

HÉLIO KUSHIMA



**Efeito dos extratos metanólicos das folhas de *Davilla elliptica* e
Davilla nitida na vigência de colite experimental induzida por
ácido trinitrobenzenosulfônico em ratos**

ORIENTADORA: PROFA. DRA. CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia de Botucatu da Universidade
Estadual Paulista - UNESP, para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Biológicas (Área de Concentração:
Farmacologia)

**Botucatu-SP
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Kushima, Hélio.

Efeito dos extratos metanólicos das folhas de *Davilla elliptica* e *Davilla nitida* na vigência de colite experimental induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico em ratos / Hélio Kushima. - Botucatu, 2010

Tese (doutorado) - Instituto de Biociências de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Clélia Akiko Hiruma-Lima

Capes: 21001006

1. Reto colite ulcerativa. 2. Intestinos – Doenças inflamatórias.

Palavras-chave: Reto colite ulcerativa; *Davilla elliptica*; *Davilla nitida*;
Dilleniaceae; Doença inflamatória intestinal; TNBS

Dedicatória

Aos meus pais, o sr. Kushima (Totchan) e a dona Yoshiko (Katchan) Kushima, pelo apoio, apesar de não compreenderem muito bem o que eu faço, sempre procuraram incentivar e me ensinaram a ser persistente.

À Bruna e ao meu filho Dalton que de muitas maneiras me deram força e procuraram dar o apoio possível, sei que por vezes fui ausente para dedicar-me ao trabalho, mas basicamente faço tudo pensando no melhor para os dois.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram.

Aos animais utilizados nos experimentos.

E à Clélia, a grande mentora, que além de ser uma excelente profissional, é uma amiga que sempre se preocupou em me apoiar na vida profissional e pessoal, incentivando e dando conselhos que com certeza levarei para minha vida toda.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima, a pessoa de maior importância para o desenvolvimento de minhas atividades acadêmicas, que me orientou quando necessário, mas que também me deu liberdade em diversos momentos para realizar as atividades de maneira autônoma. Além disso, foi ela quem possibilitou a concretização desta tese, contribuindo com as devidas alterações de projetos para deslancharmos com resultados tão expressivos.

Aos meus irmãos Eder e Henry por me apoiarem nos estudos, de maneira direta ou indireta, pelo lado financeiro e pelo apoio moral.

Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas seus alunos Clenilson e Daniel, do Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química da UNESP de Araraquara-SP, pelo envio dos extratos e frações, e também pela caracterização fitoquímica.

Ao Prof. Luiz Cláudio Di Stasi por contribuir com idéia e disponibilizar seu laboratório para realização de experimento e de seu tempo para discussão de resultados. E aos seus alunos por me auxiliarem nos experimentos.

À Profa. Dra. Lúcia Regina Machado da Rocha por sempre me chamar atenção para assuntos pertinentes as atividades laboratoriais também por disponibilizar o seu laboratório para uso.

A todos do laboratório, pelo auxílio na execução dos experimentos e pela contribuição com sugestões.

A chefia do Departamento de Fisiologia pelo incentivo e busca de alternativas para a conciliação das atividades relacionadas à tese e ao trabalho como servidor.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia pelo apoio e auxílio nas atividades relacionadas à tese.

Aos funcionários da seção de pós-graduação pelos serviços prestados.

À **CAPES**, pela concessão da bolsa de estudos usufruída nas etapas iniciais do doutorado.

À **Reitoria da UNESP**, por conceder a bolsa de complemento educacional

Prólogo

O projeto de doutorado possibilitou a formação específica em farmacologia, com os estudos direcionados para a caracterização de atividade farmacológica de produtos naturais, sendo o objeto alvo dos estudos as doenças inflamatórias intestinais. Durante a execução deste projeto, várias outras atividades foram realizadas, no intuito de enriquecer a formação profissional do aluno.

As atividades realizadas envolveram:

DISCIPLINAS CURSADAS

- Bioinformática – 4 créditos, 60 horas-aula.
- Metabólicos Secundários em Plantas – 4 créditos, 60 horas-aula.
- Tópicos de Atualização em Ciências – 3 créditos, 45 horas-aula.
- Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada – 2 créditos, 30 horas-aula.
- Farmacologia do Sistema Nervoso Autônomo Simpático – 3 créditos, 45 horas-aula.
- Mecanismos de Controle e Adaptação das Funções do Trato Gastrointestinal – 4 créditos, 60 horas-aula.
- Parâmetros de Sensibilidade a Drogas: Modelos Experimentais – 4 créditos, 60 horas-aula.
- Teoria e Prática de Técnicas Espectroscopias UV-VIS, Fluorescência e Quimiluminescência: Aplicações em Ciências Biomédicas – 2 créditos, 30 horas.

ARTIGOS PUBLICADO EM PERIÓDICOS ESPECIALIZADOS

- Moraes, T.M., Kushima, H., Moleiro, F.C., Santos, R.C., Rocha, L.R., Marques, M.O., Vilegas, W., Hiruma-Lima, C.A., 2009. Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: role of prostaglandins and gastric mucus secretion. Chem Biol Interact 180, 499-505.

- Kushima, H., Nishijima, C.M., Rodrigues, C.M., Rinaldo, D., Sassa, M.F., Bauab, T.M., Stasi, L.C., Carlos, I.Z., Brito, A.R., Vilegas, W., Hiruma-Lima, C.A., 2009. *Davilla elliptica* and *Davilla nitida*: gastroprotective, anti-inflammatory immunomodulatory and anti-*Helicobacter pylori* action. J Ethnopharmacol 123, 430-438.
- Severi, J.A., Lima, Z.P., Kushima, H., Brito, A.R., Santos, L.C., Vilegas, W., Hiruma-Lima, C.A., 2009. Polyphenols with antiulcerogenic action from aqueous decoction of mango leaves (*Mangifera indica* L.). Molecules 14, 1098-1110.
- Hiruma-Lima, C.A., Rodrigues, C.M., Kushima, H., Moraes, T.M., Lolis, S.F., Feitosa, S.B., Magri, L.P., Soares, F.R., Cola, M.M., Andrade, F.D., Vilegas, W., Souza Brito, A.R., 2009. The anti-ulcerogenic effects of *Curatella americana* L. J Ethnopharmacol 121, 425-432.
- Moraes, T.M., Rodrigues, C.M., Kushima, H., Bauab, T.M., Villegas, W., Pellizzon, C.H., Brito, A.R., Hiruma-Lima, C.A., 2008. *Hancornia speciosa*: indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. J Ethnopharmacol 120, 161-168.
- Vasconcelos, P.C., Kushima, H., Andreo, M., Hiruma-Lima, C.A., Vilegas, W., Takahira, R.K., Pellizzon, C.H., 2008. Studies of gastric mucosa regeneration and safety promoted by *Mouriri pusa* treatment in acetic acid ulcer model. J Ethnopharmacol 115, 293-301.

APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS E RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

- Serikava, S. M. O., Kushima, H., da Silva, V. C., Hiruma-Lima, C.A., 2009. Atividade gastroprotetora do extrato hidroalcoólico das folhas de *Astronium fraxinifolium* Schott. e *Astronium graveolens* Jacq. em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol e droga antiinflamatória não-esteroidal em ratos. In: XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Águas de Lindóia-SP.

- Kushima, H., Rodrigues, C. M., Rinaldo, D., Bauab, T. M., Di Stasi, L. C., Vilegas, V., Brito, A. R. M. S., Hiruma-lima, C.A., 2008. *Davilla nitida* and *Davilla elliptica* (Dilleniaceae): comparative studies of two Cerrado medicinal plants with gastroprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities. In: VI Simpósio e VI Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp, Araraquara-SP (apresentação oral).
- Kushima, H. ; Rinaldo, D., Rodrigues, C. M., Vilegas, W., Hiruma-Lima, C. A., 2008. Evaluation of ethanolic extract and fractions from *Davilla elliptica* leaves in ulcers induced by absolute ethanol. In: XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congress of Ethnopharmacology, São Paulo-SP
- Kushima, H., Rinaldo, D., Rodrigues, C. M., Vilegas, W., Hiruma-Lima, C. A., 2008. Ethnopharmacological and chemiotaxonomic approaches: two important tools in research on *Davilla* species. In: XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congress of Ethnopharmacology, São Paulo-SP.
- Serikawa, S. M. O., Kushima, H., Vasconcelos, P. C. P., Pellizzon, C. H., Seito, L. N. , Di Stasi, L. C., Coelho, R. G., Hiruma-Lima, C. A. 2008. Atividade Gastroprotetora de *Vatairea macrocarpa* Ducke em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol. In: XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congress of Ethnopharmacology, São Paulo-SP
- Rozza, A. L., Moraes, T. M., Kushima, H., Hiruma-Lima, C. A., Pellizzon, C. H., 2008. Gastroprotective effect of *Citrus lemon* essential oil and its mains constituents limonene and α,β -pinene. In: XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congress of Ethnopharmacology, São Paulo-SP
- Seito, L. N., Vasconcelos, P. C. P., Kushima, H., Sforcin, J. M., Bastos, J. K., Di Stasi, L. C., 2008. In vitro immunomodulatory and preventative TNBS rat colitis evaluation of naphthoquinones from *Zeyheria montana* Mart. (Bignoniaceae). In: XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congress of Ethnopharmacology, São Paulo-SP
- Kushima, H., Rodrigues, C. M., Cola, M., Brito, A. R. M. S., Rinaldo, D., Santos, L. C., Vilegas, W., Hiruma-Lima, C. A., 2007. *Davilla nitida*: Role of endogenous

sulphydryls and NO in gastric protection against lesions induced by ethanol. In: The First Collaborative Meeting on Phytomedicine, Monte Verità, Ascona.

- Kushima, H., Vasconcelos, P. C. P., Coelho-Ferreira, M., Santos, M. A. C., Lamarão, C., Hiruma-lima, C. A., 2006. Avaliação do papel do NO e dos compostos sulfidrílicos na gastroproteção promovida pelo extrato hidroalcoólico de *Pradosia huberi*. In: XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Águas de Lindóia –SP.
- Vasconcelos, P. C. P., Kushima, H., Andreo, M. A., Hiruma-Lima, C. A., Vilegas, W., Takahira, R. K., Pellizzon, C. H., 2006. Regeneração da mucosa gástrica induzida pelo extrato metanólico das folhas de *Mouriri pusa*. In: XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Águas de Lindóia-SP.
- Kushima, H., Rinaldo, D., Hiruma-Lima, C. A., Vilegas, W., 2006. *Davilla elliptica*: Papel dos compostos sulfidrílicos e do NO na gastroproteção em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol. In: XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Salvador-BA.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

- Avaliador de painéis durante o VIII Workshop da Pós-Graduação, Botucatu-SP, 2009.
- Participação como ouvinte do XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congress of Ethnopharmacology, São Paulo-SP, 2008.
- Participação como ouvinte do mini-curso: Aplicação de técnicas hifenadas na análise de produtos naturais de plantas medicinais, durante o XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congress of Ethnopharmacology, São Paulo-SP, 2008.

- Participação como ouvinte do VI Simpósio e VI Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp, Araraquara-SP, 2008.
- Participação como ouvinte do I Workshop de Extensão Universitária do Instituto de Biociências, Botucatu-SP, 2007.
- Participação como ouvinte do VI Workshop de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Botucatu-SP, 2007.
- Avaliador de painéis durante XVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, Botucatu-SP, 2006.
- Participação como ouvinte do XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Salvador-BA, 2006.
- Participação como ouvinte do III Simpósio de Biologia Humana, Botucatu-SP, 2006.

Organização de evento

- VI Workshop de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Botucatu-SP, 2007.
- I Encontro Nacional sobre Ética na Experimentação Animal, Botucatu-SP, 2006.
- III Simposio de Biologia Humana, Botucatu-SP, 2006.
- XVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, Botucatu, 2006.

Lista de abreviaturas

ALT - alanina aminotransferase
FA - fosfatase alcalina
AST - aspartato aminotransferase
DC - doença de Crohn
COX 1 e 2 - cicloxigenase do tipo 1 e tipo 2
DTNB - 5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzóico)
EDE - extrato metanólico de *D. elliptica*
EDN - extrato metanólico de *D. nitida*
GPX - enzima glutationala peroxidase
GRed - enzima glutationala redutase
GSH - glutationala reduzida
GSSG - glutationala oxidada
GST - glutationala S-transferase
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
DII - doença inflamatória intestinal
IL-1 - interleucina do tipo 1
IL-12 - interleucina do tipo 12
IL-13 - interleucina do tipo 13
IL-17 - interleucina do tipo 17
IL-1Ra - antagonista receptor de IL-1
IL-1 β - interleucina 1 β
IL-5 - interleucina do tipo 5
IL-6 - interleucina do tipo 6
IL-8 - interleucina do tipo 8
INF- γ - interferon γ
iNOS - óxido nítrico sintase induzível
MPO - mieloperoxidase
RCU - retocolite ulcerativa
NF κ B - fator nuclear κ B
Th1 - célula T-helper 1
Th17 - célula T-helper 17
Th2 - célula T-helper 2
TNBS - ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico

TNF- α - fator de necrose tumoral- α

TNF- α - fator de necrose tumoral- α

γ -GT - γ glutamiltransferase

Índice

I.	INTRODUÇÃO	1
II.	OBJETIVOS	11
III.	MATERIAL E MÉTODOS	11
	III.1. ANIMAIS	11
	III.2. PLANTAS	11
	III.3. INDUÇÃO DE COLITE POR TNBS	14
	III.3.1. Modelo de colite aguda	15
	III.3.2. Modelo de colite crônica com recidiva	16
	III.3.3. Avaliação do processo inflamatório intestinal	18
	III.3.4. Avaliação da atividade tóxica crônica dos extratos	19
	III.3.5. Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos e Inflamatórios	19
	a) Atividade da mieloperoxidase	19
	b) Atividade da fosfatase alcalina	19
	c) Conteúdo de glutathione total	20
	d) Quantificação de IL-1 β e TNF- α	20
	III.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
IV.	RESULTADOS	21
	IV.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DOS EXTRATOS METANÓLICOS DE <i>Davilla elliptica</i> (EDE) E <i>Davilla nitida</i> (EDN) EM COLITE AGUDA INDUZIDA POR TNBS	21
	IV.1.1. Avaliação dos parâmetros de evolução da massa corporal, de lesão cólica, macroscópicos e alimentares	21
	IV.1.2. Quantificação dos parâmetros bioquímicos do processo inflamatório	24
	IV.1.3. Quantificação de IL-1 β e TNF- α	27
	IV.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DOS EXTRATOS METANÓLICOS DE <i>Davilla elliptica</i> (EDE) e <i>Davilla nitida</i> (EDN) EM COLITE CRÔNICA INDUZIDA TNBS	29
	IV.2.1. Avaliação dos parâmetros de evolução da massa corporal, de lesão cólica, macroscópicos e alimentares	29
	IV.2.2. Quantificação dos parâmetros bioquímicos do processo inflamatório	34
	IV.2.3. Quantificação de TNF- α e IL1- β	37
V.	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	39
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

Resumo

A doença inflamatória intestinal (DII) corresponde a um conjunto de desordens crônicas inflamatórias intestinais, de etiologia ainda desconhecida, sendo a retocolite (RCU) e a doença de Crohn (DC) as duas doenças mais representativas e de maior importância clínica. Devido a pouca eficácia das terapias convencionais, muitos pacientes recorrem a métodos alternativos, como o uso de plantas medicinais. As espécies *Davilla elliptica* St. Hil e *Davilla nitida* (Vahl) Kubitzki (família Dilleniaceae) são plantas arbustivas comumente encontradas no Cerrado brasileiro. *D. elliptica*, conhecida como lixeirinha, é utilizada na medicina popular para o tratamento de afecções do trato gastrointestinal, como úlceras e gastrites, e também utilizado como antiinflamatório. *D. nitida* (cipó de fogo) apresenta um grande potencial para o tratamento de doenças do trato gastrointestinal, pois semelhante a *D. elliptica*, apresenta comprovada ação gastroprotetora e ambas possuem perfis fitoquímicos semelhantes, compostos basicamente de polifenóis. Os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos preventivos e/ou curativos dos extratos metanólicos de *D. elliptica* (EDE) e *D. nitida* (EDN) em modelos experimentais de colite (agudo e crônico) induzidos pelo ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos e os possíveis mecanismos decorrentes dessas ações farmacológicas. A partir dos resultados anteriormente obtidos da ação gastroprotetora de ambos os extratos, foram selecionadas as doses empregadas nos modelos experimentais de colite. Foi constatado que altas doses (500 mg/kg) de EDE e EDN administradas oralmente, promovem o agravamento das injúrias no cólon (aumento de 47 e 21% das lesões, respectivamente). Porém, ao avaliar os efeitos agudos de ambos os extratos no modelo de colite com doses menores (31.2, 62.5 e 125 mg/kg), ocorreram reduções significativas das áreas (para ambos os extratos) e dos escores das lesões (somente de EDN) promovidas pelo TNBS. As reduções das lesões do cólon dos animais tratados com EDE e EDN não alteraram os parâmetros de relação peso/comprimento do cólon e consumo de ração para os animais tratados com os extratos que foram iguais aos dos animais tratados com salina. No experimento agudo, ambos os extratos reduziram significativamente os níveis de mieloperoxidase (MPO), interleucina 1 β (IL-1 β) e do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), enquanto os níveis de glutathione não foram mantidos e de fosfatase alcalina (FA) não foram reduzidos em relação ao grupo salina. No modelo experimental crônico, a partir da indução da inflamação no cólon, os grupos foram tratados com a dose de 31.2 mg/kg dos extratos, durante três períodos distintos: 7, 14 e 21 dias. Animais com inflamação no cólon e tratados com EDE durante 7 dias ou EDN durante 14 dias reduziram os escores das lesões. Novamente, ambos os extratos não alteraram a relação peso/comprimento do cólon e o consumo de ração dos animais, comparados ao grupo salina. As análises da evolução do peso corporal, das alterações dos órgãos (baço, coração, fígado, pulmões e rins) e dos parâmetros bioquímicos de toxicidade (AST, ALT, γ -GT, creatinina, uréia e glicose), demonstram que as administrações de EDE e EDN não promoveram efeitos tóxicos aparentes nos diferentes períodos de análise. Os extratos não reduzem os níveis de FA, mas EDN mantém elevado os níveis de glutathione após 14 e 21 dias. Semelhante aos resultados obtidos no modelo agudo, os tratamentos com EDE e EDN reduziram os níveis de MPO, IL-1 β e TNF- α . A diminuição de MPO pela administração de EDE e EDN indica uma redução da infiltração de neutrófilos no sítio de inflamação, devido à inibição das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α , pois estas são responsáveis pela ativação de proteínas de adesão dos leucócitos. Tais efeitos podem estar associados aos polifenóis presentes em ambos os extratos, pois estes compostos são caracterizados na literatura como detentores de propriedades antiinflamatórias. Como conclusão, pode-se afirmar que EDE e EDN apresentam propriedade antiinflamatória em colite

experimental induzida por TNBS/etanol 50%, pela redução de IL-1 e de TNF- α , que leva à diminuição do influxo leucocitário no local da inflamação.

Palavras chave: *Davilla elliptica*, *Davilla nitida*, Dilleniaceae, doença inflamatória intestinal, reto colite ulcerativa, TNBS.

Abstract

Inflammatory bowel disease (DII) represents a group of chronic inflammatory bowel disorders of unknown etiology, and ulcerative colitis (RCU) and Crohn's disease (DC) both diseases are most representative and important among the DII clinic. Because the conventional therapies ineffectiveness, many patients resort to alternative methods, such as the use of medicinal plants. The species *Davilla elliptica* St. Hil and *Davilla nitida* (Vahl) Kubitzki (family Dilleniaceae) are shrubs commonly found in the Brazilian Cerrado. *D. elliptica*, known as “lixerinha”, is used in folk medicine for the gastrointestinal disorders treatment such as gastritis and ulcers and also used as anti-inflammatory. *D. nitida* (“cipó de fogo”) has great potential to treat gastrointestinal diseases, thus similar to *D. elliptica*, has proven gastroprotective action and both have similar phytochemical profiles, composed primarily of polyphenols. Our objectives were to evaluate the preventive and/or healing effects of the *D. elliptica* (EDE) and *D. nitida* (EDN) methanolic extracts in the colite experimental models (acute and chronic) induced by trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) in rats and possible mechanisms resulting from these pharmacological actions. From the previous results of gastroprotective action of both extracts, we selected the doses used in experimental models of UC. It was found that high doses (500 mg / kg) of EDN and EDE administered orally, promoted the colon injury aggravation (lesion increasing of 47 and 21%, respectively). However, in assessing the acute effects of both extracts in the UC model at lower doses (31.2, 62.5 and 125 mg/kg), there were significant reductions in areas (for both extracts) and scores of the injuries (EDN only) promoted by TNBS. The colonic lesions reduction in the animals treated with EDE and EDN did not alter the weight/length parameter of colon and feed intake in animals treated with the extracts were equal to those animals treated with saline. In the acute experiment, both extracts significantly reduced the levels of myeloperoxidase (MPO), interleukin 1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), while glutathione levels were not increased and alkaline phosphatase (AP) were not reduced compared to saline group. In the chronic experiment, the colonic inflammation was induced prior to the treatment with a dose of 31.2 mg/kg of the extracts along 7, 14 and 21 days. The lesion scores of colitic animals were reduced by the treatment with EDE for 7 days or EDN for 14 days. Again, the extracts did not alter the weight/length ratio and feed intake of animals comparing to saline group. The analysis of body weight evolution, alteration in organs (spleen, heart, liver, lungs and kidneys) and in biochemical parameters of toxicity (AST, ALT, γ -GT, creatinine, urea and glucose), showed that administration of EDE and EDN did not occasioned apparent toxic effects in different periods of analysis. The extracts did not reduce the levels of AP, but EDN increases glutathione levels after 14 and 21 days. Similarly to results obtained in the acute model, treatment with EDN and EDE reduced the levels of MPO, IL-1 β and TNF- α . The decrease of MPO by the EDE and EDN administration indicates a infiltration reduction of neutrophils at the inflammatory site, due to inhibition of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α , since cytokines are responsible for the activation of leukocyte and expression of adhesion molecules. Such effects may be related to the polyphenols present in both extracts, since the polyphenols present important anti-inflammatory properties as it is well-described in the literature. In conclusion, we can say that EDE and EDN exhibit anti-inflammatory properties in experimental colitis induced by TNBS/ethanol 50%, reducing IL-1 and TNF- α , which leads to decreased leukocyte influx at the site of inflammation.

Keywords: *Davilla elliptica*, *Davilla nitida*, Dilleniaceae, inflammatory bowel disease, ulcerative colitis, TNBS.

I. INTRODUÇÃO

A lesão tecidual ocasionada por um ferimento, microorganismo patogênico ou substância estranha ao organismo leva a uma complexa seqüência de eventos conhecida como resposta inflamatória. A resposta inflamatória é caracterizada pela ativação coordenada de várias vias de sinalização que regulam a expressão tanto de mediadores pró- como antiinflamatórios em células residentes nos tecidos e em leucócitos recrutados (Lawrence & Gilroy, 2007). Quando ocorre um dano tissular ou infecção, a resposta inflamatória promove a proteção primária do organismo pela restrição do local lesionado, de maneira imediata. Porém, havendo a persistência do antígeno ou do estímulo inflamatório, ocorre o desenvolvimento de uma resposta crônica que contribui para o dano tecidual, como no caso das doenças inflamatórias intestinais em humanos.

A doença inflamatória intestinal (DII) corresponde a um conjunto de desordens crônicas inflamatórias intestinais, caracterizadas por sangramento retal, dor abdominal, febre, perda de peso, diarreia dentre outros sintomas, sendo a colite ulcerativa (RCU) e a doença de Crohn (DC) as doenças de maior importância clínica (Machida *et al.*, 2005; Pavlick *et al.*, 2002). As características histológicas da DII incluem abscesso, perda e distorção de criptas, infiltração de um grande número de neutrófilos, monócitos e linfócitos (Yan *et al.*, 2009). Como descrito na tabela 1, a RCU afeta somente o colón e o reto, envolvendo basicamente a camada de revestimento ou mucosa, manifestando-se como áreas contínuas de inflamação e ulceração, sem segmentos de tecido normal, depleção de mucina e dano glandular; enquanto a DC acomete todo o trato gastrointestinal e as ulcerações ultrapassam a camada transmural da mucosa, podendo ocorrer fibrose, ulceração linfóide e formação de granulomas em 60% dos casos (Bossuyt, 2006).

COLITE ULCERATIVA	DOENÇA DE CROHN
Acomete cólon e/ou reto	Pode acometer qualquer porção do trato gastrointestinal (principalmente o íleo)
Afeta a camada de revestimento ou mucosa	Processo transmural (atinge todas as camadas do intestino)
Área contínua de inflamação e ulceração	Distribuição descontínua
Diarréia líquida com muco, pus e sangue	Diarréia pastosa
Dano glandular e depleção de mucina	Fibrose, granuloma e ulceração linfóide

Tabela 1. Características distintivas entre RCU e DC

Existe uma alta incidência de DII em indivíduos de países desenvolvidos e industrializados do hemisfério norte, onde estima-se que existam 396 casos para cada grupo de 100 mil habitantes, sendo a maior prevalência entre caucasianos e judeus (Hanauer, 2006; Lakatos, 2006). Tradicionalmente, países da Europa Ocidental e da América do Norte correspondem a áreas de alta incidência de DII, porém o número de casos se mantém estabilizado ou com baixo crescimento, enquanto regiões consideradas de baixa incidência como Europa Oriental, América do Sul, Ásia e região do Pacífico apresentam casos crescentes de DII (Lakatos, 2006). No Japão, o aumento do consumo de carne vermelha, açúcares e gorduras, ocorreram paralelamente acompanhado do crescimento do número de casos de RCU e DC (Sakamoto *et al.*, 2005; Kitahora *et al.*, 1995). Segundo Lakatos (2006), o crescente número de caso de DII na Ásia e nos países subdesenvolvidos nos últimos anos, acompanhou o processo de “ocidentalização” ocorrido nessas áreas.

O estilo de vida “ocidentalizado”, depressão e estresse (Danese *et al.*, 2004; Kurina *et al.*, 2001) podem aumentar a incidência de DII. Os fatores psicológicos

podem levar a uma crise aguda em pessoas que sofrem de DII, mas não são considerados como fatores responsáveis pela formação e desenvolvimento crônico dessas doenças (Hollander, 2003). Recentes estudos epidemiológicos em humanos e genéticos em modelos experimentais com animais sugerem que a combinação de fatores de susceptibilidade genética, resposta imune alterada e a microbiota do ambiente entérico, contribuem com a iniciação e desenvolvimento do estado crônico dessas doenças (Wirtz *et al.*, 2007). Além desses, inúmeros outros fatores apresentam relação com a formação e desenvolvimento de DII, tais como fumo, idade, álcool, mutações, fármacos, dentre outros (Bernstein *et al.*, 2007; Jowett *et al.*, 2004; Karlinger *et al.*, 2000). Porém a patogênese ainda é considerada desconhecida.

Dentre as descobertas associadas ao desenvolvimento da DII, estão o aumento da infiltração leucocitária e de mediadores inflamatórios (citocinas, quimiocinas, eicosanoides), sinais de estresse oxidativo, desarranjo do ambiente cólico, decréscimo da oxidação dos ácidos graxos de cadeia curta, aumento da permeabilidade intestinal, aumento da síntese de NO, que de maneira conjunta, culminam na destruição tecidual e na manifestação clínica das doenças (Jackson & Ever, 2006; Head & Jurenka, 2003; Podolski, 2002). Em condições normais, existe um estado de homeostase mantido no intestino pelo balanço entre citocinas pró-inflamatórias e as antiinflamatórias, mas em paciente com DII ocorre um desbalanço desses fatores ou até mesmo uma regulação para a persistência da inflamação intestinal (Saruta & Papadakis, 2008).

As citocinas são proteínas secretadas por células do sistema hematopoiético, e responsáveis por mediar inúmeras respostas biológicas, desempenhando um papel crítico em doenças infecciosas ou inflamatórias, em tecidos adjacentes ou distantes (Saruta & Papadakis, 2008). No caso da DII, citocinas pró-inflamatórias tais como interleucinas dos tipos 1 e 8 (IL-1 e IL-8) e fator de necrose tumoral α (TNF- α)

apresentam importância na modulação da resposta imune, agindo por diversos meios, seja pela ativação quimiotática de leucócitos (neutrófilos, macrófagos e linfócitos), como na produção de outras citocinas ou de radicais livres (Sarkar *et al.*, 2004).

A geração de radicais livres está intimamente relacionada com a patogênese da DII. Lih-Brody *et al.* (1996) comprovaram, a partir de biopsias de mucosa do cólon de humanos acometidos pela enfermidade, o estabelecimento de alterações dos níveis oxidativos. Este desequilíbrio se traduz em um incremento no estresse oxidativo acompanhado de uma diminuição nas defesas antioxidantes fisiológicas (Loguercio, 1996). Além disso, os danos aos ácidos nucleicos causados pelas espécies reativas de oxigênio e seus produtos podem originar uma síntese protéica defeituosa ou o aparecimento de mutações no material genético celular, com conseqüente perigo de desenvolvimento tumores. Este último poderia justificar a maior incidência de câncer colo-retal descrito em pacientes com colite ulcerativa (Gitnick, 1996; Obrador, 1994).

Hoje, sabe-se que existe uma regulação diferenciada das células T em DC e RCU. As alterações morfológicas e inflamatórias de DC estão associadas com as respostas imunes das células T-helper 1 (Th1) e 17 (Th17), que levam ao aumento da secreção de IL-12, TNF- α , IL-17 e de interferon γ (INF- γ) (Anunziato *et al.*, 2007). Na RCU, as alterações do ambiente cólico estão associadas às repostas imunes atípicas das células Th2 com aumento de IL-5 e de IL-13 (Fuss *et al.*, 2004). A expressão diferenciada das citocinas nas lesões intestinais de DC e RCU é importante não somente para o entendimento da patogênese destas doenças, mas também possibilita o direcionamento de tratamentos que tenham como objetivo, atingir as ações de citocinas específicas envolvidas em cada doença (Saruta & Papadakis, 2008).

O tratamento da DII inicia-se a partir do diagnóstico do tipo de enfermidade. O diagnóstico assim como diferenciação entre DC e RCU pode ser feito de maneira

precisa na maioria dos pacientes, baseado no histórico do paciente, exame físico, ileocolonosopia, exame por enema de duplo-contraste de bário, biopsia e análise microbiológica (Bossuyt, 2006). Dentre as substâncias mais empregadas em DII, destacam-se os derivados do ácido 5-aminosalicílico, corticosteróides, imunossupressores e, mais recentemente, as chamadas terapias biológicas, envolvendo o uso de anticorpos para TNF- α (infliximab, adalimumab, certolizumab), bloqueio de quimiocinas e moléculas de adesão (natalizumab), inibição de IL-12 (usteknumab, ABT-874) e de IL-6 (tocilizumab), para receptor de superfícies DC25 de células T (basiliximab), dentre outros (Stallmach *et al.*, 2010).

O tratamento convencional envolve uso de aminossalicilatos, corticosteróides e imunossupressores, que demonstram eficácia na maioria das vezes, mas nem todos os pacientes podem fazer uso desses medicamentos concomitantemente, sendo uma alternativa o uso da terapia biológica com os anticorpos (Stallmach *et al.*, 2010). De maneira geral, estes medicamentos apresentam diversos efeitos colaterais, são de alto custo, na maioria das vezes são ineficazes quando empregados isoladamente e a administração concomitante pode elevar o número de efeitos colaterais (infecções, tumores), sem considerar que existe uma alta taxa de reincidência da doença após a realização do tratamento com tais fármacos (Stallmach *et al.*, 2010; Cao *et al.*, 2005).

Como ainda não existe cura para a DII, os alvos dos medicamentos existentes no mercado envolvem a indução da remissão e manutenção deste estado, de maneira a proporcionar a melhoria da qualidade de vida ao paciente (Xu *et al.*, 2004). Diante deste quadro, muitos pacientes fazem uso de terapias complementares para o tratamento da DII. Em um estudo realizado na França com pacientes acometidos pela DII, foi demonstrado que 21.2% dos pacientes fazem uso de métodos alternativos (Bensonam *et al.*, 2006). Na Alemanha, 51.3% dos pacientes relataram ter feito uso de alternativas

terapêuticas, sendo as plantas medicinais (43.6%) e a homeopatia (52.9%) as mais empregadas. No Canadá, de um universo de 2.847 pacientes com DII, 50% relataram fazer uso de métodos complementares de maneira contínua, e as plantas medicinais representam 41% do total desse uso (Langhorst *et al.*, 2005).

Segundo Rahimi *et al.* (2009), a falta de eficácia das terapias convencionais torna crescente o uso de plantas medicinais no tratamento da DII, e os resultados decorrentes desse uso são promissores. Tais resultados demonstram uma redução da atividade das doenças, queda de sinais clínicos, remissão, redução das taxas de reincidência, melhora do sangramento retal e da consistência das fezes além de reduzir os danos histológicos em pacientes com DII (Rahimi *et al.*, 2009). Em experimentos com animais, várias espécies apresentam atividade efetiva em diversos mecanismos envolvidos na patogênese da DII, como na regulação da resposta imune, atividade antioxidante, inibição de leucotrieno B4 (LTB4), inibição do fator de transcrição nuclear κ B (NF κ B), inibição da atividade plaquetária e inibição da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Rahimi *et al.*, 2009). Este panorama revela um rumo inovador da terapêutica para o tratamento da DII, porém, as plantas medicinais apresentam um atrativo a mais como objeto de estudo, por representarem uma fonte importante de novos compostos ativos.

Plantas e seus derivados são as maiores fontes de novos fármacos. Estima-se que a comercialização mundial de fármacos derivados de plantas, em 2005, tenha sido de pelo menos de 18 bilhões de dólares (Saklani & Kutty, 2008). De acordo com Newman *et al.* (2003), entre os anos de 1981 e 2002, de 877 novas moléculas introduzidas no mercado, em torno de 49% eram substâncias isoladas de produtos naturais, semi-sintéticos, derivados de produtos naturais ou então moléculas sintetizadas tomando como modelos, estruturas de origem natural. Além disso, dos fármacos descobertos em estudos com

produtos naturais, 25% pertencem ao grupo das plantas superiores (Gurib-Fakim, 2006). Segundo Rishton (2008), compostos descobertos a partir de estudos de etnobotânicos podem tornar-se importantes medicamentos e servir como ferramentas farmacológicas para elucidação de doenças e desenvolvimento de novos fármacos.

Desse modo, a pesquisa com plantas medicinais permite a descoberta de novos compostos ativos. Compostos oriundos do metabolismo secundários das plantas, como os polifenóis, apresentam diversas atividades biológicas reconhecidas (antiinflamatória, antiviral, antibacteriana, anticancer, dentre outras) e são alvos de vários estudos para caracterização de novas estruturas e de efeitos farmacológicos sobre o trato gastrointestinal (Dryden *et al.*, 2006). Os polifenóis compõem um grupo de substâncias majoritárias dos extratos de duas espécies brasileiras, pertencentes à família Dilleniaceae: *Davilla elliptica* St. Hil. e *Davilla nitida* (Vahl) Kubitzki (Kushima *et al.*, 2009).

A espécie *Davilla elliptica* é uma planta arbustiva de até três metros de altura, encontrada freqüentemente no Cerrado, Campo Cerrado, Cerradão e Campo Cerrado sobre encosta (Silva *et al.*, 2001). Conhecida popularmente como sambaibinha, muricizinho, lixeirinha, lixeira e lixinha, é utilizada para diversos fins medicinais, tais como no tratamento de hematomas, hemorróidas, tônicos, laxativos, hérnias, anticoncepcional, diarreia, úlceras gástricas, linfatismo, inchações e orquites (Rodrigues & Carvalho, 2001; Silva *et al.*, 2001; Pott & Pott, 1994). Trabalhos recentes demonstram que *D. elliptica* possui atividade gastroprotetora, antimicrobiana, antinociceptiva, antiinflamatória, antitumoral, anti-hemorragica e imunomoduladora, comprovadas através de experimentos realizados *in vivo* e *in vitro*, a partir de diferentes preparações da planta (Edringer *et al.*, 2009; Kushima *et al.*, 2009; Nishijima *et al.*, 2009; Carli *et al.*, 2009; Lopes *et al.*, 2007; Azevedo *et al.*, 2007).

Existem poucos dados na literatura a respeito de *Davilla nitida*, que é conhecida popularmente como sambaibinha, cipó-de-fogo e lixeirinha de rama. É um arbusto de hábito trepador, também encontrado no Cerrado e pode atingir até quatro metros de altura. A espécie não apresenta dados etnofarmacológicos descritos na literatura, porém em um estudo realizado por Kushima *et al.* (2009), foi avaliado efeito antiulcerogênico dos extratos metanólicos de *D. elliptica* e *D. nitida*, e os resultados revelaram que ambas as espécies apresentam atividade gastroprotetora, sendo a atividade de *D. nitida* mais proeminente em relação à *D. elliptica*. Apesar desta diferença, o perfil fitoquímico qualitativo é muito semelhante entre as duas espécies, como pode ser observado na figura 1. Ambas as espécies são constituídas basicamente por polifenóis como flavonóides, taninos condensados e derivados do ácido fenólico (ácido gálico).

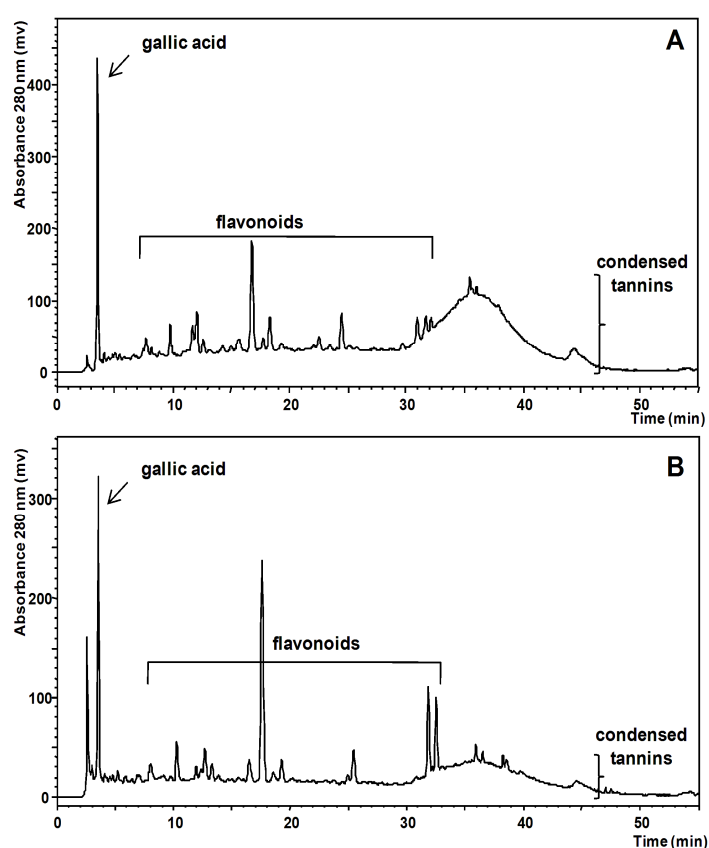


Figura 1. Perfil fitoquímico obtido em HPLC dos extratos metanólico de *D. elliptica* (A) e *D. nitida*(B) (Kushima *et al.*, 2009).

Os flavonóides correspondem aos constituintes mais diversificados encontrados nos extratos metanólicos de *D. elliptica* e *D. nitida*. Foram detectados 18 picos de flavonóides, sendo possível de identificar 12 desse total (figura 2). A miricetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosideo corresponde ao principal flavonóide de ambos os extratos, e os taninos condensados correspondem a classe de compostos de secundários em maior abundância (Kushima *et al*, 2009).

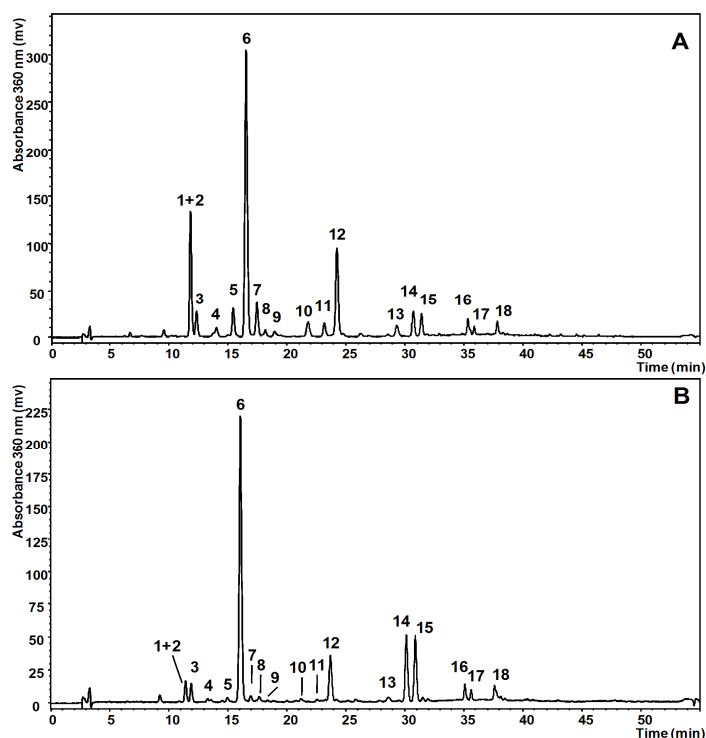


Figura 2. Perfil fitoquímico obtido em HPLC da composição flavonoídica dos extratos metanólicos de **A)** *D. elliptica* (EDE) e **B)** *D. nitida* (EDN). Pico de identificação: **1+2**, miricetina-3-*O*- β -D-galactopiranosideo and miricetina-3-*O*- β -D-glucopiranosideo; **3**, miricetina-3-*O*-(2''-*O*-galoil)- β -D-galactopiranosideo; **4**, não identificado, **5**, rutina; **6**, miricetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosideo; **7**, quercetina-3-*O*- β -D-galactopiranosideo; **8**, não identificado; **9**, não identificado; **10**, quercetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosideo; **11**, não identificado; **12**, quercetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosideo; **13**, miricetina; **14**, miricetina-3-*O*-(2''-*O*-galoil)- α -L-rhamnopiranosideo; **15**, miricetina-3-*O*-(3''-*O*-galloyl)- α -L-rhamnopiranosideo; **16**, não identificado; **17**, não identificado; **18**, quercetina (Kushima *et al.*, 2009).

Com base no conhecimento popular e os resultados descritos em diferentes artigos científicos sobre a atividade de farmacológica de *D. elliptica*, o potencial uso dessa espécie para o tratamento da DII torna-se importante, diante da inexistência de cura para esse grupo de doenças. Associado a esse fato, apesar de existirem poucas informações a seu respeito, *D. nitida* também apresenta uma possível indicação para DII, uma vez que possui atividade farmacológica sobre o trato gastrointestinal e por apresentar composição fitoquímica semelhante ao de *D. elliptica*.

Diante dos fatos expostos, o estudo da atividade antiinflamatória de *D. elliptica* e *D. nitida*, como possíveis agentes capazes de promover remissão da DII, torna-se importante devido ao número crescente de indivíduos acometidos e a falta de terapias eficazes para o tratamento dessas doenças (que ainda continuam sem cura). A busca de novas alternativas para melhoria desse quadro, seja pela descoberta de compostos inéditos bioativos ou pela introdução de novos tratamentos que auxiliem ou substituam os métodos alopáticos atuais, são essenciais para os pacientes acometidos pela DII.

II. OBJETIVOS

Caracterizar os efeitos preventivos e/ou curativos dos extratos metanólicos de *D. elliptica* (EDE) e *D. nitida* (EDN) em modelos experimentais de indução de colite ulcerativa nos modelos agudo e crônico.

III.MATERIAL E MÉTODOS

III. 1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos, provenientes do Biotério Central da UNESP-Botucatu, aclimatados às condições do biotério setorial por pelo menos sete dias antes da manipulação, sob temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas controlado. Os animais foram alimentados com ração Labina[®] e água *ad libitum*. Os experimentos obedeceram aos protocolos experimentais aprovados, previamente pela Comissão de Ética na Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu.

III.2. PLANTAS UTILIZADAS

As folhas de *Davilla elliptica* e *Davilla nitida* foram coletadas, respectivamente, em Monte do Carmo e Palmas, estado do Tocantins, pela Profa. Dra. Clélia A. Hiruma-Lima, da UNESP, Campus de Botucatu - SP. A identificação botânica foi realizada pela Profa. Solange Fátima Lolis e as exsicatas depositadas no Herbário da Universidade Federal do Tocantins sob os números 4583 (*D. elliptica*) e 3849 (*D. nitida*).

As folhas de *D. elliptica* e *D. nitida* foram devidamente secas e trituradas em moinho de faca. Os extratos de ambas espécies foram obtidos a partir do seguinte esquema de extração (figura 3).

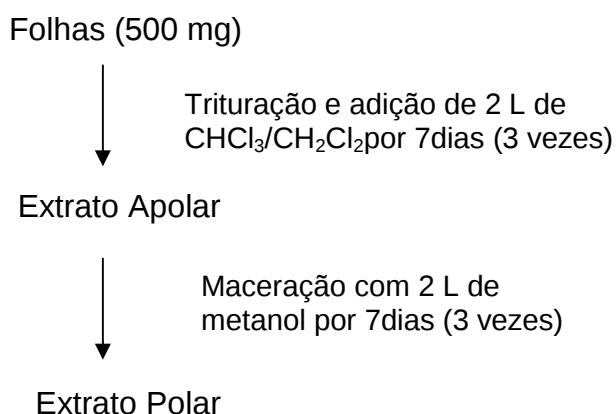


Figura 3 – Figura esquemática da técnica de extração para obtenção dos extratos de *Davilla elliptica* e *Davilla nitida*

Os solventes utilizados na extração, assim como, os rendimentos dos extratos e frações podem ser evidenciados na tabela 2.

<i>Davilla elliptica</i>		<i>Davilla nitida</i>	
Solventes	Rendimentos dos extratos	Solventes	Rendimentos dos extratos
MeOH	18,69%	MeOH	11,7%
CH ₂ Cl ₂	1,80%	CHCl ₃	1,11%

Tabela 2 – Rendimento dos extratos obtidos das folhas de *D. elliptica* e *D. nitida* como uso de metanol e clorofórmio

O procedimento de extração realizado pelos pós-doutorandos Dr. Clenilson Martins Rodrigues e Dr. Daniel Rinaldo do Instituto de Química Orgânica, UNESP, Campus de Araraquara-SP, teve por finalidade a obtenção de extratos, cujos os constituintes majoritários são compostos de baixa polaridade (extração com o clorofórmio) e de alta polaridade (extração com metanol). Esse procedimento facilita a análise fitoquímica dos extratos, pois, por exemplo, o uso somente do metanol promove a extração de diversos compostos das folhas pulverizadas, o que leva a obtenção de um extrato com compostos de baixa polaridade e alta polaridade. Tais compostos não são separados pelas colunas cromatográficas, pois o procedimento de separação se baseia no tamanho das partículas e não em sua polaridade, o que torna inviável a obtenção de substâncias puras. Dessa maneira, procedeu-se a extração inicial com o clorofórmio/diclorometano (solvente apolar) no sentido de se retirar os compostos apolares, para em seguida proceder com a extração das substâncias de alta polaridade.

Os extratos apolares de ambas as espécies foram utilizados em testes preliminares de gastroproteção, porém os resultados foram pouco conclusivos devido a

grande variação dos dados obtidos. Um dos problemas encontrados foi a dificuldade de solubilização dos extratos, que mesmo em solução de tween 80 a 8%/12% não formam uma mistura homogênea nas doses de 250 e 500 mg/kg. Enquanto os extratos metanólicos, além de serem fáceis de solubilizar e apresentar atividade gastroprotetora comprovada, apresentam o perfil fitoquímico semelhante ao do extrato obtido do infuso das folhas (procedimento utilizado popularmente) onde as substâncias predominante oriundos dessa extração são compostos polares. A falta de evidências da atividade biológica e a dificuldade de solubilização determinaram a exclusão dos extratos apolares de *D. elliptica* e *D. nitida* dos experimentos de atividade antiinflamatória em colite experimental.

III.3. INDUÇÃO DE COLITE POR TNBS

O protocolo geral de indução de colite consiste na administração intra-cólica (através de um cateter) de 10 mg de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) dissolvido em 0,25 mL de etanol/água 50%, que promove um processo inflamatório no intestino grosso do rato (Morris *et al.*, 1989).

Os tratamentos com EDE e EDN foram administrados pela via oral nas doses de 31.2, 62.5, 125, 250 e 500 mg/kg a fim de se obter uma da curva dose-efeito. Em cada experimento foi utilizado um grupo controle negativo (salina 0.9%, 10 mL/Kg), um controle positivo (prednisolona 2 mg/kg), branco (sham, sem indução da inflamação, não recebendo qualquer tratamento oral) e os grupos tratados com EDE e EDN em suas respectivas doses. A partir deste protocolo geral, foram adotadas duas formas distintas de tratamentos para a avaliação dos efeitos de EDE e EDN, sobre a colite experimental induzida por solução de TNBS/etanol 50%: o agudo e o crônico.

III.3.1. Modelo de colite aguda

Como descrito na figura 4, cada grupo de ratos recebeu seu respectivo tratamento oral três dias antes da indução da colite com a solução TNBS/etanol 50%, assim como 2 e 24 horas após essa indução. Decorridas 48 horas da aplicação da solução contendo TNBS, os animais foram mortos, em câmara de CO₂, para a retirada do colón e posterior análise das lesões e de parâmetros bioquímicos e inflamatórios, que serão descritos a seguir.

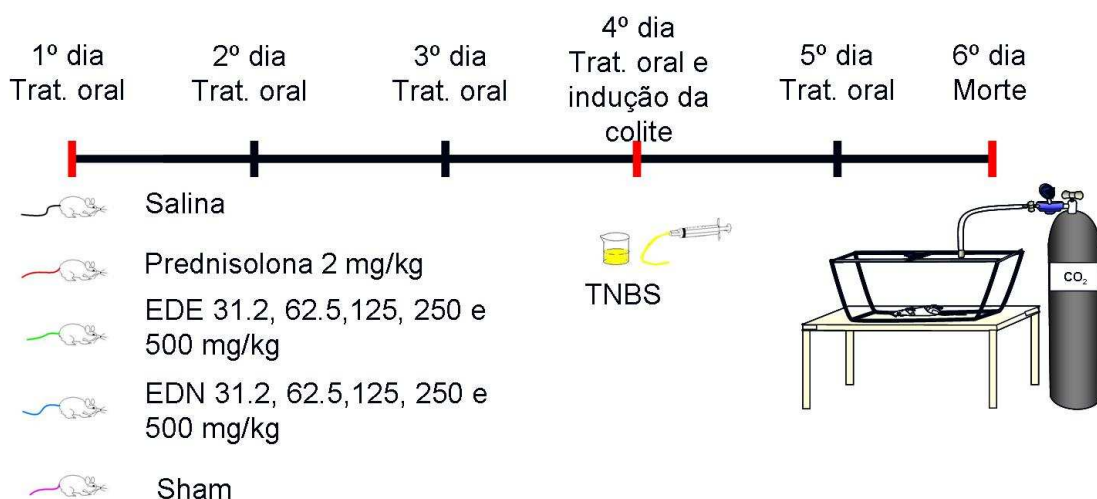


Figura 4: Esquema do procedimento experimental de tratamento e indução de colite aguda nos animais tratados com os extratos de metanólicos de *D. elliptica* e *D. nitida*

Este modelo serviu como triagem para caracterização da atividade antiinflamatória dos extratos, sendo esta uma abordagem preventiva da colite experimental.

III.3.2. Modelo de colite crônica com recidiva

Seguindo o esquema da figura 5, o processo inflamatório foi induzido com a solução de TNBS/etanol 50% no início do procedimento experimental. A partir da indução da inflamação, os grupos foram tratados durante três períodos distintos: 7, 14 e 21 dias. Cada período de tratamento apresentou todos os grupos experimentais (sham, salina, prednisolona, EDE e EDN), sendo que ao final de cada período os grupos de animais foram mortos para possibilitar a análise dos efeitos advindos da administração dos extratos de *Davilla elliptica* e *D. nitida* em diferentes períodos do processo de inflamatório. A morte por guilhotinamento foi necessária para a obtenção de amostras séricas no intuito de caracterizar possíveis efeitos tóxicos dos extratos através de quantificações de parâmetros que serão descritos a diante. A recidiva foi somente induzida nos animais tratados até 21 dias, exatamente no 14º dia de tratamento com a aplicação de outra dose do agente indutor para mimetizar as recidivas, recorrentes nas doenças inflamatórias intestinais em humanos. Todos os animais mortos tiveram o cólon retirado para a análise de parâmetros macroscópicos, bioquímicos e inflamatórios dos animais, como descrito a seguir.

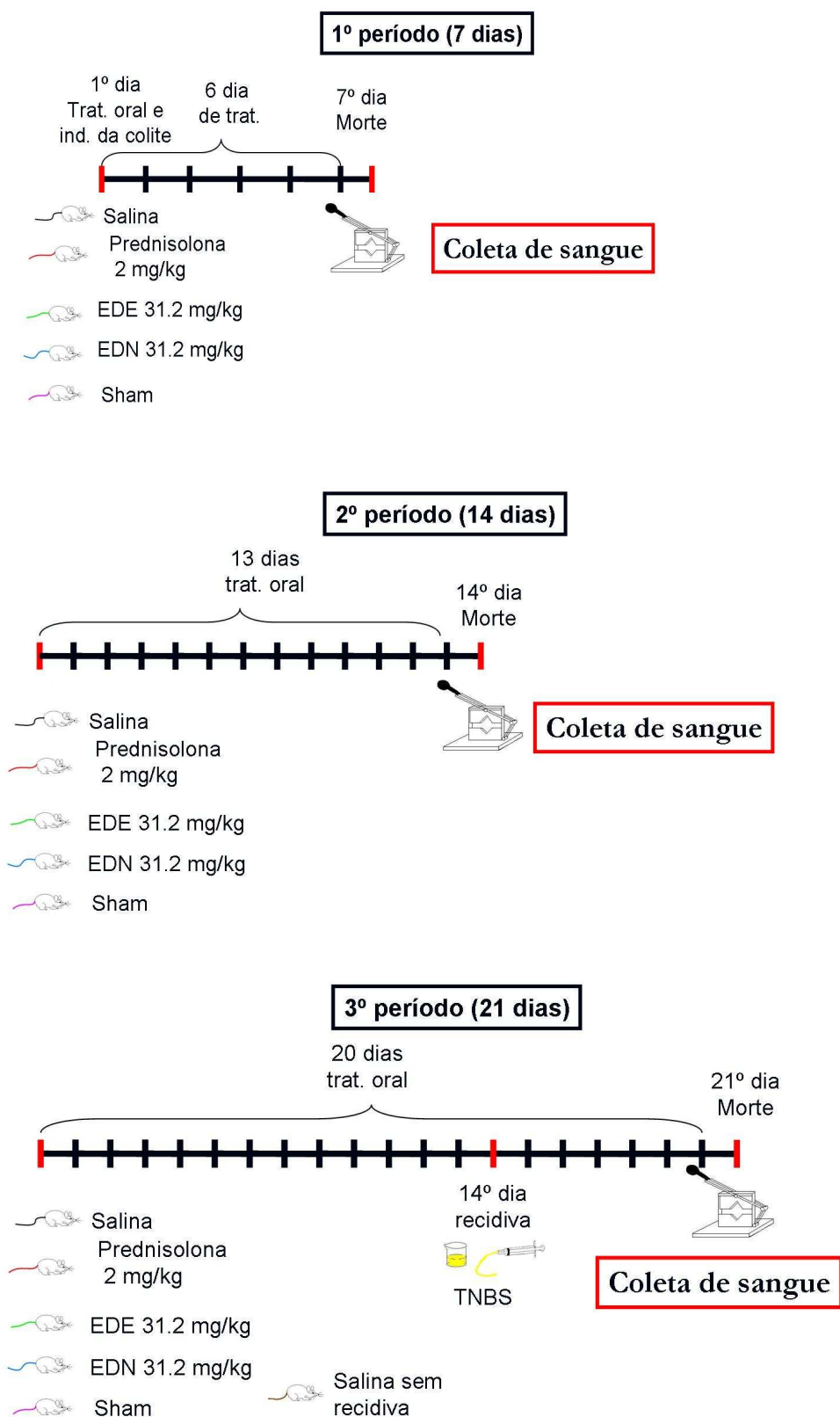


Figura 5: Esquema do procedimento experimental de indução de colite crônica com recidiva nos animais tratados, em 3 períodos diferentes, com os extratos de metanólicos de *D. elliptica* e *D. nitida*

III.3.3. Avaliação do processo inflamatório intestinal

No decorrer de todos os experimentos, foram avaliados diferentes parâmetros de caráter geral, tais como: consumo de alimento e evolução do peso corporal.

Ao final de cada experimento, o cólon retirado dos animais passou por uma análise macroscópica inicial, sendo avaliados o peso, comprimento, análise da severidade e extensão do prejuízo intestinal de acordo com uma escala descrita previamente por Bell *et al.*, 1995 (Tabela 3). Após essa avaliação inicial, os cólons foram escaneados para posterior análise das lesões a partir do analisador de imagens AVSoft Bioview[®], em seguida foram seccionados em tiras delgadas para a análise de parâmetros bioquímicos e inflamatórios.

Escore	Critério
0	Sem prejuízo
1	Hiperemia, sem úlceras
2	Úlcera linear sem inflamação significativa
3	Úlcera linear com inflamação em um sítio
4	Dois ou mais sítios de ulceração/inflamação
5	Dois ou mais sítios de ulceração e inflamação ou um sítio de inflamação maior que 1 cm ao longo da extensão do cólon
6-10	Se o prejuízo cobrir mais que 2 cm ao longo da extensão do cólon (o escore é aumentado em 1 ponto para cada centímetro adicional)

Tabela 3. Critério de determinação de escore de lesão cólica

III.3.4. Avaliação da atividade tóxica crônica dos extratos

Como parâmetros adicionais de atividade biológica, foram avaliados os possíveis efeitos tóxicos da administração crônica de EDE e EDN nos três períodos experimentais: 7,14 e 21 dias. Esses parâmetros envolveram a análise da evolução do peso corporal e quantificação dos níveis séricos dos seguintes parâmetros bioquímicos e enzimáticos: γ -GT (gama glutamiltransferase), uréia, creatinina, AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase) e glicose, quantificados utilizando-se o analisador bioquímico automático SBA-200 e kits cinéticos e colorimétricos CELM[®], Brasil. Para o período de 21 dias, foram coletados os órgãos, tais como: coração, pulmões, fígado, baço e rins, a fim de se verificar possíveis alterações macroscópicas.

III.3.5. Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos e Inflamatórios

a) Atividade da mieloperoxidase

Porções de toda extensão do cólon foram armazenadas para quantificação da atividade da mieloperoxidase. As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato com brometo hexadeciltrimetilamonio e sua atividade medida através da reação entre a mieloperoxidase e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo revelado pela o-dianisidina e quantificado em leitor de placa de ELISA pelo comprimento de onda de 450 nm (Krawisz *et al.*, 1984).

b) Atividade da fosfatase alcalina (Bessey *et al.*, 1946)

Neste modelo a fosfatase alcalina promove a hidrólise de p-nitrofenilfosfato sódico (5,5 mM) em tampão glicina (50 mM, pH =10,5), que ao incorporar $MgCl_2$, forma o p-nitrofenol. Esta molécula foi determinada através de espectrofotometria em um comprimento de onda de 405 nm, o que fornece de maneira indireta a concentração da fosfatase alcalina. Os resultados foram expressos em mU/mg de proteína. A

quantificação das proteínas totais foi realizada pelo método do ácido bicinchoninico (Smith *et al.*, 1985).

c) Conteúdo de glutathiona total (Anderson, 1985)

O conteúdo de glutathiona total do cólon foi determinado utilizando-se a substância 5,5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB). A reação enzimática tem início com a oxidação da glutathiona presente na amostra em contato com o DTNB. Em seguida, ao se adicionar a enzima glutathiona redutase, juntamente com NADPH, ocorre a redução da do conteúdo de glutathiona, cuja concentração é determinada pela velocidade redução do DTNB, mensurado em espectrofotômetro em comprimento de onda de 412 nm.

d) Quantificação de IL-1 β e TNF- α

As tiras de cólon foram devidamente homogeneizadas em tampão fosfato de pH 7,2-7,4 na proporção 1:5. Foram utilizados kits da R&D systems (Duoset Elisa Development System) para dosagem de IL 1- β (DY501) e TNF- α (DY510), específicos para dosagem em ratos. Os dados de concentração das citocinas foram relacionados com a quantidade de proteína total quantificada pelo método ácido bicinchoninico (Smith *et al.*, 1985).

III.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos na forma de média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) ou mediana e valores mínimo-máximo dos parâmetros avaliados. Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste de *a posteriori* de Dunnet ou Kruskal-Wallis e teste de *a posteriori* de Dunn. As análises estatísticas utilizadas obedeceram à classificação como paramétricos ou não-paramétrico, de acordo com cada experimento executado, onde a significância mínima considerada foi de $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS

IV.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DOS EXTRATOS METANÓLICOS DE *Davilla elliptica* (EDE) E *Davilla nitida* (EDN) EM COLITE ULCERATIVA AGUDA INDUZIDA POR TNBS

IV.1.1. Avaliação dos parâmetros macroscópicos do cólon, consumo alimentar e evolução do peso corporal

Inicialmente foi realizado um experimento piloto com o objetivo de se avaliar uma possível ação antiinflamatória no modelo colite experimental com as doses de 250 e 500 mg/kg dos extratos de EDE e EDN. Ao observar a figura 6, é possível verificar uma tendência de redução das lesões promovidas pelo processo inflamatório, com a administração menores doses de ambos os extratos, porém sem alterações estatisticamente significativas entre os grupos.

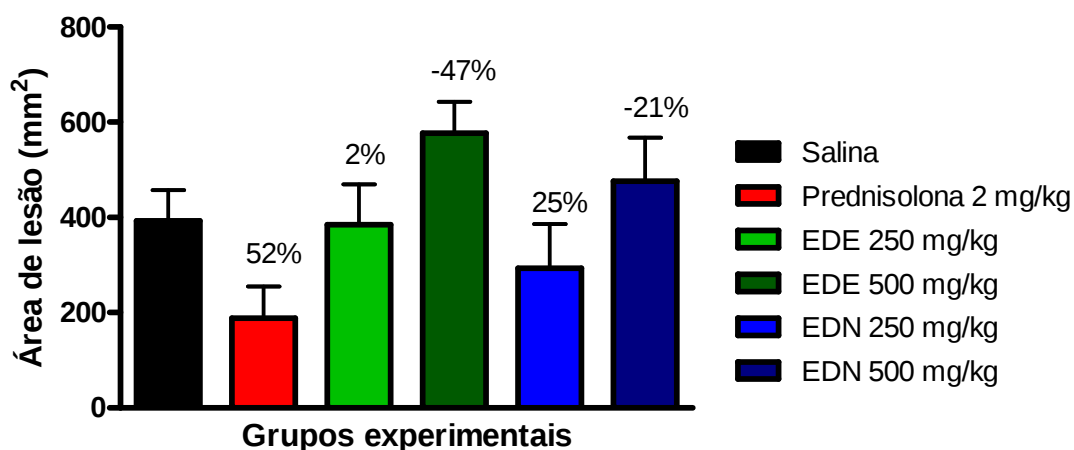


Figura 6. Efeito da administração dos extratos metanólicos de *Davilla elliptica* (EDE) e *D. nitida* (EDN) sobre a área de lesão do cólon em ratos com colite experimental aguda induzida por TNBS. Resultados expressos em média $\pm$ e. p. m. de lesão do cólon (n=7). ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnet, comparado ao grupo salina. Resultados percentuais de redução das lesões em relação aos animais tratados com salina.

A partir dos resultados da figura 6, foram selecionadas doses menores de 31.2, 62,5 e 125 mg/kg de EDE e EDN potencialmente capazes de promover a redução da colite experimental. Com a administração de EDE e EDN nessas diferentes doses, durante 5 dias, não foi possível observar alterações na evolução do peso corporal (figura 7).

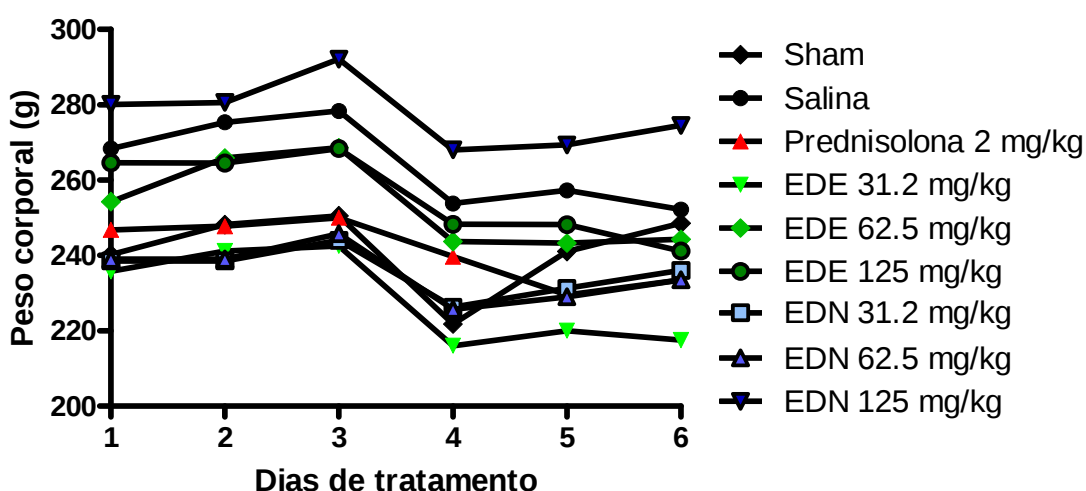


Figura 7. Evolução do peso corporal de ratos tratados com extratos metanólicos de *Davilla elliptica* (EDE) e *D. nitida* (EDN) em modelo de colite experimental aguda induzida por TNBS. Resultados expressos em média de peso corporal registrados diariamente (n=6-7). ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnet, comparado ao grupo salina e sham.

Os resultados demonstrados na tabela 4 indicam um potente efeito redutor da área de lesão nos animais tratados com EDN nas três diferentes doses. EDE também foi capaz de reduzir a área de necrose, nas doses de 31.2 e 62.5 mg/kg. Porém, não houve uma correspondência direta entre a redução da área de lesão de EDE e o escore de severidade. Somente os grupos tratados com prednisolona e EDN, em todas as doses foram capazes de reduzir os escores da inflamação.

Durante o tratamento com EDE e EDN, não foram observadas alterações no consumo de alimentar em relação aos animais dos grupos controle salina (tabela 4). Após a morte dos animais foi possível observar um aumento significativo da relação peso/comprimento do cólon do grupo sham quando comparados ao grupo salina (tabela 4).

Grupos experimentais	Dose (mg/kg)	Área de lesão (mm ²)	Percentual de redução da área de lesão	Escore	Peso/comprimento do cólon (mg/cm)	Consumo de ração diário/animal (g)
Sham		----		----	105.8 ± 6.9 ^{**}	25.5 ± 1.0
Salina		606.2 ± 55.9		6.0 (6.0-7.0)	169.5 ± 9.6	20.1 ± 4.9
Prednisolona	2	126.1 ± 42.4 ^{***}	79%	4.0 (1.0-5.0) ^{***}	150.2 ± 10.3	21.8 ± 2.4
<i>D. elliptica</i>	31.2	264.9 ± 51.1 [*]	56%	5.0 (4.0-6.0)	163.4 ± 6.4	18.9 ± 3.8
	62.5	276.2 ± 103.5 [*]	54%	5.0 (4.0-7.0)	156.8 ± 4.5	21.5 ± 4.2
	125	409.8 ± 62.0	32%	5.0 (5.0-6.0)	185.6 ± 8.1	23.0 ± 5.9
<i>D. nitida</i>	31.2	120.5 ± 50.4 ^{**}	80%	4.0 (1.0-5.0) ^{***}	166.2 ± 6.5	19.7 ± 3.8
	62.5	238.0 ± 61.4 [*]	61%	4.0 (4.0-5.0) ^{**}	182.4 ± 7.8	22.4 ± 3.5
	125	219.0 ± 73.1 ^{**}	64%	4.5 (4.0-6.0) [*]	168.9 ± 6.9	24.7 ± 3.2

Tabela 4 – Efeito da administração dos extratos metanólicos de *Davilla elliptica* (EDE) e *D. nitida* (EDN) sobre parâmetros macroscópicos do cólon e consumo alimentar de ratos com colite experimental aguda induzida por TNBS. Resultados expressos em média ± e. p. m ou em mediana e (mínimo-máximo) dos parâmetros analisados (n=6-7). Para os dados paramétricos foi utilizado (média ± e.p.m.) ANOVA e teste *a posteriori* de Dunnet, para os dados não paramétricos (mediana, mínimo-máximo) Krukall Walis e teste *a posteriori* de Dunn, para ^{*} p < 0.05, ^{**} p < 0.01 e ^{***} p < 0.001, comparado ao grupo salina.

IV.1.2. Quantificação dos parâmetros bioquímicos do processo inflamatório

A partir das amostras de cólon coletadas no experimento agudo de indução de colite foram realizadas diferentes análises bioquímicas com a finalidade de se caracterizar possíveis mecanismos de ação de EDE e EDN. Ao se quantificar a concentração de glutathiona total cólico (figura 8) foi possível observar a manutenção dos níveis normais de glutathiona somente nos animais tratados com prednisolona. Nos grupos tratados com EDE e EDN existe tendência na manutenção dos níveis de glutathiona, principalmente na dose de 31.2 mg/kg, porém sem diferença estatística em relação ao grupo controle salina.

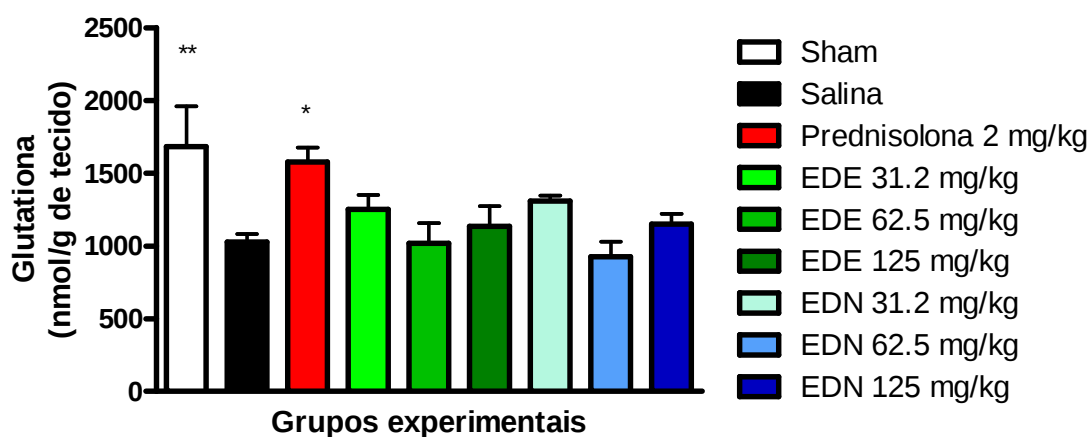


Figura 8. Efeito da administração dos extratos metanólicos de *Davilla elliptica* (EDE) e *D. nitida* (EDN) sobre os níveis de glutathiona total em ratos com colite experimental aguda induzida por TNBS. Resultados expressos em média $\pm$ e. p. m (n=6-7). ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnet, para * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$, comparado ao grupo salina.

Ao se medir a concentração de fosfatase alcalina no cólon dos animais, observa-se uma tendência de aumento progressivo dessa concentração com a administração de EDE, de maneira dose-dependente. Enquanto a administração de EDN promoveu aumento significativo desse parâmetro nas menores doses em relação, ao grupo salina (figura 9).

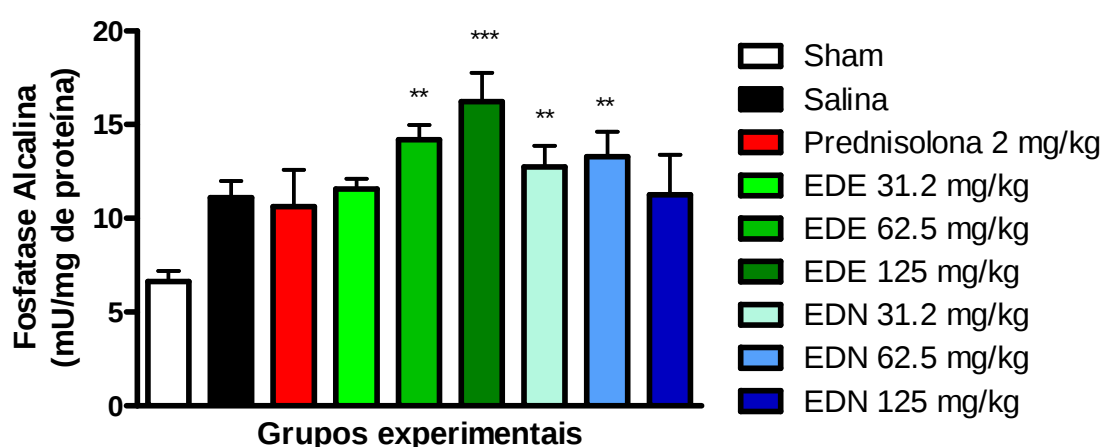


Figura 9. Efeito da administração dos extratos metanólicos de *Davilla elliptica* (EDE) e *D. nitida* (EDN) sobre os níveis de fosfatase alcalina em ratos com colite experimental aguda induzida por TNBS. Resultados expressos em média $\pm$ e. p. m (n=6-7). ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnet, para ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, comparado ao grupo salina.

Os tratamentos orais de EDE (62,5 mg/kg) e de EDN (todas as doses) reduziram de maneira significativa os níveis de mieloperoxidase cólica, em relação ao grupo que recebeu somente salina (figura 10).

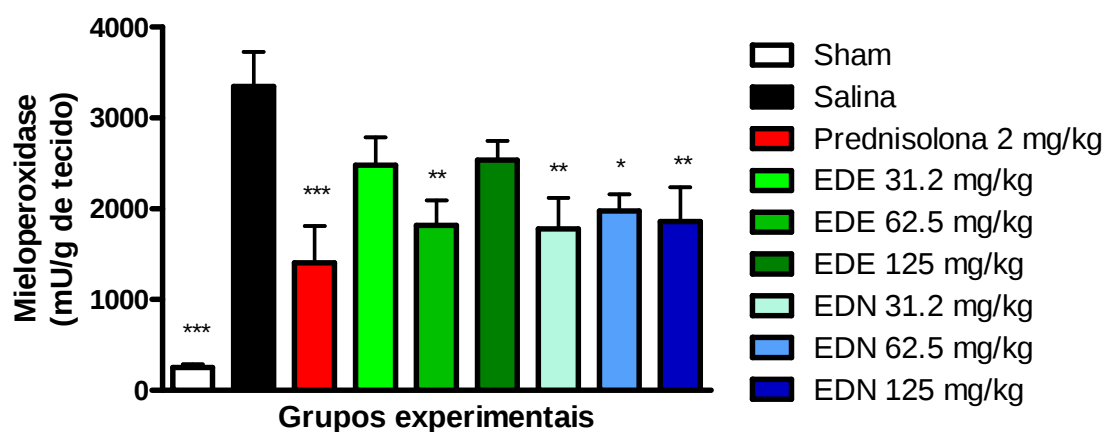


Figura 10. Efeito da administração dos extratos metanólicos de *Davilla elliptica* (EDE) e *D. nitida* (EDN) sobre os níveis de mieloperoxidase em ratos com colite experimental aguda induzida por TNBS. Resultados expressos em média $\pm$ e. p. m (n=6-7). ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnet, para * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, comparado ao grupo salina.

IV.1.3. Quantificação de IL-1 β e TNF- α

Ao quantificar a citocina pro inflamatória TNF- α , observa-se a redução de sua concentração, promovida pela administração de EDE (125 mg/kg) e EDN (em todas as doses, de maneira dose-dependente), quando comparado ao grupo controle tratado com salina (figura 11).

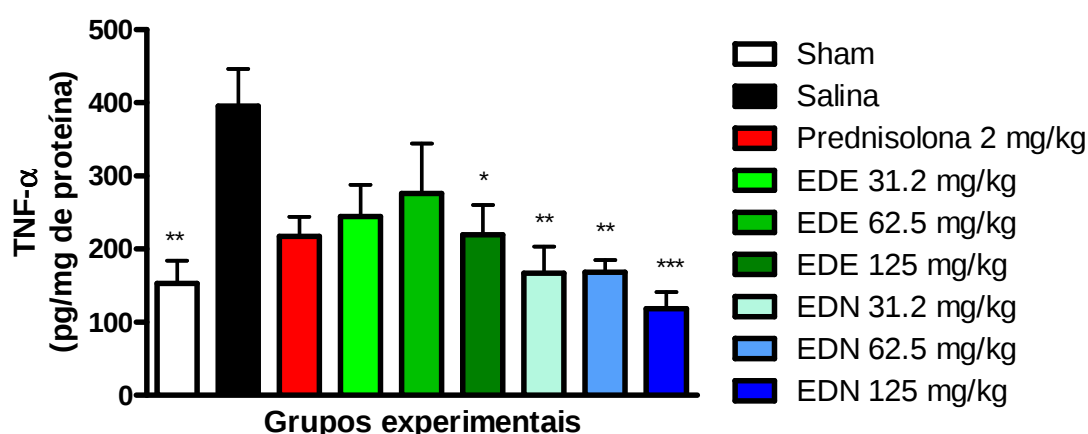


Figura 11. Efeito da administração dos extratos metanólicos de *Davilla elliptica* (EDE) e *D. nitida* (EDN) sobre os níveis de TNF- α em ratos com colite experimental aguda induzida por TNBS. Resultados expressos em média $\pm$ e. p. m (n=6-7). ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnet, para * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, comparado ao grupo salina.

Resultado semelhante ocorre com a quantificação de IL-1 β , pois EDE, nas doses de 62,5 e 125 mg/kg, e EDN, em todas as doses, foram capazes de reduzir de maneira dose-dependente a concentração de IL-1 β em relação ao grupo salina (figura 12).

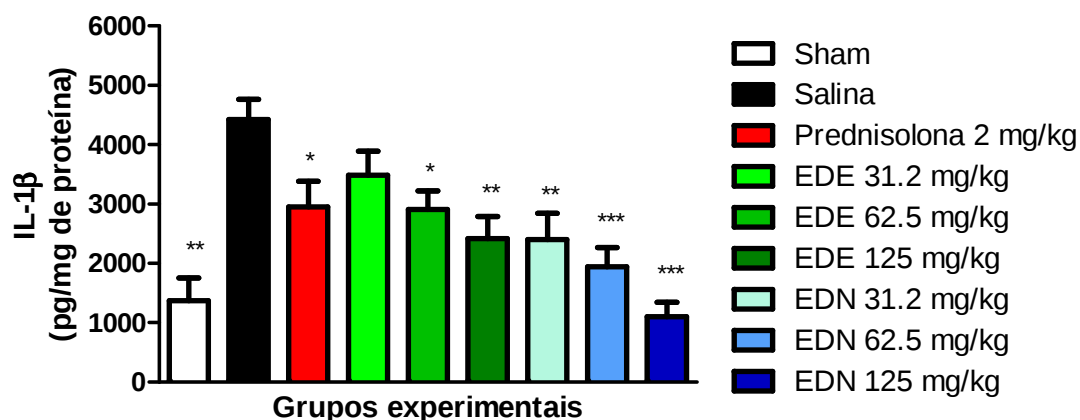


Figura 12. Efeito da administração dos extratos metanólicos de *Davilla elliptica* (EDE) e *D. nitida* (EDN) os sobre níveis de IL-1 β em ratos com colite experimental aguda induzida por TNBS. Resultados expressos em média $\pm$ e. p. m (n=6-7). ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnet, para * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ comparado ao grupo salina.

IV.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DOS EXTRATOS METANÓLICOS DE *Davilla elliptica* (EDE) e *Davilla nitida* (EDN) EM COLITE CRÔNICA COM RECIDIVA, INDUZIDA POR TNBS

IV.2.1. Avaliação dos parâmetros macroscópicos do cólon, consumo alimentar e evolução do peso corporal

Foram realizadas as avaliações da atividade de EDE e EDN durante os 3 períodos de tratamento (7, 14 e 21 dias), com a finalidade de caracterizar as ações dos extratos sobre a evolução do processo inflamatório crônico nos animais. Para tanto, foi selecionada a menor dose efetiva (31.2 mg/kg) capaz de reduzir a área de lesão no experimento agudo de colite.

Como um dos parâmetros de toxicidade, foi avaliada a evolução do peso corporal dos animais durante os tratamentos nos 3 períodos. Não se observa diferença significativa na evolução do peso corporal entre os animais tratados com os extratos e os controles salina e sham (figura 13).

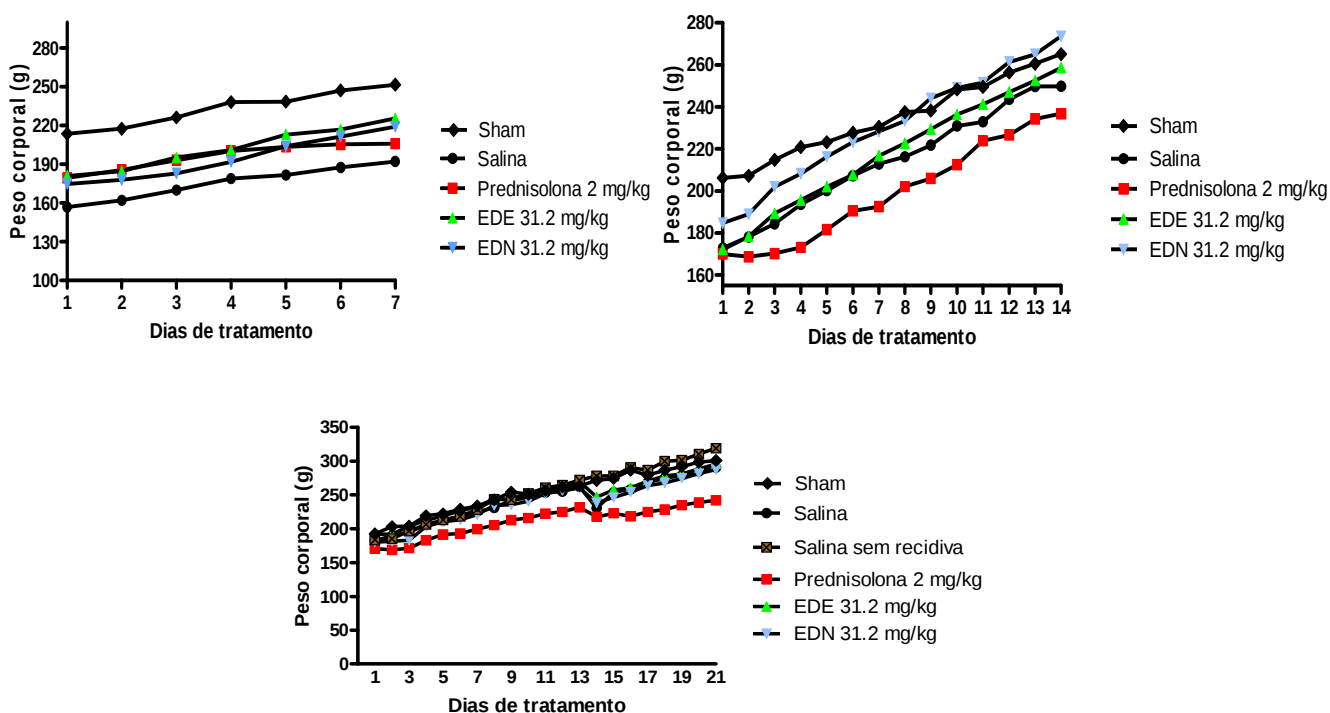


Figura 13. Evolução do peso corporal de ratos tratados com extratos metanólicos de *Davilla elliptica* (EDE) e *D. nitida* (EDN) após 7, 14 e 21 dias de tratamento em modelo crônico de colite com recidiva induzida por TNBS. Resultados expressos em média de peso corporal anotados diariamente (n=6-7). ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnet, comparado ao grupo salina e sham.

Na tabela 5, a comparação entre os resultados das dosagens dos parâmetros bioquímicos de toxicidade entre o grupo salina e EDN, indicam a redução dos níveis de AST, ALT, γ -GT e uréia nos animais tratados por 7 dias com EDN. Entretanto o tratamento com prednisolona demonstrou um aumento da concentração da glicose sérica. Aos 14 dias, os níveis de γ -GT foram reduzidos com a administração de prednisolona, EDE e EDN em comparação ao grupo salina. Com 21 de tratamento, prednisolona reduziu os níveis de γ -GT, enquanto as administrações de EDE e EDN promoveram o aumento de glicose em relação ao grupo salina.

Grupos experimentais	Dose (mg/kg)	AST U/L	ALT U/L	γ -GT U/L	Creatinina mg/dL	Uréia mg/dL	Glicose U/L
7 dias de tratamento	Salina	176.4 $\pm$ 8.9	45.6 $\pm$ 3.2	12.8 $\pm$ 1.9	0.30 $\pm$ 0.00	30.6 $\pm$ 2.2	110.2 $\pm$ 6.5
	Prednisolona	150.7 $\pm$ 7.2	40.6 $\pm$ 3.5	8.9 $\pm$ 2.0	0.34 $\pm$ 0.02	42.7 $\pm$ 3.8	142.9 $\pm$ 15.0*
	EDE	151.1 $\pm$ 5.1	40.4 $\pm$ 1.3	9.2 $\pm$ 1.5	0.36 $\pm$ 0.02	38.0 $\pm$ 2.0	132.9 $\pm$ 4.3
	EDN	137.7 $\pm$ 7.3**	35.8 $\pm$ 0.9*	4.2 $\pm$ 0.5**	0.34 $\pm$ 0.03	44.7 $\pm$ 5.5*	124.6 $\pm$ 4.5
14 dias de tratamento	Salina	190.0 $\pm$ 11.8	44.6 $\pm$ 1.6	6.9 $\pm$ 0.8	0.36 $\pm$ 0.02	46.8 $\pm$ 1.7	115.4 $\pm$ 6.1
	Prednisolona	200.4 $\pm$ 13.4	45.5 $\pm$ 3.0	3.5 $\pm$ 0.6***	0.40 $\pm$ 0.05	45.8 $\pm$ 1.1	116.0 $\pm$ 4.7
	EDE	182.7 $\pm$ 11.7	48.7 $\pm$ 3.6	2.2 $\pm$ 0.3***	0.37 $\pm$ 0.02	49.1 $\pm$ 1.7	124.0 $\pm$ 5.3
	EDN	172.5 $\pm$ 4.0	46.3 $\pm$ 3.1	2.1 $\pm$ 0.4***	0.36 $\pm$ 0.02	44.7 $\pm$ 2.8	126.6 $\pm$ 4.5
21 dias de tratamento	Salina	151.8 $\pm$ 11.6	41.1 $\pm$ 1.8	4.4 $\pm$ 1.0	0.37 $\pm$ 0.03	55.6 $\pm$ 1.2	107.9 $\pm$ 2.3
	Salina sem recidiva	189.8 $\pm$ 18.7	46.2 $\pm$ 0.9	2.1 $\pm$ 0.2	0.34 $\pm$ 0.02	55.9 $\pm$ 0.7	107.3 $\pm$ 3.9
	Prednisolona	160.9 $\pm$ 23.7	51.3 $\pm$ 7.5	1.9 $\pm$ 0.2*	0.37 $\pm$ 0.03	47.7 $\pm$ 3.6	131.3 $\pm$ 10.6
	EDE	188.5 $\pm$ 20.9	46.3 $\pm$ 1.5	4.0 $\pm$ 0.9	0.40 $\pm$ 0.00	45.3 $\pm$ 0.6	134.3 $\pm$ 5.3*
	EDN	207.7 $\pm$ 20.5	53.2 $\pm$ 4.6	3.0 $\pm$ 0.4	0.40 $\pm$ 0.03	48.1 $\pm$ 2.7	138.7 $\pm$ 8.3*

Tabela 5 – Efeito da administração dos extratos metanólicos de *Davilla elliptica* (EDE) e *D. nitida* (EDN) sobre parâmetros de toxicidade bioquímica após 7, 14 e 21 dias de tratamento em ratos com col te crônica induzida por TNBS. Resultados expressos em média $\pm$ e.p.m (n=6-7). ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnet, para * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, comparado ao grupo salina. Valores de referência: AST=129-138 U/L; ALT = 114-290 U/L; γ -GT = 4-12 U/L; Creatinina = 0.3-0.6 mg/dL; Uréia = 41-45 mg/dL; Glicose = 150-207 U/L (USP, 2008; Shamsi *et al.*, 2006).

No grupo dos animais tratados durante 21 dias, foram analisados os pesos de órgãos (baço, coração, fígado, pulmões e rins), o peso de cada órgão foi relacionado com a massa corpórea de cada animal. Somente foi observada alteração dessa relação no baço dos animais tratados com prednisolona, quando comparado ao grupo salina (tabela 6).

Tratamentos	Doses (mg/kg)	Baço	Coração	Fígado	Pulmões	Rins
Salina		3.17 ± 0.19	3.38 ± 0.08	11.59 ± 0.19	4.28 ± 0.25	5.00 ± 0.07
Salina sem recidiva		2.74 ± 0.04	3.43 ± 0.08	11.26 ± 0.30	4.12 ± 0.10	4.95 ± 0.06
Prednisolona	2	3.03 ± 0.09 **	3.35 ± 0.07	11.52 ± 0.18	4.48 ± 0.30	4.92 ± 0.08
EDE	31.2	3.20 ± 0.05	3.50 ± 0.05	11.39 ± 0.09	4.35 ± 0.23	4.85 ± 0.05
EDN	31.2	2.95 ± 0.04	3.39 ± 0.05	11.74 ± 0.17	4.15 ± 0.20	4.81 ± 0.07

Tabela 6 – Efeito da administração dos extratos metanólicos de *Davilla elliptica* (EDE) e *D. nitida* (EDN) sobre parâmetros toxicidade macroscópicos após 7, 14 e 21 dias de tratamento em colite crônica induzida por TNBS em ratos. Resultados expressos em média ± e. p. m. do arcoseno da relação dos pesos do órgão/corpóreo (n=6-7). ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnet, para ** p < 0.01, comparado ao grupo salina.

A avaliação dos escores de lesão do cólon demonstrou uma recuperação dos animais tratados com EDE após 7 dias de tratamento, EDN reduziu a severidade das lesões do cólon após 14 dias de tratamento em relação aos animais do grupo salina. Após 21 dias de tratamento com EDE e EDN, não ocorreram alterações do escore lesão, somente prednisolona foi capaz de reduzir as lesões do cólon. Nenhum dos tratamentos alterou a relação peso/comprimento nos 3 períodos avaliados e a administração de prednisolona durante os 21 dias fez com que a média de consumo de alimentar fosse reduzida em relação ao controle salina (tabela 7).

	Grupos experimentais	Dose (mg/kg)	Escore	Peso/comprimento do cólon	Consumo de ração/animal
s7 dias de tratamento	Sham		----	96.5 ± 5.1 ^{**}	23.9 ± 0.58
	Salina		6.0 (5.0-7.0)	148.2 ± 6.3	17.3±1.7
	Prednisolona	2	4.0 (1.0-5.0) [*]	166.9 ± 11.3	18.5±0.9
	EDE	31.2	2.0 (2.0-6.0) ^{**}	158.9 ± 11.7	19.5±2.7
	EDN	31.2	4.0 (2.0-5.0)	153.0 ± 12.4	18.4±3.3
14 dias de tratamento	Sham		----	96.1 ± 3.4 ^{***}	21.6 ± 0.5
	Salina		4.0 (2.0-4.0)	171.0 ± 10.8	21.5±1.0
	Prednisolona	2	2.0 (0.0-4.0)	157.5 ± 9.9	22.2 ± 1.9
	EDE	31.2	2.0 (1.0-3.0)	165.8 ± 13.6	22.9 ± 1.0
	EDN	31.2	2.0 (0.0-4.0) [*]	151.6 ± 11.9	24.1 ± 1.2
21 dias de tratamento	Sham		----	109.8 ± 10.0 ^{**}	24.6 ± 0.2
	Salina		5.0 (1.0-7.0)	180.7 ± 10.9	22.6 ± 1.1
	Salina sem recidiva		2.0 (1.0-3.0) ^{**}	145.4 ± 6.1	24.35 ± 1.5
	Prednisolona	2	5.0 (4.0-6.0)	177.5 ± 13.0	18.8 ± 1.26 ^{***}
	EDE	31.2	4.0 (3.0-4.0)	179.0 ± 3.7	22.5 ± 1.4
	EDN	31.2	4.0 (4.0-6.0)	181.2 ± 4.9	22.8 ± 1.5

Tabela 7- Avaliação dos parâmetros macroscópicos e alimentares de ratos submetidos ao modelo crônico de colite induzida por TNBS e tratados durante 7, 14 e 21 dias com extratos metanólicos de *Davilla elliptica* (EDE) e *Davilla nitida* (EDN). Resultados expressos em média ± e. p. m ou em mediana e (mínimo-máximo) dos parâmetros analisados (n=6-7). Para os dados paramétricos (média ± e.p.m.) ANOVA e teste *a posteriori* de Dunnet, para os dados não paramétricos (mediana, mínimo-máximo) Krukall Walis e teste *a posteriori* de Dunn, para ^{*} p < 0.05, ^{**} p < 0.01 e ^{***} p < 0.001 comparado ao grupo salina.

IV.2.2. Quantificação dos parâmetros bioquímicos do processo inflamatório

A quantificação dos níveis cólicos de glutathione demonstra que os tratamentos não foram capazes de promover um aumento significativo na concentração deste fator antioxidativo, após 7 dias de administração em comparação ao grupo salina. Com 14 e 21 dias de tratamento, somente o tratamento com EDN foi capaz de elevar os níveis de glutathione em relação ao grupo tratado com salina (figura 14).

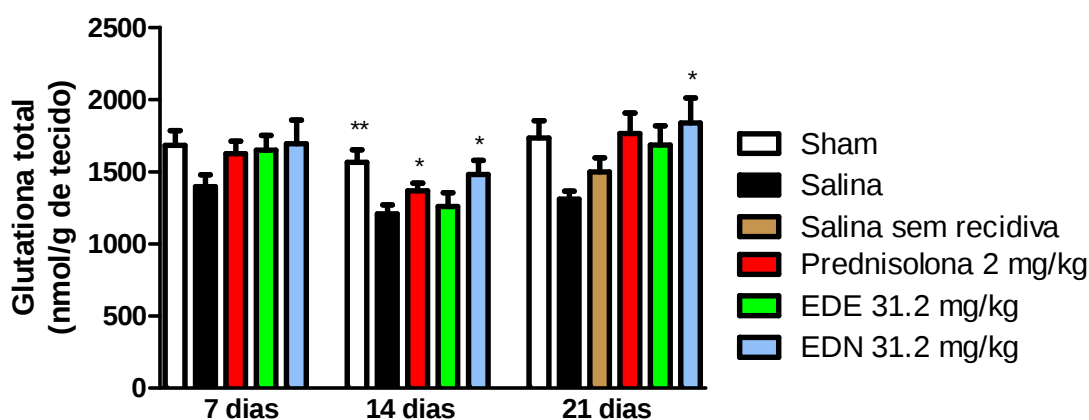


Figura 14. Efeito da administração dos extratos metanólicos de *Davilla elliptica* (EDE) e *D. nitida* (EDN) sobre níveis de glutathione após 7, 14 e 21 de tratamento em modelo crônico de colite induzida por TNBS em ratos. Resultados expressos em média $\pm$ e.p.m. (n=6-7). ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnet, para * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, comparado ao grupo salina.

A figura 15 refere-se aos dados obtidos da dosagem de fosfatase alcalina em porções de cólon dos diferentes grupos experimentais. Apesar de promover a redução dos níveis de fosfatase, os grupos de animais tratados com EDE e EDN não apresentam redução significativa deste parâmetro quando comparado ao grupo tratado com salina em nenhum dos períodos avaliados.

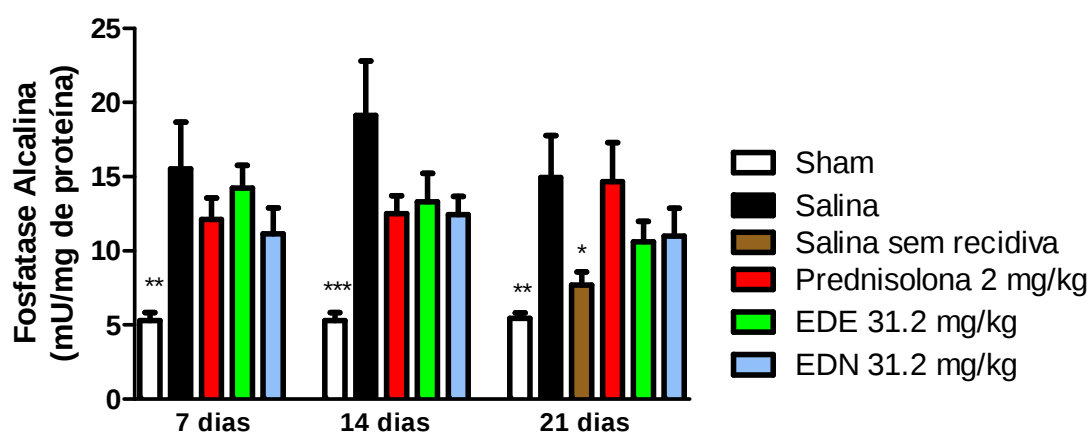


Figura 15. Efeito da administração dos extratos metanólicos de *Davilla elliptica* (EDE) e *D. nitida* (EDN) sobre os níveis de fosfatase alcalina após 7, 14 e 21 de tratamento em modelo crônico de colite induzida por TNBS em ratos. Resultados expressos em média $\pm$ e.p.m. (n=6-7). ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnet, para * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, comparado ao grupo salina.

A administração de EDN reduziu de maneira significativa as concentrações de mieloperoxidase nos 3 períodos de tratamentos analisados. EDE, apesar de manter níveis baixos em todos os períodos, apresentou redução significativa de mieloperoxidase somente com 7 dias de tratamento em comparação à salina (figura 16).

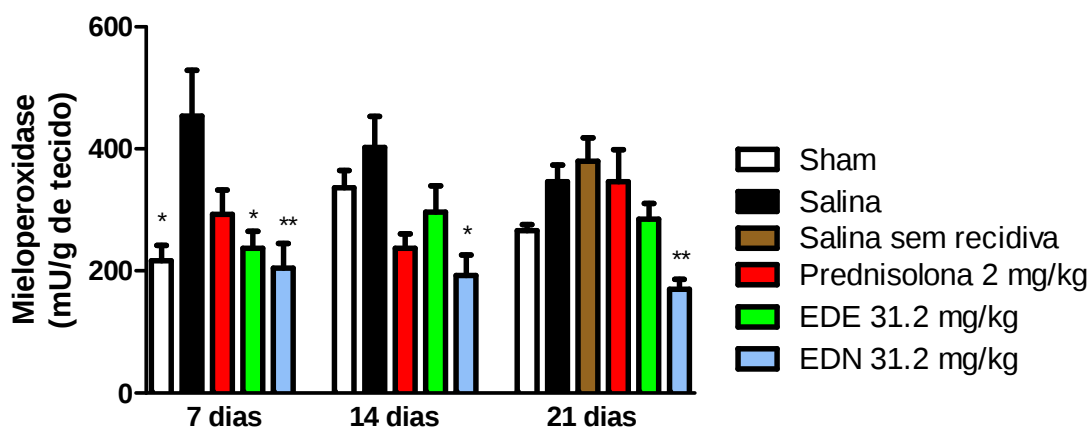


Figura 16. Efeito da administração dos extratos metanólicos de *Davilla elliptica* e *D. nitida* sobre níveis de mieloperoxidase após 7, 14 e 21 de tratamento em modelo crônico de colite induzida por TNBS em ratos. Resultados expressos em média $\pm$ e.p.m. (n=6-7). ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnet, para * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$, comparado ao grupo salina.

IV.2.3. Quantificação de TNF- α e IL1- β

Com a determinação da concentração de TNF- α , é nítido a atividade de EDE e EDN na redução dessa citocina, após 7 e 14 dias de tratamento comparado ao grupo salina (figura 17), porém ambas perdem sua capacidade anti-TNF na reincidência da colite devido a aplicação de TNBS, nos animais tratados com os extratos por 21 dias.

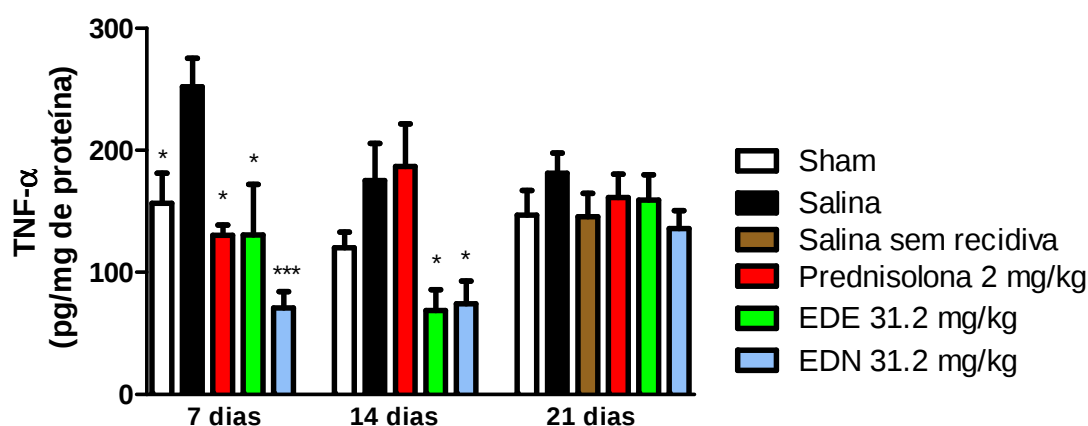


Figura 17. Efeito da administração dos extratos metanólicos de *Davilla elliptica* (EDE) e *D. nitida* (EDN) sobre os níveis de TNF- α após 7, 14 e 21 dias de tratamento em modelo crônico de colite induzida por TNBS em ratos. Resultados expressos em média $\pm$ e.p.m. (n=6-7). ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnet, para * p < 0.05, *** p < 0.001 comparado ao grupo salina.

Pela quantificação de IL-1 β nota-se que EDN promoveu redução de maneira significativa em todos os períodos analisados. Apesar de também baixar os níveis dessa citocina em todos os períodos, EDE reduziu significativamente os níveis de IL-1 β somente com 14 dias de tratamento, quando comparado ao grupo salina (figura 18).

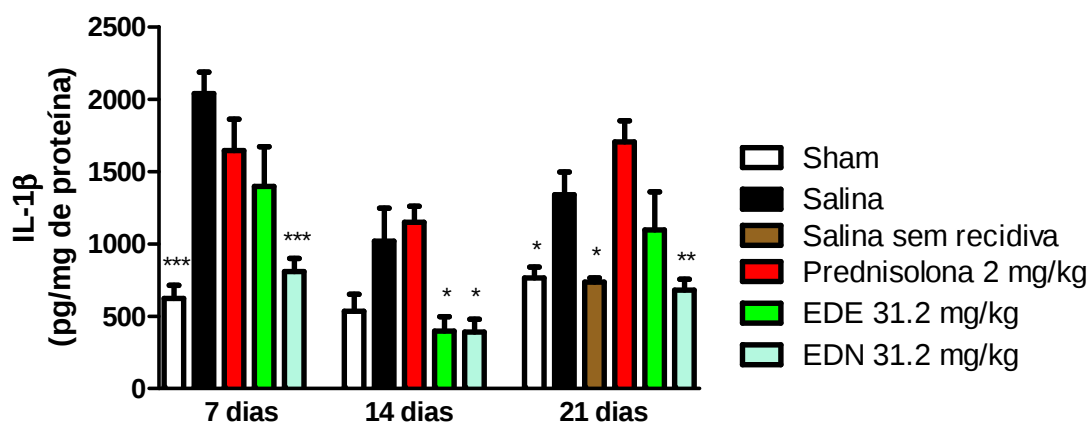


Figura 18. Efeito da administração dos extratos metanólicos de *Davilla elliptica* e *D. nitida* sobre níveis de IL-1 β após 7, 14 e 21 dias de tratamento em modelo crônico de colite ulcerativa por TNBS em ratos. Resultados expressos em média $\pm$ e.p.m. (n=6-7). ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnet, para * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, comparado ao grupo salina.

V. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A administração combinada de TNBS e etanol resulta no desenvolvimento de um processo inflamatório severo, transmural e granulomatoso no cólon, e a ulceração persiste por até 8 semanas. O TNBS age como um hapteno que ao se ligar às moléculas de alto peso molecular, como proteínas, adquire a capacidade de induzir o processo inflamatório. Porém, neste modelo experimental, há a necessidade de se administrar a solução TNBS com etanol, pois o etanol promove a ruptura da barreira protetora de muco intestinal, levando a penetração do TNBS, que isolado não promove o mesmo efeito inflamatório nos animais (Morris *et al.*, 1989).

Ao realizar o experimento piloto, somente com as doses de melhor atividade antiulcerogênica, como descritos no trabalho de Kushima *et al.* (2009), foi verificado que além de não reduzir as lesões no cólon, a administração da maior dose de EDE e EDN (500 mg/kg) provocou um aumento respectivo de 47% e 21% das áreas de lesões necrozantes promovidas pelo TNBS. Este efeito está provavelmente relacionado ao fato de haver uma grande quantidade de polifenóis na constituição dos extratos, principalmente de taninos condensados e flavonóides. Experimentos recentes, principalmente *in vitro*, demonstram que diversos fatores como concentração de polifenóis, baixos níveis de antioxidantes nos meios celulares, presença de íons metálicos, temperatura e pH interferem na estabilidade das moléculas dos polifenóis, levando a formação de quinonas, semiquinonas, ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio, que promovem efeitos pró-oxidativos nos tecidos (Sang *et al.*, 2007; Lambert *et al.*, 2007; Sang *et al.*, 2005; Awad *et al.*, 2001).

Apesar de faltarem elementos que comprovem definitivamente a responsabilidade dos polifenóis presentes em EDE e EDN pelo aumento das lesões dos animais tratados com a dose de 500 mg/kg, é inegável que ambos os extratos

promoveram um agravamento dessas lesões. Sendo a concentração dos polifenóis um dos fatores relacionados à indução de danos oxidativos, e visto que a dose de 250 mg/kg dos extratos apresentou menores áreas de lesão em relação a dose 500 mg/kg, a utilização de doses menores dos extratos poderia proporcionar a redução o processo inflamatório induzido pelo TNBS. Dessa forma, foi realizado um experimento agudo com as doses de 31.2., 62.5 e 125 mg/kg de ambos os extratos.

Ao analisar os resultados de área de lesão no experimento agudo com a administração das menores dose de ambos os extratos, pode-se notar uma redução significativa das áreas de lesão, sendo que EDN foi mais eficaz nessa redução em relação a EDE. A análise dos escores também indica uma maior atividade antiinflamatória por parte de EDN, pois todas as doses deste extrato foram significativamente menores em relação ao grupo salina, enquanto EDE não promoveu alteração desse parâmetro. Esses resultados demonstram que as altas doses dos extratos utilizadas inicialmente, estavam relacionadas com a ausência de atividade farmacológica na prevenção da colite ulcerativa induzida por TNBS/etanol.

A relação peso/comprimento é um indicador de inflamação (Talero *et al.*, 2008) na RCU experimental. EDE e EDN não foram capazes de reduzir essa relação no experimento agudo, devido a severidade do processo inflamatório provocado pelo TNBS. Outro parâmetro avaliado foi ingestão a alimentar, pois em pacientes com DII, ocorrem problemas de desnutrição relacionados principalmente a redução do consumo de alimento (Campos *et al.*, 2002), mas a administração dos extratos não promoveu alterações no consumo alimentar em relação aos animais tratados com salina.

Com base nos resultados de redução das lesões, exercida pela administração de EDE e EDN no experimento agudo, foram realizados os experimentos crônicos de colite, utilizando-se a dose 31.2 mg/kg (a menor dose efetiva).

A análise das lesões, no modelo crônico de indução de colite, levou em consideração somente o escore das lesões (parâmetro bem caracterizado na literatura). Outra tentativa de análise das áreas lesadas, pelo programa Bioview AVSoft[®], não se mostrou viável devido à dificuldade de padronização da leitura dessas áreas. Os escores demonstram uma variação nas ações de EDN e EDE. EDE reduziu a severidade das lesões somente no 7º dia, enquanto EDN no 14º dia. Apesar de não ser significativo em termos estatísticos, ambos os extratos foram capazes de reduzir as lesões nos 2 primeiros períodos, de maneira a apresentar um padrão de resposta semelhante. Vale salientar que os animais tratados com os extratos pelo período de 21 dias, receberam a recidiva da colite com a administração de TNBS/etanol no 14º dia, o que dificulta a redução da inflamação. Além disso, assim como no experimento agudo, EDE e EDN não promoveram alteração no consumo alimentar e foram incapazes de alterar a relação peso/comprimento do cólon, em nenhum dos períodos avaliados. O parâmetro peso/comprimento regride naturalmente após 3 semanas de indução da inflamação por TNBS, como demonstrado pelos resultados do grupo salina sem recidiva.

A confirmação dos efeitos preventivos e curativos de EDE e EDN levou à realização de novas análises para avaliar os possíveis mecanismos de ação desses extratos. Para tanto, foram utilizados parâmetros bioquímicos e imunológicos intimamente associados com o desenvolvimento do processo lesivo promovido pelas DII. Dentre os parâmetros bioquímicos destacam-se as alterações dos níveis de glutathiona total, da atividade da mieloperoxidase (MPO) e da fosfatase alcalina (FA).

Glutathiona é um importante fator antioxidante não enzimático que está presente em todas as células. Este componente na sua forma reduzida (GSH) pode se ligar a compostos tóxicos, como os radicais livres, em reações dependentes ou não de enzimas (Li *et al.*, 2009). A GSH é utilizada como substrato pelas enzimas da família da

glutathione S-transferase (GST) e da glutathione peroxidase (GPx). As enzimas GST apresentam a capacidade de conjugar GSH às moléculas de drogas, peróxidos e outros produtos do processo oxidativo para detoxificação celular, enquanto GPx compõem o grupo de enzimas capazes de reduzir uma variedade de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos utilizando GSH como molécula redutora (Oakley *et al.*, 2005; Massella *et al.*, 2005). Após ser oxidada, a glutathione pode sofrer um novo processo de redução por meio da enzima glutathione reductase (GR), retornando a seu estado de GSH. Havendo um desequilíbrio entre a GSH e sua forma oxidada (GSSG) ou conjugada, as células secretam o excesso da porção oxidada o que pode levar a depleção dos níveis de GSH. Porém existem mecanismos de retroalimentação para síntese *de novo* e redução da forma oxidada (Massella *et al.*, 2005).

No modelo de indução de colite por TNBS/etanol, verifica-se a redução dos níveis de glutathione total no cólon dos animais, devido ao estabelecimento do processo inflamatório (Luchini *et al.*, 2008; Camuesco *et al.*, 2005). A administração de EDE e EDN no modelo agudo, não promoveram aumento ou manutenção dos níveis basais de glutathione total nos três níveis de doses administrados em relação ao controle salina. Já no modelo crônico, com 14 e 21 dias de tratamento, EDN foi capaz de manter elevados os níveis de glutathione total. Estes dados indicam uma expressiva melhora dos animais tratados com EDN no modelo crônico por, pelo menos em parte, reduzir o processo de estresse oxidativo, promovendo a manutenção dos níveis de glutathione total próximo do normal. Apesar do tratamento com EDE manter os níveis de glutathione discretamente elevados após 7 e 21 dias de administração, este não representa um mecanismo de grande relevância para sua atividade farmacológica.

De acordo com o trabalho de Sanchez de Medina *et al.* (2004), a análise da atividade da FA serve como um marcador sensível da inflamação intestinal no modelo

de colite induzida por TNBS/etanol em ratos. Torres *et al.* (2007) realizaram análises histoquímicas de amostras intestinais de paciente com DII, e concluem que a expressão da atividade da FA é superior em paciente com DC em relação àqueles acometidos por RCU. Tanto os resultados obtidos em experimentação animal quanto em testes clínicos, não revelam os mecanismos de ação da FA envolvidos no desenvolvimento e manutenção das DII, mas sabe-se que a sua atividade é indiscutivelmente aumentada nessas doenças. EDE e EDN não reduziram os níveis de FA, quando comparados ao grupo salina, no experimento de agudo de colite. No modelo crônico, ambos os extratos tendem a reduzir os níveis de FA em relação ao controle salina, de maneira não significativa. Por esses resultados fica evidente que as ações dos extratos não estão diretamente relacionadas com a inibição desse parâmetro na colite experimental.

Outro parâmetro bioquímico analisado neste trabalho foi a MPO, que é uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos, extensamente utilizada como marcador bioquímico de infiltração desses leucócitos, por isso sua quantificação está linearmente relacionada com a presença dessas células nos diferentes tecidos, inclusive no trato gastrointestinal (Yan *et al.*, 2009; Nakhai *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2004; Carlson *et al.*, 2002). Os neutrófilos apresentam papel efetivo na defesa contra bactérias, mas também estão associados a processos de injúria e a sintomas de uma variedade de processos inflamatórios, por ter a capacidade de lesionar tecidos e células. Ao serem estimulados, os neutrófilos liberam grande quantidade de espécies reativas de oxigênio e uma variedade de grânulos de proteínas. Sugere-se que influxo de neutrófilos ativos nos sítios de inflamação governa o processo inflamatório de diversas doenças (Carlson *et al.*, 2002).

No caso das doenças inflamatórias intestinais, o nível de infiltração de neutrófilos está aumentado, o que eleva a quantidade de MPO no órgão inflamado em humanos

(Nakhai *et al.*, 2006). Segundo Yoshiyawa *et al.* (2008), a infiltração de neutrófilos, associada à liberação de radicais livres, levam a danos teciduais no cólon. Nos tratamentos agudos, EDE, na dose de 62.5 mg/kg, reduziu os níveis de MPO, EDN promoveu redução nas 3 doses administradas, denotando uma atividade superior de inibição da infiltração dos neutrófilos. No modelo crônico, ambos os extratos também reduziram os níveis de MPO, e mais uma vez, EDN apresentou um efeito mais persistente ao promover a manutenção dos níveis reduzidos de MPO nos 3 períodos de análise. Tais resultados mostram ser esse um importante mecanismo de ação dos extratos, principalmente de EDN. O tratamento agudo e crônico com os extratos reduziram a infiltração de neutrófilos, demonstrando seu papel primordial na atividade antiinflamatória no modelo de colite experimental.

Após a caracterização dos parâmetros bioquímicos na atividade farmacológica dos extratos, procedeu-se a quantificação de dois parâmetros imunológicos, as citocinas IL-1 β e TNF- α . Na DII, evidências da literatura demonstram que existe um desbalanço entre citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias. As citocinas são pequenos peptídeos, produzidos por células do sistema imunológico, que facilitam a comunicação entre células, estimulam a proliferação de células efectoras antígeno-específicas, e são responsáveis por mediar a inflamação local e sistêmica de maneira autócrina, parácrina e endócrina nos tecidos (Papadakis, 2004). As citocinas pró-inflamatórias são responsáveis por determinar a natureza da resposta imune na DII por sintetizar e secretar rapidamente mediadores inflamatórios como as espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, leucotrienos, fator de agregação plaquetária e prostaglandinas (Neuman, 2007). Na DII, ocorre um aumento dos níveis de interleucina 1 (IL-1) do fator de necrose tumoral α (TNF- α), IL-6, IL-8, além de outras citocinas pró-inflamatórias, secretadas por macrófagos, linfócitos e neutrófilos, cuja síntese é induzida pelo NF κ B,

um fator de transcrição envolvido na regulação de vários genes associados a inflamação (Rogler & Andus, 1998).

A IL-1 β pertence a uma família de citocinas pró-inflamatórias primordiais que possuem a habilidade de estimular a expressão de genes associados à inflamação e as doenças autoimunes. As ações de maior importância da IL-1 β , juntamente com a IL-1 α , envolvem a ativação da ciclooxygenase tipo 2 (COX-2), da fosfolipase tipo 2 e da isoforma induzível iNOS (Dinarello, 2002). Resultados experimentais obtidos em diferentes espécies animais indicam que as ações das IL-1 são reguladas pela relação de quantidade entre o antagonista endógeno do receptor de IL-1 (IL-1Ra)/IL-1 produzida. As alterações dessa relação podem apresentar um importante papel na instalação e progressão da DII em humanos (Ashwood *et al.*, 2004; Dionnes *et al.*, 1998). No experimento agudo realizado neste trabalho, os tratamentos com EDE e EDN reduziram significativamente os níveis de IL-1 β , sendo os resultados obtidos por EDN, novamente, mais expressivos que EDE. No experimento crônico com EDN, o extrato manteve os níveis de IL-1 β reduzidos em todos os períodos, enquanto EDE promoveu redução de IL-1 β após 14 dias, quando comparado ao controle salina. Os resultados obtidos demonstram uma grande atividade antiinflamatória principalmente por parte de EDN, por promover a redução dos níveis de IL-1 β nos diferentes modelos e períodos de análise. Provavelmente, por uma questão de dose, EDE não apresentou redução significativa do parâmetro em todos os períodos do tratamento crônico, pois no modelo agudo as maiores doses do extrato foram efetivas. Contudo, pode-se concluir que ambos os extratos apresentam uma efetiva ação antiinflamatória por reduzir os níveis da citocina pró-inflamatória IL-1 β .

Muitas evidências estabelecem que a citocina pró-inflamatória TNF- α desempenha um papel central na patogênese DC e RCU. A expressão de mRNA e da

proteína de TNF- α são significativamente altos em paciente com DII (Stucchi *et al.*, 2006). TNF é o componente chave da regulação de outras citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL1 β , IL-6 e IL-8. Em condições normais, os baixos níveis de TNF- α conferem ao organismo proteção contra agentes infecciosos, tumores, danos teciduais e desempenham um importante papel na resposta imune humoral, porém sua produção exacerbada pode levar a autoimunidade ou a doenças inflamatórias e imunopatológicas (Reguiaí & Grange, 2007). A administração de EDN reduziu de maneira dose-dependente os níveis de TNF- α no experimento agudo de RCU, enquanto EDE produziu efeito significativo de redução somente com a administração da maior dose. No modelo crônico, EDE e EDN reduziram de maneira significativa os níveis de TNF- α nos 7 e 14 dias de tratamento, porém foram incapazes de promover a mesma atividade após recidiva com TNBS. Os resultados demonstram que a atividade farmacológica de ambos os extratos está relacionada à redução dos níveis de TNF- α , levando a redução do processo inflamatório ocasionado pelo TNBS.

Os extratos desempenharam uma efetiva atividade antiinflamatória, principalmente, por reduzirem as lesões (pela análise de área e escore), a infiltração leucocitária (redução de MPO) e pela redução das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β . EDE e EDN possuem composição fitoquímica muito semelhante, compostos basicamente por polifenóis, sendo reconhecidas 3 classes principais desses metabólitos secundários: derivados do ácido fenólico, flavonóides e taninos condensados. Em termos quantitativos os taninos condensados ocupam o maior percentual na composição de EDE (41.2%) e EDN (17.3%), já os flavonóides correspondem a 5.12% e 4.48% dos extratos, respectivamente (Kushima *et al.*, 2009).

Os polifenóis apresentam uma infinidade de ações farmacológicas descritas para a classe, como agentes antioxidantes, anti-apoptóticos, anti-envelhecimento, anti-

carcinogênico, antiinflamatório, anti-angiogênico e como anti-proliferativo celular (Romier *et al.*, 2009). Os efeitos farmacológicos de ambos os extratos podem estar relacionados com ações dos polifenóis, que ao reduzirem a infiltração de neutrófilos, reduzem a liberação e formação de mais radicais livres que ocasionam danos ao cólon. Sugere-se que citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α induzem a produção de quimiocinas responsáveis pela ativação de proteínas de adesão do endotélio (Martin *et al.*, 2006). Dessa maneira, pode-se dizer que a redução dos níveis dessas citocinas, esteja relacionada, pelo menos em parte, com a diminuição da infiltração de neutrófilos. A redução de TNF- α e IL-1 β também promove a diminuição da liberação de outras citocinas pró-inflamatórias, da indução de COX, fosfolipases, iNOS, e de outros mediadores, de maneira a proporcionar a regressão da inflamação instituída pela solução TNBS/etanol 50%.

Além da caracterização das ações antiinflamatórias de EDE e EDN, no experimento crônico, foram realizados estudos de toxicidade dos extratos. Os tratamentos com EDE e EDN não demonstraram efeito tóxico aparente, pois não ocorreram alterações significativas na evolução do peso corporal nos três períodos de análise. Adicionalmente, foram realizados testes bioquímicos complementares para a análise toxicológica dos seguintes parâmetros: AST (indicador de lesão hepática aguda), ALT (indicador de lesão hepática crônica), γ -GT (indicador de lesão do canal biliar), creatinina e uréia (indicadores de lesão renal) (Cury *et al.*, 2005) e glicose (indicativo de alteração pancreática).

A administração de EDN durante 7 dias, manteve baixos os níveis de AST, ALT e γ -GT. Apesar de ser indicativo de um possível efeito hepatoprotetor, após 14 e 21 dias de tratamento com EDN, não ocorre o mesmo efeito para AST e ALT. O mesmo pode se dizer da redução dos níveis de γ -GT, após 14 dias de tratamento com EDE e EDN,

pois estes não garantiram os mesmos efeitos nos demais períodos de análise. Os níveis de glicêmicos dos animais tratados cronicamente foram verificados a fim de se constatar um possível efeito dos extratos sobre o pâncreas. Após 21 dias de tratamento com EDE ou EDN, ambos promovem aumento dos níveis de glicose em relação aos animais tratados com salina, porém, mesmo com o aumento os valores estão dentro do previsto pela literatura. Outro parâmetro utilizado foi o peso de órgãos vitais dos animais tratados por 21 dias com os extratos. Nessa análise, somente prednisolona apresentou uma redução significativa do baço, porém tal resultado é previsto na literatura em experimentos crônicos com camundongos (Shäcke *et al.*, 2003). De forma geral, ambos os extratos não possuem efeito tóxico evidente após 21 dias de tratamentos, porém existe a necessidade da execução de experimentos com duração superior e de outros modelos experimentais para comprovar a baixa toxicidade dos extratos.

A realização de novos estudos dos mecanismos de ação dos extratos torna-se interessante ao comparar os resultados obtidos por EDE e EDN com prednisolona. A redução do processo inflamatório, principalmente pela administração de EDN, foi significativa e consistente na maioria dos parâmetros analisados nos diferentes experimentos, cujos dados são mais expressivos que aqueles obtidos com o uso de prednisolona. A elucidação dos mecanismos de ação de EDE e EDN é fundamental para a caracterização dos extratos como agentes antiinflamatórios, uma vez que os dados obtidos são promissores.

Como conclusão final, pode-se afirmar que os extratos metanólicos de *Davilla elliptica* e *D. nitida* apresentam efeitos antiinflamatórios, preventivo e curativo, nos experimentos de indução de colite por TNBS. Tais ações devem estar associadas às atividades farmacológicas dos polifenóis presentes nos extratos, que promoveram a remissão do processo inflamatório pela redução dos níveis das citocinas inflamatórias

TNF- α e IL-1 β , que além de reduzir a liberação de vários mediadores inflamatórios, levam a redução da infiltração dos neutrófilos.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al Shamsi, M., Amin, A., Adeghate, E., 2006. Vitamin E ameliorates some biochemical parameters in normal and diabetic rats. *Annals New York Academy of Sciences* 1084, 411-431.
- Anderson, M.E., 1985. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol* 113, 548-555.
- Annunziato, F., Cosmi, L., Santarlasci, V., Maggi, L., Liotta, F., Mazzinghi, B., Parente, E., Fili, L., Ferri, S., Frosali, F., Giudici, F., Romagnani, P., Parronchi, P., Tonelli, F., Maggi, E., Romagnani, S., 2007. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 204, 1849-1861.
- Ashwood, P., Harvey, R., Verjee, T., Wolstencroft, R., Thompson, R.P., Powell, J.J., 2004. Functional interactions between mucosal IL-1, IL-1Ra and TGF- β 1 in ulcerative colitis. *Inflamm Res* 53, 53-59.
- Awad, H.M., Boersma, M.G., Boeren, S., Van Bladeren, P.J., Vervoort, J., Rietjens, I.M., 2001. Structure-activity study on the quinone/quinone methide chemistry of flavonoids. *Chem Res Toxicol* 14, 398-408.
- Azevedo, A.O., Campos, J.J., Galdino, G.S., Braga, F.C., Duarte, I.D., Perez, A.C., 2007. Antinociceptive effect from *Davilla elliptica* hydroalcoholic extract. *J Ethnopharmacol* 113, 354-356.
- Bell, C.J., Gall, D.G., Wallace, J.L., 1995. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. *Am J Physiol* 268, G622-G630.
- Bensoussan, M., Jovenin, N., Garcia, B., Vandromme, L., Jolly, D., Bouche, O., Thieffn, G., Cadot, G., 2006. Complementary and alternative medicine use by patients with inflammatory bowel disease: results from a postal survey. *Gastroenterol Clin Biol* 30, 14-23.
- Bernstein, C.N., Wang, M.H., Sargent, M., Brant, S.R., Collins, M.T., 2007. Testing the interaction between NOD-2 status and serological response to *Mycobacterium*

- paratuberculosis* in cases of inflammatory bowel disease. J Clin Microbiol 45, 968-971.
- Bessey, O.A., Lowry, O.H., Brook, M.J., 1946. Rapid colorimetric method for the determination of alkaline phosphatase in five cubic mililiters of serum. J Biol Chem 164, 321-329.
- Bossuyt, X., 2006. Serologic markers in inflammatory bowel disease. Clin Chem 52, 171-181.
- Campos, F.G., Waitzberg, D.L., Teixeira, M.G., Mucerino, D.R., Habr-Gama, A., Kiss, D.R., 2002. Inflammatory bowel diseases: principles of nutritional therapy. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo 57, 187-198.
- Camuesco, D., Peran, L., Comalada, M., Nieto, A., Di Stasi, L.C., Rodriguez-Cabezas, M.E., Concha, A., Zarzuelo, A., Galvez, J., 2005. Preventative effects of lactulose in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. Inflamm Bowel Dis 11, 265-271.
- Cao, Y.B., Zhang, J.D., Diao, Y.Y., Yan, L., Wang, D.J., Jia, X.M., Gao, P.H., Cheng, M.H., Xu, Z., Wang, Y., Jiang, Y.Y., 2005. Effects of Changtai granules, a traditional compound Chinese medicine, on chronic trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. World J Gastroenterol 11, 3539-3543.
- Carli, C.B., de, M., Lopes, F.C., Maia, D.C., Dias, M.B., Sannomiya, M., Rodrigues, C.M., Andreo, M.A., Vilegas, W., Colombo, L.L., Carlos, I.Z., 2009. Isolated flavonoids against mammary tumour cells LM2. Z Naturforsch C 64, 32-36.
- Carlson, M., Raab, Y., Seveus, L., Xu, S., Hallgren, R., Venge, P., 2002. Human neutrophil lipocalin is a unique marker of neutrophil inflammation in ulcerative colitis and proctitis. Gut 50, 501-506.
- Cury, M.C., Guimaraes, M.P., Lima, W.S., Caldeira, M.C., Couto, T.R., Murta, K., Carvalho, M.G., Baptista, J.M., 2005. Biochemical serum profiles in dogs experimentally infected with *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). Vet Parasitol 128, 121-127.

- Danese, S., Sans, M., Fiocchi, C., 2004. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev* 3, 394-400.
- Dinarello, C.A., 2002. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* 20, S1-13.
- Dionne, S., D'Agata, I.D., Hiscott, J., Vanounou, T., Seidman, E.G., 1998. Colonic explant production of IL-1 and its receptor antagonist is imbalanced in inflammatory bowel disease (DII). *Clin Exp Immunol* 112, 435-442.
- Dryden, G.W., Song, M., McClain, C., 2006. Polyphenols and gastrointestinal diseases. *Curr Opin Gastroenterol* 22, 165-170.
- Fiocchi, C., 2002. Inflammatory bowel disease. Current concepts of pathogenesis and implications for therapy. *Minerva Gastroenterol Dietol* 48, 215-226.
- Fuss, I.J., Heller, F., Boirivant, M., Leon, F., Yoshida, M., Fichtner-Feigl, S., Yang, Z., Exley, M., Kitani, A., Blumberg, R.S., Mannon, P., Strober, W., 2004. Nonclassical DC1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 113, 1490-1497.
- Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med* 27, 1-93.
- Hanauer, S.B., 2006. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis* 12 Suppl 1, 3-9.
- Head, K.A., Jurenka, J.S., 2003. Inflammatory bowel disease Part 1: ulcerative colitis--pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Altern Med Rev* 8, 247-283.
- Hollander, D., 2003. Inflammatory bowel diseases and brain-gut axis. *J Physiol Pharmacol* 54 Suppl 4, 183-190.
- Jackson, L., Evers, B.M., 2006. Chronic inflammation and pathogenesis of GI and pancreatic cancers. *Cancer Treat Res* 130, 39-65.

- Jackson, L.N., Zhou, Y., Qiu, S., Wang, Q., Evers, B.M., 2008. Alternative medicine products as a novel treatment strategy for inflammatory bowel disease. *Am J Chin Med* 36, 953-965.
- Jowett, S.L., Seal, C.J., Pearce, M.S., Phillips, E., Gregory, W., Barton, J.R., Welfare, M.R., 2004. Influence of dietary factors on the clinical course of ulcerative colitis: a prospective cohort study. *Gut* 53, 1479-1484.
- Karlinger, K., Gyorke, T., Mako, E., Mester, A., Tarjan, Z., 2000. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol* 35, 154-167.
- Kitahora, T., Utsunomiya, T., Yokota, A., 1995. Epidemiological study of ulcerative colitis in Japan: incidence and familial occurrence. The Epidemiology Group of the Research Committee of Inflammatory Bowel Disease in Japan. *J Gastroenterol* 30 Suppl 8, 5-8.
- Krawisz, J.E., Sharon, P., Stenson, W.F., 1984. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 87, 1344-1350.
- Kurina, L.M., Goldacre, M.J., Yeates, D., Gill, L.E., 2001. Depression and anxiety in people with inflammatory bowel disease. *J Epidemiol Community Health* 55, 716-720.
- Kushima, H., Nishijima, C.M., Rodrigues, C.M., Rinaldo, D., Sassa, M.F., Bauab, T.M., Stasi, L.C., Carlos, I.Z., Brito, A.R., Vilegas, W., Hiruma-Lima, C.A., 2009. *Davilla elliptica* and *Davilla nitida*: gastroprotective, anti-inflammatory immunomodulatory and anti-Helicobacter pylori action. *J Ethnopharmacol* 123, 430-438.
- Lakatos, P.L., 2006. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down? *World J Gastroenterol* 12, 6102-6108.
- Lambert, J.D., Sang, S., Yang, C.S., 2007. Biotransformation of green tea polyphenols and the biological activities of those metabolites. *Mol Pharm* 4, 819-825.

- Langhorst, J., Anthonisen, I.B., Steder-Neukamm, U., Ludtke, R., Spahn, G., Michalsen, A., Dobos, G.J., 2005. Amount of systemic steroid medication is a strong predictor for the use of complementary and alternative medicine in patients with inflammatory bowel disease: results from a German national survey. *Inflamm Bowel Dis* 11, 287-295.
- Lawrence, T., Gilroy, D.W., 2007. Chronic inflammation: a failure of resolution? *Int J Exp Pathol* 88, 85-94.
- Li, W., Li, Z., Ye, Q., 2009. Enzymatic synthesis of glutathione using yeast cells in two-stage reaction. *Bioprocess Biosyst Eng* (in press).
- Luchini, A.C., Rodrigues-Orsi, P., Cestari, S.H., Seito, L.N., Witaicenis, A., Pellizzon, C.H., Di Stasi, L.C., 2008. Intestinal anti-inflammatory activity of coumarin and 4-hydroxycoumarin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Biol Pharm Bull* 31, 1343-1350.
- Machida, H., Tsukamoto, K., Wen, C.Y., Shikuwa, S., Isomoto, H., Mizuta, Y., Takeshima, F., Murase, K., Matsumoto, N., Murata, I., Kohno, S., Wen, C.Y., 2005. Crohn's disease in Japanese is associated with a SNP-haplotype of N-acetyltransferase 2 gene. *World J Gastroenterol* 11, 4833-4837.
- Martin, A.R., Villegas, I., Sanchez-Hidalgo, M., de la Lastra, C.A., 2006. The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model. *Br J Pharmacol* 147, 873-885.
- Masella, R., Di, B.R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C., 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 16, 577-586.
- Morris, G.P., Beck, P.L., Herridge, M.S., Depew, W.T., Szewczuk, M.R., Wallace, J.L., 1989. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 96, 795-803.
- Nakhai, L.A., Mohammadirad, A., Yasa, N., Minaie, B., Nikfar, S., Ghazanfari, G., Zamani, M.J., Dehghan, G., Jamshidi, H., Boushehri, V.S., Khorasani, R., Abdollahi, M., 2007. Benefits of *Zataria multiflora* Boiss in experimental model of

- mouse inflammatory bowel disease. Evid Based Complement Alternat Med 4, 43-50.
- Neuman, M.G., 2007. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. Transl Res 149, 173-186.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M., 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. J Nat Prod 66, 1022-1037.
- Nishijima, C.M., Rodrigues, C.M., Silva, M.A., Lopes-Ferreira, M., Vilegas, W., Hiruma-Lima, C.A., 2009. Anti-hemorrhagic activity of four Brazilian vegetable species against *Bothrops jararaca* venom. Molecules 14, 1072-1080.
- Oakley, A.J., 2005. Glutathione transferases: new functions. Curr Opin Struct Biol 15, 716-723.
- Papadakis, K.A., 2004. Chemokines in inflammatory bowel disease. Curr Allergy Asthma Rep 4, 83-89.
- 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 33, 311-322.
- Podolsky, D.K., 2002. Inflammatory bowel disease. N Engl J Med 347, 417-429.
- Pott, A. & Pott, V.J., 1994. Plantas do Pantanal. Editora da Embrapa, Corumbá, 103.
- Reguiar, Z., Grange, F., 2007. The role of anti-tumor necrosis factor-alpha therapy in *Pyoderma gangrenosum* associated with inflammatory bowel disease. Am J Clin Dermatol 8, 67-77.
- Rishton, G.M., 2008. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. Am J Cardiol 101, 43-49.
- Rodrigues, V. E., Carvalho, D. A., 2001. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais do Cerrado na região do Alto Rio – Minas Gerais. Ciência e Agrotecnologia, Lavras – MG, 25, 102-123.
- Romier, B., Schneider, Y.J., Larondelle, Y., During, A., 2009. Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response. Nutr Rev 67, 363-378.

- Sakamoto, N., Kono, S., Wakai, K., Fukuda, Y., Satomi, M., Shimoyama, T., Inaba, Y., Miyake, Y., Sasaki, S., Okamoto, K., Kobashi, G., Washio, M., Yokoyama, T., Date, C., Tanaka, H., 2005. Dietary risk factors for inflammatory bowel disease: a multicenter case-control study in Japan. *Inflamm Bowel Dis* 11, 154-163.
- Saklani, A., Kutty, S.K., 2008. Plant-derived compounds in clinical trials. *Drug Discov Today* 13, 161-171.
- Sanchez de, M.F., Martinez-Augustin, O., Gonzalez, R., Ballester, I., Nieto, A., Galvez, J., Zarzuelo, A., 2004. Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. *Biochem Pharmacol* 68, 2317-2326.
- Sang, S., Lee, M.J., Hou, Z., Ho, C.T., Yang, C.S., 2005. Stability of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate and formation of dimers and epimers under common experimental conditions. *J Agric Food Chem* 53, 9478-9484.
- Sang, S., Yang, I., Buckley, B., Ho, C.T., Yang, C.S., 2007. Autoxidative quinone formation in vitro and metabolite formation in vivo from tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: studied by real-time mass spectrometry combined with tandem mass ion mapping. *Free Radic Biol Med* 43, 362-371.
- Sarkar, A., Sreenivasan, Y., Ramesh, G.T., Manna, S.K., 2004. beta-D-glucoside suppresses tumor necrosis factor-induced activation of nuclear transcription factor kappaB but potentiates apoptosis. *J Biol Chem* 279, 33768-33781.
- Saruta, M., Papadakis, K.A., 2008. Why are cytokines targeted for biological therapy in DII? *Inflamm Bowel Dis* 14 Suppl 2, 121-122.
- Schacke, H., Schottelius, A., Docke, W.D., Strehlke, P., Jaroch, S., Schmees, N., Rehwinkel, H., Hennekes, H., Asadullah, K., 2004. Dissociation of transactivation from transrepression by a selective glucocorticoid receptor agonist leads to separation of therapeutic effects from side effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 227-232.
- Silva, S.R., Silva, A.P., Munhoz, C.B., Silva Jr., M.C., Medeiros, M.B., 2001. Guia de plantas do Cerrado utilizadas na Chapada dos Veadeiros. Ed. WWF, Brasilia, 42.

- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- Souza, M.H., Lemos, H.P., Oliveira, R.B., Cunha, F.Q., 2004. Gastric damage and granulocyte infiltration induced by indomethacin in tumour necrosis factor receptor 1 (TNF-R1) or inducible nitric oxide synthase (iNOS) deficient mice. *Gut* 53, 791-796.
- Stallmach, A., Hagel, S., Bruns, T., 2010. Adverse effects of biologics used for treating DII. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 24, 167-182.
- Stucchi, A., Reed, K., O'Brien, M., Cerda, S., Andrews, C., Gower, A., Bushell, K., Amar, S., Leeman, S., Becker, J., 2006. A new transcription factor that regulates TNF-alpha gene expression, LITAF, is increased in intestinal tissues from patients with DC and UC. *Inflamm Bowel Dis* 12, 581-587.
- Talero, E., Sanchez-Fidalgo, S., de la Lastra, C.A., Illanes, M., Calvo, J.R., Motilva, V., 2008. Acute and chronic responses associated with adrenomedullin administration in experimental colitis. *Peptides* 29, 2001-2012.
- Torres, M.I., Lorite, P., Lopez-Casado, M.A., Rios, A., 2007. A new approach using tissue alkaline phosphatase histochemistry to identify Crohn's disease. *Pathol Res Pract* 203, 485-487.
- Universidade de São Paulo, 2008. Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina, laboratório de controle de qualidade sanitária animal. Disponível em: <<http://biot.fm.usp.br/index.php?mpg=03.00.00&tip=RATO>> acesso em: 30 jun. 2010.
- Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B., Neurath, M.F., 2007. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc* 2, 541-546.

- Xu, C.T., Meng, S.Y., Pan, B.R., 2004. Drug therapy for ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 10, 2311-2317.
- Yan, Y., Kolachala, V., Dalmasso, G., Nguyen, H., Laroui, H., Sitaraman, S.V., Merlin, D., 2009. Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS One* 4 (6), e6073.
- Yoshiyama, S., Miki, C., Okita, Y., Araki, T., Uchida, K., Kusunoki, M., 2008. Neutrophil-related immunoinflammatory disturbance in steroid-overdosed ulcerative colitis patients. *J Gastroenterol* 43, 789-797.