o extrato hidroalcoólico obtido a partir das folhas de *C. sicyoides* (EHCS 125, 250 e 500 mg/kg), afim de avaliar suas propriedades gastroprotetoras frente a modelos agudos de úlceras gástricas. Análise fitoquímica revelou a presença de dois flavonóides derivados da quercetina e um Kaempferol. Foi observado que o EHCS apresenta significativo efeito gastroprotetor frente aos agentes lesivos etanol e indometacina e ao processo agudo de isquemia e reperfusão tecidual, com a dose efetiva de 250 mg/Kg. Essa ação gastroprotetora ocorre devido á um aumento na produção de muco gástrico ocasionado pelo envolvimento com a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) para produção de óxido nítrico (NO) e conseqüentemente regulação do fluxo sanguíneo. Além disso, o extrato mostra envolvimento com o sistema antioxidante, através da redução da lipoperoxidação medida pelos níveis de malondialdeído (MDA) e diminuição da atividade da mieloperoxidase (MPO) e conseqüente diminuição da infiltração de neutrófilos local. No modelo agudo de indução de úlceras duodenais com cisteamina, o EHCS não apresentou proteção significativa e não produziu atividade anti-ssecretória sobre o modelo de ligadura do piloro. Além disso, o extrato mostrou redução da motilidade gastrointestinal contribuindo para o efeito gastroprotetor, sem alterar a porcentagem de esvaziamento gástrico. Estudo *in vitro* mostrou atividade atividade antibacteriana sobre a *Helicobacter pylori* apresentando MIC equivalente a 75 µg/mL. Sendo assim, é possível inferir uma ação gastroprotetora do EHCS frente a diversos agentes lesivos, e que este efeito se deve a efetiva ação citoprotetora, antioxidante e antimotilidade do extrato.

**Palavras chave:** *Cissus sicyoides* L.; Vitaceae; úlcera péptica; antioxidante; citoproteção.

## 1. Introdução

Úlceras pépticas são lesões provenientes de um desbalanço entre os fatores protetores e lesivos da mucosa gástrica, ocorrendo o desenvolvimento da doença, que são caracterizadas por lesão profunda da mucosa gástrica e/ou duodenal, que ultrapassa os limites da camada muscular, e ocorre nas regiões que ficam expostas à ação do ácido gástrico (Tytgat, 2011). Com relação à sua origem, admite-se uma doença heterogênea, e apesar dos grandes avanços ocorridos para desvendá-la, a sua etiologia ainda não é totalmente conhecida. A doença afeta milhões de pessoas em todo o mundo sendo considerado uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Nos Estados Unidos, aproximadamente 500.000 indivíduos desenvolvem úlceras pépticas cada ano (Ramakrishnan e Salinas, 2007). No Brasil, a prevalência de úlcera péptica ainda não é conhecida, mas estima-se que a incidência de úlcera péptica varia de 1 a 20%, sobre a população (D'acampora et al., 2008).

Sabe-se também, que existe uma grande variedade de fatores endógenos relacionados ao mecanismo de gastroproteção incluindo o muco gástrico, fluxo sanguíneo, prostaglandinas, somatostatina, óxido-nítrico e compostos sulfidrílicos (Tsukimi et al., 2001). Apesar dos grandes avanços no conhecimento da doença ulcerosa péptica, a sua etiologia ainda não é totalmente conhecida, porém estudos mostram que a etiopatogênese da doença ulcerosa envolve fatores genéticos, distúrbios fisiopatológicos e fatores ambientais como álcool, drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (DAINEs), *Helicobacter pylori*, entre outros (Konturek et al., 2005). Tem-se observado que consumo de DAINES por período prolongado e infecção por *H. pylori* são os principais fatores que induzem o surgimento de úlceras. No entanto, o aumento no consumo de bebidas alcoólicas e principalmente na frequência provoca lesões na mucosa gástrica de maneira gradativa, até a formação da úlcera. A ingestão excessiva de álcool pode resultar em gastrite, hemorragia abaixo do epitélio gástrico, esfoliação celular, devido ao contato agressivo direto com a mucosa, e infiltração de células inflamatórias (Jahovic et al., 2007; Matsushashi et al., 2007). Os danos ulcerogênicos no trato gastrointestinal provocados por ingestão contínua de DAINES, álcool, processos isquêmicos, *H. pylori* e estresse pode estar relacionado ao mecanismo de produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERRO) e desta forma, gerando estresse oxidativo (Dong e Kaunitz, 2006).

O tratamento das úlceras pépticas é baseado principalmente na inibição de secreção de ácido gástrico através do uso de inibidores da bomba de prótons, dos antagonistas de

receptores H<sub>2</sub> e antimuscarínicos, assim como a terapia ácido-independente fornecida por agentes antimicrobianos contra a *H. pylori*, sucralfato e bismuto (Bighetti et al., 2005). Entretanto, estes medicamentos além de apresentar alto custo, podem gerar numerosos efeitos adversos (hipersensibilidade, ginecomastia, impotência, arritmia e alterações hematopoiéticas), limitando assim o uso em seu tratamento (Santin et al., 2010).

Assim, é importante que estudos sejam realizados para investigar potenciais ervas antiulcerogênicas e seus compostos isolados como formas alternativas no tratamento dos efeitos agressivos de úlceras pépticas. Os extratos derivados de plantas medicinais são importantes fontes de novas moléculas biologicamente ativas e têm mostrado resultados promissores no tratamento de várias patologias, incluindo das úlceras gástricas (Borrelli e Izzo, 2000).

*Cissus sicyoides* L. é uma espécie pertencente à família Vitaceae, comumente encontrada em regiões tropicais, particularmente no Caribe e Brasil (Cano e Volpato, 2004). No Brasil, a *C. sicyoides* é largamente encontrada na Caatinga, conhecida popularmente como insulina vegetal, cortina japonesa, cortina de pobre, cipó-puçá, puçá (Barbosa et al., 2002), anil trepador, uva-brava, achite, caavurana-de-chuhan, tinta-dos-gentios e bejuco caro (Beltrame et al., 2001). O uso do chá de suas folhas é citado popularmente como anti-inflamatório, antihipertensivo, antitérmico, antidiabético, antireumático, antigripal, contra infecções respiratórias, dislipidemias, distúrbios gastrointestinais e indigestão, para o tratamento da anemia, acidente vascular cerebral, tremores e como ativador da circulação sanguínea (Barbosa et al., 2002; Van Den Berg, 1993; Beltrame et al., 2001; Agra et al., 2007; Ferreira et al., 2008). Em algumas regiões da Amazônia, o suco das folhas e ramos é empregado para o tratamento da epilepsia (Mors et al., 2000).

Estudos fitoquímicos realizados com *C. sicyoides* mostraram que os principais constituintes do extrato hidroalcoólico da planta inteira são os taninos, saponinas, quinonas, compostos fenólicos, terpenos, esteróides/triterpenos e alcalóides (Dominici et al., 2003). Já nas partes aéreas foram isolados e identificados compostos cumarínicos denominados 5,6,7,8-tetrahidroxicumarina-5 $\beta$ -xylopiranosídeo e sabadina, os flavonóides Kaempferol 3- $\alpha$ -raminosídeo e quercetina 3- $\alpha$ -raminosídeo e os triterpenos esteróidais  $\beta$ -sitosterol, sitosterol- $\beta$ -D-glicopiranosídeo e antocianinas (Beltrame et al., 2002).

Considerando a indicação popular da planta, as informações fitoquímicas e a escassez de informações acerca do efeito farmacológico de *C. sicyoides* sobre o sistema

gastrointestinal, embora já exista estudo de validação de uso etnofarmacológico no tratamento de úlceras pépticas, o presente estudo tem como objetivo investigar a atividade gastroprotetora do extrato obtido a partir das folhas de *C. sicyoides* frente a processos ulcerogênicos agudos em modelos animais, e elucidar os mecanismos envolvidos neste efeito protetor.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 *Material vegetal e obtenção do extrato*

As folhas de *C. sicyoides* foram coletados em novembro de 2012, no Jardim Botânico Municipal de Bauru - SP, Brasil (22 ° 20'30 "S e 49 ° 00'30" W). Espécimes testemunhas foram preparadas, identificadas e depositadas no Herbário da UNESP - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNBA (Bauru - SP, Brasil) sob o código ALD 147. As folhas frescas foram secas a 40 ° C durante 48 h. Após a secagem, estas foram pulverizadas separadas e extraídas com EtOH/H<sub>2</sub>O (7:3 v/v), por percolação, à temperatura ambiente. O filtrado foi concentrado até à secura sob pressão reduzida a 40 °C, proporcionando o extracto hidroalcoólico com rendimento final de 27,6% de peso seco.

### 2.2 *Identificação de substâncias químicas por HPLC-PDA-ESI-IT-MS*

Este extrato foi identificado usando um Accela alta velocidade LC (Thermo scientific®), Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 mm) de coluna, com um detector de DAP e acoplado a um Accela (Thermo scientific®) LCQ Fleet com Ion Trap 3D e ionização por eletrospray. A fase móvel foi água ultra-pura (eluente A) e metanol (eluente B), ambos contendo 0,1% de ácido fórmico. A proporção foi de: 5-100% de B em A em 60 minutos. O volume de injeção: 20,0 mL, temperatura da coluna: 25 °C, com uma relação de fluxo: 0,8 mL/min<sup>-1</sup>. A voltagem capilar foi de -25 V, a tensão de pulverização foi de 5kV, e o tubo de lente de deslocamento era -55 V. A temperatura capilar era de 274 °C. Azoto foi usado como gás de secagem a uma taxa de fluxo de 60 (unidades arbitrárias), e como gás de nebulização. A temperatura de nebulização foi de 280 °C e um potencial de -4 V foi utilizado no capilar. Espectros de massa de íons negativos foram registrados na faixa m/z 100-1500. O extrato de EtOH a 70% foi dissolvido em MeOH-H<sub>2</sub>O (8:2), e diluiu-se com uma concentração final de 50 µg/mL<sup>-1</sup>. O efluente do HPLC foi dirigido para a sonda de ESI. Os espectros de UV-vis foram registrados entre 200 e 600 nm, e os perfis cromatográficos foram registrados a 254 nm.

A identificação foi efetuada por comparação do tempo de retenção, comprimento de onda UV-vis máxima e dados de espectro de massa com os de padrões e na literatura (Xu et al., 2009).

### **2.3 Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos (180-250g) e camundongos Swiss machos e fêmeas (25-45g) provenientes do Biotério Central da UNESP-Botucatu ou da empresa Anilab Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda (Paulínia, SP), aclimatados às condições do biotério setorial (Departamento de Fisiologia, UNESP, Botucatu) por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, sob temperatura ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração Presence<sup>®</sup> e água *ad libitum*. Todos os experimentos obedeceram aos protocolos experimentais submetidos e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA), do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu, através do protocolo n. 415/12-CEUA (Anexo 1).

### **2.4 Doses empregadas**

As doses utilizadas nos modelos experimentais de úlcera induzida por etanol e por DAINÉ foram determinadas através da realização de uma curva dose-resposta (125, 250 e 500 mg/Kg, p.o.), com base em experimentos anteriores iniciais de indução de lesões gástricas (Ferreira et al., 2008). Os demais modelos experimentais e mecanismos de ação avaliados foram determinados com a melhor dose do extrato selecionado nos modelos de indução de úlcera mencionados anteriormente.

### **2.5 Atividade antiulcerogênica**

#### **2.5.1 Lesões gástricas**

Com base em suas respectivas especificações, os grupos em cada modelo experimental incluiu controles positivos (carbenoxolona ou lansoprazol) e controle negativo (veículo solução salina 0,9%). Antes de todos os procedimentos experimentais, os animais foram privados de comida por 12h, com água *ad libitum*. Além disso, foram mantidos em gaiolas com piso elevado de malha larga para evitar coprofagia. Após cada experimento, os animais foram mortos, os estômagos foram abertos ao longo da curvatura maior, pressionada sobre

uma placa de vidro, digitalizados e medidos através do software V-Brane Labiris Pro. Amostras do tecido foram coletadas e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para caracterizações enzimáticas.

### 2.5.2 *Úlcera gástrica induzida por etanol absoluto*

Baseado no modelo descrito por Robert et al., (1979), os ratos Wistar machos ( $n=8$ ) foram tratados oralmente, com o EHCS em doses variáveis (125, 250 e 500 mg/Kg), com 100 mg/Kg de Carbenoxolona (controle positivo), ou veículo (salina 0,9% NaCl, 10 mL/Kg), uma hora antes da indução das lesões gástricas pela administração, também por via oral, de 1 mL de etanol absoluto. Após 1 h da indução, os animais foram mortos e os estômagos retirados e abertos ao longo da curvatura maior para contagem da área ulcerativa.

### 2.5.3 *Úlcera gástrica induzida por indometacina*

Este experimento foi baseado no modelo descrito por Djahnguiri, (1969) com modificações. Os ratos Wistar machos ( $n=8$ ) dos diferentes grupos experimentais, foram tratados oralmente com EHCS em doses variáveis (125, 250 e 500 mg/Kg), com Lansoprazol (30 mg/Kg) ou veículo (salina 0,9% NaCl, 10 mL/Kg). Trinta minutos após o tratamento, as lesões foram induzidas por administração oral de 10 mL/Kg da Indometacina (DAINE), solubilizada em Carbonato de Sódio 0,5% na dose de 50 mg/Kg. Os animais foram mortos 6 h após a administração do agente lesivo e os estômagos retirados e abertos ao longo da maior curvatura e longitudinalmente para contagem das lesões.

### 2.5.4 *Avaliação da atividade antissecretoria*

Este modelo foi descrito de acordo com Shay et al., (1945) com modificações. Os ratos Wistar machos ( $n=8$ ) foram anestesiados e sofreram uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide para a amarradura de piloro. Os tratamentos com veículo (salina 0,9% NaCl, 10 mL/Kg) da dose definida de EHCS (250 mg/Kg) ou lansoprazol (30 mg/Kg) foram realizados por via intraduodenal (para avaliação de um possível efeito sistêmico) e 30 min. antes da amarradura no caso do tratamento por via oral (para avaliação de um possível efeito local). As incisões foram suturadas e quatro horas após a cirurgia os ratos foram mortos e a incisão reaberta. Logo em seguida, foi realizada uma ligadura da cárdia (para preservação do conteúdo gástrico) e o estômago foi retirado. O conteúdo estomacal foi coletado e, em seguida determinado o volume do suco gástrico, o pH e a concentração de íons hidrogênio na

secreção gástrica através de titulação com NaOH 0,01N em bureta digital (modelo EM, Alemanha). A concentração total de ácido foi expressa em mEq/mL/4h.

#### 2.5.5 Úlcera duodenal induzida por cisteamina

Ratos Wistar machos (n=8) foram tratados com veículo (salina 0,9% NaCl, 10 mL/Kg), lansoprazol 30 mg/Kg ou EHCS 250 mg/Kg por via oral. Após 30 min., iniciou-se a indução de úlcera duodenal por administração oral de cisteamina em duas doses de 300 mg/Kg com intervalo de 4 horas entre elas. Transcorridas 22 horas após os tratamentos, os animais foram mortos e se retirou o duodeno para mensuração das lesões de acordo com o índices de lesão descritos por Szabo, (1978):

- 0 - Ausência de lesão
- 1 - Erosão superficial da mucosa
- 2 - Lesões necrosantes;
- 3 - Lesões perfurantes da mucosa.

#### 2.5.6 Úlcera gástrica induzida por isquemia e reperfusão

Este modelo foi baseado na metodologia descrita por Ueda et al. (1989), com modificações. Ratos Wistar machos (n=8-10) foram tratados oralmente com veículo (salina 0,9% NaCl, 10 mL/Kg), EHCS (dose 250 mg/Kg), lansoprazol na dose de 30 mg/Kg, no volume fixo de 10 mL/Kg. Após a realização do tratamento oral, os animais foram anestesiados com Ketamina 0.08 mL/100g + Xilasina 0.04mL/100g via intramuscular (i.m.). Decorridos 30 min., realizou-se uma incisão de aproximadamente 3cm, do lado esquerdo do abdômen no qual a artéria celíaca foi identificada e isolada. Um *clamp* microvascular foi colocado nessa artéria e permaneceu ocluída durante 30 min. Após este período de isquemia, o *clamp* foi removido, para permitir a reperfusão, permanecendo assim os 60 min. subsequentes. O grupo denominado Sham passou pelo procedimento cirúrgico de abertura da cavidade abdominal, mas não teve a artéria clampada, além de não ter sido submetido ao tratamento oral com nenhuma droga. Após este período, os animais foram mortos e tiveram seus estômagos retirados para as análises. Tiras dos estômagos foram coletadas e armazenadas para a análise de parâmetros bioquímicos.

### *2.5.7 Avaliação da atividade sistêmica*

Para avaliar o efeito sistêmico do EHCS em ulcerações gástricas experimentais foi desenvolvido um novo método. Ratos, sob jejum de 16 horas, foram divididos aleatoriamente em 6 grupos experimentais. Animais de 3 grupos foram anestesiados e submetidos a cirurgia para ligadura do piloro duodenal e administração intraduodenal de veículo (salina 0,9% NaCl, 10 mL/Kg), sucralfato (1000 mg/Kg) ou EHCS (250 mg/Kg). Os 3 grupos restantes foram submetidos apenas aos tratamentos com veículo (salina 0.9% NaCl, 10 mL/kg), sucralfato (1000 mg/Kg) ou EHSM (250 mg/Kg) por via oral. Decorrido 1 hora dos tratamentos orais ou intraduodenais, administrou-se 1 mL de etanol absoluto em todos os animais. Transcorridos 60 min. da administração do etanol, os animais foram mortos e os estômagos retirados para análise da área de lesão, como descrito anteriormente

## ***2.6 Avaliação dos fatores protetores da mucosa***

### *2.6.1 Determinação do muco aderido à mucosa gástrica*

O muco da parede gástrica foi determinado em animais submetidos à ligadura do piloro com tratamento oral de acordo com o método de Shay descrito anteriormente. Os estômagos foram removidos e abertos no sentido de maior curvatura, sendo os segmentos glandulares do estômago removidos e pesados. Após 4 h, os animais foram mortos, a porção glandular do estômago foi removida, pesada e imersa em solução de azul Alcian, para a quantificação de muco aderido. As absorbâncias foram determinadas num espectrofotômetro a 598 nm (Rafatullah et al., 1990). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de Alcian blue/g de tecido.

### *2.6.2 Determinação do fluxo sanguíneo local em úlceras gástricas induzidas por etanol*

Ratos Wistar machos (n=8) receberam tratamentos orais com veículo (salina 0,9% NaCl, 10 mL/Kg), carbenoxolona 100 mg/Kg ou EHCS 250 mg/Kg (10mL/Kg). Grupo controle que não recebeu tratamento, denominado grupo branco, foi adicionado no experimento para avaliar o fluxo sanguíneo em condições normais. Decorrida uma hora após os pré-tratamentos, 1 mL de etanol absoluto foi administrado oralmente e após mais uma hora, o fluxo sanguíneo foi medido com o Laser Doppler (Morr Instruments, modelo VMS-LDF2, monitor de perfusão sanguínea e temperatura Millwey, Axminster, UK). Os valores foram expressos em unidade de perfusão (UP) (Kwiecien et al., 2002).

### 2.6.3 Indução de úlceras gástricas por etanol em animais pré-tratados com NEM

Este modelo foi utilizado para avaliar a participação de compostos sulfidrílicos na gastroproteção. Ratos Wistar (n=7-8) foram pré-tratados com salina 0,9% ou *N-ethyl maleimide* (NEM) 10 mg/Kg (bloqueador de compostos sulfidrílicos), via intraperitoneal (i.p.). Após 30 min., os grupos receberam oralmente os tratamentos com veículo salina (0,9% NaCl, 10 mL/Kg), carbenoxolona 100 mg/Kg e EHCS 250 mg/Kg (10mL/Kg). Uma hora após o pré-tratamento foi administrado etanol (1 mL, p.o.) e após 60 min. os animais foram mortos e os estômagos removidos para avaliar área de lesão (Matsuda et al., 1999).

### 2.6.4 Indução de úlceras gástricas em animais pré-tratados com L-NAME e L-NIL

Este modelo foi utilizado para avaliar a participação de óxido nítrico (NO) na gastroproteção. Ratos Wistar Machos (n=7-8) foram pré-tratados com (salina 0,9% NaCl, 10 mL/Kg), *ω-nitro-L-arginine methyl Ester* (L-NAME) na dose de 70 mg/Kg (bloqueador da enzima NOS) ou *L-Lysine-ω-acetamine dihydrochloride* (L-NIL) na dose de 6 mg/Kg (inibidor seletivo de iNOS) administrados pela via intraperitoneal (i.p.). Após 30 min., os grupos receberam oralmente os tratamentos com veículo (salina 0,9% NaCl, 10 mL/Kg), carbenoxolona 100 mg/Kg ou EHCS 250 mg/Kg (10mL/Kg). Uma hora após o pré-tratamento foi administrado etanol (1 mL). Uma hora após o tratamento com etanol, os animais foram mortos e os estômagos removidos para análise de área de lesão (Matsuda et al., 1999; Dudar et al., 2008, com modificações).

### 2.6.5 Indução de úlceras gástricas em animais pré-tratados com Ruthenium red

Este modelo foi utilizado para avaliar a participação dos receptores TRPV-1 na gastroproteção. Ratos Wistar machos (n=7-8) foram pré-tratados com veículo (salina 0,9% NaCl, 10 mL/Kg) ou *Ruthenium red* (bloqueador dos receptores TRPV-1) na dose de 6mg/Kg (5 mL/Kg) via subcutânea (s.c.). Após 30 min., os grupos receberam os tratamentos: solução salina (p.o.); capsaicina dissolvida em solução salina, Tween 80% e etanol (8:1:11) 5 mg/Kg (i.p.) (que se liga aos receptores TRPV-1 e promove gastroproteção), carbenoxolona 100 mg/Kg (p.o.) e EHCS 250 mg/Kg (p.o.). Todos os tratamentos foram feitos com volume de 10 mL/Kg. Uma hora após o pré-tratamento foi administrado etanol (1 mL) em todos os grupos e uma hora após o tratamento com etanol, os animais foram mortos e os estômagos removidos para análise de área de lesão (Pongpiriyadacha et al., 2003).

## ***2.7 Determinação dos parâmetros bioquímicos***

### ***2.7.1 Quantificação de proteínas totais***

Este método se baseia na reação do azul de Coomassie com grupos proteicos, originando um complexo colorido que foi analisado em espectrofotômetro a 595 nm. Proteínas totais foram determinadas para que os dados dos parâmetros analisados posteriormente sejam expressos em relação à quantidade de proteínas da amostra em miligramas (Bradford, 1976).

### ***2.7.2 Quantificação de Glutathiona Reduzida (GSH)***

Tiras armazenadas de úlceras gástricas induzidas por etanol e por isquemia e reperfusão, foram pesadas e armazenadas em 1 mL de solução de ácido tricloroacético a 5% (TCA). O conteúdo de glutathiona reduzida do estômago foi determinado utilizando a substância 5,5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) (Anderson et al., 1985). A reação enzimática é constituída através da formação de uma solução de 200 µL da amostra contendo 2 mg/mL de proteína, 0.2M de tampão fosfato (pH 8.0), 0.5 mM DTNB (2.0 mg em 10mL de citrato de sódio 1%) em um volume final de 2 mL. A absorbância foi determinada em 412 nm utilizando um espectrofotômetro e os valores foram expressos em nmol/g de tecido. Um grupo sham (que foi submetido ao mesmo estresse, porém sem tratamentos e indução de agentes lesivos) foi incluído nos experimentos para uma análise comparativa dos parâmetros de normalidade.

### ***2.7.3 Quantificação de Malondialdeído (MDA)***

Este método é utilizado para avaliar o nível de peroxidação lipídica do tecido. Tiras de tecido gástrico armazenadas do modelo de etanol, indometacina e isquemia e reperfusão foram homogeneizadas com KCl 1.15% (1:5). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 9000 rpm por 10 min. a 4°C e o sobrenadante foi coletado. A cada 400 µL de amostra, foram adicionados 400 µL de água destilada, 200 µL de lauril 8.1%, 1500 µL de ácido acético 20% pH 3.5 e 1500 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8% diluído em ácido acético 20%. A solução foi incubada a 95°C por 1h em banho-maria e posteriormente foi centrifugada a 4000 rpm por 10 min., foi coletado 200 µL de cada amostra e adicionado em placa de 96 poços. O malondialdeído (MDA) formado reage com o TBA produzindo uma reação colorimétrica que foi determinada utilizando um espectrofotômetro com comprimento

de onda de 532 nm. Os resultados foram expressos em nmol de MDA/g de tecido. O grupo denominado Sham foi incluído no experimento para uma análise comparativa dos parâmetros de normalidade (Ohkawa et al., 1979, com modificações).

#### *2.7.4 Determinação da atividade da Mieloperoxidase (MPO)*

Tiras armazenadas dos modelos de úlceras gástricas induzidas por etanol, indometacina e isquemia e reperfusão, foram utilizadas nas dosagens. Foi utilizado o tampão de reação HTAB (a 0.5% em tampão fosfato sódico 50 mM, pH 6.0) que atua como detergente lisando os grânulos dos neutrófilos que contem a enzima, sendo esta liberada. A atividade enzimática foi determinada seguindo a cinética da reação da enzima com água oxigenada do tampão de reação, sendo que uma unidade de MPO determinada é capaz de degradar 1nmol/min. de água oxigenada a 25°C (Krawisz et al., 1984). A atividade da MPO é proporcional ao número de neutrófilos infiltrados na mucosa. A absorbância foi determinada em 450 nm utilizando um espectrofotômetro e os valores foram expressos em nmol/g de tecido. Um grupo Sham (que foi submetido ao procedimento sem o tratamento oral e indução de agente lesivo) foi incluído nos experimentos para uma análise comparativa dos parâmetros de normalidade.

### *2.8 Avaliação da motilidade gastrointestinal*

#### *2.8.1 Esvaziamento gástrico*

Este modelo experimental foi realizado utilizando o método descrito por Scarpignato et al., (1980), com algumas modificações. Depois de 6 horas de jejum, camundongos Swiss machos (n=8) foram tratados por via oral com o veículo (salina 0,9% NaCl, 10 mL/Kg EHCS (125, 250 ou 500 mg/Kg) ou com atropina (5 mg/Kg, s.c.), usado como controlo positivo. Depois de 1 h ou de 30 minutos da administração dos tratamentos, cada animal recebeu 0,4 mL do marcador colorido semi-sólido (vermelho de fenol 0,05% em carboximetilcelulose 1,5%) oralmente. O grupo controle tempo zero foi eutanasiado imediatamente após a administração do marcador e as demais grupos 30 min mais da administração do respectivo marcador. Os estômagos foram removidos, fazendo-se necessária a ligadura dos esfíncteres pilórico e esofágico evitando perda de conteúdo estomacal. O conteúdo gástrico foi coletado e solubilizados com 7 mL de água destilada e centrifugado a 3000 rpm por 15 min. Após centrifugação, alíquotas de 1 mL do sobrenadante foram adicionados 1 mL de NaOH 0,025N

e agitado com auxílio de um vórtex. Desse material, 150 µL foram pipetados em microplacas e a leitura espectrofotométrica foi realizada em comprimento de onda igual a 695 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de esvaziamento gástrico em relação ao grupo controle tempo zero.

### 2.8.2 *Trânsito intestinal normal*

Camundongos Swiss machos (n=8) foram tratados oralmente com veículo (salina 0,9% NaCl, 10 mL/Kg), EHCS nas doses de 125, 250 ou 500 mg/Kg ou atropina 5 mg/Kg (s.c.). Após uma hora foi administrado por via oral uma suspensão de carvão ativado a 10% em goma arábica 5%, marcador de motilidade, todos os tratamentos com volume fixo de 10 mL/Kg. Transcorridos 30 min da administração do marcador, os animais foram eutanasiados para retirada do intestino delgado, fazendo-se necessária a ligadura dos esfíncteres pilórico e íleo-cecal. A relação entre a distância percorrida pelo carvão ativado e o tamanho total do intestino delgado foi expressa em centímetros de percurso do carvão em função do comprimento total do intestino (Stickney e Northup, 1959 com modificações).

### 2.9 *Avaliação da atividade anti-Helicobacter pylori in vitro*

Devido à importância da *H. pylori* na patogênese das úlceras gástricas também foi avaliada a ação antibiótica do EHCS contra este agente segundo modelos de Ellof, (1998), Palomino, (2002) utilizando-se a cepa ATCC43629 isolada de duodeno de indivíduos ulcerados. Foram utilizadas diluições seriadas de EHCS e se observou até qual diluição a bactéria se desenvolveu para assim se determinar a concentração inibitória mínima (CIM) da substância analisada.

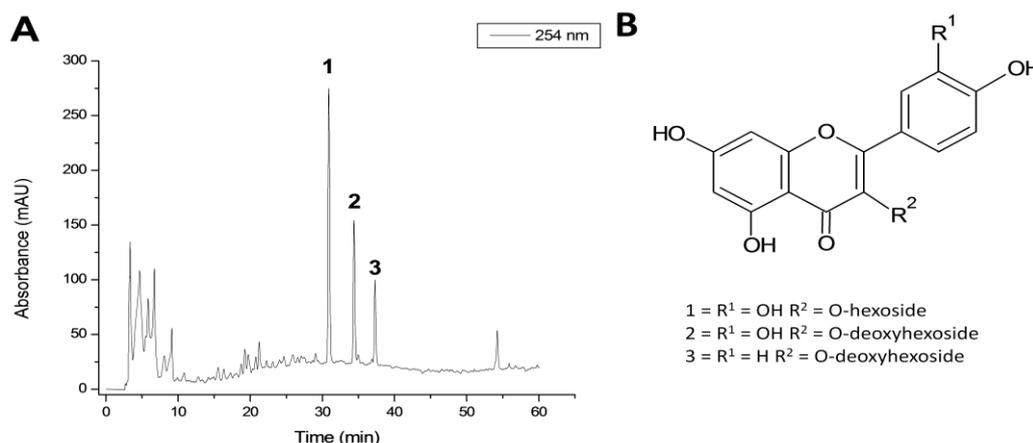
### 2.10 *Análise estatística*

Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão da média. Análise estatística utilizada foi a Análise de Variância (ANOVA), seguida por testes de significância. Para os dados não-paramétricos foram expressos sob a forma de mediana e foram analisados pelo teste Dunn, e dados paramétricos foram analisados pelo teste de Dunnet (para comparação com o veículo) e de Tukey (para comparação entre os grupos). O nível de significância mínimo considerado foi 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram analisados com o software GraphPad Prism versão 5 (San Diego, EUA, 2003).

### 3. Resultados

#### 3.1 Perfil cromatográfico e identificação de substâncias químicas por HPLC-PDA-ESI-IT-MS

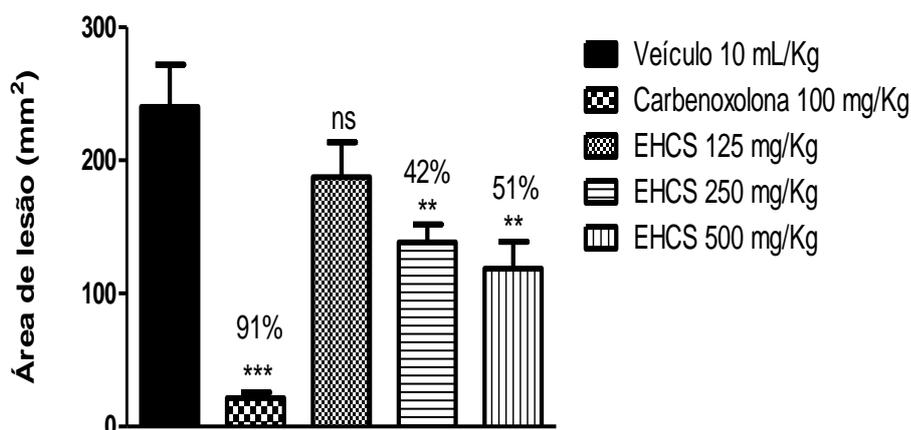
A identificação dos constituintes químicos de EHCS por meio de HPLC-ESI-PAD-TI-MS (**Figura 1**), confirmou a presença de três componentes principais característicos de *C. sicyoides* como flavonol-O-glicosídeos derivados da quercetina e o Kaempferol (Xu et al. De 2009).



**Figura 1.** Identificação de compostos químicos no EHCS por HPLC-PDA-ESI-IT-MS. **A** – Cromatograma analítico HPLC-PAD registrado a 254 nm de 70% de EHCS. A fase móvel era de H<sub>2</sub>O ultra-pura (eluyente A) e MeOH (eluyente B), ambos contendo 0,1% de ácido fórmico. A proporção foi de: 5 - 100% de B em A em 60 minutos. Volume de injeção: 20,0 µl; temperatura da coluna: 25 ° C (de Phenomenex Luna C18 ® - 250 x 4,6 mm ID, 5 µm); razão de fluxo: 0,8 mL min<sup>-1</sup>. **B** - As estruturas dos compostos identificados por HPLC-PAD-ESI-IT-MS: 1 - quercetina-3-O-hexosídeo, 2 - quercetina-3-O-a-deoxyhexosídeo, 3 - Kaempferol 3-O-deoxyhexosídeo.

#### 3.2 Úlcera gástrica induzida por etanol absoluto

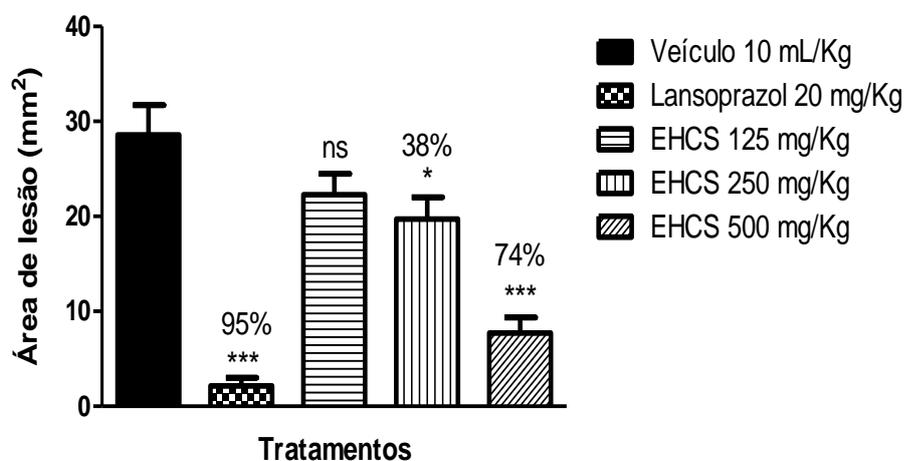
O EHCS reduziu a área de lesão nas doses de 250 e 500 mg/Kg, com efeito protetor da mucosa gástrica de 42%, na menor dose efetiva, em relação ao grupo tratado com veículo. Apenas os animais tratados com o extrato na dose de 125 mg/Kg não foram capazes de reduzir significativamente a área de lesão. Os animais tratados com o EHCS apresentaram curva dose resposta nas doses testadas e não houve diferença estatisticamente significativa entre as doses efetivas do extrato. O grupo que recebeu carbenoxolona 100 mg/Kg (controle positivo) reduziu a área de lesão em 91% em relação ao grupo tratado com veículo (**Figura 2**).



**Figura 2.** Efeito gastroprotetor do EHCS (125, 250 e 500mg/Kg p.o.) frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=7-8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de com  $**p<0,01$  e  $***p<0,001$  comparado com o grupo controle (veículo). Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey. Porcentagem indica a proteção em relação ao veículo. ns= diferença não significativa.

### 3.3 Úlcera gástrica induzida por indometacina

Neste modelo de indução de úlceras por indometacina, as doses testadas do extrato foram selecionadas a partir dos resultados obtidos no modelo de indução por etanol. O EHCS também foi capaz de reduzir significativamente a área lesionada em relação ao grupo tratado com o veículo nas doses testadas de 250 e 500 mg/Kg, com redução de 38 e 74%, respectivamente (**Figura 3**). O grupo controle positivo lansoprazol apresentou proteção de 95% em relação ao grupo tratado com o veículo.



**Figura 3.** Efeito gastroprotetor do EHCS (125, 250 e 500mg/Kg p.o.) frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por indometacina em ratos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=7-8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnet com \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  comparado com o grupo controle (veículo). Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey. Porcentagem indica a proteção em relação ao veículo. ns= diferença não significativa.

#### *3.4 Avaliação da atividade antissecretoria medida pelos parâmetros bioquímicos do suco gástrico*

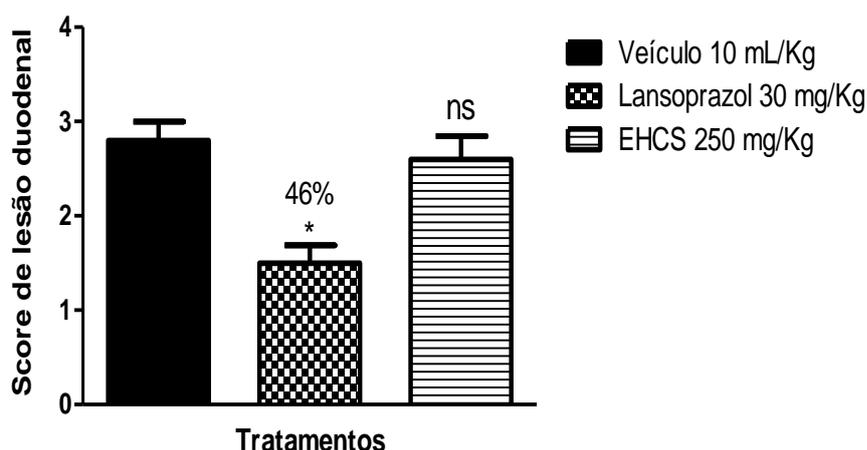
O tratamento prévio dos animais com o EHCS administrado por via oral (p.o.), na menor dose efetiva, não alterou significativamente o pH e volume do conteúdo gástrico em relação ao grupo tratado com veículo, mas houve aumento das concentrações de  $H^+$  em relação ao grupo veículo. Com o tratamento por via intraduodenal (i.d), o EHCS não alterou significativamente os valores de pH e concentração de íons hidrogênio, bem como o volume do conteúdo gástrico em relação ao grupo tratado com solução salina. Estes resultados sugerem que a gastroproteção efetuada pelo extrato na dose de 250 mg/Kg não ocorre em decorrência da inibição da secreção de ácido gástrico. Os animais tratados com o controle positivo lansoprazol, por via oral e intraduodenal, apresentaram aumento significativo no pH e redução no volume gástrico e concentrações de  $H^+$  no suco gástrico (**Tabela 1**).

Via	n	Tratamento	pH	Volume do suco gástrico (mL/4h)	Concentração de H <sup>+</sup> (mEq/L)
p.o	8	Veículo	1,6±0,05	4,31±0,38	8,18±0,86
	8	Lansoprazol 30 mg/Kg	6,09±0,32***	2,06±0,19***	4,24±0,29***
	9	EHCS 250 mg/Kg	1,0±0,10	4,91±1,03	11,33±0,75**
Via	n	Tratamento	pH	Volume do suco gástrico (mL/4h)	Concentração de H <sup>+</sup> (mEq/L)
i.d	9	Veículo	1,41±0,04	5,90±0,43	16,74±2,06
	8	Lansoprazol 30 mg/Kg	6,02±0,38***	1,86±0,22***	9,17±1,30**
	9	EHCS 250 mg/Kg	1,41±0,06	6,12±0,83	12,00±1,11

**Tabela 1.** Avaliação do efeito antissecretor do EHCS (125, 250 e 500mg/Kg p.o.) administrado por via oral e intraduodenal em ratos Wistar machos. Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média (n=8). Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnet para comparação com o controle veículo, onde \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey. ns= diferença não significativa em relação ao controle veículo.

### 3.5 Úlcera duodenal induzida por cisteamina

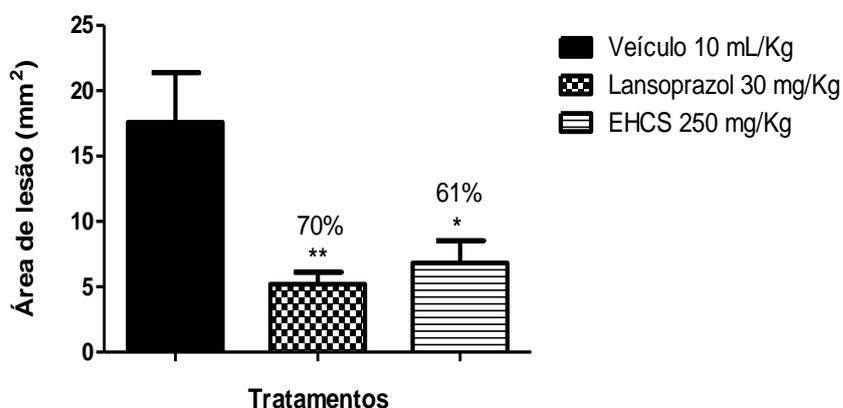
O tratamento prévio com o EHCS na dose de 250 mg/Kg não preveniu o surgimento de lesões ulcerativas perforantes induzidas por cisteamina, com índice de lesão duodenais próximo ao grupo tratado com solução salina (**Figura 4**), mostrando assim não possuir atividade antiulcerogênica nesse modelo.



**Figura 4.** Efeito gastroprotetor do EHCS (250 mg/Kg p.o.) frente ao modelo de úlcera duodenal induzida por cisteamina em ratos. Os resultados foram expressos como mediana ± erro padrão da mediana (n=7-8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunn, com \* $p < 0,05$  comparado com o grupo controle (veículo). Porcentagem indica a proteção em relação ao grupo veículo. ns= diferença não significativa.

### 3.6 Úlcera gástrica induzida por isquemia e reperfusão

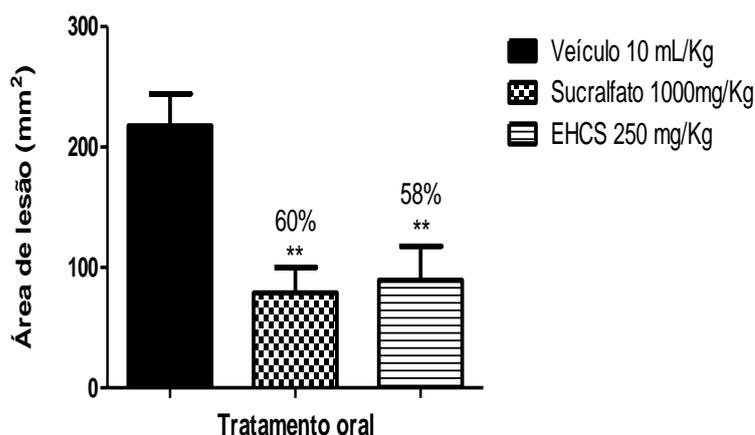
Neste modelo, observou-se que o EHCS foi efetivo em proteger a mucosa gástrica do processo isquêmico reduzindo significativamente a área lesada em 61% em relação ao grupo tratado com o veículo. O grupo de animais tratados oralmente com lansoprazol (30 mg/Kg) reduziu em 70% as lesões gástricas quando comparado aos animais tratados com veículo (**Figura 5**). Neste modelo experimental, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados com lansoprazol e o extrato.



**Figura 5.** Efeito gastroprotetor do EHCS (250mg/Kg p.o.) frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por isquemia e reperfusão em ratos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=8-10) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnet, com  $*p<0,05$  e  $**p<0,01$  comparado com o grupo controle (veículo). Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey. Porcentagem indica a proteção em relação ao veículo. ns= diferença não significativa.

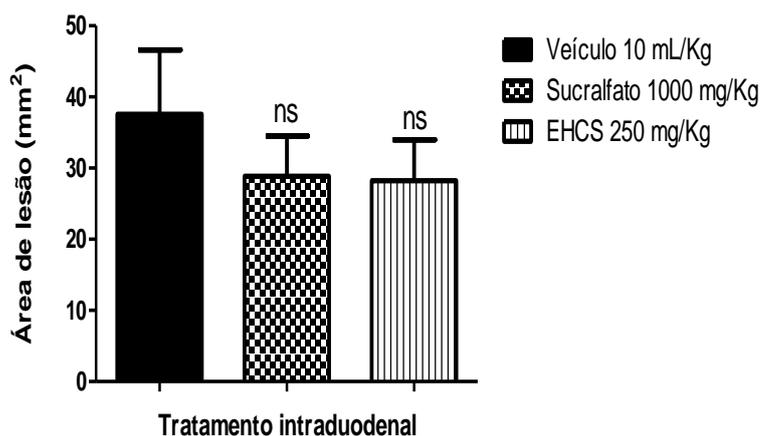
### 3.7 Avaliação da atividade sistêmica

Na **figura 6**, mostra o modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em ratos pré-tratados oralmente com veículo, sucralfato (1000 mg/Kg) ou EHCS (250 mg/Kg). O extrato promove proteção gástrica em relação ao grupo controle negativo. Porém, quando este extrato administrado por via intraduodenal, há uma perda da proteção no estômago de ratos desafiados pelo etanol absoluto (**Figura 7**).



**Figura 6.** Avaliação do efeito sistêmico de EHCS (250mg/Kg p.o.) frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=8-10) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnet, com  $**p < 0,01$  comparado com o grupo controle (veículo). Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey. Porcentagem indica a proteção em relação ao veículo. ns= diferença não significativa.

Os animais tratados oralmente com sucralfato (1000 mg/Kg), apresentaram uma proteção na mucosa gástrica quando comparados com o grupo controle negativo. Esse efeito decorrente da administração oral é responsável por formar uma barreira protetora na mucosa gástrica, como esperado, e não apresenta efeito gastroprotetor quando administrado pela via intraduodenal. Este resultado demonstra que o extrato não exerce ação gastroprotetora por atuação sistêmica e assim com o sucralfato possui ação local sobre a mucosa gástrica.

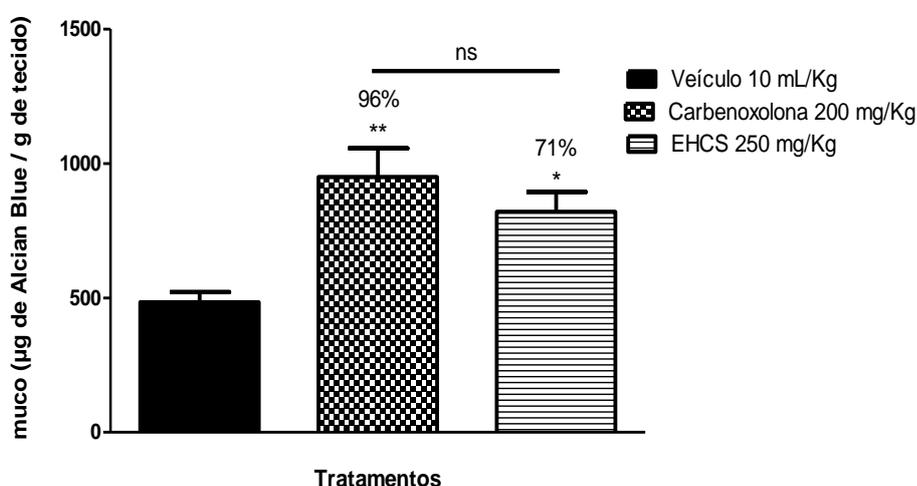


**Figura 7.** Avaliação do efeito sistêmico de EHCS (250mg/Kg p.o.) frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=8-10) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnet. Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey. ns= diferença não significativa.

### 3.8 Avaliação dos fatores protetores da mucosa

#### 3.8.1 Determinação do muco aderido à mucosa gástrica

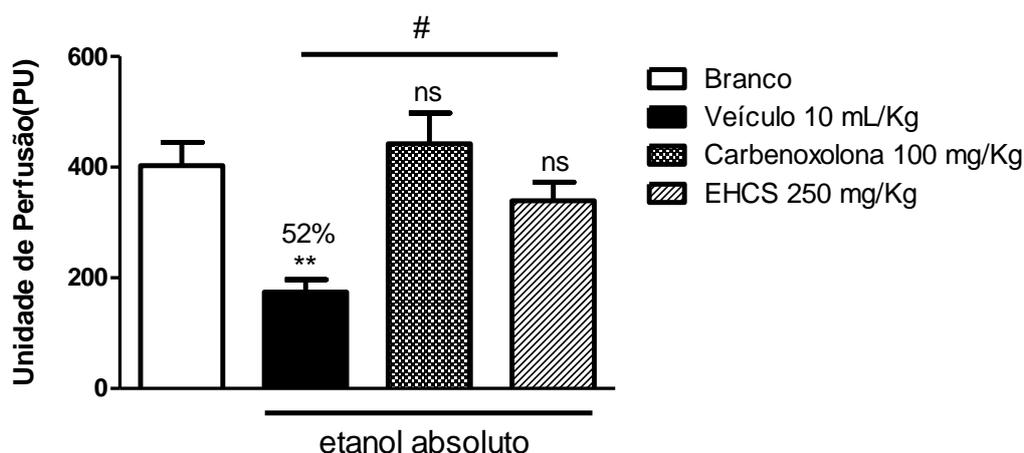
O EHCS (250 mg/Kg) administrado por via oral foi capaz de elevar significativamente (71%) a quantidade de muco gástrico no modelo de ligadura do piloro, em comparação ao grupo tratado com o veículo. Em adição, a comparação entre os grupos que receberam o extrato e carbenoxolona (200 mg/Kg) não acusou diferença estatística significativa, indicando que o aumento de muco proporcionado pela carbenoxolona é equivalente ao proporcionado pelo extrato (**Figura 8**).



**Figura 8.** Efeito de EHCS (250mg/Kg p.o.) sobre a secreção de muco gástrico frente ao modelo de ligadura do piloro em ratos Wistar machos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=8-10) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnet, com  $*p < 0,05$  e  $**p < 0,01$  comparado com o grupo controle (veículo). Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey. Porcentagem indica o aumento da produção de muco em relação ao veículo. ns= diferença não significativa.

#### 3.8.2 Determinação do fluxo sanguíneo local em úlceras gástricas induzidas por etanol

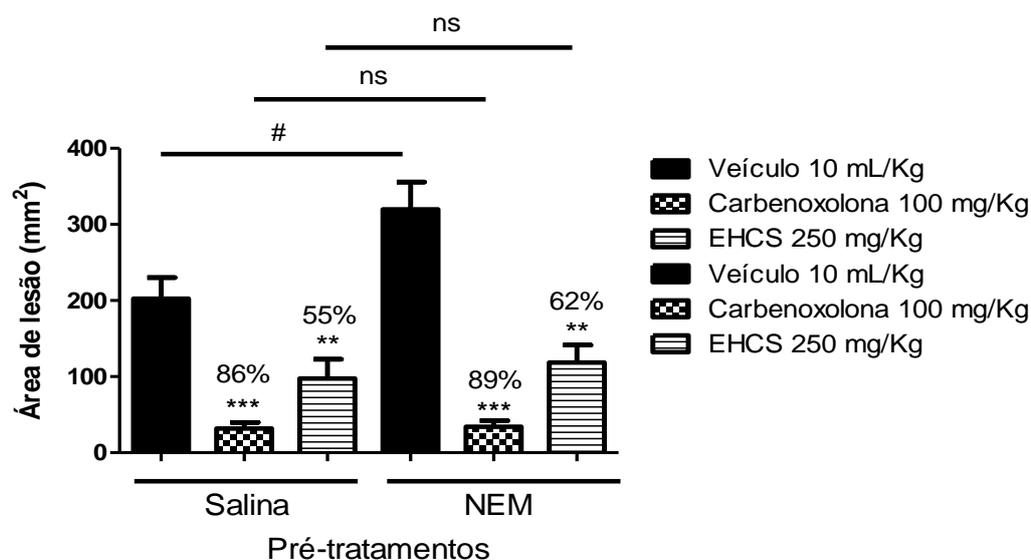
O EHCS na dose de 250 mg/Kg manteve significativamente o fluxo sanguíneo gástrico no modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em relação ao grupo que não recebeu tratamento (branco), comprovando que este extrato é capaz de restabelecer o fluxo sanguíneo após a administração do agente lesivo. O grupo tratado com carbenoxolona também restabeleceu o fluxo sanguíneo após a administração do etanol. O grupo controle negativo (veículo) diminuiu o fluxo sanguíneo (52%) comparado com o grupo sem tratamento nenhum (branco) (**Figura 9**).



**Figura 9.** Efeito de EHCS (250mg/Kg p.o.) sobre o fluxo sanguíneo gástrico frente ao modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em ratos Wistar machos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=8-10) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnet, com  $**p < 0,01$  comparado com o grupo branco. Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey. Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey, onde # $p < 0,05$ . Porcentagem indica a diminuição de fluxo sanguíneo gástrico em relação ao grupo branco. ns= diferença não significativa.

### 3.8.3 Indução de úlceras gástricas por etanol em animais pré-tratados com NEM

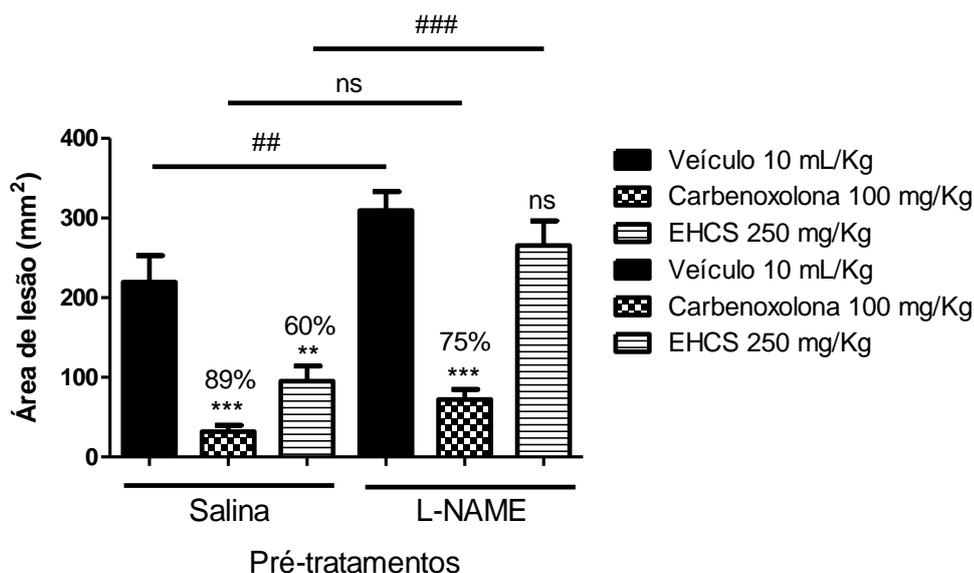
Observou-se que os animais pré-tratados com solução salina e tratados com EHCS na dose de 250 mg/Kg mantiveram proteção significativa (55%) em relação ao controle negativo veículo. Quando estes foram pré-tratados com NEM, inibidor endógeno de grupamentos sulfidrílicos, o EHCS manteve a gastroproteção, com redução de 62% na área lesionada em relação ao grupo tratado com veículo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os respectivos grupos pré-tratados com solução salina e NEM. O grupo controle positivo (carbenoxolona) manteve sua proteção quando pré-tratado com NEM, com gastroproteção de 89%. Os resultados obtidos encontram-se dispostos na **figura 10**, e indicam que tanto o ECHS quanto a carbenoxolona não depende dos grupamentos sulfidrílicos para exercerem sua ação protetora gástrica.



**Figura 10.** Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção efetuada de EHCS (250mg/Kg p.o.) frente ao modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em ratos Wistar machos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=8-10) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnet, com  $**p < 0,01$  e  $***p < 0,001$  comparado com o grupo controle (veículo). Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey, onde  $\#p < 0,05$ . Porcentagem indica a proteção em relação aos grupos veículos pré-tratados com salina e NEM. ns= diferença não significativa.

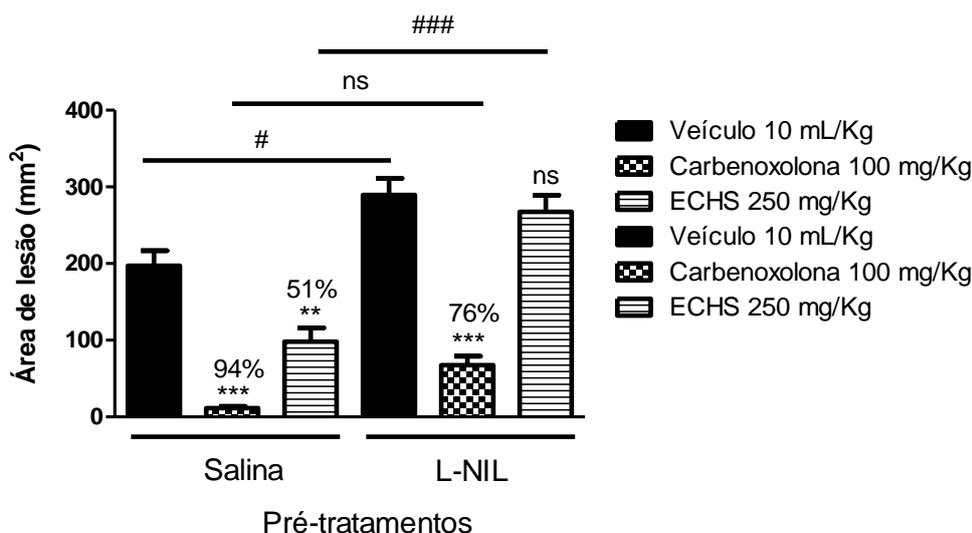
#### 3.8.4 Indução de úlceras gástricas por etanol em animais pré-tratados com L-NAME e L-NIL

O grupo pré-tratado com solução salina e tratado com o EHCS na dose de 250 mg/Kg manteve a gastroproteção observada nos modelos anteriores, com redução na área de lesão de em relação ao controle solução salina. Os animais pré-tratados com L-NAME, inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), e tratados com EHCS perderam expressivamente a gastroproteção em relação ao grupo pré-tratado com solução salina e tratado com o extrato. Estes resultados são indicativos da participação do NO na proteção da mucosa gástrica exercida pelo extrato (**Figura 11**).



**Figura 11.** Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) e papel da NOS na gastroproteção efetuada de EHCS (250mg/Kg p.o.) frente ao modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em ratos Wistar machos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=8-10) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnet, com  $**p < 0,01$  e  $***p < 0,001$  comparado com o grupo controle (veículo). Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey, onde  $##p < 0,01$  e  $###p < 0,001$ . Porcentagem indica a proteção em relação aos grupos veículos pré-tratados com salina e L-NAME. ns= diferença não significativa.

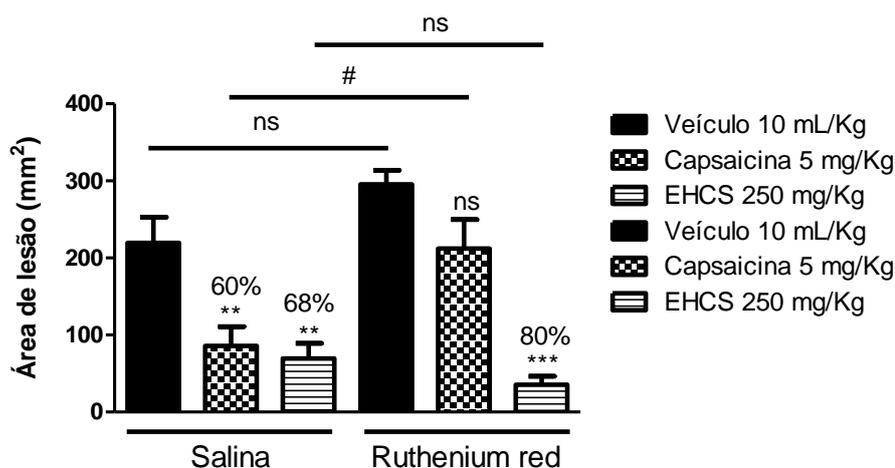
Quando os animais foram pré-tratados com inibidor seletivo de iNOS (L-NIL) e tratado com o extrato diferiu significativamente do grupo pré-tratado com salina e tratado com o extrato (**Figura 12**). No entanto, estes resultados indicam que o extrato tem grande participação no aumento na produção de NO através da ativação da enzima iNOS. O controle carbenoxolona 100 mg/Kg continuou protegendo quando os animais foram pré-tratados tanto com L-NAME (75%) quanto com o L-NIL (76%) indicando o não envolvimento por esta via na gastroproteção exercida no modelo de úlcera gástrica por etanol.



**Figura 12.** Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) e papel da iNOS na gastroproteção efetuada de EHCS (250mg/Kg p.o.) frente ao modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em ratos Wistar machos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=8-10) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnet, com  $**p < 0,01$  e  $***p < 0,001$  comparado com o grupo controle (veículo). Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey, onde  $\#p < 0,05$  e  $###p < 0,001$ . Porcentagem indica a proteção em relação aos grupos veículos pré-tratados com salina e L-NIL. ns= diferença não significativa.

### 3.8.5 Indução de úlceras gástricas em animais pré-tratados com *Ruthenium red*

Os animais que receberam EHCS apresentaram significativa gastroproteção (68%) em relação ao controle negativo (veículo) quando pré-tratados com solução salina. O grupo controle positivo (capsaicina 5.0 mg/Kg) exerceu proteção de 60% em relação ao grupo veículo, mas perdeu sua proteção quando os animais foram pré-tratados com o *Ruthenium red*, inibidor de receptores TRPV. O EHCS continuou protegendo a mucosa gástrica da ação do etanol, mesmo com o pré-tratamento com *Ruthenium red* e não mostrando diferença entre os pré-tratamentos e indicando que não há envolvimento dos receptores TRPV na gastroproteção efetuada pelo extrato (**Figura 13**).



**Figura 13.** Avaliação da participação dos receptores TRPV na gastroproteção efetuada pelo EHCS frente ao modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos Wistar machos pré-tratados com *Ruthenium red*. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=8-10) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnet, com  $**p < 0,01$  e  $***p < 0,001$  comparado com o grupo controle (veículo). Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey, onde  $\#p < 0,05$ . Porcentagem indica a proteção em relação aos grupos veículos pré-tratados com salina e *Ruthenium red*. ns= diferença não significativa.

### 3.9 Determinação dos parâmetros bioquímicos

#### 3.9.1 Quantificação dos níveis de GSH, MPO e MDA no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol

No modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol foi observado que os níveis de GSH presentes em amostras de tecido gástrico de animais tratados com EHCS mantiveram-se próximos aos do grupo controle (veículo) e somente a maior dose testada (500 mg/Kg) foi capaz de manter os níveis de GSH. O grupo tratado com carbenoxolona apresentou depleções nos níveis de GSH sem diferença estatística significativa em relação ao grupo controle negativo, conforme mostra na **tabela 2**.

Tratamentos	MPO (u/g de tecido)	GSH (nmol/g de tecido)	MDA (absorbância nmol/g)
Veículo	14620.0 $\pm$ 3427.0	603.1 $\pm$ 131.1	6.2 $\pm$ 0.2
Carbenoxolona 100 mg/Kg	4510.0 $\pm$ 406.8***	1037.0 $\pm$ 130.5 <sup>ns</sup>	3.8 $\pm$ 0.2**
EHCS 125 mg/Kg	14590.0 $\pm$ 1696.0 <sup>ns</sup>	950.3 $\pm$ 104.4 <sup>ns</sup>	5.2 $\pm$ 0.1 <sup>ns</sup>
EHCS 250 mg/Kg	9091.0 $\pm$ 1412.0*	968.2 $\pm$ 83.2 <sup>ns</sup>	4.7 $\pm$ 0.3*
EHCS 500 mg/Kg	7186.0 $\pm$ 560.9**	1288.0 $\pm$ 184.2**	4.2 $\pm$ 0.2*
Sham	3224.0 $\pm$ 330.2***	1429.0 $\pm$ 192.6**	3.7 $\pm$ 0.2**

**Tabela 2.** Quantificação dos níveis de MPO, GSH e MDA em ratos Wistar machos pré-tratados com EHCS (125, 250 e 500mg/Kg p.o.) submetidos ao modelo de indução de úlcera gástrica por etanol. Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (n=8). Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnet para comparação com o controle veículo, onde \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey. ns= diferença não significativa em relação ao controle veículo.

Neste mesmo modelo foram dosados os níveis de MPO, que houve significativa redução nos níveis de MPO nas doses de 250 mg/Kg, com exceção da dose de 125 mg/Kg em relação ao grupo tratado com o controle negativo. O EHCS não preveniu significativamente o aumento dos níveis de MPO na dose de 125 mg/Kg, dose que também não apresentou proteção no modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol (**Figura 2**). Foi observada relação dose-resposta na redução dos níveis de MPO, a mesma relação obtida na avaliação da área de lesão no modelo de úlceras induzidas por etanol (**Figura 2**). Não houve diferença significativa entre as doses de 250 e 500 mg/Kg mostrando que ambas as doses possuem o mesmo efeito sobre a redução dos níveis enzimáticos de MPO avaliados neste modelo de úlcera (**Tabela 2**). Houve diferença estatística entre as doses de 250 e 500 mg/Kg com o grupo sham. O grupo tratado com carbenoxolona apresentou redução dos níveis de MPO sem diferença estatística significativa em relação ao grupo sham, conforme mostra na tabela 2. Neste mesmo modelo, foi determinado também a peroxidação lipídica provocado pelas lesões ulcerativas induzidas pelo etanol através da quantificação dos níveis de MDA na mucosa gástrica. Assim como na quantificação de MPO, o EHCS nas doses de 250 e 500 mg/Kg apresentaram redução da peroxidação lipídica, com de diferença significativa em ambas as doses comparado com o grupo controle negativo. O grupo controle positivo (carbenoxolona 100 mg/Kg) também reduziu os níveis de MDA em relação ao grupo controle negativo e não apresentou diferença estatística significativa com o grupo sham, como mostra na tabela 2.

### 3.9.2 *Quantificação dos níveis de MPO e MDA no modelo de úlcera gástrica induzida por indometacina*

O tratamento dos animais com as diferentes doses de EHCS foi capaz de reduzir os níveis de MPO em relação ao grupo controle negativo, exceto a dose de 125 mg/Kg que também não preveniu as ulcerações provocadas pelo agente lesivo (indometacina) (**Figura 3**). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as doses efetivas ou entre cada dose e o grupo sham. Foi observada relação dose-resposta nos níveis de MPO, assim como na gastroproteção promovida pelo extrato no modelo de indução de úlcera promovida pelo etanol (**Tabela 2**). O controle positivo lansoprazol também impediu o aumento dos níveis de MPO,

mostrando expressiva redução dos níveis enzimáticos em relação ao grupo controle negativo, e sem diferença significativa com o grupo sham (**Tabela 3**).

<i>Tratamentos</i>	<i>MPO (u/g de tecido)</i>	<i>MDA (absorbância nmol/g)</i>
<i>Veículo</i>	<i>4121.0 ± 714.3</i>	<i>7.0 ± 1.1</i>
<i>Lansoprazol 30 mg/Kg</i>	<i>1724.0 ± 451.5**</i>	<i>3.2 ± 0.1**</i>
<i>EHCS 125 mg/Kg</i>	<i>2846.0 ± 429.2<sup>ns</sup></i>	—————
<i>EHCS 250 mg/Kg</i>	<i>2289.0 ± 483.8*</i>	<i>3.8 ± 0.3*</i>
<i>EHCS 500 mg/Kg</i>	<i>1892.0 ± 204.8**</i>	<i>3.3 ± 0.2*</i>
<i>Sham</i>	<i>1708 ± 405.6**</i>	<i>3.1 ± 0.1**</i>

**Tabela 3.** Quantificação dos níveis de MPO e MDA em ratos Wistar machos pré-tratados com EHCS (125, 250 e 500mg/Kg p.o.) submetidos ao modelo de indução de úlcera gástrica por indometacina. Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média (n=8). Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnet para comparação com o controle veículo, onde \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey. ns= diferença não significativa em relação ao controle veículo.

A peroxidação lipídica determinada no modelo de úlcera gástrica por indometacina mostrou que as mesmas doses efetivas na gastroproteção observadas macroscopicamente também apresentaram diferença estatística significativa comparado com o grupo controle negativo, em ambas as doses. Assim como nos demais dados anteriormente mostrados, foi observado relação dose-resposta nos níveis de MDA, indicando expressiva redução de lipoperoxidação na mucosa gástrica nas doses de 250 e 500 mg/Kg. O grupo controle positivo também preveniu a peroxidação lipídica comparado com o grupo controle negativo e não mostrou diferença entre o grupo normal denominado sham.

### 3.9.3 Quantificação dos níveis de GSH, MPO e MDA no modelo de úlcera gástrica induzida por isquemia e reperfusão

No modelo preventivo de indução de úlceras gástricas por isquemia e reperfusão, o EHCS na dose de 250 mg/Kg foi capaz de reduzir os níveis de MPO, quando comparado ao grupo controle negativo tratado com veículo. O grupo controle positivo (lansoprazol 30 mg/Kg) também reduziu os níveis de MPO quando comparados ao grupo controle negativo. Tanto o extrato quanto controle positivo lansoprazol foram capazes de reduzir os níveis de MPO e ambos não apresentaram diferença significativa com o grupo Sham operado (**Tabela 4**).

<i>Tratamentos</i>	<i>MPO (u/g de tecido)</i>	<i>GSH (nmol/g de tecido)</i>	<i>MDA (absorbância nmol/g)</i>
<i>Veículo</i>	$194.0 \pm 16.2$	$814.5 \pm 61.7$	$3.1 \pm 0.1$
<i>Lansoprazol 30 mg/Kg</i>	$127.4 \pm 9.7^{**}$	$728.3 \pm 50.1^{ns}$	$2.2 \pm 0.0^*$
<i>EHCS 250 mg/Kg</i>	$127.9 \pm 13.1^{**}$	$890.7 \pm 74.1^{ns}$	$2.3 \pm 0.0^*$
<i>Sham</i>	$127.8 \pm 8.7^{**}$	$984.1 \pm 61.2^{ns}$	$2.1 \pm 0.0^{**}$

**Tabela 4.** Quantificação dos níveis de MPO, GSH e MDA em ratos Wistar machos pré-tratados com EHCS (250 mg/Kg p.o.) submetidos ao modelo de indução de úlcera gástrica por isquemia e reperfusão. Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (n=8). Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Dunnet para comparação com o controle veículo, onde  $*p < 0,05$  e  $**p < 0,01$ . Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey. ns= diferença não significativa em relação ao controle veículo.

A quantificação dos níveis de GSH mostrou que o EHCS na dose de 250 mg/Kg não diferiu estatisticamente do grupo controle negativo. Também não houve diferença estatística entre o grupo tratado com lansoprazol e o grupo controle negativo. Não foi observado diferença significativa entre o EHCS na dose testada e o Sham (**Tabela 4**). Os resultados desta avaliação nos modelos agudos de indução de úlceras gástricas por etanol (**Tabela 2**) e por isquemia e reperfusão (**Tabela 4**) indicam que a dose do extrato avaliada não atua via manutenção dos níveis de GSH na gastroproteção em modelos agudos de úlceras gástricas. A peroxidação lipídica determinada neste modelo mostrou que o pré-tratamento com o EHCS na dose testada, foi capaz de prevenir os danos oxidativos na mucosa gástrica comparados com o grupo controle negativo (**Tabela 4**). O grupo controle positivo (lansoprazol) também preveniu a peroxidação lipídica comparado com o grupo controle negativo e ambos o extrato e lansoprazol não mostraram diferença significativa com o grupo sham operado, que não recebeu o processo isquêmico.

### **3.10 Avaliação da motilidade gastrointestinal**

#### **3.10.1 Esvaziamento gástrico**

Com esse modelo foi possível verificar que o pré-tratamento oral de EHCS nas doses de 125, 250 e 500 mg/Kg não alteraram o esvaziamento gástrico dos animais apresentando percentual de esvaziamento em 68,4%, 65,3% e 59,4% quando comparados respectivamente ao grupo tratado com veículo (71,3%). Apesar de haver uma tendência da relação dose-dependente, este extrato não apresentou diferença com o grupo veículo e, sendo assim não possui efeito sobre o esvaziamento gástrico. Contudo, a administração subcutânea de atropina (5 mg/Kg) antagonista dos receptores muscarínicos, conforme esperado, retardou o

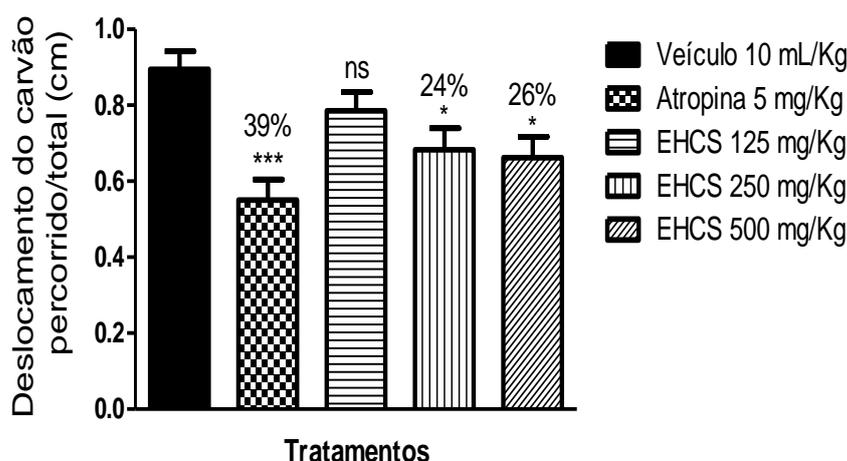
esvaziamento gástrico em 42.8% quando comparado com o grupo tratado com o veículo (71,3%), de acordo com a **tabela 5**.

<i>Tratamentos</i>	<i>n</i>	<i>% de Esvaziamento gástrico</i>
<i>Veículo</i>	8	$71.3 \pm 1.2$
<i>Atropina 5 mg/Kg</i>	8	$42.8 \pm 4.4^{***}$
<i>EHCS 125 mg/Kg</i>	8	$68.4 \pm 3.1^{ns}$
<i>EHCS 250 mg/Kg</i>	8	$65.3 \pm 5.5^{ns}$
<i>EHCS 500 mg/Kg</i>	8	$59.4 \pm 4.1^{ns}$

**Tabela 5.** Avaliação do EHCS (125, 250 e 500 mg/Kg p.o.) sobre o esvaziamento gástrico de semi-sólidos em camundongos Swiss machos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=8-10) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnet, com  $***p < 0,001$  comparado com o grupo controle (veículo). ns= diferença não significativa.

### 3.10.2 Trânsito gastrointestinal normal

Neste modelo foi possível observar que o pré-tratamento com o EHCS reduziu significativamente a motilidade intestinal nas doses de 250 e 500 mg/Kg em relação ao grupo controle negativo. Não houve diferença significativa entre as doses efetivas. A menor dose testada (125 mg/Kg) não foi capaz de alterar a motilidade gastrointestinal. O grupo controle positivo (atropina 5 mg/Kg s.c.) reduziu em 39% o trânsito intestinal em relação ao controle negativo (**Figura 14**).



**Figura 14.** Efeito do EHCS (125, 250 e 500 mg/Kg p.o.) sobre a motilidade gastrointestinal em camundongos Swiss machos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=8-10) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnet, com  $*p < 0,05$  e  $***p < 0,001$  comparado com o grupo

controle (veículo). Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey. Porcentagem indica a redução da motilidade gastrointestinal em relação ao veículo. ns= diferença não significativa.

#### 4. Discussão

Nos últimos anos, os tratamentos de úlceras pépticas têm sofrido transição gradual de uso de um único fármaco por um longo tempo para uma nova abordagem multiterapêutica. Essa mudança de paradigma também pode ser caracterizada por novos tratamentos com múltiplos alvos direcionados, para a ativação de mecanismos de defesa, proteção e reparo. Tais estratégias se baseiam em experiências clínicas e na constatação de que processos fisiopatológicos complexos podem ser enfrentados de forma mais efetiva e com menor incidência de efeitos adversos graves com a combinação de vários compostos ativos em baixa/moderada dosagem do que com uma alta dose de um composto isolado (Wagner, 2005). Diante dessa afirmação, destacamos neste estudo a vantagem que o extrato hidroalcoólico de *C. sicyoides* (EHCS), poderia oferecer quando comparado ao tratamento exclusivo com medicamentos de referência, como a carbenoxolona, lansoprazol e o sucralfato.

As plantas medicinais são amplamente empregadas no tratamento de doenças pela população mundial, principalmente, em países em desenvolvimento que tem difícil acesso aos medicamentos (Silveira et al., 2008). São estimados que 25-30% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual são desenvolvidos através de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de microorganismos e 3% de animais (Calixto, 2003; Assad e Ferro, 2005). Estes dados são suficientes para estimular a pesquisa das espécies vegetais, pois há grande disparidade entre o número de plantas conhecidas e o de plantas efetivamente estudadas no mundo.

Diversos são os grupos de metabólitos secundários produzidos pelas plantas e que podem ser os responsáveis por suas atividades biológicas. Dentre eles, estão a classe dos flavonóides, considerados um grupo de substâncias polifenólicas aos quais são atribuídas diversas atividades biológicas, como atividade antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, antiulcerogênica, anticarcinogênica, antitrombótica e hepatoprotetora (Middleton et al., 2000).

A princípio foi realizada uma análise fitoquímica pelo nosso grupo que indicou a presença de três flavonóides importantes no extrato hidroalcoólico das folhas de *C. sicyoides*, os derivados da quercetina, quercetina-3-O-hexosídeo e a quercetina-3-O-deoxyhexosídeo e o Kaempferol 3-O-deoxyhexosídeo. Estes achados são compatíveis com os de Beltrame et al., (2001), que também identificaram dois flavonóides nas folhas de *C. sicyoides* a quercetina 3- $\alpha$ -rhamnosídeo e o Kaempferol 3- $\alpha$ -rhamnosídeo. Para esta espécie, Ferreira et al., (2008)

relatam a presença de  $\beta$ -sitosterol e quercetina-3-O- $\beta$ -D-rhamnosídeo como constituintes majoritários no extrato metanólico desta espécie.

Com base na análise fitoquímica e considerando a indicação popular do uso das folhas desta espécie para tratar dores estomacais e diarreia, este trabalho contribuiu para o estudo do efeito do EHCS nas duas regiões de maior ocorrência de úlceras pépticas, estômago e duodeno, através de diferentes agentes indutores de lesão capazes de fornecer informações complementares a respeito de sua efetividade, e direcionar os estudos posteriores dos possíveis mecanismos de ação envolvidos em seu efeito antiúlcera, uma vez que são escassos os estudos farmacológicos com esse gênero e espécie.

O modelo agudo de úlcera gástrica induzido por etanol é um modelo clássico e amplamente utilizado para o estudo fisiopatológico e para a prospecção de novas moléculas (Konturek et al., 1998; Konturek et al., 2001). A gênese das lesões gástricas induzidas por etanol é de origem multifatorial, pois é um fator de ação inespecífica que agride a mucosa gástrica de forma mecânica e sistêmica (Lutnick et al., 1992). Segundo Szabo (1987), o etanol administrado por via oral penetra rapidamente na mucosa gástrica e danifica a membrana plasmática causando apoptose e esfoliação do epitélio o que deixa as estruturas da lâmina própria e submucosa (mastócitos, macrófagos e vasos sanguíneos) expostas aos agentes lesivos presentes no lúmen gástrico. Esta esfoliação favorece a permeabilidade da membrana das células superficiais ao ácido clorídrico gástrico e ao próprio etanol que também estimula a secreção ácida, reduz o fluxo sanguíneo local, gera um desequilíbrio sobre os fatores antioxidantes e pró-oxidantes, promovendo a liberação de radicais livres, que atacam as membranas celulares causando assim a lipoperoxidação no tecido gástrico (Glavin e Szabo, 1992; Repetto e Llesuy, 2002). Além disso, por alterar a vasculatura local, mecanismos inflamatórios agudos são ativados, ocasionando o recrutamento e infiltração de neutrófilos, hiperemia e hemorragia. Desta forma o etanol causa lesão, tanto de forma direta, como indireta, através da liberação de produtos vasoativos. Neste modelo, o EHCS nas doses 250 e 500 mg/Kg protegeu de forma significativa a mucosa gástrica, indicando que este efeito pode envolver o aumento da secreção de muco-bicarbonato e restabelecimento do fluxo sanguíneo local, conservação do sistema antioxidante endógeno, diminuição do recrutamento de neutrófilos e consequente diminuição da peroxidação lipídica.

A carbenoxolona utilizada como controle positivo neste experimento é um derivado sintético do ácido glicirrízico da raiz do alcaçuz, e tem sido estudada por seus efeitos

antiulcerogênicos em experimentos com animais e seres humanos (Derekanko e Long, 1981; Khan e Sullivan, 1968; Okabe et al., 1976; Watkinson, 1968). Além disso, vários estudos lidam com o mecanismo de ação da droga, como a inibição da atividade péptica (Henman, 1970), estimulação na secreção de muco (Goodier et al., 1967), inibição da difusão de ácido (Cross e Rhodes, 1972) ou um aumento na produção de prostaglandina (Dembinska-Kiec et al., 1991; Martin et al., 1983; Peskar et al., 1976), todos estes mecanismos descritos como fatores protetores da mucosa.

Uma vez que o EHCS apresentou efeito gastroprotetor frente ao etanol, passou-se a investigar se este extrato apresentaria resposta semelhante para úlcera gástrica induzida por DAINEs, considerado um dos principais causadores dessa doença no homem, principalmente por seu elevado uso indiscriminado (Wallace, 2001).

A indometacina tem sido utilizada como substância produtora de dano gástrico em protocolos experimentais tanto para o estudo de mecanismos fisiopatológicos como para testes de drogas com potencial antiulcerogênico. Sabe-se que seu principal mecanismo é a inibição da atividade das ciclooxigenases 1 e 2 (COX 1 e 2), e conseqüentemente diminuição da produção de PGE<sub>2</sub>. Os DAINEs em geral reduzem o fluxo sanguíneo da mucosa em uma variedade de espécies animais, incluindo seres humanos, comprometendo desta forma as importantes funções da microcirculação gástrica (Vigneri et al., 1992). Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar a redução no fluxo sanguíneo causada pelos DAINEs. Em primeiro lugar, a inibição direta da síntese de prostaglandinas vasodilatadoras (Vigneri et al., 1992). Relatos na literatura comprovam que essas drogas também são capazes de induzir espasmos da musculatura lisa gástrica e assim induzirem isquemia por compressão direta da vasculatura (Piasecki e Thrasivoulou, 1993). Odabasoglu e colaboradores (2008) descreveram um aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e OH<sup>-</sup> decorrente o uso de DAINEs, especificamente a indometacina. O aumento na acidez do estômago e a perda da barreira mucoprotetora podem ocasionar estresse oxidativo e peroxidação lipídica, gerando lesões ulcerativas. O EHCS nas doses avaliadas protegeu de forma significativa a mucosa gástrica dos danos causados pela indometacina nas mesmas doses efetivas (250 e 500 mg/Kg) no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol.

O controle positivo deste modelo, o lansoprazol, é uma droga benzimidazólica substituída, capaz de diminuir a secreção ácida, inibindo irreversivelmente a bomba de prótons ao se transformar em sulfonamida nos canalículos da célula parietal do estômago, além de erradicar a *H. pylori* através de mecanismos indiretos. Quando administrado

diariamente em baixa dose, mostra-se efetivo em reduzir a incidência de úlceras em usuários crônicos de AINEs (Katzung, 2007; Sugano et al., 2012).

Considerando os resultados obtidos até o presente o momento, sugere-se a participação deste extrato em mecanismos de regulação da secreção ácida, antimotoilidade, antioxidante e, sobretudo, citoprotetor.

A atividade gastroprotetora de EHCS é corroborada com estudos de Ferreira e colaboradores (2008), que mostrou que a administração oral do extrato metanólico de *C. sicyoides* nas doses 250, 500 e 1000 mg/Kg em ratos e camundongos machos, preveniram a formação de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto, HCl/etanol e por piroxicam (DAINEs).

Em nossos estudos não houve diferença significativa entre as doses do EHCS no modelo de etanol, considerado modelo de triagem de substâncias com potencial antiulcerogênico, favorecendo desta forma, a escolha da dose de 250 mg/Kg para avaliação dos mecanismos de ação envolvidos neste efeito antiúlcera.

Visto que a regulação da secreção ácida gástrica é umas das principais condições fisiológicas para a defesa da mucosa gastrointestinal, avaliar os parâmetros bioquímicos como pH, volume do conteúdo gástrico e concentração de íons  $H^+$  por meio do modelo de ligadura do piloro, são capazes de indicar a atividade antissecretória de substâncias gastroprotetoras.

O ligamento do esfíncter pilórico causa hipersecreção gástrica que pode ser associado à participação dos secretagogos histamina, gastrina e acetilcolina, bem como o reflexo vago-vagal proveniente da distensão gástrica, sobretudo na região antral do estômago. Além do mais, este processo é capaz de induzir a ativação de pepsinogênio em pepsina que juntamente com o ácido clorídrico gástrico causam fragilidade na barreira de muco-bicarbonato promovendo a autodigestão da mucosa (Shay et al., 1945; Sairam et al., 2002). Neste modelo ainda é possível avaliar-se a influência de substâncias na secreção ácida se ocorre por via sistêmica (tratamento intraduodenal) e/ou por ação local (tratamento oral) para neutralização da acidez.

O EHCS na menor dose efetiva de 250 mg/Kg passou a ser investigado neste modelo, e não alterou os parâmetros pH, volume do conteúdo gástrico, também não reduziu a concentração de  $H^+$  medidas no suco gástrico em ambas as vias de tratamento, sugerindo que este extrato não possui atividade antissecretória. Porém, foi observado um aumento da concentração de íons  $H^+$  em relação ao grupo controle veículo, o que indica uma possível

atividade do extrato como agente secretor de ácido. Este fato pode estar relacionado ao próprio caráter ácido da solução hidroalcoólica do extrato (pH 4,0) influenciando assim no aumento das concentrações de hidrogênio no estômago. Ko e colaboradores (1995) confirmaram a influência de substâncias ácidas na citoproteção gástrica explicada por uma combinação de suas próprias propriedades ácidas e hipertônicas. Estes mesmos autores sugerem que substâncias ácidas e hipertônicas são capazes de aumentar a produção de PGs na mucosa gástrica e dessa forma contribuir com a citoproteção gástrica. Em contradição a estes achados, Ding et al., (1997) relatam que concentrações elevadas de PGs na mucosa gástrica, são capazes de se ligarem a receptores do tipo 4 (EP<sub>4</sub>), presentes em células parietais e principais, e com isso modular positivamente o aumento da secreção de ácido. Desta maneira, os resultados sugerem que o EHCS, deve possuir em sua composição, substâncias gastroprotetoras de caráter ácido devido suas próprias características físico-químicas, ou até mesmo por estimular liberação excessiva de PGs levando a ativação de receptores EP<sub>4</sub> e contribuindo para o aumento da secreção de ácido. Para confirmar esta hipótese, será necessário a avaliação do efeito do EHCS sobre a modulação da PGs.

Diante dos resultados promissores com a espécie vegetal *C. sicyoides* e considerando que a úlcera duodenal é umas das formas mais prevalentes de úlcera péptica, o EHCS na dose de 250 mg/Kg passou a ser avaliada também na prevenção de úlcera duodenal aguda induzida por cisteamina hidrocloreídrica, ferramenta farmacológica capaz de causar lesões cujas características morfológicas e funcionais são semelhantes às do homem (Szabo, 1987). Embora haja estudos que demonstre o mecanismo citotóxico local provocado pela cisteamina *per si* (Khomeenko et al., 2009), Szabo (1987) cita que este agente agressor age estimulando a secreção de ácido via gastrina, que é carregado por movimentos peristálticos que ocorrem naturalmente para o duodeno, lesando-o, além de reduzir a secreção de muco alcalino e do fluxo sanguíneo local, via aumento de Endotelina-1, potente vasoconstritor. O EHCS não promoveu proteção significativa da mucosa duodenal frente à cisteamina, o que reforça a ausência de efeito antissecretório deste extrato, como é o caso do lansoprazol que exerceu efetiva gastroproteção neste modelo.

O muco aderido à mucosa gástrica constitui a primeira barreira de defesa frente aos agentes exógenos, sendo considerado um importante fator de proteção por atuar como lubrificante e antioxidante. Estudos afirmam que este agente citoprotetor é secretado por estímulos do NO, acetilcolina (ACh) e PGs, podendo ser mantido estruturalmente pelos

compostos sulfidrílicos (Phillipson et al., 2008; Flemstrom e Isenberg, 2001; Avila et al., 1996). A redução da secreção de muco gástrico torna a mucosa susceptível a alterações fisiológicas induzidas por fatores endógenos e exógenos (Szabo et al., 2007; Tarnawski, 2010). No modelo de ligadura do piloro efetuado neste estudo, o tratamento oral do EHCS foi capaz de aumentar consideravelmente a quantidade de muco aderido, sugerindo a participação desse fator na gastroproteção.

Outro principal fator envolvido na proteção da mucosa gástrica é a regulação do fluxo sanguíneo local. A perfusão sanguínea adequada é responsável por manter o tecido com oxigênio, nutrientes e hormônios, além de auxiliar na produção de muco e bicarbonato que fortalece a barreira mucoprotetora. O fluxo sanguíneo também contribui para a retrodifusão de íons de hidrogênio do lúmen gástrico (Kawano e Tsuji, 2000). Lesões gástricas provocadas por etanol causam hemorragia local aguda formando edema, congestão vascular e hiperemia (Trier, 1987). O tratamento prévio dos animais com EHCS foi capaz de restaurar significativamente o fluxo sanguíneo após a ingestão oral de etanol, corroborando com a avaliação macroscópica da atividade gastroprotetora neste mesmo modelo de úlcera.

Para manter a homeostasia, substâncias vasodilatadoras são liberadas pelo endotélio, como o NO e PGs, protegendo a mucosa gástrica contra a ação lesiva desses vasoconstritores (Laine et al., 2008). Embora haja outras substâncias endógenas, a proteção gástrica modulada pela circulação na mucosa tem sido atribuída principalmente ao NO (Laine et al., 2008; Kawano e Tsuji, 2000).

Sabe-se que o NO é sintetizado a partir da ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que converte o aminoácido L-arginina e oxigênio em L-citrulina e NO (Wright e Ward, 2000). Existem três isoformas de NOS codificadas por genes diferentes, a óxido nítrico sintase neuronal, endotelial e induzida (nNOS, eNOS e iNOS respectivamente). Tanto a nNOS quanto a eNOS são expressas em condições fisiológicas normais e ditas como constitutivas, já a NO sintase induzida (iNOS), precisa ser estimulada para ser ativada e conseqüentemente produzir NO (Nishida et al., 1997; Nahavandi et al., 1999). O NO é uma substância vasodilatadora que regula a microcirculação e mantém a integridade da mucosa gástrica (Kato et al., 1998). Estudos indicam que além de promover esta vasodilatação, o NO também estimula a secreção de muco, e como potente antioxidante, reduz a peroxidação lipídica no epitélio gástrico (Cho, 2001; Kwiecien et al., 2002; Brown et al., 1993). O NO endógeno parece estar envolvido na regulação da secreção ácida, diretamente atuando na célula parietal

(Berg et al., 2005), e de forma indireta, diminuindo a liberação de histamina pelas células ECL (Kato et al., 1998).

Neste contexto, foi verificado a participação de NO, utilizando L-NAME (N-nitro-L-arginina metil éster) como inibidor não seletivo da enzima NOS e o etanol como agente indutor de lesão gástrica. Assim, os resultados demonstraram uma expressiva reversão do efeito protetor do EHCS frente ao etanol, quando os animais tiveram previamente a síntese de NO suprimida (tratados com L-NAME). Sendo assim, sugere-se que a via do NO está relacionada a este efeito gastroprotetor do extrato, confirmando o efeito sobre a regulação do fluxo sanguíneo avaliado no modelo de úlcera gástrica por etanol. Esta resposta também foi verificada para esta espécie vegetal (Ferreira et al., 2008), contudo foi observado apenas uma perda parcial do efeito protetor em ratos previamente pré-tratados com L-NAME, onde a via do NO foi apontada na gastroproteção promovida pelo extrato metanólico de *C. sicyoides*.

Não obstante, foi investigado ainda o envolvimento do EHCS sobre a NOS induzível (iNOS) através da utilização do inibidor seletivo de iNOS (L-NIL). Não se pode descartar a participação de outras NOS envolvidas na gastroproteção, porém cabe ressaltar que parte considerável da produção do NO se deve pelo aumento da atividade enzimática de iNOS e que esta enzima deve sofrer algum estímulo para ser ativada, como um agente endógeno e/ou exógeno capaz de estimular a secreção ácida ou de reduzir os agentes citoprotetores da mucosa gástrica (Lanas, 2008). Os resultados deste experimento também mostraram expressiva reversão do efeito protetor do EHCS frente ao etanol, quando os animais foram pré-tratados com o L-NIL, confirmando desta forma que o extrato promove gastroproteção mediado pelo aumento da produção de NO a partir de iNOS.

Em seguida, passou a investigar a ação do EHCS sobre os receptores de potencial transitório vanilóides (TRPVs). Schubert (2004) afirma que a inervação da mucosa apresenta importante papel na proteção gástrica, em particular, as fibras aferentes sensíveis a capsaicina, os quais têm sido implicados diretamente na resposta aguda à agressão da mucosa, promovendo a dilatação das arteríolas da submucosa e aumentando rapidamente a circulação sanguínea local. O TRPV1 em especial, é responsável por aumentar o fluxo sanguíneo na mucosa gástrica, e está expresso por um subgrupo de neurônios nociceptivos aferentes importantes no controle da dor (Holzer et al., 1991; Szolcsanyi, 2004). Neste estudo, os resultados mostraram que o *Ruthenium red*, um antagonista inespecífico dos receptores TRPVs, não produziu bloqueio da gastroproteção do EHCS, sugerindo que a gastroproteção,

em especial, a modulação do fluxo sanguíneo mediada pelo extrato é independente destes receptores.

O próximo passo foi investigar a participação dos compostos sulfidrílicos na gastroproteção evidenciada pelo EHCS. O principal efeito citoprotetor dependente de compostos sulfidrílicos é a preservação da microcirculação da mucosa através do sequestro de radicais livres (Konturek, 1990). Estes compostos estão envolvidos na manutenção da barreira de muco aderido fortalecendo-a com a formação de pontes dissulfetos entre as glicoproteínas que compõe a formação do muco e propiciando dessa forma, a atividade antioxidante (Repetto e Llesuy, 2002). De acordo com Rastogi e colaboradores (1998), bloqueadores de compostos sulfidrílicos, como N-etilmaleimida (NEM), podem exacerbar as lesões gastrointestinais causadas por etanol. Foi verificado que mesmo com o bloqueio destes grupamentos, os animais tratados com o EHCS mantiveram gastroproteção, sem diferença significativa de efeito quando comparado ao grupo de animais não bloqueado com NEM e tratado com EHCS. Portanto, a via dos compostos sulfidrílicos não está relacionada à gastroproteção efetuada pelo EHCS.

A gastroproteção atribuída de EHCS está relacionada ao aumento da quantidade de muco aderido, manutenção da microcirculação local e produção de NO via iNOS, e não envolve a diminuição da secreção ácida, bem como a participação de compostos sulfidrílicos e receptores vanilóides como mecanismos citoprotetores envolvidos neste efeito.

Para avaliar o efeito do EHCS sobre componentes do sistema antioxidante endógeno, a fim de relacioná-lo aos resultados já evidenciados na gastroproteção deste extrato, foi realizado o modelo agudo de úlcera gástrica induzida por isquemia-reperfusão da artéria celíaca.

A isquemia provoca o acúmulo de hipoxantina e a conversão de xantina desidrogenase a xantina oxidase (Ueda et al., 1989). Com a reperfusão, xantina oxidase catalisa a reação entre hipoxantina e oxigênio formando  $O^{2-}$  e  $H_2O_2$  (Ueda et al., 1989). Subsequentemente  $O^{2-}$  e  $H_2O_2$  reagem na presença de metal de transição para formar radical OH reativo e citotóxico (Ueda et al., 1989). Os resultados obtidos neste modelo demonstram que o tratamento com EHCS na dose 250 mg/Kg protegeu significativamente a mucosa gástrica contra a formação de lesão comparado aos animais tratados somente com veículo, sugerindo que o EHCS atua por ação antioxidante ou por modular as defesas antioxidantes endógenas.

Drogas antissecretórias, como os inibidores de bomba de prótons (Kitano et al., 1997), bem como os antioxidantes e quelantes de radicais livres (Yoshikawa et al., 1991) fornecem uma proteção contra as lesões gástricas induzidas por isquemia e reperfusão. O lansoprazol, utilizado neste modelo experimental como controle positivo, e outros compostos relacionados, atuam como potentes inibidores da bomba de prótons, sua ação depende do bloqueio da subunidade  $\alpha$  da  $H^+/K^+$ -ATPase gástrica, a enzima responsável pela última etapa na secreção de ácido clorídrico pelas células parietais (Matheson e Jarvis, 2001; Sachs, 1997).

A produção excessiva de radicais livres pode conduzir a danos celulares, sendo a causa ou o agravamento de inúmeras doenças, entre elas a úlcera péptica. As principais fontes de radicais livres são organelas citoplasmáticas detentoras de sistemas enzimáticos que utilizam oxigênio, nitrogênio, cloro, enxofre, hidrogênio, carbono e metais de transição nas reações metabólicas gerando metabólitos reativos em quantidade superior às condições homeostáticas (Rover Junior et al., 2001). Entretanto, o organismo possui um aparato antioxidante correspondente a fatores enzimáticos e não enzimáticos que funciona como mecanismo intrínseco de defesa, mas que pode ser insuficiente na presença excessiva de radicais livres (Anderson, 1996; Halliwell et al., 1995). Os elementos que compõem o sistema antioxidante enzimático são SOD, CAT, Glutathione peroxidase (GPx) e Glutathione redutase (GR), enquanto os componentes não enzimáticos são Glutathione (GSH), melatonina, transferrina, ferritina e ubiquinona (Halliwell et al., 1995).

A atividade antioxidante é um parâmetro utilizado para caracterizar substâncias capazes de proteger um sistema biológico contra os danos celulares de processos ou reações que causam oxidação excessiva de moléculas importantes do organismo (Arnao, 2000).

Conforme este entendimento, o efeito do EHCS por ser um composto rico em flavonóides, foi avaliado frente à peroxidação lipídica nos modelos de úlcera gástrica induzida por etanol, indometacina e isquemia-reperfusão. O processo da lipoperoxidação da mucosa gástrica é formado pelos peróxidos lipídicos cujo produto secundário é o malondialdeído (MDA), que reage com o ácido tiobarbitúrico emitindo uma coloração rósea (Ohkawa et al., 1979). Nestas condições, O EHCS diminuiu de forma significativa a peroxidação lipídica no tecido gástrico, medida pelos níveis de MDA em todos os modelos agudos de úlceras gástricas avaliados, corroborando dessa forma com as análises macroscópicas e confirmando a ação antioxidante deste extrato.

No intuito de definir se essa atividade está relacionada com a propriedade sequestradora de radicais livres ou influenciando na atividade de algum fator do sistema antioxidante endógeno, o efeito de EHCS também foi avaliado sobre o nível de GSH em modelo de úlcera induzida por etanol e isquemia-reperfusão, e foi constatado que este extrato não foi capaz de manter os níveis aumentados de GSH em ambos os modelos de úlcera avaliados, sugerindo que a atenuação da lipoperoxidação pelo EHCS, esteja atribuída à manutenção de outros elementos do sistema antioxidante endógeno.

Em busca de como o EHCS estaria protegendo a mucosa gástrica por atenuação da peroxidação lipídica nos modelos de úlceras gástricas induzida por etanol, indometacina e isquemia-reperfusão, a atividade da enzima MPO (Mieloperoxidase) também foi analisada com objetivo de associá-la a uma possível redução na infiltração de polimorfonucleares no tecido gástrico lesado.

A enzima MPO é uma heme peroxidase constituída de compostos sulfidrílicos formando pontes de dissulfeto, e possui função antimicrobiana inespecífica desenvolvida pelo ácido hipocloroso produzido pelas reações de oxidação entre o peróxido de hidrogênio e o gás cloro (Fernandes et al., 2008). De acordo com Hansson e colaboradores (2006), a síntese de MPO se inicia durante a diferenciação mielóide dos granulócitos na medula óssea e finaliza-se antes da passagem dessas células para a circulação. Esta enzima é encontrada em neutrófilos, monócitos e alguns subtipos de macrófagos teciduais, representando mais de 5% do total de conteúdo protéico nos neutrófilos e 1% nos monócitos. Logo, os neutrófilos podem ser considerados fontes endógenas de radicais livres em consequência da atividade aumentada de MPO (Sakurai et al., 2005).

Quando o efeito do EHCS foi avaliado sobre os níveis de MPO em úlcera gástrica induzida por etanol, indometacina e isquemia-reperfusão, foi constatada uma redução na atividade dessa enzima em todos os modelos de úlceras avaliados, com maior significância no modelo de isquemia-reperfusão. A diminuição da peroxidação lipídica verificada anteriormente proporcionada pelo EHCS, possivelmente pode ser atribuída à redução da infiltração de neutrófilos no tecido gástrico.

Diante desses resultados relevantes, um interesse considerável se reuniu em torno do papel protetor do EHCS em prevenir danos devido ao desequilíbrio oxidativo encontrado nestes processos ulcerogênicos apresentados. Estes dados corroboram com estudos realizados com a espécie *C. sicyoides*, onde foi confirmada atividade antioxidante por um ensaio *in vitro*

realizado, com os valores de IC<sub>50</sub> de 63,35 ± 1,68 µg/mL (valor da quercetina foi de IC<sub>50</sub> 1,08 ± 0,02 µg/mL) (Ferreira et al., 2008). Em adição a estas informações, o extrato aquoso extraído das folhas de *C. sicyoides* também mostrou atividade antioxidante *in vitro* sobre a eliminação de O<sup>2-</sup> e apresentou forte efeito inibidor sobre a atividade da MPO medida por oxidação de guaiacol (Khalil et al., 2008), sugerindo a esta espécie potente atividade antioxidante natural na prevenção de doenças associadas com o estresse oxidativo.

Os resultados obtidos até o presente momento permitiram caracterizar a capacidade gastroprotetora do EHCS administrado pela via oral. Porém, é desconhecido seu efeito pela via sistêmica e dessa forma, questiona-se o que aconteceria, caso a administração do extrato fosse realizada por uma via onde não ocorresse o contato direto do extrato com o epitélio gástrico. Não se conhece o efeito sistêmico de um composto com ação antiúlcera. Para tanto, desenvolveu-se um novo modelo, onde ratos pré-tratados por via oral e intraduodenal, submetidos a uma leve ligadura do piloro e induzidos úlcera por etanol absoluto. Neste modelo desenvolvido em nosso laboratório, o controle positivo usado sucralfato, mostrou validação do experimento, pois não foi observado gastroproteção de forma sistêmica quando administrado por via intraduodenal, mas atuou exercendo gastroproteção local, que segundo Brunton et al., (2006) produz polímeros viscosos que aderem a mucosa gástrica formando um revestimento sobre a sua superfície. Da mesma forma, foi verificado que a ação gastroprotetora do EHCS manteve-se por via oral, mas quando administrado por via intraduodenal, não foi capaz de proteger a mucosa gástrica contra lesões induzidas por etanol.

Nos testes para avaliar a atividade antibacteriana contra *H. pylori* o EHCS apresentou uma potente atividade contra esta bactéria, pois o seu MIC (concentração inibitória mínima) foi inferior a 100 µg/mL, apresentou MIC equivalente a 75 µg/mL. Segundo Ellof (1998) para apresentar uma ação antibacteriana efetiva, óleos essenciais ou extratos brutos devem apresentar um MIC menor ou igual a 100 µg/mL.

Considerando que a motilidade gastrointestinal é uma atividade importante para o funcionamento do trato gastrointestinal e alterações nessa atividade podem interferir diretamente no processo farmacocinético de absorção de drogas, alterando os níveis plasmáticos de diversas substâncias, fato que pode causar prejuízos ao organismo. Há vários estudos que correlacionam esses parâmetros à gênese e tratamento da úlcera péptica (Fülöp et al., 2005). Os autores Ko et al., (1995) sugerem que substâncias que reduzem o esvaziamento gástrico e o trânsito intestinal diluem o agente lesivo (etanol absoluto) e deste forma contribui

para o efeito gastroprotetor. O efeito de EHCS foi avaliado sobre o esvaziamento gástrico, e não foi observado alterações na porcentagem dessa atividade em animais submetidos ao tratamento com o EHCS sob condições fisiológicas normais.

Em ambos os modelos, a atropina controle positivo, mostrou efeito inibitório sobre a motilidade gastrointestinal e confirmou a importância da via colinérgica, pois é um fármaco antagonista muscarínico capaz de causar redução na motilidade e esvaziamento gástrico (Chiba et al., 2002).

Para Stickney e Northup (1959), a atividade propulsiva intestinal é essencialmente independente do esvaziamento gástrico, mesmo com a influência do processo gastroentérico ocasionado pelo relaxamento momentâneo do fundo do estômago na recepção do alimento. O efeito de EHCS foi analisado sobre condições normais na motilidade gastrointestinal utilizando o carvão ativado como marcador. As doses de 250 e 500 mg/Kg retardaram significativamente o trânsito gastrointestinal, sugerindo mecanismo defensor da mucosa gástrica. Esta atividade inibitória da motilidade gastrointestinal proporcionada pelo EHCS possivelmente pode estar relacionada à gastroproteção efetiva no modelo de úlcera gástrica induzido por indometacina, visto um dos meios pelo qual este agente agressor age, como na indução de espasmos da musculatura lisa e conseqüentemente alterações na motilidade gástrica (Piasecki e Thrasivoulou, 1993).

## 5. Conclusão

Os resultados desenvolvidos neste estudo indicam uma potente ação citoprotetora do extrato hidroalcoólico obtido de *C. sicyoides* dependente da liberação de muco e regulação da microcirculação local, sem participação efetiva dos grupamentos sulfidrila e dos receptores vanilóides, porém dependente da via do NO, em especial da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) responsável pela sua síntese, e também da atividade antimotilidade que também pode contribuir com a ação antiulcerogênica. Além disso, análises bioquímicas confirmaram macroscopicamente o efeito gastroprotetor avaliado, indicando ação antioxidante, através da redução da atividade da mieloperoxidase impedindo assim os danos oxidativos na mucosa gástrica. Provavelmente, essas atividades estão relacionadas ao menos em parte, à presença dos flavonóides glicosilados, como a quercetina-3-O-hexosídeo, quercetina-3-O-deoxyhexosídeo e o Kaempferol 3-O-deoxyhexosídeo, encontrados neste extrato.

## 6. Referências

- Agra, M. F.; Freitas, P. F.; Barbosa-Filho, J. M. 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17, n. 1, p. 114-140.
- Anderson, M. E. 1985. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol*, 113:548-555.
- Arnao, M. B. 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*, v. 11, p. 419-421.
- Assad, A. L. D.; Ferro, A. F. P. 2005. Biodiversidade e sua utilização na geração de fitoterápicos. *Fármacos e Medicamentos*, n.37, ano VI, p. 14-18.
- Anderson, D. 1996. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research*, v. 350, p. 103-108.
- Avila, J. R.; Lastra, A. D. L.; Martín, M. J.; Motilva, V.; Luque, I.; Delgado, D.; Esteban, J.; Herrerias, J. 1996. Role of endogenous sulphhydryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. *Inflammation Research*, v. 45, p. 83-88.
- Barbosa, W. L. R.; Santos, W. R. A.; Pinto, L. N.; Tavares, I. C. C. 2002. Flavonóides de *Cissus verticallata* e a atividade hipoglicemiante do chá de suas folhas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 12, supl., p.13-15.
- Berg, A.; Redén, S.; Grenegård, M.; Ericson, A.C.; Sjöstrand, S. E. 2005. Nitric oxide inhibits gastric acid secretion by increasing intraparietal cell levels of cGMP in isolated human gastric glands. *American Journal Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 289, p. G1061-G1066.
- Beltrame, F. L.; Pessini, G. L.; Doro, D. L.; Dias Filho, B. P.; Bazotte, R. B.; Cortez, D. A. G. 2002. Evaluation of the antidiabetic and antibacterial activity of *Cissus sicyoides*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 45, n.1. p. 1-5.
- Beltrame, F. L.; Sartoretto, J. L.; Bazotte, R. B.; Cuman, R. N.; Cortez Dag. 2001. Evaluation of the antidiabetic potential of *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). *Química Nova* 24: 783-785.
- Bighetti, A. E., Antônio, M. A., Kohn, L. K., Rehder, V. L. G., Foglio, M. A., Possenti, A., Vilela, L., Carvalho, J.E., (2005). Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania laevigata* Schultz Bip. *Phytomedicine* 12, 72–77.
- Borrelli, F.; Izzo, A. A. 2000. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytotherapy Research* 14, 581–591.
- Bradford, M. M. 1986. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *J Biol Chem*, 164:321-329.
- Brown, F.; Keates, A. C.; Hanson, P. J.; Whittle, B. J. 1993. Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells. *J. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.*, v. 265, p. 418-422.
- Brunton, L. L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L. 2006. *Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 11.ed., Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil. 1821 p.
- Calixto, J. B. 2003. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Ciência e Cultura*, v. 55, p.37-39.

- Cano, J. H.; Volpato, G. 2004. Herbal mixtures in the traditional medicine of Eastern Cuba. *Journal of Ethnopharmacology*, v.90, p.293-316.
- Cho, C.H. 2001. Current roles of oxide nitric in gastrointestinal disorders. *Journal of physiology.*, 95: 253-256.
- Cross, S.; Rhodes J. 1972. Carbenoxolone: its protective action against bile damage to gastric mucosa in canine pouches (abstract). *Gastroenterology*. v. 62, A-737.
- D'acampora, A. J. 2008. Perfil Epidemiológico Dos Pacientes Portadores De Úlcera Péptica Perfurada Atendidos No Centro Cirúrgico Do Hospital Florianópolis. *Rev. Med. Res.* vol., v. 10, n. 4, p. 138.
- Dembinska-Kiec, A.; Pallapies, D.; Simmet, T.; Peskar, B. M.; Peskar, B. A. 1991. Effect of carbenoxolone on the biological activity of nitric oxide: relation to gastroprotection. *Br. J. Pharmac.* v. 104, p. 811–816.
- Derekanko, M. J.; Long, J. F. 1981. Carbenoxolone sodium protects rat gastric mucosa against ethanol-induced necrosis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* v. 166, p. 394–397.
- Ding, M.; Kinoshita, Y.; Kishi, K.; Nakata, H.; Hassan, S.; Kawanami, C.; Sugimoto Y.; Katsuyama, M.; Negishi, M.; Narumiya, S.; Ichikawa, A.; Chiba, T. 1997. Distribution of prostaglandin E receptors in the rat gastrointestinal tract. *Prostaglandins*, v.53, pg. 199–216.
- Djahanguiri, B. 1969. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, v. 4, p. 265.
- Dominici, A. J. C.; Rego, T. J. A.; Silva, A. Z.; Rocha, C. C.; Lima, E. B. 2003. Abordagem fitoquímica de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). In: *54º Congresso Nacional de Botânica*, Belém, PA.
- Dong, M. H.; Kaunitz, J. D. 2006. Gastroduodenal mucosal defense. *Curr Opin Gastroenterol*, 22(6):599-606.
- Dudar, G. K.; D'andrea, L. D.; Di Stasi, R.; Pedone, C.; Wallace, J. L. 2008. A vascular endotelial growth fator mimetic accelerates gastric ulcer healing in na iNOS-dependent manner. *Am J Physiol Gastroint Liver Physiol*, 295:G364-G381.
- Eloff, J. N. 1998. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *Journal of Ethnopharmacology.*, 60: 1–8.
- Ferreira, M. P.; Nishijima, C. M.; Seito, L. N.; Dokkedal, A. L.; Lopes-Ferreira, M.; Di Stasi, L. C.; Vilegas, W.; Hiruma-Lima, C. A. 2008. Gastroprotective effect of *Cissus sicyoides* (Vitaceae): Involvement of microcirculation, endogenous sulfhdryls and nitric oxide. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 117, p. 170-174.
- Fernandes, D. C.; Regasini, L. O.; Velloso, J. C. R.; Pauletti, P. M.; Castro-Gamboa, I.; Bolzani, V. S.; Oliveira, O. M. M.; Silva, D. H. S. 2008. Myeloperoxidase inhibitory and radical scavenging activities of flavones from *Pterogyne nitens*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 56, p. 723-726.
- Flemstrom, G.; Isenberg, J. I. 2001. Gastroduodenal mucosal alkaline secretion and mucosal protection. *News in Physiological Sciences*, v. 16, p. 23-28.
- Glavin, G. B.; Szabo, S. 1992. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. *The FASEB J*, 6(3): 825-831.
- Goodier, J. E. W.; Horwich, L.; Galloway, R. W. 1967. Morphological observation on gastric ulcers treated with carbenoxolone sodium. *Gut*. v. 8, p. 544–547.
- Halliwell, B.; Aeschbach, R.; Loliger, J.; Aruoma, O. J. 1995. The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, v. 33, p. 601-617.
- Hansson, M.; Olsson, I.; Nauseef, W. M. 2006. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 445, p. 214-224.

Henman, F. D. 1970. Inhibition of peptic activity by carbenoxolone and glycyrrhetic acid. *Gut*. v. 11, p. 344–351.

Holzer, P. 1991. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol. Ver.*, v. 43, p. 143-201.

Jahovic, N.; Erkanli, G.; Iseri, S.; Arbak, S.; Alican, I. 2007. Gastric protection by  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone against ethanol in rats: Involvement of somatostatina. *Life Sci*, 80:1040-1045.

Kato, S.; Kitamura, M.; Korolkiewicz, R. P.; Takeuchi, K. 1998. Role of nitric oxide in regulation of gastric acid secretion in rats: effects of NO donors and NO synthase inhibitor. *British Journal of Pharmacology*, v. 123, p. 839-846.

Katzung, B. G. 2007. *Farmacologia básica e clínica*, 10<sup>a</sup> ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Kawano, S.; Tsuji, S. 2000. Role Of Mucosal Blood Flow: A Conceptual Review In Gastric Mucosal Injury And Protection. *J Gastroent Hepat*, 15 (Suppl.):D1-D6.

Khalil, N. M.; Pepato, M. T.; Brunetti, I. L. 2008. Free radicals scavenging profile and myeloperoxidase inhibition of extracts from antidiabetic plants: *Bauhinia forficata* and *Cissus sicyoides*. *Biol Res* 41: 165-171.

Khanm, M. H.; Sullivan, F. M. 1968. The pharmacology of carbenoxolone sodium. In *Symposium on Carbenoxolone Sodium* (Edited by Robson J. M. and Sullivan F. M.), p. 5-14. Butterworths, London.

Khomenko, T.; Szabo, S.; Deng, X.; Ishikawa, H.; Anderson, G. J.; McLaren, G.D. 2009. Role of iron in the pathogenesis of cysteamine-induced duodenal ulceration in rats. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal & Liver Physiology*, v. 296, p. G1277-G1286.

Kitano, M.; Wada, K.; Kamisaki, Y.; Nakamoto, K.; Kishimoto, Y.; Kawasaki, H.; Itoh, T. 1997. Effects of cimetidine on acute gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. *Pharmacology*. v. 55, p. 154–164.

Ko, J. K.; Cho, C. H.; Lam, S. K.; Ching, C. K. 1995. The importance of gastric emptying and mucosal folds in the adaptive cytoprotection of mild irritants in rats. *Inflamm. Res.*, v.44(12), p.518-522.

Konturek, P. C. H.; Brzozowski, T.; Meixner, H.; Ptak, A.; Hahn, E. G.; Konturek, S. J. 2001. Central and peripheral neural aspects of gastroprotective and ulcer healing effects of lipopolysaccharides. *J Physiol Pharmacol*. v. 52, p. 611-623.

Konturek, P. C. H. 1998. Bacterial lipopolysaccharide protects gastric mucosa against acute injury in rats by activation of genes for cyclooxygenases and endogenous prostaglandins. *Digestion*. v. 59, p. 284-297.

Konturek, S. J. 1990. Mechanisms of gastroprotection. *Scand. J. Gastroenterol*. v.174, p.15-28.

Konturek, S. J.; Konturek, P. C.; Brzozowski, T.; Konturek, J. W.; Pawlik, W.W.; 2005. From nerves and hormones to bacteria in the stomach: nobel prize for achievements in gastrology during last century. *Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 56 (4), p. 507-530.

Krawisz, J. E.; Sharon, P.; Stenson, W. F. 1984. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in the rat and hamster model. *Gastroenterol*, 87:1344-1350.

Kwiecien, S.; Brzozowski, T.; Konturek, P. Ch.; Konturek, S. J. 2002. The role of reactive oxygen species in action of nitric oxide-donors on stress-induced gastric mucosal lesions. *Journal of physiology and pharmacology*, 53 (4): 761-773.

Kwiecien, T.; Brzozowski, S. J.; Konturek, S. J. (2002). Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. *J Physiol Pharmacol*, 53(1):39-50.

Laine, L.; Takeuchi, K.; Tarnawski, A. 2008. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterology*, 135:41-60.

Lanas, A. 2008. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract. *Arth Res Therap*, 10: S2-S4.

Lutnicki, K.; Wróbel, J.; Ledwozyw, A.; Trebas-Pietras, E. 1992. The effect of calcium ions on the intensity of peroxidation processes and the severity of ethanol-induced injury to the rat's gastric mucosa. *Archivum Veterinarium Polonicum*, v. 32, p. 125-132.

Martin, A.; Gurrieri, G.; Sturniolo, G. C.; Naccarato, R. 1983. Effect of carbenoxolone on gastric prostaglandin E release and cytoprotection in the rat. In *Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research*, v. 12, p. 409-411. Raven Press, New York.

Matsuda, H.; Li, Y.; Yoshikawa, M. 1999. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulphhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by mormodin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesion in rats. *Life Sci.*, v.65, p.27-32.

Matheson, A. J.; Jarvis, B. 2001. Lansoprazole: an update of its place in the management of acid-related disorders. *Drugs*. v. 61, p. 1801-1833.

Matsushashi, T.; Otaka, M.; Odashima, M. 2007. Protective effect of a novel rice extract against ethanol-induced gastric mucosal injury in rat. *Dig Dis Sci*, 52:434-441.

Middleton, E.; Kandaswami, C.; Theoharides, T. C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological Reviews*, v. 52, p. 3-5.

Mors, W. B.; Rizzine, C. T.; Pereira, N. A. 2000. *Medicinal plants of Brazil*. Algonac, Michigan: Reference Publications.

Nahavandi, A.; Dehpour, A. R.; Mani, A. R.; Homayounfar, H.; Abdoli, A. 1999. NG-nitro-L-arginine methylester is protective against ethanol-induced gastric damage in cholestatic rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 170: 283-286.

Nishida, K.; Ohta, Y.; Ishiguro, I. 1997. Role of gastric mucosal constitutive and inducible nitric oxide synthesis in the development of stress-induced gastric mucosal lesions in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 236: 275-279.

Phillipson, M.; Johansson, M. E. V.; Henriksna, S, J.; Petersson, J.; Gendler, S. J.; Sandler, S.; Persson, A. E. G.; Hansson, G. C.; Holm, L. 2008. The gastric mucus layers: constituents and regulation of accumulation. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal & Liver Physiology*, v. 295, p.G806-G812.

Pongpiriyadacha, Y.; Matsuda, H.; Morikawa, T.; Asao, Y.; Yoshikawa, M. 2003. Protective effects of polygodial on gastric mucosal lesions induced by necrotizing agents in rats and the possible mechanisms of action. *Biol Pharm Bull*, 26(5):651-657.

Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, v. 95, p. 351-358.

Okabe, S.; Takata, Y.; Takeuchi, K.; Naganuma, T.; Takagi, K. 1976. Effects of carbenoxolone Na on acute and chronic gastric ulcer models in experimental animals. *Am. J. Dig. Dis.* v. 21, p. 618-625.

Odabasoglu, F.; Cakir, A.; Suleyman, H.; Aslan, A.; Bayir, Y.; Halici, M.; Kazaz, C. 2006. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *J Ethnopharmacol*, 103:59-65.

- Palomino, J. C.; Martin, A.; Camacho, M.; Guerra, H.; Swings, J.; Portaels, F. 2002. Rezazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Micobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* v.46, n.8, p. 2720-2722.
- Peskar, B. M.; Holland, A.; Peskar, B. A. 1976. Effect of carbenoxolone on prostaglandin synthesis and degradation. *J. Pharm. Pharmac.* v. 28, p. 146–148.
- Piasecki, C. K.; Thrasivoulou, C. 1993. Spam of gastric muscularis mucosae might play a key role in causing focal mucosal ischemia and ulceration. An experimental study in guinea pigs. *Dig Dis Sci.* v. 38, p. 1183-1189.
- Rafatullah, S., Tariq, M.; Al-Yahya, M. A.; Mossa, J. S.; Ageel, A. M. 1990. Evaluation of turmeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. *Journal of Ethnopharmacology.* 29(1), 25-34.
- Ramakrishnan, K.; Salinas, R. C. 2007. Peptic ulcer disease. *American Family Physician.*, v. 76, 1005–1012.
- Rastogi, L.; Patnaik, G. K.; Dikhit, M. 1998. Free radicals and antioxidant status following pylorus ligation induced gastric mucosal injury in rats. *Pharmacological Research*, v. 38, n. 2, p.125-132.
- Repetto, M. G.; Llesuy, S. L. 2002. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 35, p. 523-534.
- Robert, A.; Nezamis, J. E.; Lancaster, C.; Hanchar, A. J. 1979. Cytoprotection by prostaglandins in rats: prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. *Gastroenterol.*77(3): 433-443.
- Rover Junior, L.; Höehr, N. F.; Vellasco, A. P.; Kubota, L. T. 2001. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Química Nova*, v. 24, p. 112- 119.
- Sachs, G. 1997. Proton pump inhibitors and acid-related diseases. *Pharmacotherapy.* v. 17, p. 22–37.
- Sairam, K.; Rao, C. V.; Dora Babu, M.; Vijay Kumar, K.; Agrawal, V. K.; Goel, R. K. 2002. Antiulcerogenic effect of methanolic extract of *Embllica officinalis*: an experimental study. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 82, n.1, p.1-9.
- Sakurai, K.; Osaka, T.; Yamasaki, K. 2005. Rebamipide Reduces Recurrence Of Experimental Gastric Ulcers: Role Of Free Radicals And Neutrophils. *Digestive Diseases And Sciences*, V. 50, P. S90-S96.
- Sanchez, S.; Martin, M. J. Ortiz, P.; Motilva, V.; Alarcon De La Lastra, C. 2002. Effects of dipyrone on inflammatory infiltration and oxidative metabolism in gastric mucosa: comparison with acetaminophen and diclofenac. *Digestive Diseases and Science*, v. 47, p. 1389-1398.
- Santin, J. R.; Lemos, M.; Júnior, L. C. K.; Niero, R.; Andrade, S. F. 2010. Antiulcer effects of *Achyroline satureoides* (Lam.) DC (Asteraceae) (marcela), a folk medicine plant, in different experimental models. *Journal of Ethnopharmacology*, v.130, 334–339.
- Scarpignato, S.; Capovilla, T.; Bertaccini, G. 1980. Action of caerulein no gastric emptying of conscius rat. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, v. 246, p. 286-294.
- Schubert, M. L. 2004. Gastric secretion. *Current Opinion in Gastroenterology*, v. 20, p. 519–525.

Shay, H.; Komarov, S. A.; Fels, S. S.; Meranze, D.; Gruenstein, M.; Siple, H. 1945. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterology*, v. 5, p.43-61.

Silveira, P. F.; Bandeira, M. A. M.; Arrais, P. S. D. 2008. Farmacovigilância e reações às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, p. 618-626.

Stickney, J. C.; Northup, D. W. 1959. Effect of gastric emptying upon propulsive motility of small intestine of rats. *P.S.E.B.M.*, v 101, p. 582-583.

Sugano, K.; Kontani, T.; Katsuo, S.; Takei, Y.; Sakaki, N.; Ashida, K.; Mizokami, Y.; Asaka, M.; Matsui, S.; Kanto, T.; Soen, S.; Takeuchi, T.; Hiraishi, H.; Hiramatsu, N. 2012. Lansoprazole for secondary prevention of gastric or duodenal ulcers associated with long-term non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) therapy: results of a prospective, multicenter, double-blind, randomized, double-dummy, active controlled trial. *J. Gastroenterol*, v.47, n.5, p.540-552.

Szabo, S. 1987. Mechanisms of mucosal injury in the stomach and duodenum: time sequence analysis of morphologic, functional, biochemical and histochemical studies. *Scand J Gastroenterol*, 127(Suppl.): 21-28.

Szolcsányi, J. 2004. Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptide.*, 38, 377-84.

Tytgat, G. N. J. 2011. Etiopathogenetic Principles and Peptic Ulcer Disease Classification. *Dig Dis*,29 (5):454-458.

Trier, J. S.; Szabo, S.; Allan, C. H. 1987. Ethanol-induced damage to mucosal capillaries of rat stomach. *Gastroenterol*, 92:13-22.

Tsukimi, Y.; Okabe, S. 2001. Recent advances in gastrointestinal pathophysiology: role of heat shock proteins in mucosal defense and ulcer healing. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v.24, p. 1-9.

Ueda, S.; Yoshikawa, T.; Takahashi, S.; Ichikawa, H.; Yasuda, M.; Oyamada, H.; Tanigawa, T.; Sugino, S.; Kondo, M. 1989. Role of free radicals and lipid peroxidation in gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. *Scand. J. Gastroenterol.* 162, 55-58.

Van Den Berg, M. E. *Plantas Mediciniais da Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático*. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1993.

Vigneri, S.; Scialabba, A.; Termini, R.; Germanà, B.; Vianello, F.; Grassi, S. A.; Plebani, M.; Di Mario, F. 1992. Pathophysiology of the gastric microcirculation. *Ital J Gastroenterol*. v. 24, p. 22-30.

Wagner, H. 2005. Natural products chemistry and phytomedicine in the 21(st) century: New developments and challenges. *Pure and Applied Chemistry* [S.I.], v. 77, n. 1, p. 1-6.

Wallace, J. L. 2001. Pathogenesis of NSAID-induced gastroduodenal mucosal injury. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v. 15. p.691-703.

Wright, K. L.; Ward, S. G. 2000. Interactions between phosphatidylinositol 3-kinase and nitric oxide: explaining the paradox. *Molecular Cell Biology Research Communications*, v. 4, p. 137-143.

Wotkinson, G. 1968. Treating ulcer diseases with carbenoxolone sodium. *Postgrad. Med.* v. 44, p. 91-98.

Yoshikawa, T.; Yasuda, M.; Ueda, S.; Naito, Y.; Tanigawa, T.; Oyamada, H.; Kondo, M. 1991. Vitamin E in gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion. *Am. J. Clin. Nutr.* v. 53, p. S210-S214.

Xu, F.; Matsuda, H.; Hata, H.; Sugawara, K.; Nakamura, S.; Yoshikawa, M. 2009. Structures of New Flavonoids and Benzofuran-Type Stilbene and Degranulation Inhibitors of Rat Basophilic Leukemia Cells from the Brazilian Herbal Medicine *Cissus sicyoides*. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 57, n. 10, p. 1089 – 1095.

## **CAPÍTULO 3**

**“Mecanismos farmacológicos envolvidos no efeito anti-inflamatório e antidiarreico de *Cissus sicyoides* Linneu (Vitaceae) em diferentes modelos experimentais em roedores”**

**ARTIGO 2 PARA PUBLICAÇÃO**

Formato: *Journal of Ethnopharmacology* – Research Article

**“Mecanismos farmacológicos envolvidos no efeito anti-inflamatório e antidiarreico de *Cissus sicyoides* Linneu (Vitaceae) em diferentes modelos experimentais em roedores”**

Fernando Pereira Beserra<sup>a</sup>, Raquel de Cássio Santos<sup>a</sup>, Flávia Bonamin<sup>a</sup>, Larissa Lucena Périco<sup>a</sup>, Luiz Ricardo de Almeida Kiguti<sup>b</sup>, Luiz Leonardo Saldanha<sup>c</sup>, André Sampaio Pupo<sup>b</sup>, Lúcia Regina Machado da Rocha<sup>a</sup>, Anne Lígia Dokkedal<sup>c</sup>, Clélia Akiko Hiruma-Lima<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Univ. Estadual Paulista-UNESP – Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, CEP: 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brasil*

<sup>b</sup> *Univ. Estadual Paulista-UNESP – Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, CEP: 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brasil*

<sup>c</sup> *Univ. Estadual Paulista-UNESP – Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências, CEP: 17033-360, Bauru, São Paulo, Brasil*

## RESUMO

Quando os estímulos nocivos sejam eles químicos, mecânicos, térmicos, bactérias ou processo imunológicos, provocam lesões teciduais diversas, ocorre a liberação de substâncias pelos tecidos danificados, resultando em alterações locais, chamadas de inflamação. No processo inflamatório diversas substâncias são liberadas pelos tecidos danificados, destacando-se as prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>) e os leucotrienos (LTB<sub>4</sub>). Sabe-se que as PGE<sub>2</sub> são responsáveis pela vasodilatação e edema no processo inflamatório e também são importantes agentes envolvidos na diarreia causada pelo óleo de rícino em modelos animais experimentais. Levando em consideração estas informações, a indicação popular de *Cissus sicyoides* para tratar distúrbios do trato gastrointestinal e inflamação, assim como os constituintes químicos encontrados no extrato hidroalcoólico das folhas de *C. sicyoides* (EHCS), se fez necessário investigar o efeito inibitório do EHCS sobre processos edematogênicos e diarreicos, bem como elucidar os mecanismos farmacológicos envolvidos nestes efeitos. Neste trabalho foram realizados os testes de toxicidade aguda e avaliação da performance motora. Foram também realizados estudos acerca da ação antiedematogênica e anti-inflamatória do EHCS nos modelos de edema de orelha induzido por xilol ou ácido araquidônico (em camundongos), e edema de pata induzido por carragenina (em ratos), além da avaliação do efeito do extrato sobre a diarreia induzida por óleo de rícino e seus mecanismos estudados nos modelos de trânsito intestinal e acúmulo de fluido intestinal induzidos por óleo de rícino. Os resultados obtidos neste estudo demonstram ausência de toxicidade aguda do extrato, sem alterações na performance motora. O tratamento oral do EHCS produziu efeito antiedematogênico no edema de orelha induzido pelo agente flogístico xilol. Na inflamação induzida pela aplicação tópica de ácido araquidônico, e no edema de pata induzido por carragenina, o EHCS apresentou expressivo efeito anti-inflamatório em ambos os modelos, sugerindo envolvimento da via da COX (ciclooxigenase). Na diarreia induzida por óleo de rícino, o EHCS apresentou atividade antidiarreica, com envolvimento via inibição da produção de PGE<sub>2</sub> na redução da secreção intestinal e, bloqueio dual de receptores muscarínicos e canais de Ca<sup>2+</sup>, mecanismo relacionado à inibição do trânsito intestinal. Estes resultados corroboram com a indicação popular de uso desta espécie e indicam que o EHCS é bastante promissor para a utilização terapêutica na inflamação e distúrbio gastrointestinal como a diarreia.

**Palavras chave:** Etnofarmacologia; *Cissus sicyoides*; Toxicidade aguda; inflamação; Diarreia.

## 1. Introdução

Embora a barreira inflamatória seja um dos componentes mais importantes das rotas defensivas para proteger o organismo contra patógenos exógenos (Tolft et al., 2008), as respostas exageradas de células inflamatórias inatas, como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos, podem causar sérios danos no corpo do hospedeiro, levando a numerosas complicações, tais como, aterosclerose, artrite, reumatismo, diabetes, choque séptico e até mesmo o câncer (McGeer e McGeer de 2008). O processo inflamatório caracteriza-se morfológicamente pela saída de fluidos e de células do sangue para o interstício, e macroscopicamente, geralmente, desenvolve-se a formação de eritema e edema (Morrow e Roberts, 2007).

O papel central da resposta inflamatória é desempenhado pelos mastócitos, células responsáveis por conduzir uma série de sinalização intracelular, como: a liberação de histamina, bradicinina, 5-hidroxitriptamina, a ativação de ácido araquidônico e o seu subsequente metabolismo em prostaglandinas e leucotrienos, respectivamente, através das vias ciclooxigenase (COX) e lipooxigenase (LOX) e, finalmente a transcrição de genes de citocinas e quimiocinas. Todas estas respostas contribuem para a resposta inflamatória (Mequanint et al., 2011).

As prostaglandinas, em especial metabólitos derivados da ação das COXs sobre o ácido araquidônico (AA), desenvolvem ações importantes nos processos fisiológicos normais e também nos processos patológicos, através de receptores EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> e EP<sub>4</sub> (Kobayashi e Narumiya, 2002). A PGE<sub>2</sub> é responsável pela vasodilatação e pelo edema no processo inflamatório, e também age como um mediador lipídico importante no processamento dos sinais dolorosos periféricos ou centrais, uma vez que os receptores de PG são expressos nas fibras sensoriais (Zeilhofer e Brune, 2006; Vanegas e Schaible, 2001). Estes prostanóides também são considerados bons agentes pró-diarreicos em modelos animais experimentais, bem como em seres humanos, pois estão associados a alterações na secreção intestinal e desta forma contribuindo com a diarreia. Estudo recente mostra que o efeito laxante de ácido ricinoléico presente no óleo de mamona é devido à indução da contração do músculo liso intestinal que é mediada pela ativação de receptores EP<sub>2</sub> localizados neste tecido (Brijeab et al., 2009).

A diarreia é considerada uma manifestação inflamatória, percebida geralmente em pacientes portadores da doença inflamatória intestinal (Wenzl, 2012) e comumente

relacionadas também a doença ulcerosa péptica. As doenças diarreicas são as principais causas de doença e morte em todo o mundo. Aproximadamente 88% das mortes relacionadas com a diarreia são causadas devido ao saneamento inadequado e falta de higiene (Kosek et al., de 2003). Este distúrbio é considerado uma das principais causas de retardo do crescimento e morte em recém-nascidos (Petri et al., 2008).

Atualmente existe um grande número de medicamentos usados para tratar estas desordens, mas nos últimos anos tem-se observado um grande interesse em práticas alternativas e complementares a saúde, entre as quais se destaca a Fitoterapia. Este fato deve-se ao elevado custo da assistência médica, difícil acesso aos medicamentos e precariedade da assistência prestada pelos serviços públicos de saúde (Trovo et al., 2003). A população ainda atribui a busca pelos produtos naturais aos perigos do uso irracional dos medicamentos alopáticos. Entretanto, desconhecem que parte desses produtos também são substâncias químicas e que o princípio ativo das plantas utilizadas na medicina popular, não possui sua eficácia comprovada através de estudos científicos (Tomazzoni et al., 2006). É crescente o interesse dos pesquisadores por estratégias que visam identificar e viabilizar novos fármacos a partir de produtos naturais, sobretudo as espécies vegetais, com o propósito de serem mais eficazes e possuírem menos efeitos colaterais que as classes comercializadas atualmente. Neste sentido, buscam-se novos fármacos que possam ser mais eficazes no tratamento de doenças, bem como na minimização de efeitos colaterais.

Nestas condições, se faz necessário a validação do uso popular das plantas medicinais e contribuição destes conhecimentos para a produção de fitoterápicos e fitofármacos, realizando estudos multidisciplinares referentes aos aspectos botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos e tecnológicos, a exemplo do controle de qualidade (Toledo et al., 2003).

*Cissus sicyoides* Linneu (Vitaceae) é uma planta medicinal conhecida popularmente no Brasil como “Insulina vegetal” e usada pela medicina popular para tratar diabetes, dor, artrite reumatóide, dores estomacais, indigestão, epilepsia, convulsões, e hipertensão (Vicentini et al., 2001). Diversas atividades biológicas já foram estudadas para esta espécie, e mostraram atividade anti-diabética e anti-lipêmica (Viana et al., 2004), anti-alérgica (Quilez et al., 2004), citostática (Saenz et al., 2000), antibacteriana (Beltrame et al., 2004), efeito antinociceptivo and anti-inflamatório (Garcia et al., 2000; Almeida et al., 2006) e atividade gastroprotetora (Ferreira et al., 2008). A análise fitoquímica mostrou a presença de

coumarinas, flavonóides, esteróides e taninos (Lizama et al., 2000; Beltrame et al., 2001; Viana et al., 2004). Beltrame et al., (2001), identificaram dois importantes flavonóides nas folhas de *C. sicyoides* a quercetina 3- $\alpha$ -rhamnosideo e o Kaempferol 3- $\alpha$ -rhamnosideo e os autores Ferreira et al., (2008) relatam a presença de  $\beta$ -sitosterol e quercetina-3- $O$ - $\beta$ -D-rhamnosideo como constituintes majoritários no extrato metanólico de *C. sicyoides*.

Os flavonóides são compostos químicos naturais largamente encontrados no reino vegetal. Aproximadamente 3.000 tipos de flavonóides já foram identificados e novas estruturas estão sempre sendo descobertas e relatadas. Estas substâncias constituem o princípio ativo de muitas plantas medicinais utilizadas em várias partes do mundo. São descritos na literatura diversos mecanismos pelos quais estes compostos agem no organismo, a inibição da liberação de histamina induzida por antígeno, de mastócitos e basófilos, inibição da contração de íleo de cobaio induzida por histamina, acetilcolina e prostaglandina E<sub>2</sub> (Fanning et al., 1983).

Considerando estas informações científicas, a indicação popular do uso desta planta para tratar doenças envolvidas no processo inflamatório e distúrbios gastrointestinais, e que drogas que apresentam atividade anti-inflamatória também podem apresentar propriedade de inibição da diarreia pela consequente redução da produção de PGE<sub>2</sub> (Awouters et al., 1978), este estudo teve como objetivo avaliar o potencial efeito anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico de *C. sicyoides* e relacioná-lo com o efeito antidiarreico, e mecanismos envolvidos em ambos os efeitos. Além disso, foi estudado também um possível efeito tóxico do extrato, através do modelo de toxicidade aguda e *screening* hipocrático.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Material vegetal e obtenção do extrato

As folhas de *C. sicyoides* foram coletados em novembro de 2012, no Jardim Botânico Municipal de Bauru - SP, Brasil (22 ° 20'30 "S e 49 ° 00'30" W). Espécimes testemunhas foram preparadas, identificadas e depositadas no Herbário da UNESP – Univ. Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNBA (Bauru - SP, Brasil) sob o código ALD 147. As folhas frescas foram secas a 40° C durante 48 h. Após a secagem, estas foram pulverizadas separadas e extraídas com EtOH/H<sub>2</sub>O (7:3 v/v), por percolação, à temperatura ambiente. O filtrado foi concentrado até à *secura* sob pressão reduzida a 40 °C, proporcionando o extracto hidroalcoólico com rendimento final de 27,6% de peso seco.

## 2.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (180-250g) e camundongos Swiss machos (25-45g) provenientes do Biotério Central da UNESP-Botucatu ou da empresa Anilab Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda (Paulínia, SP), aclimatados às condições do biotério setorial (Departamento de Fisiologia, UNESP, Botucatu) por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, sob temperatura ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração Presence<sup>®</sup> e água *ad libitum*. Todos os experimentos obedeceram aos protocolos experimentais submetidos e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA), do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu, através do protocolo n. 415/12-CEUA (Anexo 2).

## 2.3 Toxicidade oral aguda e screening hipocrático

Foram utilizados camundongos Swiss albinos machos e fêmeas (n=10), divididos em grupos: um grupo tratado com o veículo (salina 0,9%) e os demais tratados com uma dose única aguda de 5000 mg/Kg do EHCS. Os tratamentos foram realizados por via oral (p.o.) e os parâmetros comportamentais (Anexo 3 e 4), descritos por Sousa-Brito (1994) – foram observados aos 30, 60, 120, 240 e 360 min. após a administração do extrato, bem como o número de mortes. O peso corporal dos animais foi avaliado diariamente por 14 dias após o início dos experimentos. No décimo quinto dia, os animais foram mortos e os seguintes órgãos foram retirados: coração, fígado, pulmão, baço, rins, testículos, ovários e úteros. Estes órgãos foram pesados para se realizar uma determinação analítica e comparativa em relação aos animais submetidos ao tratamento com o veículo indicando ou não efeito tóxico agudo dos extratos vegetais.

## 2.4 Avaliação da coordenação motora

Foram usados camundongos machos submetidos ao teste rota-rod (Ugo Basile) que consiste em uma barra com o diâmetro de 2,5 cm subdividida em compartimentos, baseados em Dunham e Miya (1957). O aparelho contém uma barra de ferro giratória com velocidade regulável em rotações por minuto (6 rpm), separada em 04 compartimentos permitindo a avaliação simultânea de vários animais. Os animais foram pré-selecionados 24 horas antes do experimento, eliminando-se os camundongos que não permaneceram na barra por 3 períodos consecutivos de 60 segundos. Os animais foram tratados (p.o.) com uma única dose (maior

dose testado experimentalmente neste estudo) de EHCS (500 mg/Kg) ou veículo (salina 10 ml/Kg) 1 hora antes ou com diazepam (2 mg/Kg i.p, controle positivo) 30 min. antes de serem submetidos ao teste de performance motora. Foi analisado o número de quedas de cada animal durante os 3 min de observação.

## *2.5 Avaliação da atividade anti-inflamatória*

### *2.5.1 Edema de orelha induzido por xilol*

Para avaliar o efeito anti-edematogênico do EHCS foi utilizado o modelo experimental de indução de edema com o uso tópico do xilol, segundo Swingle et al., (1981), com modificações. Para indução de edema de orelha, 40 µl de xilol foram aplicados topicamente na orelha direita dos camundongos (20 µl na face anterior da orelha, 20 µl na face posterior). A orelha esquerda é utilizada como controle. Os animais (n=8-10), submetidos ao jejum por 2 horas, foram tratados 2 horas antes da indução com dexametasona (5 mg/Kg, i.p) e uma hora antes da indução do edema tratados com a substância teste de interesse e o controle negativo (veículo). Foram testadas as doses de 125, 250 e 500 mg/Kg p.o., no volume de 10mL/Kg do EHCS Após uma hora de indução do edema, os camundongos foram mortos e foi retirada uma secção circular (7 mm de diâmetro) de suas orelhas esquerdas e direitas com o auxílio de um puncher (perfurador). Logo em seguida as orelhas foram pesadas. O edema é expresso através da diferença de massa (em miligramas) entre a orelha direita e orelha esquerda.

### *2.5.2 Edema de orelha induzido por ácido araquidônico (AA)*

Para avaliar a participação do AA na ação anti-inflamatória do EHCS, foi utilizado o modelo experimental de indução de edema com o uso tópico do AA segundo Young et al., (1984), com modificações. Para indução desse edema de orelha, 20 µl de AA diluído em acetona na concentração de 2mg/20µl, foram aplicados topicamente na orelha direita dos camundongos (10 µl na face anterior da orelha, 10 µl na face posterior). A orelha esquerda foi utilizada como controle. Os camundongos machos (n=10), submetidos ao jejum por 2 horas, foram tratados 2 horas antes da indução do edema com 5 mg/Kg, (i.p) de dexametasona e uma hora antes da indução do edema tratados oralmente com veículo (salina 10mL/Kg) ou EHCS (125, 250 ou 500 mg/Kg - 10 mL/Kg). Após uma hora da indução do edema, os camundongos foram mortos e foi retirada uma secção circular (7 mm de diâmetro) de suas orelhas esquerdas e direitas com o auxílio de um puncher (perfurador). Logo em seguida as orelhas foram

pesadas e o edema foi caracterizado através da diferença de massa (em miligramas) entre a orelha direita e a orelha esquerda.

### 2.5.3 *Edema de pata induzido por carragenina*

Para verificar a possível atividade antiedematogênica do EHCS, foi utilizado o método de indução de edema de pata com carragenina em ratos Wistar machos (Winter et al. 1962; Levy, 1969; Henriques et al. 1987). Os animais (n=8) em jejum foram divididos em grupos: veículo (salina), Piroxicam 30 mg/Kg (controle positivo), EHCS (125, 250 ou 500 mg/Kg), todos tratados por via oral no volume final de 10 mL/Kg. Os tratamentos (extrato e grupos controle) foram administrados pela via oral 1 hora antes da indução do edema através da injeção subcutânea de 100 µl/pata de carragenina (1% em solução salina estéril) na região subplantar da pata posterior direita e 100 µl/pata de salina estéril na pata esquerda. Fez-se a medição de ambas as patas durante 4 horas, a cada uma hora de intervalo, utilizando o pletismômetro Insight. O resultado foi expresso pela diferença de volume (ml) deslocado entre as patas medidas.

### 2.5.4 *Quantificação de PGE<sub>2</sub> em edema de orelha induzido por AA*

Para avaliar se o EHCS age como anti-inflamatório sobre a via da COX ao inibir o edema de orelha induzido por AA, foi realizada a quantificação de PGE<sub>2</sub> das orelhas segundo a metodologia padronizada de Xian et al. (2012) com modificações. Após a retirada das orelhas, foi obtida uma secção circular de 7mm de diâmetro com auxílio de um perfurador. Cada orelha direita foi homogeneizada vigorosamente em 0,7mL de solução tampão fosfato 0,1M (pH= 7,25) contendo 1mM de EDTA. As amostras foram incubadas a temperatura de 0°C por 15min e posteriormente centrifugadas a 10.000 rpm x 15min x 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para tubo eppendorf e armazenado em freezer -80°C até o momento da determinação da concentração de PGE<sub>2</sub>, através do teste imunoenzimático, ELISA (Kit R&D System KGE004B).

### 2.5.5 *Quantificação de LTB<sub>4</sub> em edema de orelha induzido por AA*

Para avaliar se o EHCS age como anti-inflamatório sobre a via da LOX ao inibir o edema de orelha induzido por AA, foi realizada a quantificação de LTB<sub>4</sub> das orelhas segundo metodologias de Xian et al. (2012) com modificações e Huang et al. (2006). Após a retirada

das orelhas, foi obtida uma secção circular de 7mm de diâmetro com auxílio de um perfurador. Cada orelha direita foi homogeneizada vigorosamente em 0,7mL de solução tampão fosfato 0,1M (pH= 7,25) contendo 1mM de EDTA. As amostras foram incubadas a temperatura de 0°C por 15min e posteriormente centrifugadas a 10.000 rpm x 15min x 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para tubo eppendorf e armazenado em freezer -80°C até o momento da determinação da concentração de LTB<sub>4</sub> através do teste imunoenzimático, ELISA (Kit R&D System KGE006B).

## *2.6 Avaliação da atividade antidiarreica*

### *2.6.1 Diarreia induzida por óleo de rícino*

Camundongos Swiss machos (n=8) foram mantidos em jejum 12 horas antes de receberem o tratamento por via oral, veículo (Salina 0,9%, 10 mL/Kg), loperamida (10 mg/Kg), ou EHCS (125, 250 e 500 mg/Kg) e 1 hora antes da administração oral de óleo de rícino (0,2 mL/animal) (Awouters et al., 1978 modificado por Mukherjee et al., 1998). Imediatamente após a administração do óleo de rícino, cada animal foi colocado na gaiola individual forrada com papel branco e observados durante 4 h. Foram observados os seguintes parâmetros: início da diarreia, frequência das fezes baseados em sua consistência sendo atribuídos de acordo com uma pontuação numérica: 1 (fezes sólidas), 2 (fezes semi-sólida), e 3 (fezes líquidas).

### *2.6.2 Trânsito intestinal induzido por óleo de rícino*

O efeito de EHCS sobre a motilidade intestinal induzida por óleo de rícino camundongos, foi testado usando o método descrito por Stickney e Northup (1959), com modificações. Os camundongos (n=8) foram mantidos em jejum durante 6 horas e distribuídos aleatoriamente em três grupos que receberam oralmente o veículo (Salina 0,9% - 10 mL/Kg), loperamida (10 mg/Kg), ou EHCS (125, 250 ou 500 mg/Kg). Após 1 hora, o óleo de rícino (0,2 mL/animal p.o.) foi administrado a cada animal, e após 30 min. da administração do agente catártico, suspensão de carvão ativado a 10% em goma arábica 5%, marcador de motilidade, todos os tratamentos com volume fixo de 10 mL/Kg. Transcorridos 30 min da administração do marcador, os animais foram eutanasiados para retirada do intestino delgado, fazendo-se necessária a ligadura dos esfíncteres pilórico e íleo-cecal. A relação entre a distância percorrida pelo carvão ativado e o tamanho total do intestino delgado

foi expressa em centímetros de percurso do carvão em função do comprimento total do intestino.

### *2.6.3 Acúmulo de fluido intestinal induzido por óleo de rícino*

Os camundongos (n=8), após 6 horas de jejum, foram tratados oralmente com veículo (10 mL/ Kg), loperamida (10 mg/Kg) ou EHCS (125, 250 ou 500 mg/Kg), e uma hora depois, cada animal recebeu por via oral o óleo de rícino (0,2 mL). Todos os animais foram sacrificados 30min. após uma hora da administração do agente catártico e o intestino delgado foi removido após a ligadura no final do piloro e junção ileocecal e, posteriormente pesados. O conteúdo do intestino foi removido e pesado (g), e as diferenças entre os intestinos cheios e vazios foram calculados (Robert et al., 1976 com modificações).

## *2.7 Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na redução do trânsito intestinal*

### *2.7.1 Envolvimento dos receptores opióides no trânsito intestinal*

Camundongos Swiss machos (n=7-8), após 6 horas de jejum, foram pré-tratados com solução salina 0,9% ou com um antagonista de receptores opióides (naloxona 15 mg/Kg i.p), após 15 minutos foram tratados oralmente com veículo (salina), morfina 2,5 mg/Kg por via s.c ou EHCS 500 mg/Kg, p.o. Decorridos 1 hora do pré-tratamento foi administrado por via oral a suspensão de carvão ativado a 10% em goma arábica 5% e após 30 minutos os animais foram mortos e feita a relação entre a distância percorrida pelo carvão ativado e o tamanho total do intestino delgado (Baggio et al., 2003; Howd et al., 1978).

### *2.7.2 Envolvimento dos receptores $\alpha_2$ -adrenérgicos no trânsito intestinal*

Camundongos Swiss machos (n=7-8), após 6 horas de jejum, foram pré-tratados com solução salina 0,9% ou com um antagonista seletivo dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos (ioimbina 1 mg/Kg) por via intraperitoneal, após 15 minutos foram tratados oralmente com veículo (salina), clonidina 0,1 mg/Kg ou EHCS 500 mg/Kg. Decorridos 1 hora do tratamento oral, foi administrado a suspensão de carvão ativado a 10% em goma arábica 5% (p.o.) e após 30 minutos os animais foram mortos e feita a relação entre a distância percorrida pelo carvão ativado e o tamanho total do intestino delgado (Meli et al., 1990, com modificações).

### *2.7.3 Envolvimento dos receptores muscarínicos no trânsito intestinal*

Camundongos Swiss machos (n=7-8), após 6 horas de jejum, foram pré-tratados oralmente com veículo (salina), EHCS 500 mg/Kg ou atropina 5 mg/Kg por via s.c. Decorridos 1 hora do tratamento oral e 30 min. do tratamento subcutâneo, foi administrado por via oral o agonista muscarínico, carbacol (0,5 mg/Kg) e 30min. após esta indução do trânsito, foi dado a cada animal a suspensão de carvão ativado a 10% em goma arábica 5% e após 30 minutos os animais foram mortos e feita a relação entre a distância percorrida pelo carvão ativado e o tamanho total do intestino delgado (Izzo et al., 1994, com modificações).

### *2.7.4 Efeito antiespasmódico sobre as contrações fásicas induzidas por carbacol ou KCl em íleo isolado de camundongos in vitro*

Camundongos Swiss machos foram eutanasiadas por deslocamento cervical seguida de secção dos vasos cervicais. O abdômen foi aberto e um segmento do íleo de aproximadamente 15 cm de comprimento foi retirado e colocado em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs pH 7,4 (119 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, e 11 mM de dextrose) modificado a 37 °C sob aeração com carbogênio. Após cuidadosa dissecação, o segmento do íleo foi seccionado em fragmentos de 2 a 3 cm de comprimento, suspensos individualmente em cubas de vidro e deixados em repouso por 1 hora, tempo necessário para perfeita estabilização da preparação, durante este período a solução nutritiva era trocada a cada 15 minutos. Após este período de estabilização, as contrações do íleo em resposta ao carbacol 3 µM ou KCl (60 mM) (suficiente para provocar 80% da contração máxima) foram repetidas a um intervalo de 30 min, até as contrações semelhantes obtidas. O EHCS (75, 150, 300 e 500 mg/mL) foi incubado com os tecidos durante 30 minutos, e as contrações em resposta ao carbacol 3µM ou KCl (60 Mm) foram registados para cada concentração do extrato (Mazzolin et al., 2013; Daniel et al., 2001).

## *2.8 Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na redução da secreção intestinal*

### *2.8.1 Acúmulo de fluido intestinal induzido por L-arginina*

Camundongos Swiss machos (n=8), após 6 horas de jejum, foram tratados oralmente com veículo (10 mL/ Kg), EHCS (500 mg/Kg) ou L-NAME (100 mg/Kg i.p.) e uma hora após o tratamento oral e 30 min. após o tratamento intraperitoneal, estes animais receberam o

precursor da formação de óxido nítrico L-arginina (600 mg/Kg, i.p.) como indutor da secreção de fluido de intestinal. Todos os animais foram sacrificados 30min. após a administração da L-arginina e o intestino delgado foi removido após a ligadura no final do piloro e junção ileocecal e, posteriormente pesados. O conteúdo do intestino foi removido e pesado (g), e as diferenças entre os intestinos cheios e vazios foram calculados. Um grupo branco (controle, sem tratamento) foi adicionado ao experimento de modo a verificar os parâmetros de normalidade (Izzi et al., 1994 com modificações).

### 2.8.2 Acúmulo de fluido intestinal induzido por PGE<sub>2</sub>

Camundongos Swiss machos (n=8), após 6 horas de jejum, foram tratados oralmente com veículo (10 mL/ Kg), EHCS (500 mg/Kg) ou loperamida (10 mg/Kg) e uma hora após o tratamento oral todos os animais receberam a administração por via oral PGE<sub>2</sub> (100 µg/Kg) como indutor da secreção de fluido de intestinal. Todos os animais foram sacrificados 30min. após a administração da PGE<sub>2</sub> e o intestino delgado foi removido após a ligadura no final do piloro e junção ileocecal e, posteriormente pesados. O conteúdo do intestino foi removido e pesado (g), e as diferenças entre os intestinos cheios e vazios foram calculados. Um grupo branco (controle, sem tratamento) foi adicionado ao experimento de modo a verificar os parâmetros de normalidade (Viswanatha et al., 2007, com modificações).

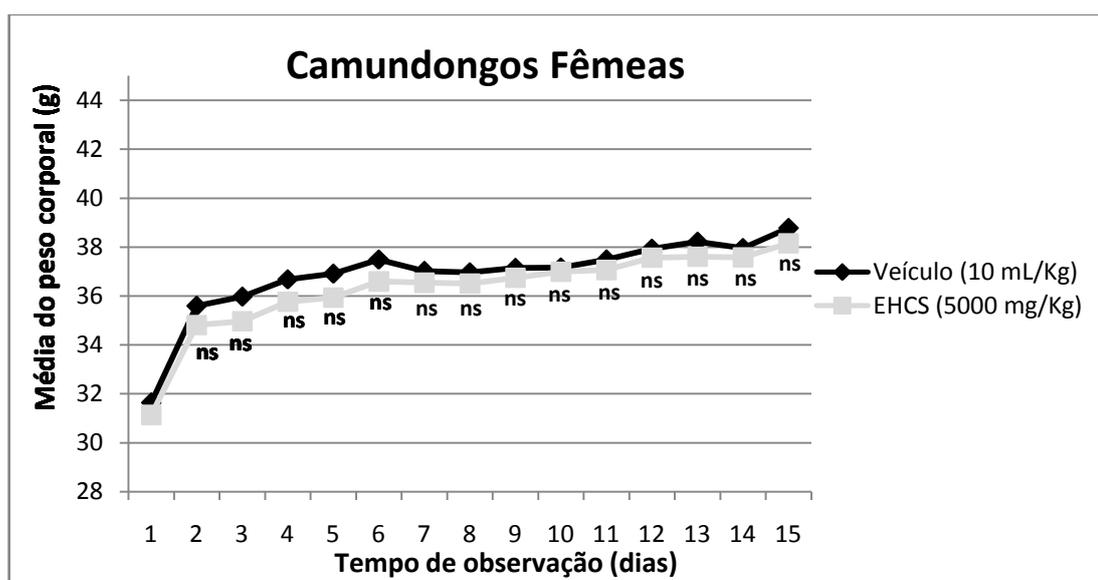
### 2.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão da média. Análise estatística utilizada foi a Análise de Variância (ANOVA), seguida por testes de significância. Para os dados não-paramétricos foram expressos sob a forma de mediana e foram analisados pelo teste Dunn, e dados paramétricos foram analisados pelo teste de Dunnett (para comparação com o veículo) e de Tukey (para comparação entre os grupos), ANOVA de duas vias, seguida de teste de Bonferroni para múltiplas comparações, ou teste de Student (t) para comparação entre dois grupos. O nível de significância mínimo considerado foi 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram analisados com o software GraphPad Prism versão 5 (San Diego, EUA, 2003).

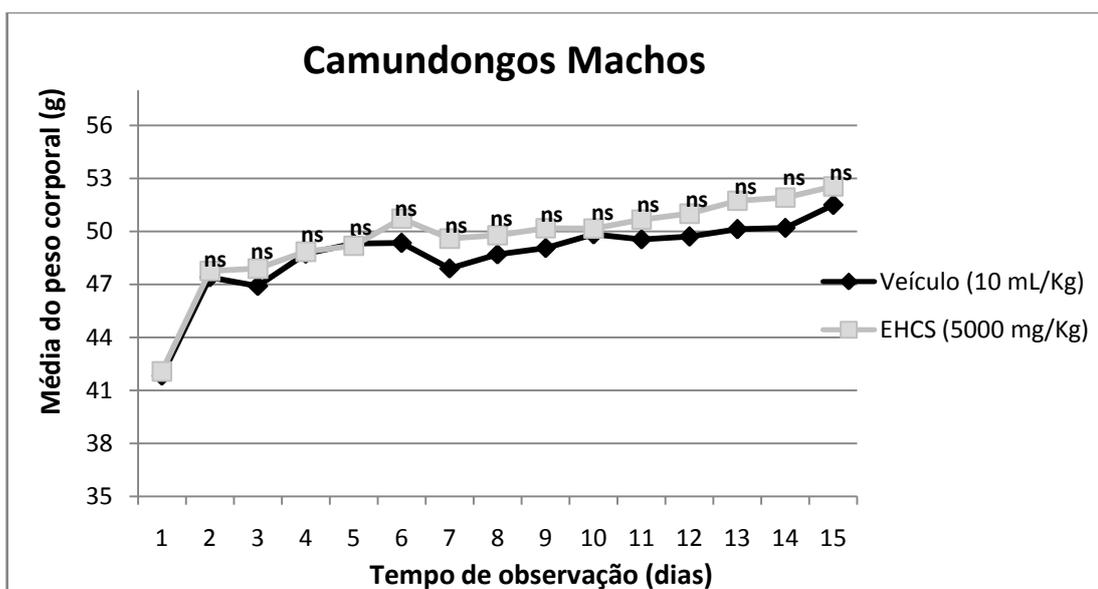
### 3. Resultados

#### 3.1 Toxicidade oral aguda e Screening hipocrático

A administração oral do EHCS na dose de 5000 mg/Kg para camundongos machos e fêmeas não foi capaz de provocar mortes e também não foram observadas qualquer alterações nos parâmetros comportamentais avaliados quando comparados ao grupo controle (veículo). Quanto à evolução do peso corporal diária destes animais machos e fêmeas, acompanhada por 14 dias, não foi observada variação em relação ao grupo controle (veículo) (**Figuras 1 e 2**).



**Figura 1.** Evolução do peso corporal (g) de camundongos fêmeas tratados com dose única do EHCS (5000mg/Kg, p.o.). Média do peso (g) dos animais monitorados durante 14 dias. Os pontos representam as médias de peso dos grupos para cada dia de observação. Análise estatística: ANOVA seguido do teste t "Student". ns= diferença não significativa comparado com o grupo controle (veículo).



**Figura 2.** Evolução do peso corporal (g) de camundongos machos tratados com dose única do EHCS (5000mg/Kg, p.o.). Média do peso (g) dos animais monitorados durante 14 dias. Os pontos representam as médias de peso dos grupos para cada dia de observação. Análise estatística: ANOVA seguido do teste t "Student". ns= diferença não significativa comparado com o grupo controle (veículo).

Outro parâmetro analisado também foi o peso relativo dos órgãos obtidos pela razão entre o peso dos órgãos vitais e reprodutivos com o peso total do animal transformado em arcoseno para adequação estatística (**Tabela 1 e 2**). Após a realização deste teste, verificou-se ausência de diferença significativa no peso dos órgãos dos animais tratados oralmente com o EHCS e tratados com o veículo, tanto para machos quanto para fêmeas.

<i>Tratamentos</i>	<i>Coração</i>	<i>Rins</i>	<i>Pulmão</i>	<i>Fígado</i>	<i>Baço</i>
♂ <i>Veículo - Salina</i>	3,99±0,07	6,47±0,12	4,30±0,12	13,80±0,20	3,18±0,16
<i>EHCS 5000 mg/ Kg</i>	3,97±0,11 <sup>ns</sup>	6,78±0,19 <sup>ns</sup>	4,26±0,18 <sup>ns</sup>	14,09±0,17 <sup>ns</sup>	3,10±0,18 <sup>ns</sup>
♀ <i>Veículo - Salina</i>	4,14±0,08	5,99±0,19	5,13±0,20	13,90±0,36	3,38±0,11
<i>EHCS 5000 mg/ Kg</i>	4,09±0,09 <sup>ns</sup>	5,81±0,09 <sup>ns</sup>	4,81±0,27 <sup>ns</sup>	13,63±0,16 <sup>ns</sup>	3,28±0,13 <sup>ns</sup>

**Tabela 1.** Relação entre o peso dos órgãos vitais e o peso corporal de camundongos Swiss machos e fêmeas tratados com EHCS (5000 mg/Kg) no modelo de toxicidade oral aguda. Valores expressos em média ± erro padrão da média do arcoseno (n=10). Análise estatística: ANOVA seguido do teste t "Student" para comparação com o controle negativo tratado com veículo. ns= diferença não significativa.

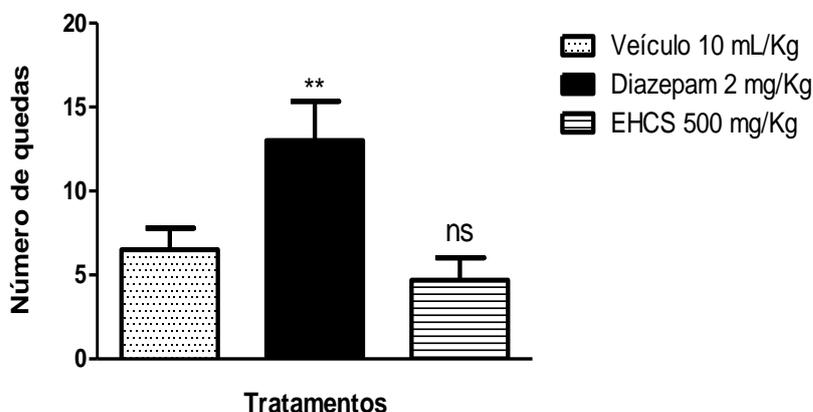
<i>Tratamentos</i>	♂ <i>Testículos</i>	♀ <i>Ovários</i>	♀ <i>Útero</i>
<i>Veículo - Salina</i>	4,14±0,08	2,01±0,19	5,13±0,20
<i>EHCS 5000 mg/ Kg</i>	4,09±0,09 <sup>ns</sup>	1,93±0,09 <sup>ns</sup>	4,91±0,27 <sup>ns</sup>

**Tabela 2.** Relação entre o peso dos órgãos reprodutivos e o peso corporal de camundongos Swiss machos e fêmeas tratados com EHCS (5000 mg/Kg) no modelo de toxicidade oral aguda. Valores expressos em média ± erro padrão da média do arcoseno (n=10). Análise estatística: ANOVA seguido do teste t "Student" para comparação com o controle negativo tratado com veículo. ns= diferença não significativa.

### 3.2 Avaliação da coordenação motora

Com base nos resultados anteriores, a partir da curva dose-resposta do EHCS utilizados nos diversos modelos experimentais, selecionou-se a maior dose usada, de 500 mg/Kg para avaliação de indícios de alteração na performance motora quando submetidos ao aparato de roda giratória. O pré-tratamento oral com EHCS (500 mg/Kg) não produziu alterações no número de quedas ( $4.7 \pm 1.3$ ) dos animais durante o período avaliado, quando

comparado ao grupo controle (veículo) ( $6.5 \pm 1.2$ ). O grupo tratado com diazepam apresentou aumento significativo no número de quedas ( $13.0 \pm 1.9$ ), como mostra a **figura 3**.

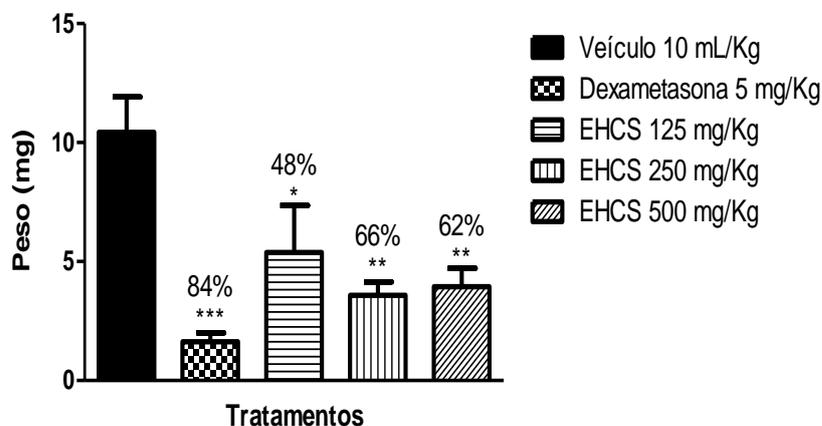


**Figura 3.** Avaliação do número de quedas dos camundongos tratados com EHCS (500 mg/Kg p.o.) no modelo de Rota Rod. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnett, onde  $**p < 0,01$  comparado com o grupo controle (veículo). Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey. ns= diferença não significativa.

### 3.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória

#### 3.3.1 Edema de orelha induzido por xilol

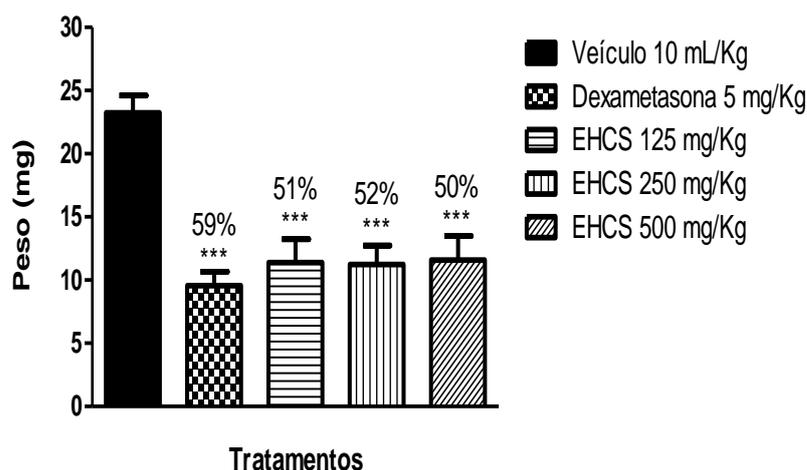
No modelo do edema de orelha induzido pela aplicação tópica de xilol, os animais pré-tratados com EHCS apresentaram significativa redução do edema em todas as doses avaliadas 125, 250 e 500 mg/Kg, inibindo em 48%, 66% e 62% respectivamente, quando comparados ao grupo tratado com o veículo (salina). O controle positivo, dexametasona (5 mg/Kg, i.p.), apresentou inibição do edema de 84%, como mostra a **Figura 4**.



**Figura 4.** Efeito do pré-tratamento oral com EHCS (125, 250 e 500 mg/Kg) no modelo de edema de orelha induzido por xilol. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnett, onde  $*p<0,05$ ,  $**p<0,01$  e  $***p<0,001$  comparado com o grupo controle (veículo). Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey. Porcentagem corresponde á redução da média da diferença de peso (mg) das orelhas em relação ao grupo controle (veículo).

### 3.3.2 Edema de orelha induzido por ácido araquidônico

No modelo do edema de orelha induzido pela aplicação tópica de ácido araquidônico (**Figura 5**), os animais pré-tratados com EHCS também obtiveram redução do edema de orelha em todas as doses testadas (125, 250 e 500 mg/Kg), inibindo em 51%, 52% e 50% respectivamente, quando comparados ao grupo tratado com o veículo (salina). O grupo controle positivo tratado com dexametasona (5 mg/Kg, i.p.), apresentou inibição do edema de 59%.

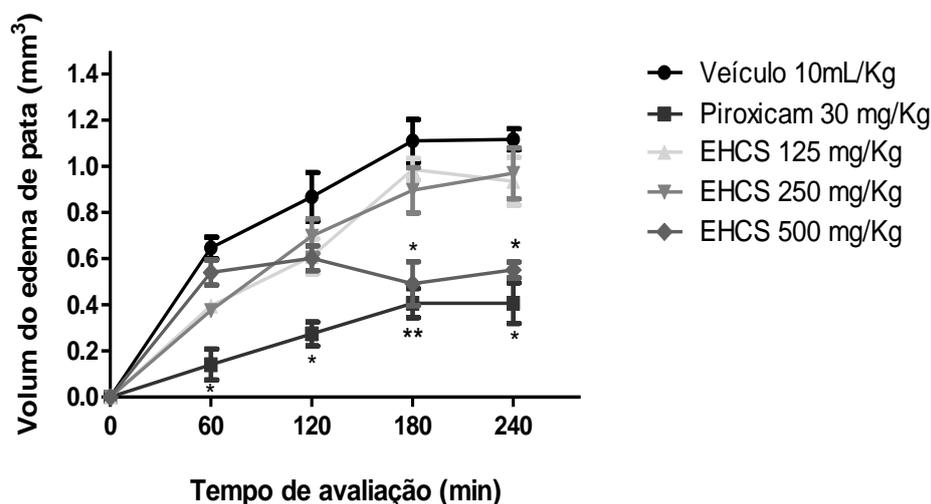


**Figura 5.** Efeito do pré-tratamento oral com EHCS (125, 250 e 500 mg/Kg) no modelo de edema de orelha induzido por ácido araquidônico. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnett, onde  $***p<0,001$  comparado com o grupo controle (veículo). Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey. Porcentagem corresponde á redução da média da diferença de peso (mg) das orelhas em relação ao grupo controle (veículo).

### 3.3.3 Edema de pata induzido por carragenina

A prevenção e redução do edema de pata induzido com carragenina 1% em ratos wistar machos foi investigado pelo pré-tratamento oral de EHCS (125, 250 e 500 mg/Kg). Os resultados deste experimento estão dispostos na **figura 6** e mostra que somente a maior dose avaliada (500 mg/Kg) preveniu a formação do edema nas duas últimas horas de avaliação (180 e 240min), apresentando volume de pata em  $0,49 \pm 0,09 \text{ mm}^3$  e  $0,55 \pm 0,03 \text{ mm}^3$  respectivamente comparados com o grupo controle negativo (veículo) apresentando volume

1,11 ± 0.09 mm<sup>3</sup> e 1,11 ± 0.04 mm<sup>3</sup>. O grupo controle positivo (Piroxicam 30 mg/Kg, p.o.) mostrou inibição em todas as 4 horas avaliadas, inibindo respectivamente em 61% (0,14 ± 0,06 mm<sup>3</sup>), 64% (0,27 ± 0,05 mm<sup>3</sup>), 55% (0,40 ± 0,06 mm<sup>3</sup>) e 63% (0,41 ± 0,07 mm<sup>3</sup>) quando comparado ao grupo controle (veículo).

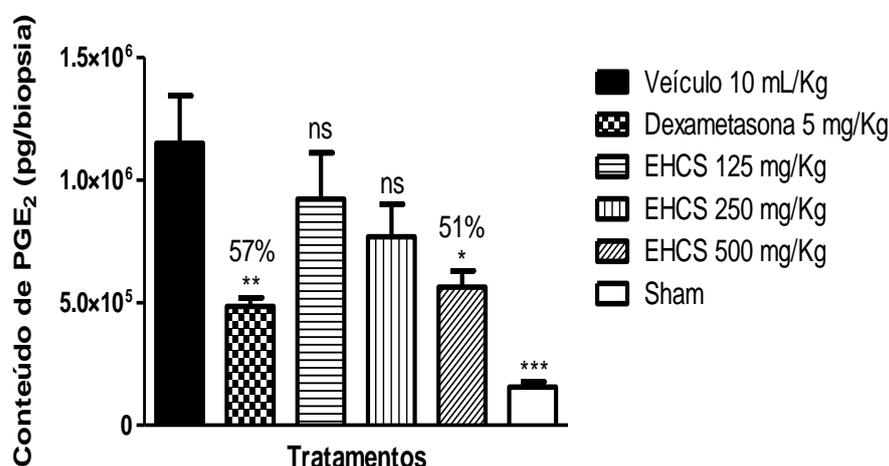


**Figura 6.** Efeito do pré-tratamento oral com EHCS (125, 250 e 500 mg/Kg) no modelo de edema de pata induzido por carragenina. Os resultados foram expressos como média ± e.p.m e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnett, onde \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  comparado com o grupo controle (veículo). Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey. Os pontos representam as médias de volume da pata medidas durante 4 horas de avaliação.

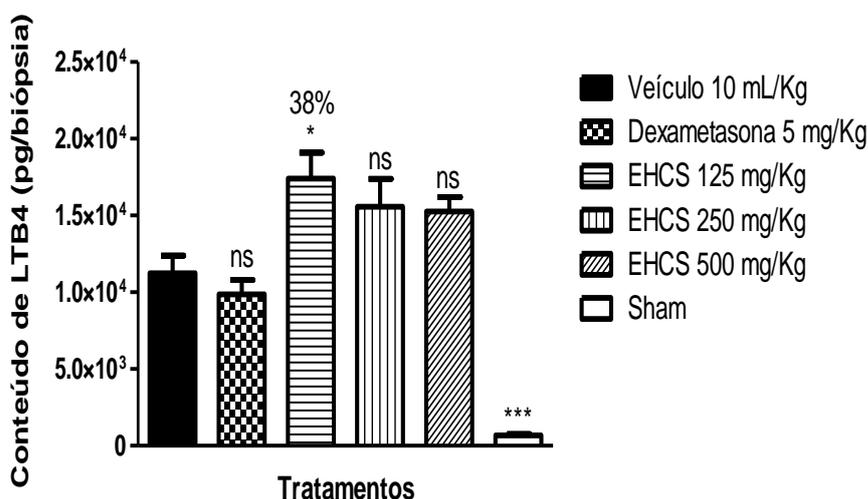
### 3.3.4 Quantificação de PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> em edema de orelha induzido por ácido araquidônico

Os resultados apresentados na **Figura 7**, mostram que o pré-tratamento oral do EHCS somente na maior dose (500 mg/Kg) foi capaz de reduzir significativamente os níveis de PGE<sub>2</sub> do edema de orelha induzido por ácido araquidônico em 51%. Observa-se uma relação de efeito dose-dependente do extrato, mas somente a maior dose (500 mg/Kg) foi efetiva neste modelo mostrando redução dos níveis de PGE<sub>2</sub> quando comparado com o grupo tratado com veículo. O controle positivo dexametasona (5mg/Kg i.p.) reduziu em 64.5% os níveis de PGE<sub>2</sub> quando comparado ao grupo controle (veículo). Os resultados apresentados na **Figura 8** mostram que o controle positivo dexametasona (5 mg/Kg i.p.), assim como as duas maiores doses do extrato (250 e 500 mg/Kg) não foram capazes de reduzir os níveis de LTB<sub>4</sub> do edema de orelha induzido por ácido araquidônico quando comparado ao grupo controle (veículo). Porém, a menor dose avaliada nesta quantificação bioquímica mostrou uma elevação dos níveis deste prostanóide em 38% comparado com o grupo controle negativo

tratado com veículo. Não houve diferença significativa entre as três doses avaliadas mostrando possível envolvimento do extrato no aumento dos níveis de LTB<sub>4</sub> em edema de orelha induzido por ácido araquidônico.



**Figura 7.** Efeito do pré-tratamento oral com EHCS (125, 250 e 500 mg/Kg) na produção de PGE<sub>2</sub> no modelo de edema de orelha induzido por ácido araquidônico. Os resultados foram expressos como média ± e.p.m e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnett, onde \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  comparado com o grupo controle (veículo). Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey. Porcentagem corresponde à redução da quantidade de PGE<sub>2</sub> das orelhas em relação ao grupo controle (veículo); ns= a ausência de significância em comparação ao grupo controle (veículo).



**Figura 8.** Efeito do pré-tratamento oral com EHCS (125, 250 e 500 mg/Kg) na produção de LTB<sub>4</sub> no modelo de edema de orelha induzido por ácido araquidônico. Os resultados foram expressos como média ± e.p.m e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnett, onde \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  comparado com o grupo controle (veículo). Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey. Porcentagem corresponde à redução da quantidade de LTB<sub>4</sub> das orelhas em relação ao grupo controle (veículo); ns= a ausência de significância em comparação ao grupo controle (veículo).

### 3.4 Avaliação da atividade antidiarreica

#### 3.4.1 Diarreia induzida por óleo de rícino

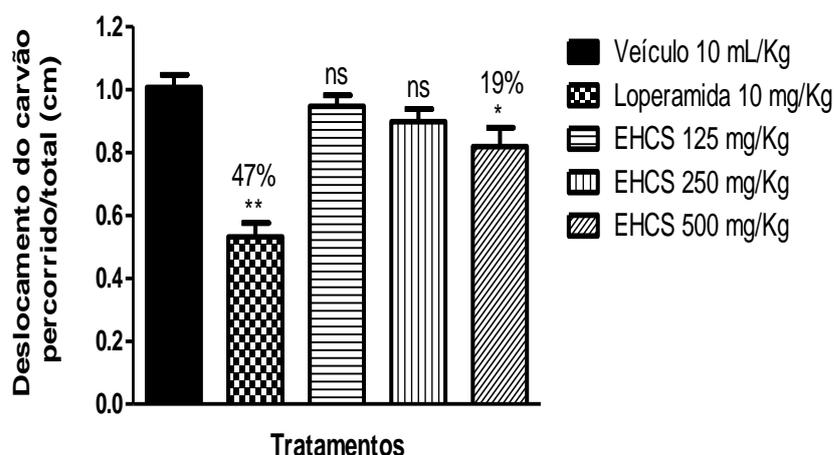
Neste modelo de indução de diarreia, os camundongos pré-tratados com EHCS apresentaram efeito antidiarreico somente nas maiores doses (250 e 500 mg/Kg) aumentando o tempo de início das evacuações em  $173,4 \pm 29,43$ min e  $189,1 \pm 24,95$ min, respectivamente quando comparado com os animais tratados com veículo  $86,88 \pm 23,26$ min. Estas mesmas doses também diminuíram a produção de fezes líquidas em  $4,28 \pm 0,35$  e  $2,66 \pm 0,66$  quando comparado com os animais tratados com veículo  $6,66 \pm 0,66$ . O grupo controle positivo tratado com loperamida (10 mg/Kg, p.o.), apresentou efeito antidiarreico em ambos os parâmetros avaliados, conforme **tabela 3**.

Tratamentos (mg/Kg)	Início das evacuações (min)	Numero de fezes		
		Normal	Semi-sólida	Líquida
Veículo	$86,88 \pm 23,26$	$1,88 \pm 0,48$	$2,37 \pm 0,26$	$6,66 \pm 0,66$
Loperamida 10 mg/Kg	$217,9 \pm 18,93^{***}$	$0,00 \pm 0,00^*$	$0,50 \pm 0,26^{**}$	$0,33 \pm 0,34^{***}$
EHCS 125 mg/Kg	$115,1 \pm 10,18^{ns}$	$1,29 \pm 0,64^{ns}$	$1,00 \pm 0,43^{ns}$	$5,33 \pm 0,55^{ns}$
EHCS 250 mg/Kg	$173,4 \pm 29,43^*$	$1,88 \pm 0,67^{ns}$	$1,01 \pm 0,26^{ns}$	$4,28 \pm 0,35^*$
EHCS 500 mg/Kg	$189,1 \pm 24,95^*$	$1,75 \pm 0,55^{ns}$	$1,05 \pm 0,31^{ns}$	$2,66 \pm 0,66^{***}$

**Tabela 3.** Efeito do pré-tratamento oral de EHCS (125, 250 e 500 mg/Kg) sobre a diarreia aguda induzida em camundongos Swiss machos. Os valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m). Análise estatística: ANOVA seguido de Dunnett para o tempo de início das evacuações aquosas e Kruskal-Wallis seguido de Dunn para a quantidade de evacuações. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ . (ns= diferença não significativa)

#### 3.4.2 Trânsito intestinal induzido por óleo de rícino

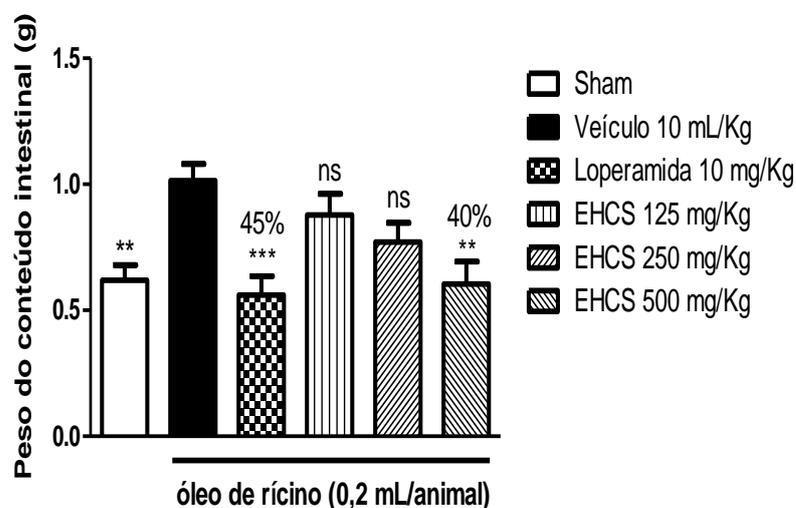
O pré-tratamento oral com o EHCS (125, 250 e 500 mg/Kg) mostrou redução do trânsito intestinal (19%) significativamente somente na maior dose testada de 500 mg/Kg em relação ao grupo controle negativo. As doses 125 e 250 mg/Kg não foram capazes de alterar o trânsito induzido por óleo de rícino. O grupo controle positivo (loperamida 10 mg/Kg p.o.) reduziu em 47% o trânsito intestinal em relação ao controle negativo (**Figura 9**).



**Figura 9.** Efeito do EHCS (125, 250 e 500 mg/Kg p.o.) sobre o trânsito intestinal induzido por óleo de rícino em camundongos Swiss machos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnet, com  $*p<0,05$  e  $**p<0,01$  comparado com o grupo controle (veículo). Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey. Porcentagem indica a redução do trânsito intestinal em relação ao grupo tratado com veículo. ns= diferença não significativa.

### 3.4.3 Acúmulo de fluido intestinal induzido por óleo de rícino

Assim como no resultado anterior, somente a maior dose do extrato mostrou redução do acúmulo de fluido intestinal significativamente em relação ao grupo pré-tratado com veículo. As doses 125 e 250 mg/Kg neste modelo também não foram capazes de prevenir este efeito secretório de fluido intestinal induzido por óleo de rícino. O grupo controle positivo (loperamida 10 mg/Kg p.o.) foi eficaz em reduzir 45% o acúmulo de fluido intestinal em relação ao controle negativo (**Figura 10**).



**Figura 10.** Efeito do EHCS (125, 250 e 500 mg/Kg p.o.) sobre a secreção de fluido intestinal induzido por óleo de rícino em camundongos Swiss machos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnet, com  $**p<0,01$  e  $***p<0,001$  comparado com o grupo controle (veículo). Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey. Porcentagem indica a redução do trânsito intestinal em relação ao grupo tratado com veículo. ns= diferença não significativa.

### 3.5 Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na redução do trânsito intestinal

#### 3.5.1 Envolvimento dos receptores opióides no trânsito intestinal

A **tabela 4** mostra que os animais pré-tratados com salina e tratados com EHCS (500 mg/Kg p.o.) e Morfina (2,5 mg/Kg s.c.), produziram efeito inibitório significativo do trânsito intestinal  $0.59 \pm 0.03$  e  $0.65 \pm 0.03$ , respectivamente quando comparados com os animais pré-tratados com salina e tratados com veículo. A naloxona (15 mg/Kg, i.p), um antagonista opióide inespecífico, antagonizou de forma significativa em  $0.86 \pm 0.02$  o efeito inibitório da morfina sobre o trânsito intestinal quando comparado com o seu efeito em animais pré-tratados com salina  $0.65 \pm 0.03$ . Contudo, a naloxona não foi capaz de reverter, de forma significativa o efeito exercido pelo EHCS na dose de 500 mg/Kg p.o. descartando dessa forma, o envolvimento por esta via.

<i>Pré-tratamento</i>	<i>Tratamento</i>	<i>Percorrido/total</i>	<i>% de inibição</i>
<i>Salina 0,9% i.p</i>	<i>Veículo 10 mL/Kg p.o.</i>	<i>0.80 <math>\pm</math> 0.03</i>	—
<i>Salina 0,9% i.p</i>	<i>Morfina 2,5 mg/Kg s.c</i>	<i>0.59 <math>\pm</math> 0.03<sup>**</sup></i>	29%
<i>Salina 0,9% i.p</i>	<i>EHCS 500 mg/Kg p.o.</i>	<i>0.65 <math>\pm</math> 0.03<sup>*</sup></i>	22%
<i>Naloxona 15 mg/Kg i.p</i>	<i>Veículo 10 mL/Kg p.o.</i>	<i>0.96 <math>\pm</math> 0.04</i>	—
<i>Naloxona 15 mg/Kg i.p</i>	<i>Morfina 2,5 mg/Kg s.c</i>	<i>0.86 <math>\pm</math> 0.02<sup>ns</sup></i>	—
<i>Naloxona 15 mg/Kg i.p</i>	<i>EHCS 500 mg/Kg p.o.</i>	<i>0.77 <math>\pm</math> 0.04<sup>***</sup></i>	19%

ns = diferença não significativa; ### = diferença significativa entre grupos.

**Tabela 4.** Avaliação do envolvimento com receptores opióides no trânsito intestinal em camundongos Swiss machos tratados oralmente com EHCS (500 mg/Kg). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=8-10) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnet, com  $*p<0,05$ ,  $**p<0,01$  e  $***p<0,001$  comparado com o grupo controle (veículo). Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey, onde  $###p<0,001$ . Porcentagem indica a inibição do trânsito intestinal em relação aos grupos veículos pré-tratados com salina e naloxona. ns= diferença não significativa.

#### 3.5.2 Envolvimento dos receptores $\alpha_2$ -adrenérgicos no trânsito intestinal

Neste modelo, os animais pré-tratados com salina e tratados com EHCS (500 mg/Kg p.o.) assim como aqueles tratados com Clonidina (0,1 mg/Kg p.o.), produziram efeito inibitório significativo do trânsito intestinal  $0.39 \pm 0.03$  e  $0.65 \pm 0.03$ , respectivamente quando

comparados com os animais pré-tratados com salina e tratados com veículo, **tabela 5**. A ioimbina droga predominantemente antagonista dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos antagonizou de forma significativa em  $0.87 \pm 0.04$  o efeito inibitório da clonidina sobre o trânsito intestinal quando comparado com o seu efeito em animais pré-tratados com salina  $0.39 \pm 0.03$ . Assim como a naloxona (**tabela 4**), a ioimbina também não foi capaz de reverter, de forma significativa o efeito exercido pelo EHCS na dose de 500 mg/Kg p.o. sobre o trânsito intestinal, neste grupo o valor registrado foi  $0.77 \pm 0.03$  sem diferença significativa no grupo pré-tratado com salina e tratado com EHCS (500 mg/Kg p.o.).

<i>Pré-tratamento</i>	<i>Tratamento</i>	<i>Percorrido/total</i>	<i>% de inibição</i>
<i>Salina 0,9% i.p</i>	<i>Veículo 10 mL/Kg p.o.</i>	<i>0.80 ± 0.02</i>	—
<i>Salina 0,9% i.p</i>	<i>Clonidina 0,1 mg/Kg p.o.</i>	<i>0.39 ± 0.03<sup>***</sup></i>	50%
<i>Salina 0,9% i.p</i>	<i>EHCS 500 mg/Kg p.o.</i>	<i>0.65 ± 0.03<sup>**</sup></i>	20%
<i>Ioimbina 1 mg/Kg i.p</i>	<i>Veículo 10 mL/Kg p.o.</i>	<i>1.00 ± 0.04</i>	—
<i>Ioimbina 1 mg/Kg i.p</i>	<i>Clonidina 0,1 mg/Kg p.o.</i>	<i>0.87 ± 0.04<sup>ns</sup></i>	—
<i>Ioimbina 1 mg/Kg i.p</i>	<i>EHCS 500 mg/Kg p.o.</i>	<i>0.77 ± 0.03<sup>**</sup></i>	22%

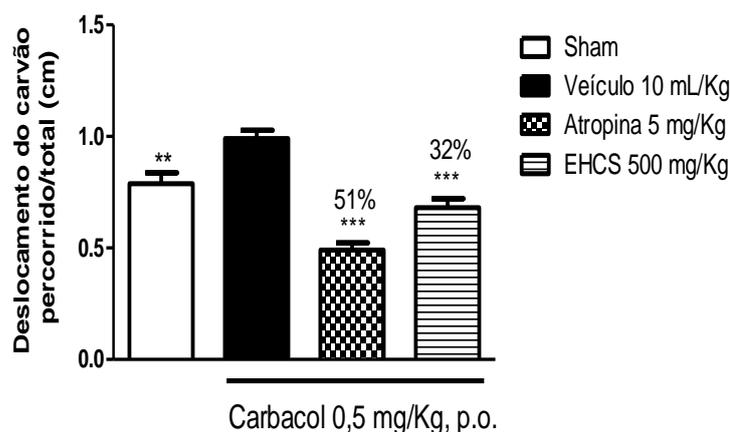
ns

###

**Tabela 5.** Avaliação do envolvimento com receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos no trânsito intestinal em camundongos Swiss machos tratados oralmente com EHCS (500 mg/Kg). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=8-10) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnet, com  $**p < 0,01$  e  $***p < 0,001$  comparado com o grupo controle (veículo). Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey, onde  $###p < 0,001$ . Porcentagem indica a inibição do trânsito intestinal em relação aos grupos veículos pré-tratados com salina e ioimbina. ns= diferença não significativa.

### 3.5.3 Envolvimento dos receptores muscarínicos no trânsito intestinal

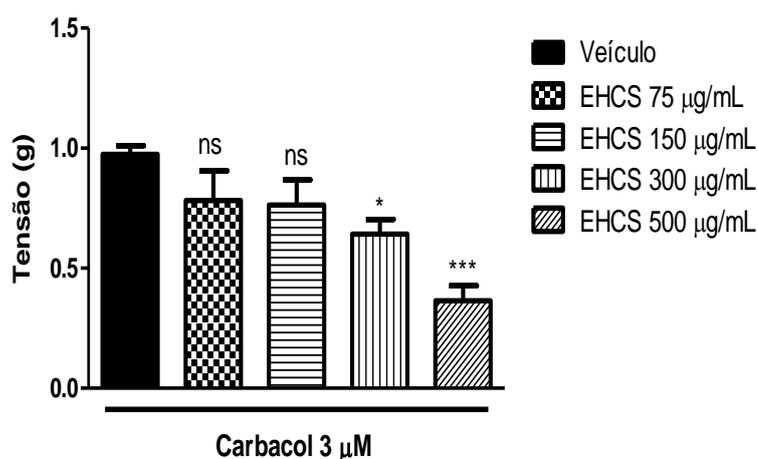
No modelo de trânsito intestinal induzido por carbacol (agonista dos receptores muscarínicos), os animais pré-tratados com EHCS na dose de 500 mg/Kg por via oral e com o controle positivo atropina (5 mg/Kg s.c.), antagonista muscarínico, apresentaram significativa redução do trânsito intestinal inibindo em 32% e 51% respectivamente, quando comparados ao grupo tratado com veículo. A comparação entre os grupos que receberam o extrato e atropina não acusou diferença estatística significativa, indicando que este efeito inibitório observado pela atropina é equivalente ao proporcionado pelo extrato (**Figura 11**).



**Figura 11.** Efeito do EHCS (500 mg/Kg p.o.) sobre o trânsito intestinal induzido por carbaccol em camundongos Swiss machos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnet, com  $**p < 0,01$  e  $***p < 0,001$ , comparado com o grupo controle (veículo). Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey. Porcentagem indica a redução do trânsito intestinal em relação ao grupo tratado com veículo.

### 3.5.4 Efeito antiespasmódico sobre as contrações fásicas induzidas por carbaccol ou KCl em íleo isolado de camundongo *in vitro*

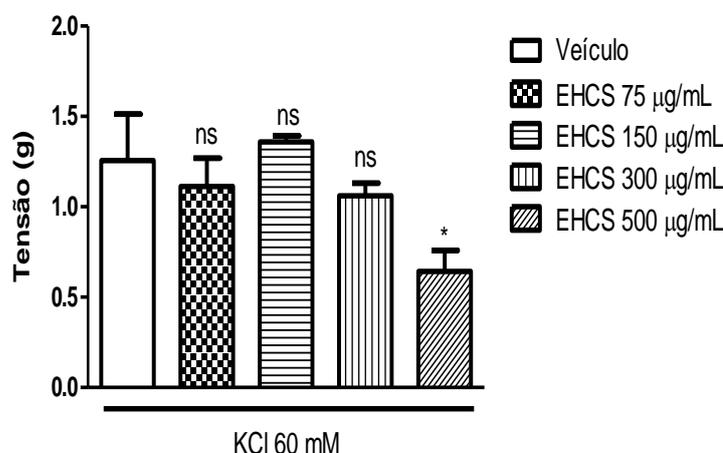
Neste modelo foi avaliado o efeito antiespasmódico de concentrações crescentes de 75 a 500  $\mu\text{g/mL}$  do EHCS *in vitro*. Somente as concentrações de 300 e 500  $\mu\text{g/mL}$  (n=5) relaxaram de maneira significativa e dependente de concentração, o íleo de camundongo pré-contraído com 3  $\mu\text{M}$  de carbaccol, apresentando uma percentual de efeito inibitório de 34% (300  $\mu\text{g/mL}$ ) e 63% (500  $\mu\text{g/mL}$ ) em comparação com o grupo controle tratado *in vitro* com o veículo (**Figura 12**).



**Figura 12.** Efeito antiespasmódico do EHCS (75, 150, 300 e 500  $\mu\text{g/mL}$ ) sobre as contrações fásicas induzidas por carbaccol em íleo isolado de camundongo *in vitro*. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=5)

e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnet, com  $*p<0,05$  e  $***p<0,001$ , comparado com o grupo controle (veículo). Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey. ns= diferença não significativa.

A **figura 13** mostra o efeito inibitório do EHCS sobre as contrações fásicas induzidas por KCl (60 mM) somente na maior concentração testada. O íleo pré-contraído com KCl e tratado *in vitro* com o EHCS na concentração efetiva de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  apresentou um percentual efeito relaxante de 49% comparado com o grupo controle tratado *in vitro* com veículo.

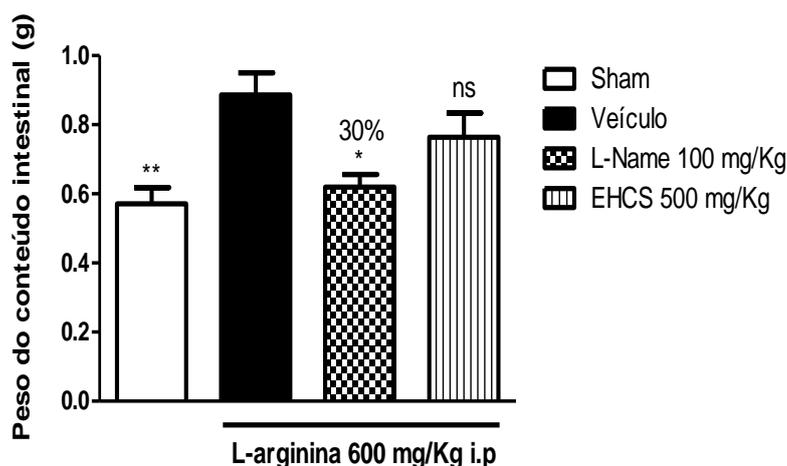


**Figura 13.** Efeito antiespasmódico do EHCS (75, 150, 300 e 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sobre as contrações fásicas induzidas por KCl em íleo isolado de camundongo *in vitro*. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=5) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnet, com  $*p<0,05$ , comparado com o grupo controle (veículo). Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey. ns= diferença não significativa.

### 3.6 Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na redução da secreção intestinal

#### 3.6.1 Acúmulo de fluido intestinal induzido por L-arginina

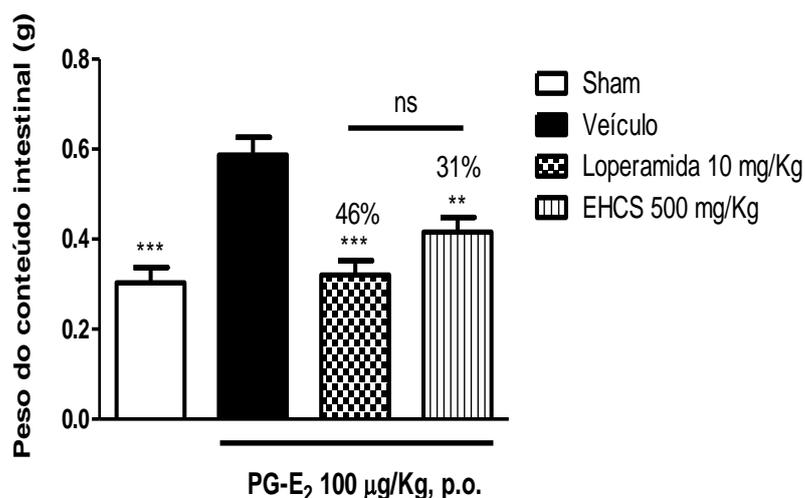
O pré-tratamento oral com veículo e indução do acúmulo de fluido intestinal com L-arginina na dose de 600 mg/Kg i.p. mostra um aumento da secreção intestinal comparados com o grupo controle normal (sham). Observou-se que o pré-tratamento oral com EHCS (500 mg/Kg) não apresentou redução do acúmulo de fluido intestinal significativamente em relação ao grupo pré-tratado com veículo. O grupo controle positivo (L-NAME 100 mg/Kg i.p.) foi eficaz em reduzir 30% o acúmulo de fluido intestinal em relação ao grupo controle negativo tratados com veículo, mostrados na **figura 14**.



**Figura 14:** Efeito do EHCS (500 mg/Kg p.o.) sobre a secreção de fluido intestinal induzido por L-arginina em camundongos Swiss machos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnet, com  $*p < 0,05$  e  $**p < 0,01$  comparado com o grupo controle (veículo). Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey. Porcentagem indica a redução do trânsito intestinal em relação ao grupo tratado com veículo. ns= diferença não significativa.

### 3.6.2 Acúmulo de fluido intestinal induzido por $PGE_2$

A **figura 15** mostra que os animais pré-tratados oralmente com veículo e posteriormente tratados com a solução de  $PGE_2$  (100  $\mu$ g/Kg, p.o.), aumentaram o acúmulo de fluido intestinal comparados com o grupo controle normal (sham). O pré-tratamento oral com EHCS (500 mg/Kg) apresentou redução significativa de 31% em relação ao grupo pré-tratado com veículo. O grupo que recebeu loperamida 10 mg/Kg, p.o. mostrou redução significativa de 46% em relação ao grupo controle negativo tratados com veículo. A comparação entre o grupo que recebeu o extrato e a loperamida não mostrou diferença significativa, indicando que ambos apresentam o mesmo efeito inibitório da secreção de fluido intestinal induzido por  $PGE_2$ .



**Figura 15:** Efeito do EHCS (500 mg/Kg p.o.) sobre a secreção de fluido intestinal induzido por PGE<sub>2</sub> em camundongos Swiss machos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=8) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA seguida de teste de Dunnet, com \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0.001$  comparado com o grupo controle (veículo). Para comparação entre dois grupos, usou-se Tukey. Porcentagem indica a redução do trânsito intestinal em relação ao grupo tratado com veículo. ns= diferença não significativa.

#### 4. Discussão

As plantas medicinais têm sido utilizadas em diferentes tipos de preparações, na forma de remédios caseiros ou medicamentos fitoterápicos, para tratar diversos tipos de doenças, apresentando um importante papel nos cuidados com a saúde. Essa prática alternativa adquiriu grande aceitação pela população de diversos países, o que facilita a adesão ao tratamento de doenças (Calixto, 2000). Embora as espécies vegetais possuam diversas atividades benéficas para o ser humano, as mesmas não são isentas de toxicidade, efeitos colaterais, mutagênicos e alérgicos; e além do mais, as plantas, quando utilizadas concomitantemente com alimentos, medicamentos ou até mesmo com outras espécies vegetais, podem causar interações indesejáveis (Taylor et al., 2001).

Atualmente, não basta apenas alertar a população sobre o conceito equivocado de que produtos derivados de plantas são naturais e não causam mal a saúde, é preciso identificar a espécie vegetal, os componentes ativos e, principalmente, garantir sua qualidade, segurança e eficácia por meio de estudos toxicológicos e farmacológicos.

Conforme, o Guia *Organization for Economic Co-operation Development* (OECD, 2001) para Testes de Substâncias Químicas em geral, em seu tópico que descreve as práticas corretas para avaliação da toxicidade oral aguda de substâncias, indica que o método mais adequado para garantir a segurança da droga avaliada deve ser feito com doses entre 2,0 a 5,0 g/Kg e em animais de ambos os sexos. Para tal, procedeu-se a avaliação do efeito do EHCS

no modelo de toxicidade aguda em camundongos Swiss de ambos os sexos. Observou-se que a administração oral do extrato em dose única de 5000 mg/Kg não promoveu morte e tanto os animais machos quanto os animais fêmeas tratados, não apresentaram alterações em nenhum dos parâmetros avaliados, como variação da massa corporal e sinais comportamentais de toxicidade, durante um período curto de tempo (14 dias). Outro parâmetro que indicou a segurança do EHCS foi a ausência de alterações morfológicas nos órgãos avaliados. Além disso, não houve aumento da massa relativa dos órgãos vitais (baço, rins, fígado, pulmões e coração) tão pouco nos órgãos reprodutivos (testículos, útero e ovários).

Para descartar a hipótese deste extrato ter efeito miorrelaxante e/ou sedativo foi utilizado o teste de coordenação motora através do Rota Rod. O Rota Rod é um dispositivo que mede a atividade forçada, através da avaliação da coordenação motora dos animais (processada primeiramente pelo córtex cerebral e associada com cerebelo e fatores cognitivos) (Gasbarri et al., 2003), e do equilíbrio, parâmetros esses indicativos de transtornos neurológicos decorrentes de neurotoxicidade (Rosland et al., 1990; Almeida, 2006). O resultado obtido mostrou que o tratamento oral com EHCS, na dose de 500 mg/Kg (maior dose utilizada nos modelos experimentais), não promoveu efeito sedativo nos animais, sendo descartado qualquer efeito na performance motora gerado pelo tratamento com o extrato que pudesse interferir com os demais resultados experimentais desenvolvidos neste trabalho.

Os benzodiazepínicos, como o diazepam, utilizado como controle positivo neste experimento, foi introduzido na clínica por ser descrito como uma droga ansiolítica, hipnótica, anticonvulsivante e miorelaxante (Milić et al., 2012). Eles afetam negativamente a coordenação motora e o equilíbrio (Verster et al. 2002; Licata et al. 2009). O diazepam farmacologicamente age como um agonista não seletivo de receptores GABA<sub>A</sub>, e a ativação das subunidades  $\gamma$ ,  $\alpha_1$  e  $\alpha_5$  do receptor, potencializa os efeitos do GABA, levando a ataxia e relaxamento muscular (Milić et al., 2012; Rang e Dale, 2007).

O fato do EHCS ser destituído de toxicidade sistêmica observados nos experimentos de toxicidade aguda, nos permitiu uma escolha segura das doses utilizadas nos protocolos experimentais realizados com o objetivo de investigar o efeito anti-inflamatório e antidiarreico da substância teste em estudo.

Para caracterizar a atividade do EHCS sobre o processo inflamatório, o primeiro modelo avaliado foi o edema de orelha induzido por xilol, um composto aromático irritante que desencadeia mecanismos celulares envolvidos na liberação de substâncias bioativas a

partir das terminações periféricas de neurônios sensoriais, que agem sobre células-alvos periféricas, tais como mastócitos e outras células do sistema imune, e células da musculatura lisa vascular, produzindo uma resposta inflamatória do tipo neurogênica caracterizada por dor, calor, rubor e edema. Esta inflamação é iniciada pela ação de mediadores, tais como acetilcolina, bradicinina, prostaglandinas e capsaicina. Estes mediadores promovem a excitação dos neurônios, levando à liberação direta dos neuropeptídeos e ativação dos seus receptores, que é promovida por influxo de cálcio, ativação da proteína quinase C ou desinibição do fosfatidil inositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>) (Richardson & Vasko, 2002). A inflamação também parece estar relacionada com a ativação de receptores do tipo TRPA-1 por espécies reativas do oxigênio geradas pelo xilol (Julius e Basbaum, 2001; Trevisani et al., 2007; Sandor et al., 2009), que aumenta o Ca<sup>2+</sup> intracelular e induz a liberação de neuropeptídeos sensoriais como a substância P e o CGRP (Trevisani et al., 2007).

Neste trabalho verificou-se a redução do edema de orelha induzido pelo xilol dos animais tratados oralmente com EHCS em todas as doses avaliadas, possivelmente devido à presença abundante de flavonóides no extrato (Adeyemi et al., 2008). Mustafa e colaboradores (2010) ressaltam a importância do papel dos flavonóides no estresse oxidativo, agindo como antioxidantes e sequestrantes de radicais livres. Sendo assim, o efeito anti-edematogênico do EHCS provavelmente pode estar relacionado com a regulação da ativação do receptor TRPA-1 e o aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular, e/ou por agir como sequestrante de radicais livres.

Para uma melhor elucidação do mecanismo relacionado ao efeito anti-inflamatório do EHCS foi utilizado um modelo mais específico, o de indução do edema de orelha com a aplicação tópica de AA.

A aplicação tópica de AA é capaz de induzir uma intensa resposta inflamatória, causando vasodilatação e a hiperemia observadas após 5 minutos da aplicação, enquanto que o edema pode ser visualizado após 15 minutos e com maior intensidade aos 60 minutos. Os principais produtos metabólicos do AA que estão envolvidos com processos inflamatórios são as prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>) e os leucotrienos (LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> e LTD<sub>4</sub>) (Young et al., 1983; Chang et al., 1986; Humes et al., 1986; Crummey et al., 1987). A administração oral de EHCS em animais submetidos ao edema de orelha induzido por AA produziu efeito inibitório em todas as doses testadas de maneira semelhante à dexametasona, um glicocorticóide com efeito anti-inflamatório por indução da formação de anexina-1 e diminuição da expressão da COX-2

(induzida) (Fu et al., 1990). A anexina-1 inibe a atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> citosólica sobre a liberação do AA, substrato enzimático para COX-1/COX-2 e 5-LOX na formação de eicosanóides envolvidos na inflamação: prostaglandinas e leucotrienos (Hong et al., 1976; Hirata et al., 1980; Masferrer et al., 1990).

Sabe-se que a PGE<sub>2</sub> tem papel crucial na geração da resposta inflamatória, causando vasodilatação e potencialização do edema, além de contribuir para a dor inflamatória (Kumar et al., 2005; Ricciotti e FitzGerald, 2011; Kawabata, 2011; Chen et al., 2013). Outro mediador também envolvido nesse processo é o LTB<sub>4</sub>, sintetizado nos neutrófilos e exerce efeito autócrino sobre eles, além de estar envolvido na quimiotaxia dos leucócitos (Carlson et al., 1985; McDonald et al., 1994; Kumar et al., 2005). Desta forma, eles parecem ter algumas propriedades pró-inflamatórias. Nas dosagens bioquímicas, a dexametasona (controle positivo) e o EHCS (500 mg/Kg p.o.), foram capazes de diminuir a síntese de PGE<sub>2</sub>. Entretanto, nenhuma das substâncias, controle positivo/teste foram capazes de diminuir a síntese de LTB<sub>4</sub>.

De acordo com Riddick et al., (1997), a dexametasona aumenta a expressão da via da 5-LOX, devido a ativação da codificação do mRNA para síntese de 5-lipoxigenase e 5-LAP. Stankova et al., (2002) comprovou que a dexametasona, assim como o LTB<sub>4</sub>, previne a apoptose dos neutrófilos através de mecanismos de suprarregulação (*up regulation*) dos receptores BLT<sub>1</sub> de alta afinidade pelo LTB<sub>4</sub> encontrados nos leucócitos polimorfonucleares.

O mecanismo de ação do EHCS envolvido no efeito anti-inflamatório sobre o edema de orelha induzido por AA, está relacionado com o envolvimento da via da COX, através da diminuição da síntese de PGE<sub>2</sub>, mas não pela ação sobre a via da 5-LOX, uma vez que nem o extrato ou a dexametasona não foram capazes de diminuir a síntese e/ou liberação de LTB<sub>4</sub>. Este mecanismo anti-inflamatório do EHCS possivelmente se deve a presença do composto majoritário quercetina-3-O-β-D-rhamnosideo neste extrato (Ferreira et al., 2008), e vai de encontro aos estudos de Guardia e colaboradores (2001), que relatam que flavonóides como quercetina e rutina em altas concentrações inibem a enzima ciclooxygenase, reguladora da produção de prostaglandinas, e importante alvo de fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais.

Outro modelo para avaliar a atividade antiedematogênica e anti-inflamatória do EHCS foi o edema de pata induzido por carragenina em ratos. A carragenina é um mucopolissacarídeo encontrado nas algas vermelhas, capaz de induzir a migração de células

inflamatórias para o local da injeção que, juntamente com células residentes, produzem mediadores importantes para o desenvolvimento da inflamação (Cuzzocrea et al., 2004). Pesquisas recentes mostram que o edema causado por este agente flogístico envolve mecanismos inflamatórios não-neurogênicos e neurogênicos, que tem sido associado com a produção de PGs, bem como expressões protéicas de COX-1 e COX-2 e formação de espécies reativas nitrogenadas e oxigenadas, citocinas e outros mediadores inflamatórios, bem como participação com receptores TRPA-1 (Posadas, 2004; Moilanen et al., 2012).

O uso do rato neste modelo justifica-se pela maior sensibilidade destes animais a reação inflamatória produzida pela carragenina (Winter, et al., 1962). O camundongo apresenta, além da menor sensibilidade (Levy, 1969), diferenças no processo exudativo provocado pela carragenina (Garcia Leme et al., 1973).

Este modelo experimental é bifásico, decorrente de um efeito proteolítico que libera na fase inicial (1-2 horas) mediadores inflamatórios como, bradicinina, histamina e serotonina, e na fase tardia (3-4 horas) é sustentada pela liberação de PGE<sub>2</sub> no tecido (Di Rosa et al., 1968, Di Rosa et al., 1971; Brito e Antonio, 1998). Nesta investigação, foi observado que somente a dose de 500 mg/Kg, p.o. foi capaz de inibir a formação de edema de pata induzido pela carragenina durante a fase tardia, confirmando o envolvimento do EHCS sobre a via COX através da inibição da síntese de PGE<sub>2</sub>, tornando-se evidente a ação anti-inflamatória do extrato. Em contribuição a estes dados, Garcia e colaboradores (2000) também mostraram a ação anti-inflamatória do extrato aquoso do caule de *C. sicyoides* no teste de edema de pata induzido por carragenina. A administração oral deste extrato nas doses de 300 e 500 mg/Kg promoveu uma importante redução do edema de pata, mais pronunciado na 5<sup>a</sup> hora após a injeção de carragenina e esta atividade, segundo os autores, poderia estar relacionada com a redução da produção de PGE<sub>2</sub>.

Em geral, sabe-se que drogas que apresentam atividade anti-inflamatória também podem apresentar propriedade de inibição da diarreia induzida por óleo de rícino, sugerindo principalmente o envolvimento com PGE<sub>2</sub> (Awouters et al., 1978) e/ou óxido nítrico (NO) (Mascolo et al., 1994), além de outros mecanismos.

Nessa perspectiva e considerando que *C. sicyoides* apresenta indicação popular no tratamento de distúrbios gastrintestinais (Ferreira et al., 2008), além de ter apresentado uma expressiva ação anti-inflamatória nos modelos de edema (orelha e pata), mencionados anteriormente, passou-se a investigar o possível efeito do EHCS sobre o intestino pelos

modelos de diarreia induzida por óleo de rícino, além de caracterizar os mecanismos envolvidos neste efeito através dos modelos de trânsito e acúmulo de fluido intestinal.

A diarreia resulta do rápido deslocamento do bolo fecal pelo intestino grosso (Guyton e Hall, 1998). Para recuperar este processo, muitos pacientes necessitam de terapia antidiarreica, responsável por aumentar a resistência ao fluxo, aumentar a absorção da mucosa, além de diminuir a secreção de líquidos (Akindele e Adeyemi, 2006).

Para determinar o efeito antidiarreico do EHCS, foi utilizado o teste com óleo de rícino, que é amplamente empregado para a triagem de drogas com esta propriedade. Uma das vantagens deste modelo é a grande reprodutibilidade de evacuação de fezes líquidas formadas uma hora após a administração do agente laxante (Borrelli et al., 2006).

O óleo de rícino é um agente laxante efetivo, extraído das sementes de *Ricinus communis* quando ingerido é hidrolisado pelas lípases pancreáticas a glicerol e ácido ricinoléico, sendo este último o responsável pela atividade diarreica do óleo (Akindele e Adeyemi, 2006). O EHCS na dose de 250 e 500 mg/Kg foi capaz de inibir a diarreia neste modelo tanto em relação à frequência de defecação quanto ao número de fezes líquidas, sugerindo que esta ação pode ser por uma alteração na motilidade intestinal de inibindo do trânsito e/ou pelo aumento da absorção de água e eletrólitos e conseqüentemente diminuição da secreção de líquidos no trato gastrintestinal (TGI), uma vez que este extrato diminuiu significativamente o número de bolos fecais líquidos comparados com o grupo veículo.

A loperamida utilizada neste modelo como controle positivo, é o fármaco de escolha para a diarreia e é componente de vários antidiarreicos patenteados. Tem uma ação relativamente seletiva sobre o trato gastrintestinal, reduz a frequência das cólicas abdominais, diminui a eliminação de fezes e abrevia a duração da doença (Rang e Dale, 2007). A loperamida é um exemplo de composto efetivo pois tem como alvo a secreção e a motilidade. Este análogo opióide mu, diminui efetivamente estas atividades, tem mínimos efeitos centrais devido sua pouca penetração na barreira hematoencefálica, e é relativamente livre de efeitos colaterais (Kamm, 2000).

É descrito na literatura que drogas que inibem o trânsito intestinal podem ser eficazes no alívio da diarreia (Borrelli, 2006). O marcador a base de carvão ativado utilizado no modelo de trânsito gastrintestinal tem sido usado por mais de 60 anos como uma ferramenta simples para avaliação do efeito de laxativos (Gaginella et al., 1994). Este método indica a distância máxima percorrida pelo marcador (carvão ativado) e na avaliação do seu trajeto no

intestino delgado durante um período de tempo (Stickney e Northup, 1959). O EHCS apresentou efeito inibitório da motilidade gastrointestinal na maior dose avaliada, reduzindo a relação entre a distância percorrida pelo carvão e o comprimento total do intestino delgado, sugerindo assim que o mecanismo de ação antidiarreico deste extrato envolve a redução na motilidade intestinal.

Para esclarecer o mecanismo envolvido neste efeito inibitório do extrato sobre o trânsito gastrintestinal, alguns agentes farmacológicos foram utilizados. Sabe-se que o controle da excitabilidade do músculo liso do TGI pode ser modulado por neurotransmissores, hormônios ou agentes farmacológicos como os opióides, que são substâncias que além de afetar as funções motoras do trato gastrointestinal (Kurz e Sessler, 2003), também apresenta atividade antinociceptiva na dor inflamatória (Hunskar e Hole, 1985) e atividade gastroprotetora (Gyires, 1990). Os opióides no trato gastrointestinal provocam redução da propulsão intestinal, reduzem a motilidade gástrica e aumenta a absorção de fluídos e eletrólitos (Beard et al., 2011). Desta forma, foi observado que a administração oral de EHCS em animais pré-tratados com a naloxona (antagonista opióide não seletivo) continuou produzindo ação inibitória sobre o trânsito intestinal, indicando que este efeito não depende de mecanismo opióide na redução do trânsito gastrointestinal induzida por este extrato.

A ativação do sistema simpático via receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos no trato gastrintestinal inibe a atividade peristáltica e reduz o tônus muscular capaz de atenuar o esvaziamento gástrico, além de promover defesa da mucosa estomacal (Fülöp et al., 2005). Ao tentar avaliar uma possível atividade  $\alpha_2$ -adrenérgica do EHCS, o grupo tratado com este extrato foi comparado ao tratado com clonidina, um agonista  $\alpha_2$ -adrenérgico, droga considerada antidiarreica (Rabbani et al., 1982). A maioria das evidências sugerem que o efeito antidiarreico da clonidina resulta de ativação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos localizados em nervos mioentéricos e/ou células do músculo liso intestinal, pois não foram demonstradas ações antidiarreicas centrais da clonidina (Tadano et al., 1992). O pré-tratamento com ioimbina (antagonista seletivo dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos) e o tratamento com o EHCS, foi incapaz de reverter o efeito inibitório do trânsito intestinal, sugerindo que este efeito não depende de mecanismo  $\alpha_2$ -adrenérgico.

Sabe-se também que o trânsito gastrointestinal pode ser retardado por inibição da liberação de acetilcolina e de neurotransmissores não adrenérgicos e não colinérgicos dos nervos entéricos (Wood e Galligan, 2004). Sendo assim, foi verificado também se o EHCS

bloquearia a via colinérgica muscarínica para promover redução na motilidade gastrointestinal contra os efeitos do carbacol *in vivo* (agonista muscarínico). Foi observado que a administração oral do EHCS reduziu significativamente o trânsito intestinal induzido por carbacol, sugerindo envolvimento com receptores muscarínicos neste efeito inibitório.

Uma propriedade antiespasmódica do EHCS pode ser referida devido uma diminuição no movimento propulsivo do carvão ativado no intestino delgado induzida por agonista muscarínico. Para tentar elucidar melhor esta via, verificou em testes *in vitro* com íleo isolado de camundongo se o EHCS inibiria a contração do músculo liso induzida por agonista muscarínico ou por agente despolarizante (KCl).

O músculo liso é o principal tipo de músculo que controla a maioria dos sistemas de órgãos ocos do corpo (Watterson et al., 2005). A contração do músculo liso é disparada principalmente pelo aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ), e pode ser alcançada tanto via despolarização de membrana, levando ao aumento da  $[Ca^{2+}]_i$ , como pela ligação do agonista ao receptor, que pode ser independente do potencial de membrana, originalmente designados por acoplamentos eletromecânico e farmacomecânico (Somlyo e Somlyo, 2003).

No presente estudo, avaliou-se o efeito do EHCS sobre as contrações fásicas induzidas por agonista de acoplamento misto como carbacol (fármaco e eletromecânico) ou por um agente despolarizante como KCl (acoplamento eletromecânico) em íleo isolado de camundongo. Os resultados obtidos nestas análises mostram que o EHCS induziu relaxamento do íleo pré-contraído frente ao carbacol, confirmando o envolvimento com receptores muscarínicos observado *in vivo*. O relaxamento observado em íleo pré-contraído frente agente despolarizante (KCl) (acoplamento eletromecânico) indica que este efeito também é decorrente ao bloqueio do influxo de  $Ca^{2+}$  através dos  $Ca_v$ . O fato de não haver diferença significativa entre a potência relaxante EHCS frente aos agentes contráteis testados, sugere que esses podem estar agindo por um mecanismo de ação comum à via de sinalização dos agentes contráteis testados, e não somente a nível de receptor na membrana plasmática.

Apesar de, usualmente, achar-se que o intestino delgado tem apenas a função absorptiva, ele também possui a capacidade de secretar água e eletrólitos. Esta capacidade secretória excessiva pode ser demonstrada de forma evidente através da administração do agente catártico óleo de rícino, sendo esta um distúrbio/característica ocorrido na diarreia (Gurgel, 2000).

Com isso, avaliou-se o efeito do EHCS no modelo de acúmulo de fluido intestinal induzido por óleo de rícino em camundongos. Foi observado que a mesma dose efetiva na redução do trânsito intestinal induzido por óleo de rícino, também inibiu o acúmulo de fluido intestinal, sugerindo que o mecanismo de ação antidiarreico deste extrato também envolve alterações na secreção intestinal.

Vários mecanismos têm sido propostos para a diarreia induzida por óleo de rícino, dentre eles a inibição da atividade da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase intestinal, que reduz a absorção de fluidos normais; ativação da adenilato ciclase com consequente aumento de AMPc da mucosa que medeia o acúmulo de secreção no intestino delgado e cólon e afeta a contratilidade do músculo liso intestinal, bem como a estimulação da síntese de  $\text{PGE}_2$  que por sua vez inibe reabsorção de  $\text{NaCl}$  e água; além da estimulação da secreção do fator de ativação plaquetário (PAF) (Rouf et al., 2007; Afroz et al., 2006).

Considerando estas informações e o fato do EHCS possuir envolvimento via diminuição da produção de  $\text{PGE}_2$  nos modelos de inflamação já apresentados, passou-se a avaliar qual seria o comportamento deste extrato frente à secreção de fluido intestinal induzido por  $\text{PGE}_2$ . Conforme esperado, o EHCS possuiu efeito inibitório sobre o acúmulo de fluido intestinal induzido por  $\text{PGE}_2$  confirmando desta forma o mecanismo via inibição da produção deste prostanóide envolvido na diarreia.

Na tentativa de mostrar um possível envolvimento com NO no efeito antissecretor intestinal do EHCS, utilizou-se L-arginina (substrato para a síntese de NO) como indutor da secreção de fluido intestinal. Evidência experimental tem mostrado envolvimento também do NO ao observar que inibidores da síntese do NO impedem a diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos (Mascolo et al., 1994). Isso porque o NO age estimulando a guanilato ciclase intestinal (Ward et al., 1992), e a elevação intracelular desta enzima está associada com o relaxamento do músculo liso (Katsuki et al., 1977) e também com a secreção intestinal (Brasitus et al., 1976). O pré-tratamento com o EHCS não foi capaz de reverter o efeito pró-diarreico da L-arginina, entretanto este efeito antissecretor intestinal não depende de mecanismo via inibição da síntese de NO.

Este efeito inibitório do EHCS sobre a motilidade e a secreção de fluido intestinal talvez seja devido à presença de flavonóides em sua composição (Beltrame et al., 2001). Os flavonóides encontram-se amplamente distribuídos na natureza. Vários deles têm mostrado inibir tanto o trânsito como a secreção intestinal (Di Carlo et al., 1993). Sabe-se que a

quercetina, o flavonóide mais ativo, inibe as contrações do íleo de cobaia estimuladas por agonista ou por anafilaxia (Fanning et al., 1983). Outros flavonóides também mostraram atividade semelhante (Middleton e Drzewiecki, 1984; Capasso et al., 1991). Além dos flavonóides, os taninos também podem estar contribuindo para a atividade antidiarreica de EHCS. Foi relatada a presença de taninos no extrato hidroalcoólico em todas as partes desta espécie vegetal (Dominici et al., 2003). Segundo Almeida et al., (1995), plantas que contêm taninos em sua composição podem inibir o trânsito, uma vez que estas substâncias reduzem os movimentos peristálticos, além de reduzir a secreção intestinal.

## 5. Conclusão

A partir dos resultados obtidos neste estudo, é possível concluir que o EHCS apresenta ausência de efeito tóxico em modelos de toxicidade oral aguda. Os resultados mais importantes desse estudo são as demonstrações pela primeira vez, da atividade antidiarreica e anti-inflamatória, apresentando mecanismo comum em ambos os modelos, via inibição da produção de PGE<sub>2</sub>, o que seguramente trará uma grande contribuição para a farmacologia desta espécie. Além disso, o extrato apresentou também propriedade antiespasmódica, mediada através do bloqueio dual de receptores muscarínicos e canais de Ca<sup>2+</sup>.

## 6. Referências

- Afroz, S., Alamgir, M., Khan, M. T. H., Jabbar, S., Nahar, N. Choudhuri, M. S. K. 2006. Antidiarrhoeal activity of the ethanol extract of *Paederia foetida* Linn. (Rubiaceae). *J. Ethnopharmacol.*, v.105, p.125-130.
- Adeyemi, O. O.; Yemitan, O. K.; Afolabi, L. 2008. Inhibition of chemically induced inflammation and pain by orally and topically administered leaf extract of *Manihot esculenta* Crantz in rodents. *J. Ethnopharmacol.*, v.119, p.6-11.
- Akindele, A. J.; Adeyemi, O. O. 2006. Evaluation of the antidiarrhoeal activity of *Byrsocarpus coccineus*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 108, p. 20-25.
- Almeida, C. E.; Karnikowski, M. G. O.; Foletto, R.; Baldisserotto, B. 1995. Analysis of the antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. *Rev. Saúde Pública*, v. 29, p. 428-433.
- Almeida, E.R., Olivera, J.R.G., Lucena, F.F.R., Soares, R.P.D.F., Couto, G.B.L., 2006. The action of extract of the dry leaves of *Cissus sicyoides* L. in pregnant rats. *Acta Farmaceutica Bonaerense*. v.25, p.421-424.
- Almeida, R. N. 2006. *Psicofarmacologia - Fundamentos Práticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Awouters, F., Niemegeers, C. J. E., Lenaerts, F. M., Janseen, P. A. J. 1978. Delay of castor oil diarrhoea in rats: A new way to evaluate inhibitors of prostaglandin synthesis. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.30, p.41-45.

- Baggio, C. H.; Freitas, C. S.; Rieck, L.; Marques, M. C. 2003. Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC in rats. *Pharm. Res.*, v. 47, p 93-98.
- Beard, T. L.; Leslie, J. B.; Nemeth, J. 2011. The opioid component of delayed gastrointestinal recovery after bowel resection. *J. Gastrointest. Surg.*, v.15 (7), p.1259-1268.
- Beltrame, F.L., Ferreira, A.G., Cortez, D.A. 2001. Coumarin glycoside from *Cissus sicyoides*. *Natural Product Letters*. v.16, p.213–216.
- Beltrame, F.L., Sartoretto, J.L., Bazotte, R.B., Cuman, R.N., Cortez, D.A.G. 2004. Estudo químico e avaliação do potencial antidiabético do *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). *Quimica Nova* 24, 783–785.
- Borrelli, F., Capasso, F., Capasso, R., Ascione, V., Aviello, G., Longo, L., Izzo, A. A. 2006. Effect of *Boswellia serrata* on intestinal motility in rodents: inhibition of diarrhoea without constipation. *Brit. J. Pharmacol.*, v.148, p.553-560.
- Brasitus, T. A.; Field, M.; Kimberg, V. 1976. Intestinal mucosal cyclic GMP: Regulation and relation to ion transport. *Am. J. Physiol.*, v. 231, p. G275-G282.
- Brijesh, S.; Daswani, P.; Tetali, P.; Antia, N.; Birdi, T. 2009. Studies on the anti-diarrhoeal activity of *Aegle marmelos* unripe fruit: Validating its traditional usage. *BMC Complement Altern Med*; 9 (47): 1-12.
- Brito, A. R. M. S.; Antonio, M. A. 1998. Oral anti-inflammatory and ulcerogenic activities of a hydroalcoholic extract and partitioned fractions of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). *J. of Ethnopharmacol.* v. 61, 215-28.
- Calixto, J. B. 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research*, v. 33, p.179-189.
- Capasso, A.; Pinto, A.; Mascolo, N.; Autore, G.; Capasso, F. 1991. Reduction of agonist-induced contractions of guinea-pig isolated ileum by flavonoids. *Phytother. Res.*, v. 5, p. 85-87.
- Carlson, R. P.; O'Neill-Davis, L.; Chang, J.; Lewis, A. J. 1985. Modulation of mouse ear oedema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents. *Agents Actions*, v.17, p. 197-206, p. 1985.
- Chang, J.; Carlson, R. P.; O'Neill-Davis, L.; Lamb, B.; Sharma, R. N.; Lewis, A. J. 1986. Correlation between mouse skin inflammation induced by arachidonic acid and eicosanoid synthesis. *J. Inflamm.*, v. 10, p. 205-214.
- Chen, L.; Guangrui Y.; Tilo, G. 2013. Prostanoids and inflammatory pain. *Prostaglandins Other Lipid Mediators*, p. 104-105.
- Chiba, T.; Bharucha, A. E.; Thomforde, G. M.; Kost, L. J.; Phillips, F. S. 2002. Model of rapid gastrointestinal transit in dogs: effect of muscarinic antagonists and a nitric oxide synthase inhibitor. *Neurogastroenterology and Motility*. v.14, p.535–541.
- Crummey, A.; Harper, G. P.; Boyle, E. A.; Mangan, F. R. 1987. Inhibition of arachidonic acid-induced ear oedema as a model for assessing topical anti-inflammatory compounds. *Agents Actions*, v. 20, p. 69-76.
- Cuzzocrea, S.; Pisano, B.; Dugo, L.; Ianaro, A.; Maffia, P.; Patel, N. S.; Di Paola, R.; Ialenti, A.; Genovese, T.; Chatterjee, P. K.; Di Rosa, M.; Caputi, A. P.; Thiemermann, C. 2004. Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ , reduces acute inflammation. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 483, n. 1, p. 79- 93.
- Daniel, E. E; Kwanc, Y.; Janssen, L. 2001. Pharmacological techniques for the *in vitro* study of intestinal smooth muscle. *J. Pharmacol. Toxicol.*, v.45, p.141-158.

Di Carlo, G.; Autore, G.; Izzo, A. A.; Maiolino, P.; Mascolo, N.; Viola, P.; Diurno, M. V.; Capasso, F. 1993. Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure-activity relationships. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 45, n. 12, p. 1054-1059.

Di Rosa, M.; Sorrentino, L. 1968. The mechanism of the inflammatory effect of carrageenin. *Eur. J. Pharm.*, v.4, p.340-342.

Di Rosa, M., Giroud, J. P., Willoughb Y, D. A. 1971. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J.Pathol.*, v.104, p. 15 – 28.

Dominici, A. J. C.; Rego, T. J. A.; Silva, A. Z.; Rocha, C. C.; Lima, E. B. 2003. Abordagem fitoquímica de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). In: *54º Congresso Nacional de Botânica*, Belém, PA.

Dunham, N. W.; Myia, T. S. 1957. A note na simple apparatus for detection neurological déficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc*, 46:208-209.

Fanning, M. J.; Macander, P.; Drzewiecki, G.; Middleton, E. 1983. Quercetin inhibits anaphylactic contraction of guinea-pig ileum smooth muscle. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, v. 71, n. 4, p. 371-373.

Ferreira, M. P.; Nishijima, C. M.; Seito, L. N.; Dokkedal, A. L.; Lopes-Ferreira, M.; Di Stasi, L. C.; Vilegas, W.; Hiruma-Lima, C. A. 2008. Gastroprotective effect of *Cissus sicyoides* (Vitaceae): Involvement of microcirculation, endogenous sulfhdryls and nitric oxide. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 117, p. 170-174.

Fu, J. Y.; Masferrer, J. L.; Seibert, K.; Raz, A.; Needleman, P. 1990. The induction and suppression of prostaglandin HZ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J. Biol. Chrm.* v.265. p.16737- 16740, 1990.

Fülöp, K.; Zádori, Z.; Rónai, A. Z.; Gyires, K. 2005. Characterisation of  $\alpha_2$ -adrenoceptor subtypes involved in gastric emptying gastric motility and gastric mucosal defence. *European Journal of Pharmacology*, v. 528, p. 150-157.

Gaginella, T. S.; Mascolo, N.; Izzo, A. A.; Autore, G.; Capasso, F. 1994. Nitric oxide as a mediator of bisacodyl and phenolphthalein laxative action: induction of nitric oxide synthase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 270, p. 1239-1245.

Garcia Leme, J.; Hamamura, L.; Leite, M. P.; Rocha e Silva, M. 1973. Pharmacological analysis of the acute inflammatory process induce in rat's paw by local injection of carrageenan and by heating. *Br. J. Pharmac.*, v.48, p.88-96.

Garcia, M. D.; Quílez, A. M.; Sáenz, M. T.; Martínez-Domínguez, M. E.; De la Puerta, R. 2000. Anti-inflammatory activity of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L., species used in the Caribbean traditional Medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. v.71, 395–400.

Gasbarri, A.; Pompili, A.; Pacitti, C.; Cicerata, F. 2003. Comparative effects of lesions to the ponto-cerebellar and olivo-cerebellar pathways on motor and spatial learning in the rat. *Neurosci.*, v. 116, n. 4, p. 1131-40.

Guardia, T.; Rotelli, A. E.; Juarez, A. O.; Pelzer. L. E. 2001. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *II Farmaco*. v.56, p.683 – 687.

Gurgel, L. A.; Silva, R. M.; Santos, F. A.; Martins, D. T. O.; Mattos, P. O.; Rao, V. S. N. 2000. Studies on the antidiarrhoeal effect of Dragon's Blood from *Croton urucurana*. *Phytother. Res.*, v. 14, p. 1-4.

Guyton, A. C, Hall, J. E. 1998. *Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças*. Editora Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro, 457-489.

Gyires, K. 1990. Morphine inhibits the ethanol-induced gastric damage in rats. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* v.306, p.170-181.

Henriques, M. G.; Silva, P. M.; Martins, M. A.; Flores, C. A.; Cunha, F. Q.; Assreuy-Filho, J.; Cordeiro, R. S. 1987. Mouse Paw Edema. A new model for inflammation? *Braz. J. Med. Bio. Res.* v. 20, p.243-249.

Hirata, F.; Schiffmann, E.; Venkatasubramanian, K.; Salomon, D.; Axelrod, J. 1980. A phospholipase A, inhibitory protein in rabbit neutrophils induced by glucocorticoids. *Proc. Natl Acad. Sci.*, v. 77, n. 5, p. 2533-2536.

Hong, S. L.; Levine, L. 1976. Inhibition of arachidonic acid release from cells as the biochemical action of anti-inflammatory corticosteroids, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, v.73, p.730- 1734.

Howd, R. A., Adamovics, A., Palekar, A. 1978. Naloxone and intestinal motility. *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 3, p 1310-1311.

Huang, M. T.; Liu, Y.; Ramji, D.; Lo, C. Y.; Ghai, G.; Dushenkov, S.; Ho, C. T. 2006. Inhibitory effects of black tea theaflavin derivatives on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation and arachidonic acid metabolism in mouse ears. *Mol. nutri. food res.*, v. 50, n. 2, p. 115-122.

Humes, J. L.; Opas, E. E.; Bonney, R. J. 1986. Arachidonic acid metabolites in mouse ear oedema. *Advances in inflammations research*. Nova York: Raven Press, p. 57-65.

Hunskar, S.; Hole, K. 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, v.30(1), p.103-104.

Izzo, A. A.; Mascolo, N.; Di Carlo, G.; Capasso, F. 1994. N<sup>G</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester modulates intestinal secretion and motility produced by carbachol. *European Journal of Pharmacology*. v. 271, 31-35.

Julius, D.; Basbaum A. I. 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, v. 413, p. 203-210.

Katsuki, S.; Arnold, W. P.; Murad, F. 1977. Effects of sodium nitroprusside, nitroglycerin, and sodium azide on levels of cyclic nucleotides and mechanical activity of various tissues. *J. Cyclic Nucleotide Res.*, v. 3, p. 239-247.

Kawabata, A. 2011. Prostaglandin E<sub>2</sub> and pain-an update. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 34, n. 8, p. 1170-1173.

Kamm, M. A. 2000. Why the enteric nervous system is important to clinicians. *Gut*. v. 47 Supl. 4, p. iv8- iv9.

Kobayashi, T.; Narumiya, S. 2002. Function of prostanoid receptors: studies on knockout mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* v. 69: p.557-573.

Kosek, M., Bern, C., Guerrant, R.L., 2003. The global burden of diarrheal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bulletin of the World Health Organization*. v.81, p.197-204.

Kumar, V; Abbas, A. K; Fausto, N. 2005. *Robbins e Cotran: Patologia: Bases Patológicas das Doenças*. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier.

Kurz, A.; Sessler, D. I. 2003. Opioid-induced bowel dysfunction: pathophysiology and potential new therapies. *Drugs*, v.63(7), p.649-671.

Levy, L. 1969. Carregenan paw edema in the mouse. *Life Sci.*, v.8, p.601-606.

Licata, S. C.; Platt, D. M.; Cook, J. M.; Van Linn, M. L.; Rowlett, J. K. 2009. Contribution of alpha1 subunit-containing gamma-aminobutyric acidA (GABA<sub>A</sub>) receptors to motor-impairing effects of benzodiazepines in squirrel monkeys. *Psychopharmacology*. v. 203, p. 539-46.

- Lizama, T. S.; Martinez, M. M.; Pérez, O. C. 2000. Contribución al estudio de *Cissus sicyoides* L. (béjucoubi). *Revista Cubana de Farmacia*. v.34, p.120–124.
- Mascolo, N., Izzo, A. A., Autore, G., Barbato, F., Capasso, F. 1994. Nitric oxide and castor oil-induced diarrhea. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.268, p.291- 295.
- Masferrer, J. L.; Zweifel, B. S.; Seibert, K.; Needleman, P. 1990. Selective Regulation of Cellular Cyclooxygenase by Dexamethasone and Endotoxin in Mice. *J. Clin. Invest.*, v.86, p.1375-1379.
- Mazzolin, L. P.; Kiguti, L. R. A.; Maia, E. O.; Fernandes, L. T. L.; Rocha, L. R. M.; Vilegas, W.; Pupo, A. S.; DiStasi, L. C.; Hiruma-Lima, C. A. 2013. Antidiarrheal and intestinal anti-inflammatory activities of a methanolic extract of *Qualea parviflora* Mart. in experimental models. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 150, 1016–1023.
- McDonald, P. P.; McColl, S. R.; Braquet, P.; Borgeat, P. 1994. Autocrine enhancement of leukotriene synthesis by endogenous leukotriene B<sub>4</sub> and platelet-activating factor in human neutrophils. *Br. J. Pharmacol.*, v.111, p. 852-860.
- McGeer, P. L.; McGeer, E. G. 2008. Glial reactions in Parkinson's disease. *Movement Disorders*. v. 23, p.474–483.
- Meli, R.; Autore, G.; Di Carlo, G.; Capasso, F. 1990. Inhibitory action of quercetin on intestinal transit in mice. *Phytother. Res.*, v. 4, p. 201-201.
- Mequanint, W.; Makonnen, E.; Urga, K. 2011. In vivo anti-inflammatory activities of leaf extracts of *Ocimumla miifolium* in mice model. *J. Ethnopharmacol.* v.134, 32–36.
- Middleton, E.; Drzewiecki, G. 1984. Flavonoid inhibition of human basophil histamine release stimulated by various agents. *Biochem. Pharmacol.*, v. 33, p. 3333-3334.
- Milić, M.; Divljaković, J.; Rallapalli, S.; Van Linn, M. L.; Timić, T.; Cook, J. M.; Savić, M. M. 2012. The role of  $\alpha_1$  and  $\alpha_5$  subunit-containing GABA<sub>A</sub> Receptors in motor impairment induced by benzodiazepines in rats. *Behav Pharmacol.* v. 23(2), p. 191–197, 2012.
- Moilanen, L. J.; Laavola, M.; Kukkonen, M.; Korhonen, R.; Leppänen, T.; Högestätt, E. D.; Zygmunt, P. M.; Nieminen, R. M.; Moilanen, E. 2012. TRPA<sub>1</sub> Contributes to the Acute Inflammatory Response and Mediates Carrageenan-Induced Paw Edema in the Mouse. *Sci. Rep.*, v.2, p. 380-403.
- Mukherjee, D. 2002. Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors and potential risk of cardiovascular events. *Biochem Pharmacol*, 63:817-821.
- Mustafa, R. A.; Abdul, H. A.; Mohamed, S.; Bakar, F. A. 2010. Total Phenolic Compounds, Flavonoids, and Radical Scavenging Activity of 21 Selected Tropical Plants. *J. Food Sci.*, v.75, p.C28–C35.
- Organization for economic co-operation development (OECD). 2001. *Guideline for testing of chemicals: Acute Oral Toxicity*. Paris, France. 14p.
- Petri, W. A.; Miller, M.; Binder, H. J.; Levine, M. M.; Dillingham, R.; Guerrant, R. L. 2008. Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development. *Journal of Clinical Investigation* 118, 1277–1290.
- Posadas, I.; Bucci, M.; Roviezzo, F.; Rossi, A.; Parente, L.; Sautebin, L.; Cirino, G. 2004. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br. J. Pharmacol.*, v. 142, p.331–338.
- Rabbani, G. H.; Greenough, I. I. I.; Holmgren, J.; Kirkwood, B. 1982. Controlled trial of chlorpromazine as antisecretory agent in patients with cholera hydrated intravenously. *Br. Med. J.*, v. 284, n. 6326, p. 1361-1364.

Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter J. M.; Flower, R. 2007. *Farmacologia*, 6ª ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Richardson, J. D.; Vasko, M. R. 2002. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 302, p.839-845.

Ricciotti, E; Fitzgerald, G. A. 2011. Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v.31, p. 986-1000.

Riddick, C. A.; Ring, W. L.; Baker, J. R.; Hodulik, C. R.; Bigby, T. D. 1997. Dexamethasone increases expression of 5-lipoxygenase and its activating protein in human monocytes and THP-1 cells. *Eur. J. Biochem.*, v.246, n.1, p.112-8.

Robert, A.; Nezamis, J. E.; Lancaster, C.; Hanchar, A. J.; Klepper, M. S. 1976. Enteropooling assay: a test for diarrhoeal produced by prostaglandins. *Prostaglandins*, v. 11, p. 809–814.

Rosland, J. H.; Hunskaar, S.; Hole, K. 1990. Diazepam attenuates morphine antinociception test-dependently im mice. *J. Pharmacol. Toxicol.* v. 66, p. 382-386.

Rouf, R., Uddin, S. J., Shilpi, J. A., Alamgir, M. 2007. Assessment of antidiarrhoeal activity of the methanol extract of *Xylocarpus granatum* bark in mice model. *J. Ethnopharmacol.*, v.109, p.539-542.

Saenz, M. T.; Garcia, M. D.; Quilez, A.; Ahumanda, M. C. 2000. Cytotoxic activity of *Agave intermixta* L. (Agavaceae) and *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). *Phytotherapy Research* 14, 552–554.

Sandor, K; Helyes, Z; Elekes, K; Szolcsányi, J. 2009. Involvement of capsaicin-sensitive afferents and the transient receptor potencial vanilloid 1 receptor in xylene-induced nocifensive behaviour and inflammation in the mouse. *Neurosc. Letters*, v. 405, p. 204-207.

Souza-Brito, A. R. M. 1994. *Manual de Ensaio Toxicológicos in vivo: Ciências médicas*. 1ed. Campinas: Editora da Unicamp. p.15-22.

Stankova, J.; Sylvie, T.; Jennifer, H.; Marek, R. P. 2002. Modulation of Leukotriene B4 Receptor-1. *J. Immunol.*, v.168, p.3570-3576.

Stickney, J. C.; Northup, D. W. 1959. Effect of gastric emptying upon propulsive motility of small intestine of rats. *P.S.E.B.M.*, v 101, p. 582-583.

Somlyo, A. P.; Somlyo, A. V. 2003. Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smoth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiological Reviews*, v. 83, p. 1325 – 1358.

Swingle, K. F; Reiter, M. J; Schwartzmiller, D. H. 1981. Comparison of croton oil and cantharidin induced inflammations of the mouse ear and their modification by topically applied drugs., *Arch. Int. Pharmacodyn.*, V. 254, p. 168-176.

Tadano, T., Kisara, K.; Stewart, J. J. 1992. A comparison of peripheral and central effects of clonidine on rat intestinal transit. *Res. Com. Chem. Pathol. Pharmacol.*, v. 78, n. 2, p. 161-179.

Taylor, J. L. S.; Rabe, T.; Mcgaw, L. J.; Jäger, A. K.; Van Staden, J. 2001. Towards the scientific validation of traditional medicinal plants. *Plant Growth Regulation*, v. 34, p. 23-37.

Toledo, A. C. O.; Hirata, L. L.; Buffon, M. C. M.; Miguel, M. D.; Miguel, O. G. 2003. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. *Revista Lecta, Bragança Paulista*, v. 21, p. 7-13.

Totl, L. J.; Swystun, L. L.; Pepler, L.; Liaw, P. C. 2008. Protective effects of activated protein C in sepsis. *Thrombosis and Haemostasis*. v.100, p.582–592.

Tomazzoni, M. I.; Negrelle, R. R. B.; Centa, M. L. 2006. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. *Texto & Contexto Enfermagem Florianópolis*, v. 15, p. 115-121.

Trevisani, M.; Siemens, J.; Materazzi, S.; Bautista, D. M.; Nassini, R.; Campi, B.; Imamachi, N.; Andrè, E.; Patacchini, R.; Cottrell, G. S.; Gatti, R.; Basbaum, A. I.; Bunnett, N. W.; Julius, D.; Geppetti, P. 2007. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.*, v.104, p.13519–13524.

Trovo, M. M.; Silva, M. J. P.; Leão, E. R. 2003. Terapias alternativas/complementares no ensino público e privado: análise do conhecimento dos acadêmicos de enfermagem. *Revista Latino Americana de Enfermagem*, v. 11, p. 483-489.

Vanegas, H; Schaible, H. G. 2001. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Prog. Neurobiol.*, v. 64, p.327–363.

Verster, J. C.; Volkerts, E. R.; Verbaten, M. N. 2002. Effects of alprazolam on driving ability, memory functioning and psychomotor performance: a randomized, placebo-controlled study. *Neuropsychopharmacology*. v. 27, p. 260–9.

Viana, G. S. B., Medeiros, A. C. C., Lacerda, A. M. R., Kalyne, L.; Leal, A. M.; Vale, T. G.; Matos, F. J. A. 2004. Hypoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. *BioMed Central Pharmacology*. v.4, p.4–9.

Vicentini, V. E. P., Camparoto, M. L., Teixeira, R. O., Mantovani, M. S. 2001. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* L., *Skeels* and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and animal test system. *Acta Scientiarum*. v.23, p.593–598.

Viswanatha, G. L.; Srinath, R.; Nandakumar, K.; Shylaja, H.; Lakshman, K. 2007. Antidiarrheal activity of alcoholic and aqueous extracts of stem bark of *Thespesia populnea* in rodents. *Pharmacology online*. v.3, 222-230.

Ward, S. M.; Dalziel, H. H.; Bradley, M. E.; Buxton, I. L. O.; Keef, K.; Westfall, D. P.; Sanders, K. M. 1992. Involvement of cyclic GMP in nonadrenergic, non-cholinergic inhibitory neurotransmission in dog proximal colon. *Br. J. Pharmacol.*, v. 107, p. 1075-1082.

Watterson, K. R.; Ratz, P. H.; Spiegel, S. 2005. The role of sphingosine-1- phosphate in smooth muscle contraction. *Cellular Signalling*, v. 17, p. 289–298.

Wenzl, H. H. 2012. Diarrhea in chronic inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Clin. N.Am.*41,651–675.

Winter, A. C; Risley, E. A; Nuss, G. W. 1962. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, v.111, p.544-547.

Wood, J. D.; Galligan, J. J. 2004. Function of opioids in the enteric nervous system. *Neurogastroenterology & Motility*, v. 16, p. 17-28.

Yan-Fang, X.; Zhi-Xiu, L.; Xin-Yi, X.; Zi-Ren, S.; Jian-Nan, C.; Xiao-Ping, L.; Siu-Po, I. 2012. Effect of Rhizoma Polygonati on 12-O-tetradecanoylphorbol-acetate-induced ear edema in mice. *J. Ethnopharmacol.*, v. 142, 851–856.

Young, J. M.; Wagner, B. N.; Spires, D. A. 1983. Tachyphylaxis in 12-O-tetradecanoylphorbol acetate-and arachidonic acid-induced ear edema. *J. Invest. Dermatol.*, v. 80, n. 1, p. 48-52.

Young, J. M.; Spires, D. A.; Bedord, C. J.; Wagner, B.; Ballaron, S. J.; De Young, L. M. 1984. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. *J. Invest. Dermatol.*, v. 82, p. 367- 371.

Zeilhofer, H.U.; Brune, K. 2006. Analgesic strategies beyond the inhibition of cyclooxygenases. *Trends. Pharmacol. Sci.*. v. 9, p.467-74.

## CONCLUSÃO GERAL

A análise dos resultados geral permite concluir que:

- O EHCS é gastroprotetor quando avaliada por modelos agudos de úlcera gástrica;
- O EHCS não previne a úlcera duodenal e não apresenta atividade antissecretoria;
- A gastroproteção do EHCS envolve a participação de citoprotetores, fatores antioxidantes e antimotilidade gastrointestinal;
- O extrato não apresenta toxicidade aguda em nenhum dos parâmetros avaliados;
- O EHCS apresenta potente atividade anti-inflamatória avaliada nos edemas possivelmente por interação com receptores TRPA-1 e/ou como antioxidante no modelo do xilol, e através da diminuição da síntese de PGE<sub>2</sub> no modelo do AA, bem como inibição do edema de pata induzido por carragenina na fase tardia;
- O efeito antidiarreico ocorre devido alterações no trânsito intestinal avaliados *in vivo* e *in vitro* mostrando efeito antiespasmódico, e confirmando desta forma o envolvimento com o bloqueio dual de receptores muscarínicos e canais de Ca<sup>2+</sup>.
- Outro mecanismo relacionado ao efeito antidiarreico do EHCS, ocorre através da redução da secreção de fluidos mediada pela diminuição da síntese de PGE<sub>2</sub>

Em síntese, pode-se inferir que a atividade **antiulcerogênica** deste extrato, é mediada principalmente por mecanismos citoprotetores e antioxidantes sobre a mucosa gástrica e o efeito **anti-inflamatório** envolve participação via diminuição da síntese de PGE<sub>2</sub> assim como no efeito **antidiarreico** somado ao bloqueio de receptores muscarínicos e canais de Ca<sup>2+</sup> sugerindo que estes mecanismos apresentados podem estar relacionadas à ação dos flavonóides (derivados da quercetina e Kaempferol) presentes nas folhas de *C. sicyoides*. Apesar de serem necessários mais estudos, neste contexto, o uso do extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* se mostra promissor como potencial medicamento fitoterápico.

**FIM!!!**

## ANEXOS

## Anexo 1 – Protocolo do Comitê de Ética em Experimentação Animal (nº 415-CEUA)



*Certificado*

Certificamos que o Protocolo nº **415-CEUA**, sobre “Avaliação do potencial antiulcerogênico, antidiarréico, analgésico e antiinflamatório do extrato hidroalcoólico obtido a partir das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae)”, sob a responsabilidade de **Clélia Akiko Hiruma-Lima**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado “Ad referendum” da **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**, nesta data.

Botucatu, 19 de junho de 2012.

  
**Prof.ª Dr.ª Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro**  
Presidente da CEUA

Instituto de Biociências - Diretorio Técnico Acadêmico  
Distrito da Rubião Júnior s/n CEP 13618-970 Botucatu SP Brasil  
Tel 14 3811 6013/6014 fax 14 3815 3744 e-mail: dta@ibbunesp.br

## Anexo 2 – Protocolo do Comitê de Ética em Experimentação Animal (nº 416-CEUA)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



## Certificado

Certificamos que o Protocolo nº 416-CEUA, sobre “Avaliação do potencial antiulcerogênico, antidiarréico, analgésico e antiinflamatório do extrato hidroalcoólico obtido a partir das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae)”, sob a responsabilidade de **Clélia Akiko Hiruma-Lima**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado “Ad referendum” da **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA), nesta data.

Botucatu, 19 de junho de 2012.

Prof. Dr. Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro  
Presidente da CEUA

Instituto de Biociências - Diretoria Técnica Acadêmica  
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 13618-970 Botucatu SP Brasil  
Tel 14 3811 6013/6014 Fax 14 3815 3744 e-mail: dta@ibunesp.br

**Anexo 3 - Protocolo experimental das avaliações do teste “Screening” hipocrático**

Os parâmetros a serem observados de acordo com a tabela de Sousa-Brito (1994) e segundo explicações de alguns padrões comportamentais descritos por Malone e Robichaud (1962), são os seguintes:

<b><i>Frêmito vocal:</i></b>	Emissão de ruídos frequentes
<b><i>Irritabilidade:</i></b>	Reação ao indivíduo ao lado ou ao manuseá-lo
<b><i>Resposta ao toque:</i></b>	Direcionar algo em direção ao animal e esperar ele desviar
<b><i>Aperto de cauda:</i></b>	Apertar a ponta da cauda e puxá-lo
<b><i>Contorção:</i></b>	Animal faz movimento sinuoso
<b><i>Trem posterior:</i></b>	Pata posterior abaixada
<b><i>Endireitamento:</i></b>	5, pode ser posicionado em único lado; 6, pode ser posicionado em qualquer dos lados igualmente bem; 7, pode ser posicionado de costas tão bem como qualquer lado; 8, não pode ser despertado, estando de costas, com um beliscão no dedo da pata traseira.
<b><i>Tônus corporal:</i></b>	Puxar a pele pra ver se ela retorna ao normal
<b><i>Força de agarrar:</i></b>	Fazê-lo segurar na grade e puxá-lo pela cauda
<b><i>Ataxia:</i></b>	1, detecção de perda de coordenação; 2, dificuldade de andar reto mas prosseguir alinhado; 3 não conseguir andar reto, com curso errante; 4, não conseguir qualquer curso
<b><i>Reflexo auricular:</i></b>	Mexer a orelha com a pinça
<b><i>Reflexo corneal:</i></b>	Levar em direção ao olho a pinça para ver se eles tentam fechá-los.
<b><i>Tremores:</i></b>	Verificar se eles tremem, comparando com o normal.
<b><i>Convulsões:</i></b>	São medidas subjetivamente de 1 a 4 de acordo com a severidade e

	duração
<b><i>Estimulações:</i></b>	Movimentos repentinos
<b><i>Straub:</i></b>	Cauda levantada como uma bandeira
<b><i>Hipnose:</i></b>	Dormir agrupados
<b><i>Anestesia:</i></b>	1- resposta lenta quando uma agulha é pressionada no pé; 2- sem reação à agulha firme pressionada; 3- sem reação com a penetração da agulha
<b><i>Lacrimação:</i></b>	Comparar com a normal
<b><i>Ptose:</i></b>	1- notável fechamento do olho; 2- metade fechado; 3- quase completamente fechado; 4- fechado completamente
<b><i>Micção:</i></b>	Considerar subjetivamente a frequência e quantidade
<b><i>Defecação:</i></b>	Verificar alteração na consistência das fezes
<b><i>Piloereção:</i></b>	A gradação é analisada subjetivamente através da ereção e do aspecto do pelo
<b><i>Hipotermia:</i></b>	Tocar o animal e verificar se a temperatura é baixa em relação ao controle
<b><i>Respiração:</i></b>	Comparar com o normal
<b><i>Cianose:</i></b>	Observar a alteração da cor de orelhas, patas e da mucosa oral.
<b><i>Número de mortos:</i></b>	Anotar a cada verificação dos comportamentos

**Anexo 4 - Teste Hipocrático – Toxicidade de drogas por Análise Comportamental Parâmetros analisados em camundongos machos e fêmeas tratados oralmente com dose única de veículo e EHCS 5000 mg/kg**

<b>Sintomas</b>	<b>Normal</b>	<b>Tempo para as análises comportamentais (minutos)</b>				
		<b>30'</b>	<b>60'</b>	<b>120'</b>	<b>240'</b>	<b>360'</b>
Aparência geral	4	4	4	4	4	4
Frênilo vocal	0	0	0	0	0	0
Irritabilidade	0	0	0	0	0	0
Reposta ao toque	4	4	4	4	4	4
Aperto da cauda	4	4	4	4	4	4
Contorção	0	0	0	0	0	0
Trem posterior	0	0	0	0	0	0
Endireitamento	4	4	4	4	4	4
Tônus muscular	4	4	4	4	4	4
Força de agarrar	4	4	4	4	4	4
Ataxia	0	0	0	0	0	0
Reflexo auricular	4	4	4	4	4	4
Reflexo corneal	4	4	4	4	4	4
Tremores	0	0	0	0	0	0
Convulsões	0	0	0	0	0	0
Estimulações	4	4	4	4	4	4
Straub	0	0	0	0	0	0
Hipnose	0	0	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0	0	0
Lacrimação	0	0	0	0	0	0
Ptose	0	0	0	0	0	0

Micção	4	4	4	4	4	4
Piloereção	0	0	0	0	0	0
Defecação	4	4	4	4	4	4
Hipotermia	0	0	0	0	0	0
Respiração	4	4	4	4	4	4
Cianose	0	0	0	0	0	0
Morte		0	0	0	0	0

Códigos: Testes com anotação normal “0”, a intensidade do efeito varia na escala de 1 a 4; testes com anotação normal “4”, a intensidade do efeito poderá variar de 0 a 3 quando ocorrer diminuição, 4 quando igual ao controle e de 5 a 8 quando ocorrer aumento.