

Dissertação de Mestrado



**Efeito da (-)-Epicatequina presente nas
folhas de *Mouriri pusa* Gardn.
(Melastomataceae) na prevenção e
tratamento de colite ulcerativa em ratos**

Paulo César de Paula Vasconcelos

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Helena Pellizzon
Co-Orientadora: Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima

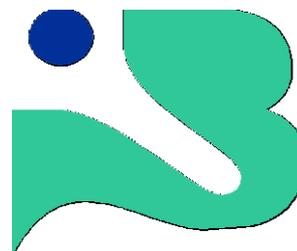
PAULO CÉSAR DE PAULA VASCONCELOS

Efeito da (-)-Epicatequina presente nas folhas *Mouriri pusa* Gardn. (Melastomataceae) na prevenção e tratamento de colite ulcerativa em ratos

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia

ORIENTADORA: PROFA. DRA. CLÁUDIA HELENA PELLIZZON

CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Vasconcelos, Paulo César de Paula.

Efeito da (-)- epicatequina presente nas folhas *Mouriri pusa* Gardn.
(Melastomataceae) na prevenção e tratamento de colite ulcerativa em ratos /
Paulo César de Paula Vasconcelos. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências, Botucatu, 2009.

Orientadora: Cláudia Helena Pellizzon

Assunto CAPES: 21001006

1. Colite - Tratamento 2. Flavonóides 3. Produtos naturais - Aspectos
farmacológicos

CDD 615.532

Palavras-chave: Colite ulcerativa; Epicatequina; Flavonóide; Plantas medici-
nais

Banca examinadora – Dissertação de Mestrado

Membros titulares:

Profa. Dra. Cláudia Helena Pellizzon (orientadora)

Prof. Dr. Luís Cláudio Di Stasi

Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Membros Suplentes:

Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma Lima

Prof. Dr. Sergio Brito Garcia

Data da defesa: 13 de março de 2009

Agradecimentos

Com algumas atualizações, meus agradecimentos são semelhantes aos do meu trabalho de conclusão de curso, o que comprova que essas pessoas continuaram me apoiando.

A meus pais Cláudio e Mirian e minha irmã Lilian pela grande força, apoio e incentivo dedicados, amizade e momentos desestressantes durante os feriados;

À minha namorada Nathalie pela companhia constante, ajudas a qualquer hora, compartilhamento de momentos felizes ou tristes, sempre amorosa e dedicada, às vezes me dando mais preguiça, ma sempre me incentivando a continuar;

À sobrinhada, que agora se multiplica, por manter sempre uma vontade de reencontrar-nos e botar o papo em dia e tomar aquela cervejinha com violão;

À minha orientadora Cláudia, a quem devo muito pelo meu crescimento acadêmico desde a graduação, pelas inúmeras horas de atenção;

Aos colegas de laboratório Sponja, Monje, Kita e Joplin, pela companhia e ajudas indispensáveis;

À professora Clélia, também orientadora, pelas cobranças oportunas, comentários e sugestões sempre pertinentes e competência científica;

Ao pessoal da Fisiologia: Pom Pom, Mingo, Pocotó, Catarine, Kalose, pelo imprescindível apoio nos experimentos e também algumas boas risadas;

Ao professor Luis Cláudio Di Stasi e ao pessoal de seu laboratório (Carol, Patrícia, Aline, Viviane, Andréia, Tarina e, em especial ao Léo) pela grande ajuda e orientação durante os experimentos e por emprestar o laboratório em algumas ocasiões;

Aos parceiros da minha república Viralata durante o mestrado (Nikito, OB, Dona Rosa, Girassol, Vage e PV), e aos outros fundadores (Sócio, Marylin e Kremoso) pelos churrascos, festas, bagunças em geral e acima de tudo amizade.

À minha turma, a 39, que é osso duro de roer!

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. VASCONCELOS, P. C. P., KUSHIMA, H., ANDREO, M. A., HIRUMA-LIMA, C. A., VILEGAS, W., TAKAHIRA, R. K., PELLIZZON, C. H.
Studies of gastric mucosa regeneration and safety promoted by *Mouriri pusa* treatment in acetic acid ulcer model. *Journal of Ethnopharmacology*. , v.115, p.293 - 301, 2008.
2. HIRUMA-LIMA, C. A., SANTOS, L C, KUSHIMA, H., PELLIZZON, C. H., SILVEIRA, G. G., VASCONCELOS, P. C. P., VILEGAS, W., SOUZA-BRITO, A. R. M.
Qualea grandiflora, a Brazilian Cerrado medicinal plant presents an important antiulcer activity. *Journal of Ethnopharmacology*. , v.104, p.207 - 214, 2005.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

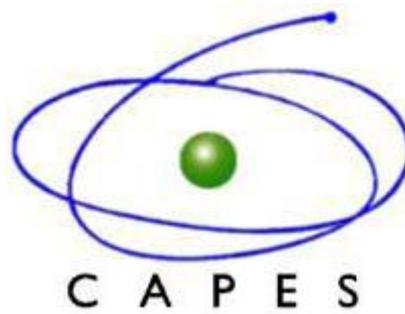
1. VASCONCELOS, P. C. P., SEITO, L. N., DI STASI, L. C., HIRUMA-LIMA, C. A., VILEGAS, W., PELLIZZON, C. H.
Effect of (-)-epicatechin from *Mouriri pusa* against acute ulcerative colitis in rats In: XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil & X Congresso Internacional de Etnofarmacologia
Anais do XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil & X Congresso Internacional de Etnofarmacologia. , 2008.
2. VASCONCELOS, P. C. P., SEITO, L. N., DI STASI, L. C., HIRUMA-LIMA, C. A., VILEGAS, W., PELLIZZON, C. H.
EVALUATION OF (-)-EPICATECHIN FROM *Mouriri pusa* EFFECT AGAINST ACUTE ULCERATIVE COLITIS IN RATS In: 40º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2008, Águas de Lindóia.
Anais do 40º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. , 2008.
3. KUSHIMA, H., RINALDO, D., VASCONCELOS, P. C. P., ROZZA, A. L., HIRUMA-LIMA, C. A.
Avaliação da atividade cicatrizante e do potencial tóxico do extrato etanólico de *Davilla elliptica* (Dilleniaceae) em modelo de indução de lesão gástrica por ácido acético em ratos In: 39º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2007, Ribeirão Preto.
Anais do 39º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. , 2007.
4. VASCONCELOS, P. C. P., ANDREO, M. A., HIRUMA-LIMA, C. A., VILEGAS, W., PELLIZZON, C. H.
Avaliação do efeito gastroprotetor das frações de Flavonóides e de Taninos do extrato metanólico das folhas de *Mouriri pusa* Gardn. In: 39º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2007, Ribeirão Preto.
Anais do 39º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. , 2007.
5. VASCONCELOS, P. C. P., ANDREO, M. A., HIRUMA-LIMA, C. A., VILEGAS, W., PELLIZZON, C. H.
Gastric ulcer healing promoted by Flavonoids and Tannins from the medicinal plant *Mouriri pusa* Gardn. (Melastomataceae) In: The First Collaborative Meeting on Phytomedicine, 2007, Ascona.
The First Collaborative Meeting on Phytomedicine Proceedings. , 2007.
6. VASCONCELOS, P. C. P., ANDREO, M. A., HIRUMA-LIMA, C. A., VILEGAS, W., PELLIZZON, C. H.
Tannins from *Mouriri pusa* Gardn. (melastomataceae) promoted cytoprotection in gastric mucosa: an ultrastructural analysis In: XVI Congresso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina, 2007, La Plata.
Anais do XVI Congresso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina. , 2007.

7. KUSHIMA, H., VASCONCELOS, P. C. P., COELHO-FERREIRA, M., SANTOS, M. A. C., LAMARAO, C. AVALIAÇÃO DO PAPEL DO NO E DOS COMPOSTOS SULFIDRÍLICOS NA GASTROPROTEÇÃO PROMOVIDA PELO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Pradosia huberi* In: XXI Reunião de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2006, ÁGUAS DE LINDÓIA.
XXI REUNIÃO ANUAL DA FESBE. , 2006.
8. VASCONCELOS, P. C. P., KUSHIMA, H., ANDREO, M. A., HIRUMA-LIMA, C. A., VILEGAS, W., TAKAHIRA, R. K., PELLIZZON, C. H. REGENERAÇÃO DA MUCOSA GÁSTRICA INDUZIDA PELO EXTRATO METANÓLICO DAS FOLHAS DE *Mouriri pusa* In: XXI Reunião de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2006, ÁGUAS DE LINDÓIA, SP.
XXI REUNIÃO ANUAL DA FESBE. , 2006.
9. PELLIZZON, C. H., MORAES, T. M., ROCHA, L. R. M., SILVEIRA, G. G., VASCONCELOS, P. C. P., QUEBEM, M. C., NEVES, J. P., ROZZA, A. L., HIRUMA-LIMA, C. A. AÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus aurantium* L. (RUTACEAE) NA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA E CICATRIZANTE In: Reunião de Integração da Morfologia Pan-Americana, 2004, Foz do Iguaçu.
Anais da Reunião de Integração da Morfologia Pan-Americana. , 2004.
10. MORAES, T. M., HIRUMA-LIMA, C. A., ROCHA, L. R. M., SILVEIRA, G. G., VASCONCELOS, P. C. P., PELLIZZON, C. H. Atividade Antiulcerogênica e Cicatrizante do Óleo Essencial de *Citrus aurantium* L. (Rutaceae) In: XXXVI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2004, Águas de Lindóia.
Anais do XXXVI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. , 2004.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. VASCONCELOS, P. C. P., BALLESTEROS, K.V.R., LIMA, Z.P., KUSHIMA, H., HIRUMA-LIMA, C. A., VILEGAS, W., PELLIZZON, C. H. Avaliação da atividade antiulcerogênica das folhas de *Mouriri pusa* (Melastomataceae): uma espécie medicinal do cerrado In: Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2005, Botucatu.
Congresso de Iniciação Científica da UNESP. , 2005.
2. VASCONCELOS, P. C. P., BALLESTEROS, K.V.R., LIMA, Z.P., KUSHIMA, H., HIRUMA-LIMA, C. A., VILEGAS, W., PELLIZZON, C. H. EFFECT OF *Mouriri pusa* EXTRACT, "CERRADO" PLANT, IN THE CICATRISATION PROCESS OF GASTRIC ULCERS EXPERIMENTAL In: XX Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2005, Águas de Lindóia.
Brazilian Journal of Morphological Sciences. , 2005.

Auxílio Financeiro:



Processo: 07/53201-2

Sumário

Resumo	7
Abstract.....	8
1. Introdução.....	9
1.1. Considerações gerais	9
1.2. Colite Ulcerativa em humanos.....	10
1.3. Planta em estudo	11
1.4. Substância utilizada	12
2. Objetivos	13
3. Material e Métodos	14
3.1. Animais	14
3.2. Drogas	14
3.3. Modelo de indução e tratamentos de colite ulcerativa	14
Colite aguda:	15
Colite com recidiva:	15
3.4. Avaliação do processo inflamatório intestinal	16
3.4.1. Avaliação macroscópica.....	16
3.4.2. Avaliação bioquímica	16
3.4.3. Avaliação microscópica.....	17
3.4.4. Imunohistoquímica	18
3.4.5. <i>Western Blot</i>	19
3.5. Análise estatística	20
4. Resultados e Discussão	21
4.1. Ensaio Agudo	21
4.2. Ensaio Crônico com Recidiva	24
4.3. Considerações Finais.....	29
5. Conclusões	31
6. Referências	32
Anexos.....	37

Resumo

A etiologia da colite ulcerativa ainda permanece desconhecida, porém atinge uma grande parcela da população mundial. A maioria das terapias disponíveis tem eficácia limitada e geram significativos clínicos efeitos adversos. A espécie medicinal *Mouriri pusa* Gardn. (Melastomataceae) foi citada diversas vezes pela população local do Tocantins como útil no tratamento de distúrbios do trato digestório. Os estudos preliminares com essa planta têm apresentado efeitos gastroprotetores e cicatrizantes intensos. Estudos fitoquímicos de seu extrato metanólico revelaram presença de (-)-epicatequina, além de outros flavonóides, e taninos. Nesse projeto, induziu-se colite ulcerativa em ratos por injeção local de ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS). Foram analisados parâmetros morfológicos, inflamatórios, imunohistoquímicos e *Western Blot*. O efeito da (-)-epicatequina foi avaliado em modelo agudo nas doses de 5, 10, 25 e 50 mg/kg (p.o). Os animais receberam os tratamentos uma vez por dia durante 3 dias antes da indução de colite, 2 h e 24 h após a mesma. Observou-se macroscopicamente que as doses de 10 e 50 mg/kg (EC10 e EC50) de epicatequina foram efetivas em reduzir o grau de seriedade da lesão, sendo confirmado pela análise microscópica para EC10. Nas quantificações do tecido intestinal, observou-se que a concentração de glutathione em EC10 foi maior que no controle, mostrando um possível mecanismo de ação, já que a manutenção da glutathione no tecido inflamado pode indicar potencial antioxidante da substância. Observou-se diminuição de COX-2, um parâmetro inflamatório, e um aumento de PCNA, antígeno de proliferação celular, em EC10, indicando ação antiinflamatória e estimuladora de proliferação celular. EC10 e EC50 foram usadas então para o modelo crônico de colite, no qual os diferentes grupos de animais receberam, após indução de colite no primeiro dia, os tratamentos durante 21 dias. Ao final de cada semana, uma parte dos animais de cada grupo foi morta para acompanhamento e ao final da segunda semana os ratos foram submetidos a uma recidiva de lesão. Foram obtidos resultados semelhantes ao modelo agudo: a EC10 apresentou escores macroscópico e microscópico de lesão significativamente menor e aumento significativo de glutathione em relação ao controle. Observou-se, como no agudo, diminuição de COX-2, e um aumento de PCNA na primeira e na terceira semana nos cólons do grupo EC10. A proliferação celular aumentada foi justificada pelo aumento, observado por *Western Blot*, de EGF, fator de crescimento que estimula proliferação celular e regeneração do epitélio. Os resultados confirmam o papel da (-)-epicatequina como antioxidante na redução do grau de lesão, bem como seu potencial estimulante da proliferação celular e reparação tecidual, sendo útil na prevenção e tratamento da colite ulcerativa.

Abstract

Ulcerative colitis etiology is still not completely known, however, it is present among great portion of world's population. The majority of available therapies has limited efficacy and provides significant adverse effects. The medicinal species *Mouriri pusa* Gardn. (Melastomataceae) has been often mentioned by local population from Tocantins as useful in the treatment of gastrointestinal disorders. Previous studies with this plant have presented intense gastroprotective and cicatrizing effects. Phytochemical studies of its methanolic extract revealed presence of (-)-epicatechin, besides other flavonoids, and tannins. In this work, ulcerative colitis was induced in rats by local injection of TNBS (Trinitrobenzenesulphonic acid). We analyzed morphological, inflammatory, immunohistochemical and Western Blot parameters. (-)-Epicatechin effect was evaluated in acute model in 5, 10, 25 e 50 mg/kg doses (p.o). The animals received treatments once a day for 3 days before colitis induction, and 2 h and 24 h after it. The doses of 10 and 50 mg/kg (EC10 and EC50) were macroscopically observed to be effective in reducing lesion seriousness, what was confirmed by microscopical analysis for EC10. By quantifications in the colon tissue, it was observed that glutathion concentration in EC10 was greater than in control, showing a possible mechanism of action, since glutathione maintenance in the inflamed tissue may indicate antioxidant potential from the compound. It was observed COX-2 reduction, an inflammatory parameter, and an increase in PCNA, proliferating cell antigen, in EC10, indicating anti-inflammatory and proliferation stimulating action. EC10 and EC were then used for chronic colitis model, in which the groups, after colitis induction in the first Day, treatments for 21 days. At the end of each week, some of the rats from each group were killed for accompaniment, and after the second week, lasting animals were submitted to lesion relapse. Results similar to acute model were obtained: EC10 presented significantly lower macroscopic and microscopic scores and significant increase of glutathione comparing to control. As in acute model, a reduction of COX-2 and an increase in PCNA were observed in EC10 group. The augmented cell proliferation was justified by the increase of EGF observed by Western Blot. EGF is a growth factor that stimulates cell proliferation and epithelium regeneration. The results confirm the role of (-)-epicatechin as antioxidant in reducing lesion level, as well as its stimulating potential of proliferation and tissue healing, being useful in the prevention and treatment of ulcerative colitis.

1. Introdução

1.1. Considerações gerais

A pesquisa farmacológica com plantas medicinais no Brasil tem mais de 50 anos, porém ao longo deste período diversos tipos de abordagens foram utilizados no intuito de buscar compostos biologicamente ativos para uso terapêutico. Vários problemas foram detectados e relatados nas diversas etapas envolvidas neste tipo de pesquisa e muito tem sido discutido sobre como solucioná-los (Di Stasi, 1996; Simões *et al.*, 1999; Yunes & Calixto, 2001). No Brasil, muitas vezes são utilizadas plantas com fins medicinais com pouco ou nenhum conhecimento de suas propriedades farmacológicas (Veiga Junior *et al.*, 2005). Pesquisas com produtos naturais são normalmente guiadas pelo conhecimento etnofarmacológico e têm contribuído bastante para a renovação dos fármacos, por proporcionar o aparecimento de novas estruturas químicas e a caracterização de novos mecanismos de ação (Rates, 2001). 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 modelo estruturas de origem natural.

Atualmente, é consenso que a pesquisa envolvendo plantas medicinais é complexa e se faz necessária uma seleção criteriosa das espécies a serem estudadas, levando em consideração a indicação popular de uso medicinal (etnofarmacologia) e a participação de uma equipe multidisciplinar, em todas as etapas da pesquisa. (Di Stasi, 1996; Souza Brito & Nunes, 1997). Este trabalho é parte de um projeto temático interdisciplinar intitulado "Bioprospecção de Plantas Superiores do Estado de São Paulo" desenvolvido no programa BIOTA/FAPESP cujo objetivo é a caracterização farmacológica e fitoquímica da flora medicinal do Cerrado. Considerando os resultados previamente obtidos nos projetos "Avaliação da atividade antiulcerogênica das folhas de *Mouriri pusa* (Melastomalaceae): uma espécie medicinal do cerrado" (PIBIC/CNPq) (Vasconcelos *et al.*, 2008), e "Efeito das Frações de Taninos e Flavonóides de *Mouriri pusa* na prevenção e tratamento de úlceras gástricas em ratos" (FAPESP 05/58347-0) o presente trabalho tem o objetivo de avaliar farmacologicamente, agora, a substância isolada (-)-epicatequina, um flavonóide presente no extrato metanólico das folhas de

Mouriri pusa, estudando seu potencial terapêutico na prevenção e/ou cura de colite ulcerativa experimental.

1.2. Colite Ulcerativa em humanos

A colite ulcerativa, juntamente com a doença de Crohn, faz parte de um grupo chamado Doenças Inflamatórias Intestinais (DII). É caracterizada por disfunção das células T da mucosa, produção anormal de citocinas e inflamação celular, que levam a dano na mucosa do cólon (Fiocchi, 1998). As DII atingem uma parcela significativa da população mundial, tendo uma prevalência maior em países desenvolvidos, acometendo aproximadamente 1,4 milhões de pessoas nos Estados Unidos e 2,2 milhões na Europa (Loftus *et al.*, 2004). Em países em desenvolvimento como no Brasil, apesar de poucos dados disponíveis, sua prevalência apresenta uma tendência crescente (Souza *et al.*, 2002).

A etiologia da colite ulcerativa permanece praticamente desconhecida. Discute-se que a doença seja causada por desregulamento do sistema imune da mucosa e respostas patológicas de células T em indivíduos geneticamente suscetíveis (Neurath *et al.*, 2002), sendo portanto, uma doença auto-imune. Outra hipótese é de que o distúrbio na barreira da mucosa é um fator iniciante e ataques subseqüentes por bactérias comensais colônicas levam a inflamação da mucosa (Stremmel *et al.*, 2005).

Além dos fatores imunológicos, a patogênese da colite ulcerativa possui um importante componente ambiental. Isso é evidenciado pelo fato de haver pouca concordância de ocorrência entre gêmeos idênticos (6-14%) (Orholm *et al.*, 2000; Tysk *et al.*, 1988), associação com o estresse (Xu *et al.*, 2008), além de exacerbação e reincidência da doença induzidas pelo consumo de AINEs (Evans *et al.*, 1997). O componente bacteriano, apesar de não ser uma causa, também parece ter alguma influência, já que, em experimentos, animais desenvolvem colite se expostos a microflora bacteriana, mas não se forem *germ-free* (Sartor, 2008). Além disso, existe um importante benefício dos antibióticos (Turunen *et al.*, 1998) e probióticos (Peran *et al.*, 2007) na terapia de manutenção da colite ulcerativa. Os fatores genéticos também são reconhecidos como de grande importância segundo as evidências de que parentes de primeiro grau de pacientes com colite ulcerativa tem dez vezes mais chances de também desenvolverem a doença (Orholm *et al.*, 1991), assim como judeus tem maior

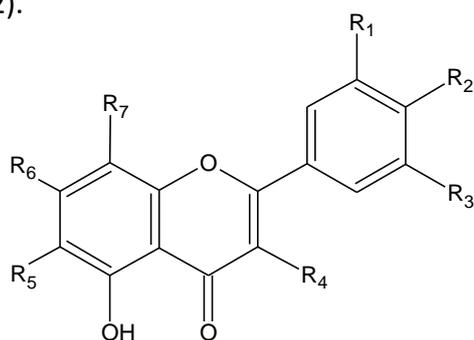
risco que não-judeus de apresentarem colite ulcerativa, sendo que vários genes já foram caracterizados como importantes na suscetibilidade à doença (Satsangi *et al.*, 1996).

A maioria das terapias contra colite ulcerativa atuais inclui a utilização de glicocorticoesteróides, sulfassalazina, ácido 5-aminosalicílico, agentes imunossupressores e anticorpos monoclonais anti-TNF- α . Essas terapias são caras, têm eficácia limitada, não são específicas e geram significativos efeitos clínicos adversos, sendo que em alguns casos, a única alternativa disponível acaba sendo a cirurgia de colostomia (Cheng *et al.*, 2007), que gera enorme desconforto para o resto da vida do paciente. Dessa forma, há uma grande necessidade de desenvolvimento de novos tratamentos e a descoberta de fármacos realmente efetivas contra a colite ulcerativa.

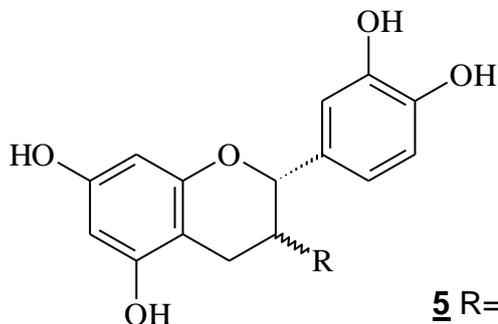
1.3. Planta em estudo

A espécie *Mouriri pusa* Gardn. (Melastomataceae) é encontrada freqüentemente no Cerrado brasileiro (PiauÍ, Ceará, Pernambuco, Bahia e Minas Gerais). Conhecida popularmente como puçá, jabuticaba do mato em Goiás, manapuçá ou mandapuçá em Minas Gerais e no Mato Grosso, jabuticaba do cerrado e moroso cigano no Ceará. Esta espécie é uma pequena árvore de 5 a 7m. Através de um levantamento etnofarmacológico realizado por Silva *et al.*, (2000) com espécies do Cerrado do Estado do Tocantins, a *Mouriri spp* foi citada diversas vezes pela população local como útil no tratamento de distúrbios do trato digestório, úlceras e gastrites na forma de chá das suas partes aéreas. Os estudos preliminares realizados com dois extratos de polaridades diferentes (os extratos diclorometano e metanólico) de *M. pusa* apresentaram efeitos gastroprotetores intensos, principalmente o metanólico (Andreo *et al.*, 2006). Estudos fitoquímicos do extrato metanólico de *Mouriri pusa* revelaram a existência de grande quantidade de taninos condensados e de doze flavonóides e seus glicosídeos além da (-)-epicatequina (Andreo *et al.*, 2006) (Figura 1). Os taninos têm a capacidade de precipitar proteínas no local da úlcera, formando uma película protetora que previne absorção de substâncias tóxicas e promove resistência à ação de enzimas proteolíticas (Nwafor *et al.*, 2007; John & Onabanjo, 1990). Os flavonóides possuem ação antioxidante pronunciada (Azuma *et al.*, 2000). Também podem apresentar ação antiinflamatória em baixas doses por aumentar a resistência

de capilares (Hashizume *et al.*, 1978), ou pró-inflamatória em altas doses (Gracioso *et al.*, 2002).



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
1	H	OH	H	H	OH	OMe	H
2	H	OH	H	OH	H	OH	H
3	OH	OH	H	OH	H	OH	H
4	OH	OH	OH	OH	H	OH	H
6	OH	OH	H	O-Ara(f)	H	OH	H
7	H	OH	H	O-Gal	H	OH	H
8	H	OH	H	O-Ara(p)	H	OH	H
9	H	OH	H	O-Glu	OH	OH	OH
10	OH	OH	H	O-Glu	H	OH	H
11	OH	O-Ara(p)	H	OH	H	OH	H
12	OH	OH	H	O-Gal	H	OH	H
13	OH	OH	H	O-Glu-Rha	H	OH	H



5 R= α , (-)-epicatequina

Figura 1 – Estrutura química dos Flavonóides e da epicatequina das folhas de *M. pusa* (Andreo *et al.*, 2006)

1.4. Substância utilizada

Dentre as substâncias encontradas no extrato, a epicatequina foi escolhida para objeto deste estudo por alguns fatores. Ela é tida como um importante citoprotetor, tanto por ter uma atividade antioxidante intensa como também por prevenir apoptose celular interferindo na cadeia de caspases (Spencer *et al.*, 2001). Galvez *et al.* (1995) verificaram que a epicatequina possui uma potente capacidade de inibir a peroxidação lipídica, tanto em modelo não-enzimático quanto enzimático envolvendo ácido

aracdônico, e que essa inibição é independente de interferência no sistema enzimático da glutatona. Isso mostra que a epicatequina pode atuar na remoção de radicais livres na mucosa inflamada do cólon, ajudando na sua restauração. Além disso, por inibir a peroxidação mediada por ácido aracdônico, a epicatequina tem potencial para atuar como antiinflamatória na doença inflamatória intestinal, podendo atuar na atividade de enzimas como lipooxigenase e ciclooxigenase.

Foi encontrada, por parte de trómeros de epicatequina, ação inibitória de aderência de bactérias uropatogênicas ao urotélio humano, sendo essa propriedade relacionada à inibição de fimbrias bacterianas (Foo *et al.*, 2000). Essa atividade pode ser um importante um indicativo de que ela possa também inibir adesão de bactérias enteropatogênicas. Foi demonstrado também que a epicatequina promove importantes benefícios vasculares, tendo atividade estimulante da liberação endotelial de óxido nítrico (NO) (Schroeter *et al.*, 2006). Isso pode explicar em parte o efeito antiúlcera dependente da produção de NO por parte do extrato metanólico de *M. pusa* observado em estudos anteriores (Andreo *et al.*, 2006). Já que é sabido que o NO está relacionado à manutenção da integridade da mucosa gastrointestinal, regulação de seu fluxo sanguíneo e de sua produção de muco (Chandranath *et al.*, 2002). Também foi reportado o papel da epicatequina na prevenção de câncer por ajudar na manutenção das *gap junctions* entre células epiteliais (Kang *et al.*, 2000), o que ajuda a prevenir a evolução de lesões gastrointestinais para lesões malignas.

2. Objetivos

Nosso objetivo geral é o de estudar espécies medicinais que possuam substâncias farmacologicamente ativas como nova opção terapêutica para as doenças gastrointestinais, contribuindo também para o desenvolvimento sustentável da flora do Cerrado do Estado de São Paulo.

Este estudo pretendeu avaliar o envolvimento da (-)-epicatequina, presente nas folhas de *Mouriri pusa*, na prevenção e tratamento de colite ulcerativa em ratos por meio de análises macroscópicas, microscópicas e bioquímicas das lesões intestinais em modelos agudo e crônico, visando avaliar seus efeitos antiinflamatórios e cicatrizantes.

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados ratos machos *Wistar* (150 a 200g) provenientes do Biotério Central da UNICAMP (CEMIB), aclimatados às condições do biotério setorial por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, sob temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro escuro de 12 horas controlado. Os animais foram alimentados com ração Guabi® e água *ad libitum*. Todos os experimentos obedeceram a protocolos experimentais previamente aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu.

3.2. Drogas

Foram utilizadas para indução de colite ou tratamentos:

1. Ácido trinitrobenzenosulfônico (Sigma®)
2. Sulfassalazina (Sigma®)
3. (-)-Epicatequina (Sigma®)

3.3. Modelo de indução e tratamentos de colite ulcerativa

O modelo de inflamação intestinal selecionado consistiu da administração intracolônica, nos ratos, de 10 mg de ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) dissolvido em um volume de 0,25 ml de etanol/água 50% (Morris *et al.*, 1989). Este modelo se caracteriza por gerar um processo inflamatório no intestino grosso do rato com duração de pelo menos seis semanas.

As doses de (-)-epicatequina selecionadas foram entre 5 e 50 mg/kg. Tais doses foram selecionadas com base nas doses que outros compostos fenólicos, como outros flavonóides e a paepalantina, que têm demonstrado ação antiinflamatória neste mesmo modelo experimental (Di Stasi *et al.*, 2004; Galvez *et al.*, 2001).

Em cada experimento utilizou-se um grupo de animais controle (sem tratamento farmacológico e com inflamação colônica) e outro branco (sem indução da inflamação). Paralelamente se utilizaram distintos lotes de animais como controles positivos, os quais receberam um tratamento com sulfassalazina (100 mg/kg), fármaco utilizado na prática clínica humana nas doses de 25-250 mg/kg, via oral.

O protocolo geral dos experimentos envolveu dois tratamentos: agudo e crônico com recidiva, descritos a seguir:

Colite aguda: os animais receberam doses de 5, 10, 25 e 50 mg/kg uma vez por dia de (-)-epicatequina (via oral) durante 2 dias antes da indução da colite, assim como 2 horas antes e 24 horas após a mesma. A (-)-epicatequina foi dissolvida em solução salina alcoolizada a 10% (veículo estabelecido após testes prévios de solubilidade) e administrada usando uma cânula (vol: 10 ml/kg). Animais do grupo controle e do grupo sem colite (branco) receberam apenas o veículo (10 ml/kg). Outro grupo (controle positivo) recebeu sulfassalazina (100 mg/kg) dissolvida no mesmo veículo. O peso corporal e a ocorrência da diarreia para cada grupo foram registrados diariamente.

Colite com recidiva: Neste protocolo de 3 semanas, a colite foi primeiramente induzida com 10 mg de TNBS em etanol 50%, conforme descrito previamente, e após 14 dias os animais receberam uma segunda dose de 10 mg de TNBS como tentativa de mimetizar as recidivas comuns da Doença Inflamatória Intestinal em humanos (Cheng *et al.*, 2007). Os animais foram divididos em 5 grupos: dois grupos receberam diariamente por via oral duas doses de epicatequina (10 e 50 mg/kg, doses selecionadas pelo ensaio de colite aguda) dissolvidas em salina alcoolizada a 10%, um grupo controle positivo recebeu 100 mg/kg de sulfassalazina dissolvida no mesmo veículo, enquanto um grupo controle remanescente recebeu apenas o veículo (10 ml/kg de salina alcoolizada a 10%) e outro grupo, que também recebeu veículo, não teve indução de colite (branco). O tratamento iniciou-se 24 horas após a primeira administração de TNBS e continuou até o dia da morte dos animais. Um grupo adicional com colite recebendo somente a primeira dose de TNBS (grupo controle sem recidiva) foi incluído como referência, também tratado com o veículo. Peso corporal, ocorrência de diarreia e consumo total de comida foram registrados para cada grupo diariamente. O n utilizado foi de 15 animais para o grupo branco, 7 para o controle sem recidiva e 21 para os demais grupos. Um terço dos animais de cada grupo foram mortos 1, 2 e 3 semanas após a primeira dose de TNBS, enquanto os 7 animais do grupo controle sem recidiva foram mortos apenas após 3 semanas.

3.4. Avaliação do processo inflamatório intestinal

Durante o desenvolvimento dos distintos experimentos, os animais foram avaliados em diferentes parâmetros de caráter geral tais como: consumo de alimento, peso corporal e aparecimento de fezes diarréicas. Ao final de cada período de tratamento, os animais foram mortos, o cólon foi extraído e analisado quanto aos prejuízos intestinais considerando-se parâmetros de macroscopia, bioquímica, microscopia, imunohistoquímica e Western Blotting.

3.4.1. Avaliação macroscópica

Na análise macroscópica foram avaliados peso e comprimento do cólon, existência de aderências entre o intestino e órgãos adjacentes e análise da severidade e extensão do prejuízo intestinal de acordo com uma escala descrita previamente por Bell *et al.*, 1995 (Tabela 1).

Tabela 1: Critério de determinação de escore macroscópico de lesão colônica

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)

3.4.2. Avaliação bioquímica

Na análise bioquímica de amostras de tecido do cólon dos animais foram avaliados os seguintes parâmetros:

A - Conteúdo de glutathiona total (Anderson, 1985). A glutathiona é um tripeptídeo que funciona como removedora de radicais livres. Sua determinação é útil para caracterizar possível mecanismo de ação da substância relacionado à sua produção e/ou manutenção.

B - Atividade da mieloperoxidase (MPO) (Krawisz *et al.*, 1984). Parâmetro utilizado como marcador da infiltração de neutrófilos, que caracteriza a inflamação intestinal.

C - Atividade da fosfatase alcalina (Bessey *et al.*, 1946). Marcador de diferenciação celular e cuja atividade se encontra aumentada neste modelo de inflamação intestinal (Sanchez de Medina, 1996).

D - Conteúdo de proteínas totais por ácido bicinchonínico (BCA) (Smith *et al.*, 1985) para a quantificação de Fosfatase Alcalina em mU/mg de proteína.

A análise dos resultados obtidos nestas determinações bioquímicas nos permite, de forma simultânea, avaliar o prejuízo intestinal, assim como obter informações sobre o possível mecanismo de ação pelo qual um determinado composto possa exercer seu efeito benéfico.

3.4.3. Avaliação microscópica

Imediatamente após a avaliação macroscópica do processo inflamatório colônico, amostras de tecido (0,5 mm) adjacentes à área de lesão foram coletadas para processamento histológico. Essas amostras foram fixadas em ALFAC por 24 horas sendo, depois, desidratadas em série alcoólica crescente, diafanizadas em xilol, e posteriormente incluídas em parafina Histosec-Pastilhas (Merck-11609) e preparadas para a microtomia. Os cortes, com 6µm de espessura, foram desparafinizados e reidratados utilizando série alcoólica etílica decrescente. Em seguida, as amostras foram submetidas à coloração em eosina-hematoxilina para a análise morfológica das lesões. Foi estabelecido escore microscópico segundo a tabela 2:

Tabela 2: Critério de determinação de escore microscópico de lesão colônica

Local	Critérios
Epitélio da mucosa	Ulceração: nenhuma (0); leve na superfície (1); moderada (2); extensiva em toda a largura (3)
Criptas	Atividade mitótica: terço inferior (0); leve no terço médio (1); moderada no terço médio (2); terço superior (3) Depleção de muco: nenhuma (0); leve (1); moderada (2); severa (3)
Lâmina própria	Infiltrado mononuclear: nenhum (0); leve (1); moderado (2); severo (3) Infiltrado de granulócitos: nenhum (0); leve (1); moderado (2); severo (3) Vascularidade: nenhuma (0); leve (1); moderada (2); severa (3)
Submucosa	Infiltrado mononuclear: nenhum (0); leve (1); moderado (2); severo (3) Infiltrado de granulócitos: nenhum (0); leve (1); moderado (2); severo (3) Edema: nenhum (0); leve (1); moderado (2); severo (3)
Escore máximo 27	Camuesco <i>et al.</i> , 2005; Stucchi <i>et al.</i> , 2000

3.4.4. Imunohistoquímica

Os cortes histológicos foram desparafinizados, re-hidratados e submetidos a recuperação antigênica pelo método do tampão citrato em forno de microondas em alta temperatura por 10 minutos. Depois, os cortes foram colocados em solução de bloqueio de sítios de ligação inespecíficos: leite desnatado a 1% em PBS; e solução de bloqueio de peroxidase endógena: H₂O₂ 3% em PBS. Foram então lavados em PBS e incubados por duas horas, a temperatura ambiente, com anticorpo primário diluído em solução PBS. Então foram lavados em PBS e incubados com anticorpo secundário biotilado, novamente lavados, e depois incubados com o reagente ABC (Complexo peroxidase avidina : biotilada) Vectastain®. A revelação foi feita com o substrato DAB (diaminobenzidina) mais H₂O₂. O resultado do processo foi analisado em microscópio LEICA® e os campos de 0,32 mm² capturados pelo software Leica Q-Win®. As quantificações foram feitas no software AVSoft BioView 4®.

Apenas a dose de epicatequina que apresentou melhor efeito nos parâmetros anteriores foi analisada, além dos controles. Os anticorpos primários utilizados foram:

A- COX-2 (Santa Cruz®), para avaliar grau de inflamação (Motilva *et al.*, 2005; De Maria *et al.*, 2003; Halter *et al.*, 2001). Foi quantificada a área de expressão de COX-2 na mucosa do cólon em campos aleatórios.

B- PCNA (Santa Cruz®), marcador de divisão celular par avaliar grau de regeneração tecidual. Foram contados núcleos de células PCNA-positivos em campos aleatórios da mucosa colônica.

3.4.5. *Western Blot*

As amostras teciduais de cólon foram colocadas em tampão de extração de proteína [Tris-HCl 100mM pH 7,6; NaCl 50mM; EDTA 5mM pH 8; Triton x100 1% e coquetel inibidor de protease (Sigma®) 1%] na proporção de 1 g de tecido : 5 ml de tampão. Foram homogeneizadas com Turrax e centrifugadas a 3000 rpm por 10 min. O sobrenadante, após determinação de proteínas totais por BCA (Smith *et al.*, 1985), teve a concentração de proteínas totais corrigida para 2 µg/µl com tampão de amostra SDS-PAGE (Tris-HCl 260mM pH 6,8; SDS 7,3%; β-mercaptoetanol 0,2% e sacarose 16,6%). Posteriormente, essas amostras foram fervidas a 95°C por 5 min e, em seguida, foram aplicados 10 µl de cada amostra em gel de poliacrilamida a 10%. A corrida eletroforética foi feita utilizando-se tampão de eletrodo (Tris-HCl 25mM, glicina 190mM e SDS 0,1%), a 120V por 4 h.

A transferência eletroforética das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em tampão de transferência (glicina 192mM, Tris-HCl 25mM, SDS 0,1% e etanol 18%) por 3 h, a 35 V. Após a eletrotransferência, a membrana foi corada com *Ponceau* [*Ponceau R* (Sigma®) 0,2% em ácido tricloroacético a 3%].

As membranas foram, então, incubadas com solução bloqueadora de sítios inespecíficos leite-TBS/T [Leite desnatado 5% em TBS/T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%, pH 7,4)] por 1 h sob agitação. Foram incubadas com anticorpo primário 1:500 em leite-TBS/T por 1 h e lavadas com TBS/T. Foram, então, incubadas com anticorpo secundário biotilado por 1 h, novamente lavadas, e depois incubadas com o reagente ABC (Complexo peroxidase avidina : biotilada) Vectastain® por 1 h. A revelação foi feita com o substrato DAB (diaminobenzidina) mais H₂O₂. As membranas foram escaneadas em Scanner HP Twain 2400® e as bandas mensuradas no software AVSoft BioView 4®. Apenas a dose de epicatequina que apresentou melhor efeito nos parâmetros anteriores foi analisada, além dos controles.

Para o modelo de colite agudo, utilizou-se o anticorpo primário anti-HSP-70 (*Heat Shock Protein 70*), proteína com função de proteger os processos homeostáticos celulares de injúrias ambientais e fisiológicas através da preservação de estruturas de proteínas normais e reparo ou remoção de proteínas danificadas (Tytell & Hooper, 2001), para avaliar possível mecanismo de proteção, além de verificar se a epicatequina tem efeito sensibilizante por inibir a expressão de HSP como foi observado em outros flavonóides (Hosokawa *et al.*, 1992).

Para o modelo de colite crônico com recidiva utilizaram-se os seguintes anticorpos primários:

A – EGF (Fator de Crescimento Epidermal): peptídeo constantemente liberado na luz do trato gastrointestinal com ação estimulante sobre a proliferação celular e a regeneração do epitélio da mucosa intestinal no caso de ulceração (Playford, 1995).

B – iNOS (Óxido Nítrico Sintase induzível): enzima com importante papel na patogênese da colite, onde sua expressão encontra-se aumentada (Salas *et al.*, 2002). Além disso, já foram reportados flavonóides com ação inibidora sobre essa enzima (Middleton *et al.*, 2000).

3.5. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Diferenças entre as médias foram testadas por Análise de Variância (ANOVA) seguida por testes de significância. Dados não paramétricos (escores) foram expressos como mediana e intervalo interquartil e foram analisados pelo teste U de Mann-Whitney. Dados de frequência foram analisados pelo teste χ^2 . Significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

4. Resultados e Discussão

4.1. Ensaio Agudo

Após a realização do modelo agudo de indução de colite, pôde-se constatar através do escore macroscópico das lesões que as doses de (-)-epicatequina (EC) de 10 mg/kg (EC10) e 50 mg/kg (EC50) foram efetivas em diminuir a severidade das lesões (tabela 3) comparando-se ao controle, o que pôde ser confirmado, no caso de EC10, com a análise microscópica das lesões (tabela 3).

Tabela 3: Escores macroscópico e microscópico dos diferentes grupos submetidos ao modelo de colite agudo.

	Branco	Controle	EC 5	EC 10	EC 25	EC 50	Sulfa.
Escore Macroscópico	0*	9 (1,25)	8 (1)	7 (1)*	7,5 (1)	7 (0,5)*	8 (1,5)
Escore Microscópico	0*	19 (1,5)	18 (1,0)	15 (1,5)*	18 (3,5)	16 (2,0)	16 (1,0)

Resultados expressos em mediana (intervalo interquartil). Kruskal-Wallis – Mann-Whitney, * $p < 0,05$ em relação ao controle. n= 5; 8; 7; 7; 6; 7; 7, respectivamente. Sulfa.= Sulfasalazina.

Os pesos corporais dos animais eram semelhantes entre os diferentes grupos até o dia 3 (figura 2), dia em que a colite foi induzida após 24h de jejum (por isso a queda no peso do dia 2 para o dia 3). Após esse dia, o grupo branco no dia 5 apresentou peso significativamente maior que o controle, indicando que a indução da colite diminuiu o ganho de peso dos animais de forma semelhante entre os grupos. Também com os dados de peso e comprimento dos cólons não houve diferença entre os grupos colíticos, embora o grupo branco tenha apresentado maior comprimento e menor peso de cólon em relação ao controle (tabela 4), indicando que a indução de colite diminuiu o comprimento e aumentou o peso dos cólons de forma semelhante entre os grupos colíticos independentemente do tratamento.

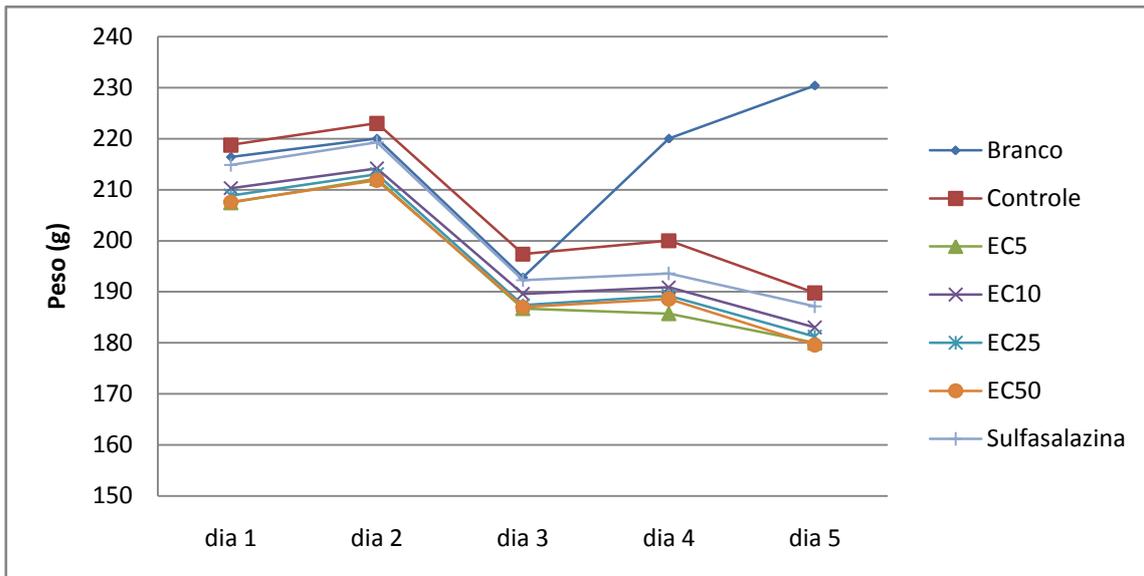


Figura 2: Peso dos animais ao longo dos 5 dias de experimento agudo. Resultados expressos em média. ANOVA – Dunnet. n= 5; 8; 7; 7; 6; 7; 7, respectivamente. Obs.: dia 3: indução de colite após 24h de jejum.

Tabela 4: Relação peso/comprimento dos cólons dos diferentes grupos submetidos ao modelo de colite agudo.

	Branco	Controle	EC 5	EC 10	EC 25	EC 50	Sulfa.
Peso do Cólon (mg/cm)	78,43 ± 5,42*	152,19 ± 8,31	134,90 ± 8,19	130,13 ± 7,64	139,77 ± 10,61	141,17 ± 11,01	136,38 ± 4,81

Resultados expressos em média ± E.P.M. ANOVA – Dunnet, *p<0,05 em relação ao controle. n= 5; 8; 7; 7; 6; 7; 7, respectivamente. Sulfa.= Sulfasalazina.

Com as análises bioquímicas, pôde-se ter uma noção do provável mecanismo de ação da EC, visto que a dose da substância que diminuiu tanto o escore macroscópico quanto o microscópico (EC10) também apresentou níveis de Glutathione no tecido do cólon significativamente maior do que a encontrada no grupo controle (tabela 5). Para os demais parâmetros analisados (MPO, fosfatase alcalina e proteínas totais) não houve diferença entre os grupos colíticos tratados e o controle (tabela 5). A glutathione (GSH) é um tripeptídeo produzido pelas células da mucosa que funciona como antioxidante ao participar de vários aspectos do metabolismo oxidativo, incluindo remoção de hidroperóxidos e manutenção do estado fisiológico dos grupamentos sulfidrílica de proteínas (Hayes & McLellan, 1999; Loguercio & Di Pierro, 1999). Por isso, ao se constatar uma maior concentração de GSH no grupo tratado com epicatequina, pode-se inferir que a substância-teste estimula a produção de GSH no

tecido atuando como antioxidante, podendo inclusive atuar como antioxidante diretamente, fazendo com que a depleção de GSH devido ao processo inflamatório seja menor.

Tabela 5: Quantificações bioquímicas de glutatona, mieloperoxidase (MPO) e fosfatase alcalina no cólon dos animais submetidos ao modelo de colite agudo.

	Glutaciona (nmol/g)	MPO (U/g)	Fosfatase Alcalina (mU/mg de proteína)
Branco	1555,75 ± 107,83*	16,98 ± 4,63*	8,43 ± 0,79*
Controle	954,73 ± 69,74	1780,19 ± 263,77	17,21 ± 1,16
EC 5	1035,49 ± 72,95	1975,90 ± 294,86	20,78 ± 1,98
EC 10	1176,55 ± 46,34*	1876,74 ± 243,27	17,83 ± 1,30
EC 25	1130,95 ± 42,46	1973,38 ± 178,27	20,04 ± 2,71
EC 50	1127,25 ± 35,36	1806,57 ± 219,35	20,47 ± 2,02
Sulfassalazina	1104,60 ± 22,33	1814,55 ± 214,46	20,49 ± 2,01

Resultados expressos em média ± E.P.M. ANOVA - Dunnet comparando controle com cada grupo, *p<0,05. n= 5; 8; 7; 7; 6; 7; 7, respectivamente.

A imunohistoquímica para COX-2 revelou que a EC10 (única dose acessada por ser a de melhor efeito) apresenta significativa diminuição de expressão de COX-2 em relação ao controle (Tabela 6), demonstrando sua ação antiinflamatória. Segundo Villegas *et al.* (2003), os flavonóides são notadamente reconhecidos como antiinflamatórios e seus efeitos terapêuticos de proteção da mucosa são exercidos através de um mecanismo complexo envolvendo inibição da síntese eicosanóides e/ou limpeza de radicais livres e ação antioxidante. Portanto, essa redução era esperada e consiste com o resultado obtido com a fração de flavonóides de *Mouriri pusa*, que diminuiu a expressão de COX-2 na mucosa gástrica (Vasconcelos *et al.*, 2007).

Já na análise imunohistoquímica para PCNA, a EC10 aumentou a expressão desse peptídeo em relação ao controle (Tabela 6). O PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular) é um polipeptídeo nuclear de 36 kDa altamente conservado identificado como proteína auxiliar da DNA polimerase delta (Nanji & Tahan, 1996; Prelich *et al.*, 1987; Bravo *et al.*, 1987). Ele é expresso principalmente durante a fase S do ciclo celular, podendo ser usado, portanto, como marcador de células em proliferação (Celis & Celis, 1985). Esse aumento na proliferação celular é positivo para a regeneração da mucosa, pois repõe mais rapidamente as células epiteliais danificadas.

Tabela 6: Quantificações imunohistoquímicas de COX-2 e células PCNA-positivas no cólon dos animais submetidos ao modelo de colite agudo.

	COX-2 ($\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$)	PCNA (cél./ mm^2)
Branco	4058,65 ± 3356,31*	249,21 ± 18,49*
Controle	24207,99 ± 2614,22	399,34 ± 19,43
EC 10	9257,06 ± 3110,30*	572,83 ± 15,69*
Sulfassalazina	14635,04 ± 2039,01*	372,52 ± 24,85

Resultados expressos em média ± E.P.M. ANOVA – Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao controle. n= 5; 8; 7; 7, respectivamente.

Foi analisada por *Western Blot* a presença no tecido colônico de HSP-70. A HSP70 - *Heat Shock Protein 70* – é uma proteína da família HSP presente nas células de mamíferos, com peso molecular aproximado de 70 kDa. É a mais abundante, conservada e consistentemente produzida no interior das células em resposta as diferentes formas de estresse (Shichijo *et al.*, 2003), tais como calor, agentes tóxicos, infecção e proliferação (Oberringer *et al.*, 1995). Tais proteínas têm a função de proteger os processos homeostáticos celulares de injúrias ambientais e fisiológicas através da preservação de estruturas de proteínas normais e reparo ou remoção de proteínas danificadas (Tytell & Hooper, 2001). Não foi observada diferença de expressão entre a EC10 e o controle (Figura 3), indicando a não participação dessa proteína no mecanismo de ação da EC10, tampouco que a EC10 promova sensibilização celular por inibição da produção de HSP-70 frente ao estresse, fato ocorrido com outros flavonóides como a quercetina (Hosokawa *et al.*, 1992).

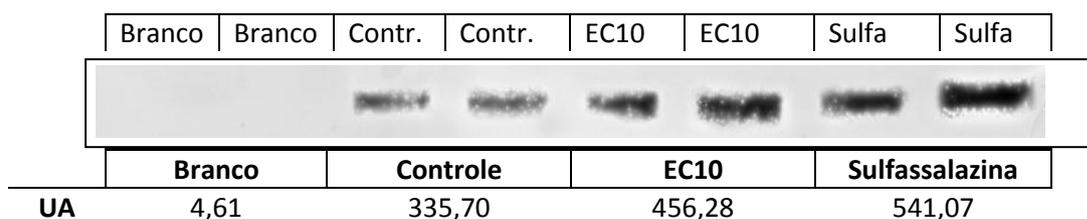


Figura 3: Western Blot da expressão de HSP-70 no cólon dos ratos submetidos ao ensaio de colite agudo. Resultados em média, quantificações em UA (Unidade aleatória)

4.2. Ensaio Crônico com Recidiva

Com a observação de que as doses que apresentaram melhores resultados no ensaio agudo foram de 10 e de 50 mg/kg, essas doses foram utilizadas no ensaio crônico. Ao final de cada uma das três semanas de avaliação, os escores macroscópicos de lesão foram avaliados e nas três semanas a EC10, a exemplo do ensaio agudo,

apresentou escore significativamente menor que o controle (tabela 7), indicando sua eficácia em reduzir também a gravidade de lesões cronicamente, inclusive após recidiva. Na terceira semana, após recidiva, o escore do grupo EC10, ao contrário dos outros grupos colíticos, não foi estatisticamente diferente do controle sem recidiva. Este é um importante indicativo do efeito terapêutico da epicatequina pois indica que a instalação da lesão recorrente para o grupo EC10 foi pouco eficaz, mostrando seu potencial preventivo também na inibição de agravamento da lesão colítica por reincidência de estímulo lesivo. Corroborando esses dados, a análise microscópica das lesões revelou que a EC10 apresentou escore significativamente menor que o controle nas três semanas avaliadas e também não foi estatisticamente diferente do controle sem recidiva.

Tabela 7: Escores macroscópico e microscópico das lesões colíticas dos diferentes grupos submetidos ao modelo de colite agudo.

	Escore 1ª semana		Escore 2ª semana		Escore 3ª semana	
	Macro	Micro	Macro	Micro	Macro	Micro
Branco	0*	0*	0*	0*	0* [#]	0* [#]
Controle	6 (1,5)	18 (2)	6 (1,5)	19 (2,5)	5,5 (1,75) [#]	18,5 (1) [#]
EC 10	4 (1)*	14 (1,5)*	2 (1)*	13 (2)*	3 (1)*	15 (2)*
EC 50	4 (2,5)	16 (2,5)	3 (1)	15 (1,5)	4 (1,5) [#]	16 (1,5)
Sulfassalazina	3,5 (2,5)	15,5 (2,5)	4 (1,5)	16 (1,5)	5 (2) [#]	17 (2) [#]
CSR	-	-	-	-	2 (1)*	12 (1)*

Resultados expressos em mediana (intervalo interquartil). Kruskal-Wallis – Mann-Whitney, *p<0,05 em relação ao controle, [#]p<0,05 em relação ao controle sem recidiva (CSR). n(1ª semana)= 5;7;7;7;6, n(2ª semana)= 4;7;7;7;7, n(3ª semana)= 5;6;7;7;7, respectivamente.

Para as quantificações bioquímicas, a exemplo do ensaio agudo, houve um aumento estatisticamente significativo de glutathione no grupo EC10 com relação ao controle, na primeira e terceira semanas, confirmando o seu papel antioxidante ao proporcionar a manutenção da glutathione no tecido (Tabela 8). Na segunda semana provavelmente não foi detectado aumento devido ao tempo decorrido da indução ser maior (duas semanas) que na primeira (uma semana) e terceira semanas (uma semana após a recidiva).

Tabela 8: Quantificações bioquímicas de glutatona (GSH) (nmol/g), mieloperoxidase (MPO) (U/g) e fosfatase alcalina (mU/mg de proteína) no cólon dos animais submetidos ao modelo de colite crônica.

	GSH 1ª semana	GSH 2ª semana	GSH 3ª semana
Branco	1727,88 ± 95,34*	1134,20 ± 79,27	1726,73 ± 34,92* [#]
Controle	1323,49 ± 43,15	1353,74 ± 77,53	1374,42 ± 77,55 [#]
EC 10	1662,56 ± 99,92*	1236,37 ± 45,62	1673,06 ± 82,37* [#]
EC 50	1529,50 ± 87,26	1150,68 ± 52,38	1658,92 ± 110,49
Sulfassalazina	1555,76 ± 141,52	1269,79 ± 57,53	1562,79 ± 110,64 [#]
CSR	-	-	1914,64 ± 63,62*

	MPO 1ª semana	MPO 2ª semana	MPO 3ª semana
Branco	64,56 ± 19,05*	101,65 ± 6,63*	71,69 ± 5,64* [#]
Controle	377,52 ± 85,14	219,49 ± 25,09	634,42 ± 149,44 [#]
EC 10	386,31 ± 76,80	247,64 ± 34,71	401,91 ± 70,28
EC 50	463,36 ± 98,97	211,67 ± 51,93	504,98 ± 144,73
Sulfassalazina	383,79 ± 81,39	179,12 ± 26,34	450,46 ± 73,96 [#]
CSR	-	-	225,23 ± 46,09*

	Fosfatase Alcalina 1ª semana	Fosfatase Alcalina 2ª semana	Fosfatase Alcalina 3ª semana
Branco	20,93 ± 2,21*	28,18 ± 1,56*	17,56 ± 1,39*
Controle	46,94 ± 2,62	40,02 ± 3,63	27,39 ± 3,76
EC 10	54,04 ± 6,67	34,96 ± 1,56	27,23 ± 2,10
EC 50	49,89 ± 7,95	48,16 ± 9,97	30,31 ± 1,20
Sulfassalazina	55,92 ± 7,85	39,40 ± 5,07	38,38 ± 4,96 [#]
CSR	-	-	24,25 ± 2,71

Resultados expressos em média ± E.P.M. ANOVA - Dunnet comparando controles com cada grupo, *p<0,05 em relação ao controle, [#]p<0,05 em relação ao controle sem recidiva (CSR). n(1ª semana)= 5;7;7;7;6, n(2ª semana)= 4;7;7;7;7, n(3ª semana)= 5;6;7;7;7;7, respectivamente.

Os pesos corporais dos animais evoluíram sem diferença significativa entre os grupos tratados com epicatequina e o controle (Figura 4). Com relação ao peso e comprimento dos cólons no experimento crônico, observou-se que o grupo branco apresentou maior comprimento de cólon, como no ensaio agudo, porém somente na segunda e terceira semanas. Os grupos EC não diferiram do controle em nenhuma semana (Tabela 9).

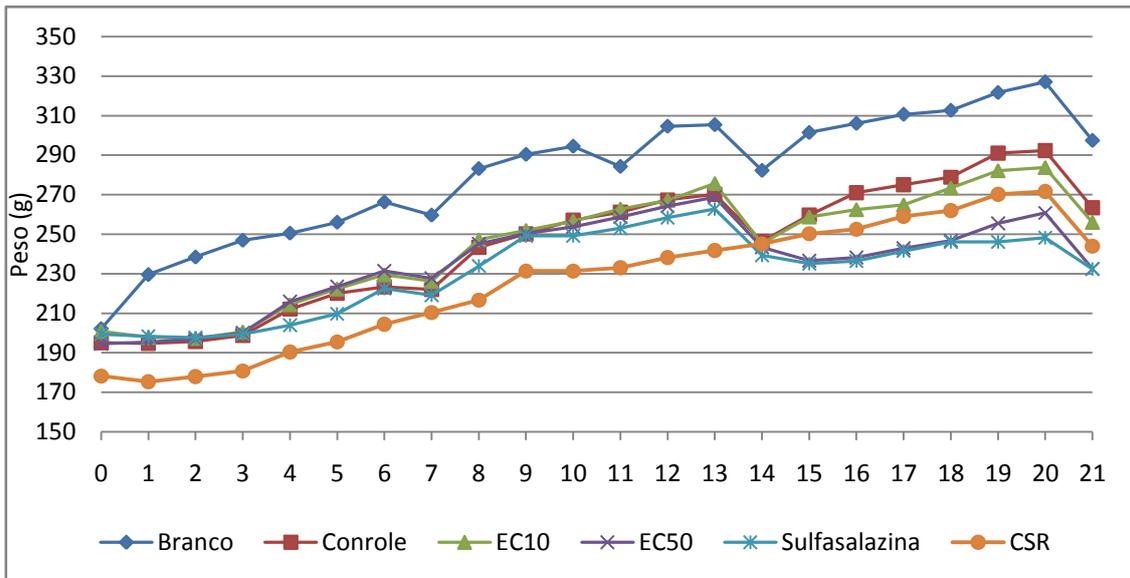


Figura 4: Peso dos animais ao longo dos 21 dias de experimento crônico. Resultados expressos em média. ANOVA – Dunnet. Obs.: dias 0 e 14: indução de colite após 24 h de jejum; dias 7, 14 e 21: morte de 7 animais de cada grupo, 5 do grupo branco, após 24 h de jejum.

Tabela 9: Peso e comprimento dos cólons dos diferentes grupos submetidos ao modelo de colite crônico.

	1ª Semana		2ª Semana		3ª Semana	
	Peso do cólon (g)	Comprimento do cólon (cm)	Peso do cólon (g)	Comprimento do cólon (cm)	Peso do cólon (g)	Comprimento do cólon (cm)
Branco	1,56 ± 0,15	17,22 ± 1,00	1,95 ± 0,23	19,05 ± 1,24*	2,13 ± 0,11	23,56 ± 0,54* [#]
Controle	2,20 ± 0,28	15,50 ± 0,35	1,97 ± 0,15	15,46 ± 0,34	2,38 ± 0,27	16,58 ± 0,72 [#]
EC 10	2,37 ± 0,26	15,31 ± 0,63	1,93 ± 0,12	14,91 ± 0,54	2,18 ± 0,13	16,70 ± 0,59 [#]
EC 50	2,32 ± 0,21	15,26 ± 0,40	2,13 ± 0,11	15,24 ± 0,56	2,03 ± 0,10	14,99 ± 0,46
Sulfa.	2,34 ± 0,18	15,12 ± 0,27	1,97 ± 0,09	16,70 ± 0,68	2,27 ± 0,09	13,94 ± 0,47*
CSR	-	-	-	-	1,84 ± 0,12	14,09 ± 0,49*

Resultados expressos em média ± E.P.M. ANOVA – Dunnet, *p<0,05 em relação ao controle, [#]p<0,05 em relação ao controle sem recidiva (CSR). n(1ª semana)= 5;7;7;7;6, n(2ª semana)= 4;7;7;7;7, n(3ª semana)= 5;6;7;7;7;7, respectivamente. Sulfa.= Sulfasalazina.

A exemplo do ocorrido no ensaio agudo, a EC10 diminuiu a expressão de COX-2 no tecido do cólon quando analisada por imunohistoquímica (Tabela 10). Nas três semanas analisadas, a expressão de COX-2 no grupo EC10 foi significativamente menor que no controle, reforçando assim a sua ação antiinflamatória. A sulfasalazina também atuou como antiinflamatória na primeira e na terceira semana por reduzir a expressão de COX-2.

Também semelhantemente ao ensaio agudo, a expressão de PCNA avaliada por imunohistoquímica foi aumentada no grupo EC10 em relação ao controle na primeira e na terceira semana avaliadas (Tabela 10), indicando aumento da proliferação celular.

Na segunda semana não houve aumento significativo de proliferação celular para o grupo EC10 provavelmente pelo fato de a lesão já estar se resolvendo.

Tabela 10: Quantificações imunohistoquímicas de COX-2 e células PCNA-positivas no cólon dos animais submetidos ao modelo de colite crônica.

	COX-2 1ª semana	COX-2 2ª semana	COX-2 3ª semana
Branco	13151,38 ± 7642,79*	5899,88 ± 6947,30*	6618,02 ± 7509,17*
Controle	42561,22 ± 7504,32	52894,12 ± 10978,02	46529,49 ± 11713,00
EC 10	8515,84 ± 7309,41*	8599,16 ± 7965,00*	8139,53 ± 8095,28*
Sulfassalazin a	16594,99 ± 6111,12*	29415,99 ± 11128,13	16125,29 ± 10938,09
CSR	-	-	16986,12 ± 8481,50

	PCNA 1ª semana	PCNA 2ª semana	PCNA 3ª semana
Branco	277,94 ± 21,54*	274,82 ± 28,95*	237,34 ± 30,82*
Controle	452,82 ± 74,51	371,63 ± 25,49	359,13 ± 16,83
EC 10	568,37 ± 20,43*	306,04 ± 19,91	484,05 ± 21,86*#
Sulfassalazin a	387,24 ± 23,76	396,61 ± 22,43	412,22 ± 28,92#
CSR	-	-	306,04 ± 23,26

Resultados expressos em média ± E.P.M. ANOVA - Dunnet, *p<0,05 em relação ao controle, #p<0,05 em relação ao controle sem recidiva (CSR). n(1ª semana)= 5;7;7;6, n(2ª semana)= 4;7;7;7, n(3ª semana)= 5;6;7;7;7, respectivamente.

Para investigar o mecanismo desse aumento na proliferação celular, foi estudada a presença de EGF (Fator de Crescimento Epidermal) na mucosa do cólon dos animais por *Western Blot*. Verificou-se que a EC10 apresentou níveis de EGF acima dos verificados no controle (Figura 5), o que pode explicar o aumento na proliferação celular por parte desse tratamento. O EGF é produzido pelas glândulas salivares e pelas glândulas de Brunner do duodeno. Além disso, a ulceração do epitélio induz a diferenciação de uma linhagem de células tronco gastrointestinais que cresce localmente como um túbulo adjacente à ulcera e produz e secreta EGF (Wright *et al.*, 1990). Sua ação, no caso de ulceração, é estimulante sobre a proliferação celular e a regeneração do epitélio da mucosa intestinal (Playford, 1995). Sinha *et al.* (2003) demonstraram que a administração por enema de EGF juntamente com o tratamento oral de messalazina reduziu significativamente a inflamação colítica quando comparado com pacientes tratados apenas com messalazina e enema de placebo. Esse aumento da expressão de EGF pode ser um dos mecanismos de ação da EC10 contra a colite.

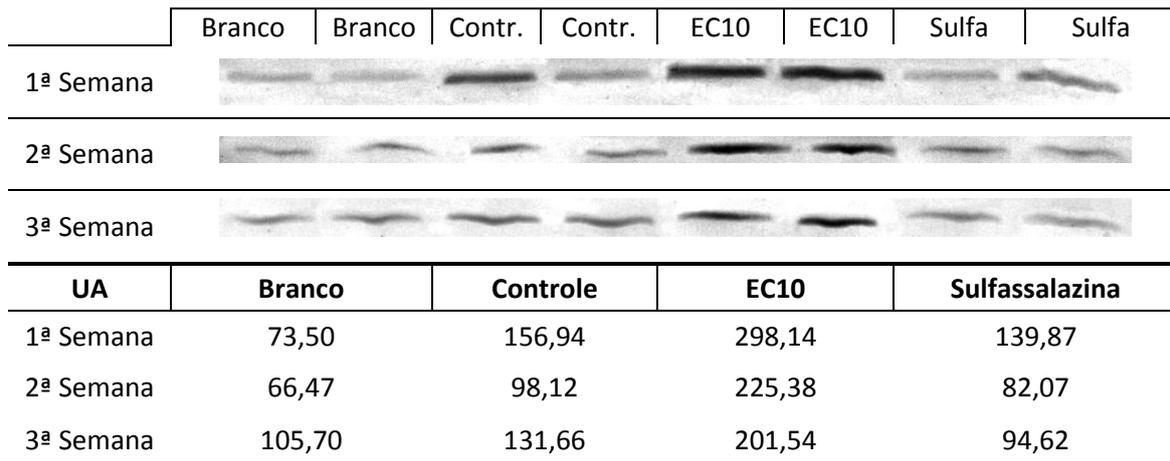


Figura 5: Western Blot da expressão de EGF no cólon dos ratos submetidos ao ensaio de colite crônica. Resultados em média, quantificações em UA (Unidade Aleatória).

A expressão de iNOS (Óxido Nítrico Sintase induzível) também foi avaliada por *Western Blot* por ser uma enzima com importante participação na patogênese da colite ulcerativa (Salas *et al.*, 2002). Camuesco *et al.* (2004) associaram o efeito antiinflamatório do flavonóide quercitrina sobre a colite ulcerativa à sua capacidade de inibir a expressão de iNOS. Porém, embora os grupos colíticos tenham apresentado expressão aumentada de iNOS em relação ao grupo branco (fato descrito na literatura de que a colite ulcerativa aumenta os níveis de expressão de iNOS no cólon (Boughton-Smith *et al.*, 1993)), nenhum tratamento reduziu essa expressão (Figura 6).

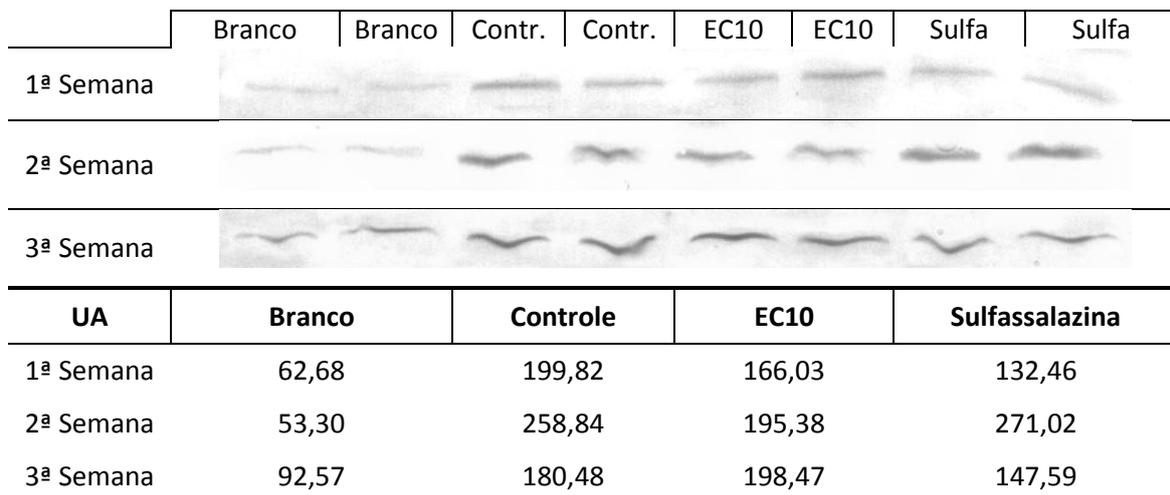


Figura 6: Western Blot da expressão de iNOS no cólon dos ratos submetidos ao ensaio de colite crônica. Resultados em média, quantificações em UA (Unidade Aleatória).

4.3. Considerações Finais

O efeito benéfico da dose de 10 mg/kg de epicatequina sobre lesões intestinais desapareceu neste estudo quando a dose foi aumentada, fato já observado com outras

substâncias fenólicas para este modelo, sendo sugerido que isso se deve a uma ação pró-oxidante dessas substâncias em doses mais elevadas, que sobrepuja seus efeitos benéficos sobre a colite ulcerativa (Sanchez de Medina *et al.*, 1996).

O fato de a epicatequina não ter sido capaz de reduzir a enzima MPO no tecido colônico em relação ao controle, apesar de uma diminuição na infiltração de neutrófilos ter sido observada microscopicamente, pode estar relacionado à natureza de indução de colite utilizada, o TNBS, que gera um dano muito intenso, sendo difícil de essa ação farmacológica ser detectada (Veljaca *et al.*, 1995). Apesar disso, mesmo não sendo diminuída a ação da MPO nesse modelo, a epicatequina protegeu a mucosa dos danos oxidativos provocados pela infiltração granulocítica atuando na manutenção de glutatona no tecido, ação semelhante à encontrada no tratamento com paepalantina em dose similar (Di Stasi *et al.*, 2004). Essa quantidade maior de glutatona encontrada nos cólons dos animais tratados com epicatequina, somado ao fato de a epicatequina ser capaz, *in vitro*, de inibir a peroxidação lipídica, tanto em modelo não-enzimático quanto enzimático envolvendo ácido aracdônico, independentemente de interferência no sistema enzimático da glutatona (Galvez *et al.*, 1995), permite afirmar que a substância atua na normalização do estresse oxidativo por mecanismos antioxidantes. Essa ação benéfica sobre a colite ulcerativa devido a mecanismos antioxidantes é bastante observada no tratamento com plantas ricas em compostos polifenólicos, como a *Turnera ulmifolia* (Galvez *et al.*, 2006). Um desequilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio e micronutrientes antioxidantes é importante na patogênese e perpetuação do dano tecidual nas doenças inflamatórias intestinais em geral (Lih-Brody *et al.*, 1996), portanto, terapias de abordagem antioxidante podem ser promissoras no tratamento e prevenção de colite ulcerativa.

5. Conclusões

Todos esses resultados nos mostram que a epicatequina na dose de 10 mg/kg foi efetiva na redução da gravidade das lesões, tanto no ensaio agudo quanto no crônico. Embora não tenha tido sucesso na diminuição da infiltração de neutrófilos na mucosa, o que foi observado pela não alteração na concentração da enzima mieloperoxidase, a epicatequina pôde proteger essa mucosa dos danos da infiltração inflamatória por redução de stress oxidativo, observado pela manutenção da glutathiona. A sua ação antiinflamatória também foi notada pela diminuição nos níveis de COX-2 no tecido. Além disso, a epicatequina foi capaz de estimular a proliferação celular e reparação do epitélio por estimulação da expressão de EGF. Os fatores de crescimento, como o EGF, estão cada vez mais sendo estudados no tratamento de doenças inflamatórias intestinais e também constituem um potencial mecanismo para desenvolvimento de novos fármacos.

6. Referências

- Anderson, M.E., 1985. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.*, 113, 548-555.
- Andreo, M.A., Ballesteros, K.V., Hiruma-Lima, C.A., Hado da Rocha, L.R., Souza Brito, A.R., Vilegas, W., 2006. Effect of *Mouriri pusa* extracts on experimentally induced gastric lesions in rodents: role of endogenous sulfhydryls compounds and nitric oxide in gastroprotection. *J. Ethnopharmacol.*, 107, 431-441.
- Azuma, K., Ippoushi, K., Nakayama, M., Ito, H., Higashio, H., Terao, J., 2000. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5496-5500.
- Bell, C.J., Gall, D.G., Wallace, J.L., 1995. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. *Am. J. Physiol.*, 268, G622-G630.
- Bessey, O.A., Lowry, O.H., Brook, M.J., 1946. Rapid colorimetric method for the determination of alkaline phosphatase in five cubic milliliters of serum. *J. Biol. Chem.*, 164, 321-329.
- Boughton-Smith, N.K., Evans, S.M., Hawkey, C.J., Cole, A.T., Balsitis, M., Whittle, B.J., Moncada, S., 1993. Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Lancet*, 342, 338-340.
- Bravo, R., Frank, R., Blundell, P.A., Donald-Bravo, H., 1987. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature*, 326, 515-517.
- Celis, J.E., Celis, A., 1985. Individual nuclei in polykaryons can control cyclin distribution and DNA synthesis. *EMBO J.*, 4, 1187-1192.
- Chandranath, S.I., Bastaki, S.M., Singh, J., 2002. A comparative study on the activity of lansoprazole, omeprazole and PD-136450 on acidified ethanol- and indomethacin-induced gastric lesions in the rat. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*, 29, 173-180.
- Cheng, H., Xia, B., Guo, Q., Zhang, L., Wang, F., Jiang, L., Wang, Z., Zhang, Y., Li, C., 2007. Sinomenine attenuates 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. *Int. Immunopharmacol.*, 7, 604-611.
- DeMaria, A.N., Weir, M.R., 2003. Coxibs--beyond the GI tract: renal and cardiovascular issues. *J. Pain Symptom. Manage.*, 25, S41-S49.
- Di Stasi, L.C., 1996. *Plantas Mediciniais: Arte e Ciência - Um guia de estudo interdisciplinar*. Editora da UNESP, São Paulo.
- Di Stasi, L.C., Camuesco, D., Nieto, A., Vilegas, W., Zarzuelo, A., Galvez, J., 2004. Intestinal anti-inflammatory activity of paepalantine, an isocoumarin isolated from the capitula of *Paepalanthus bromelioides*, in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. *Planta Med.*, 70, 315-320.

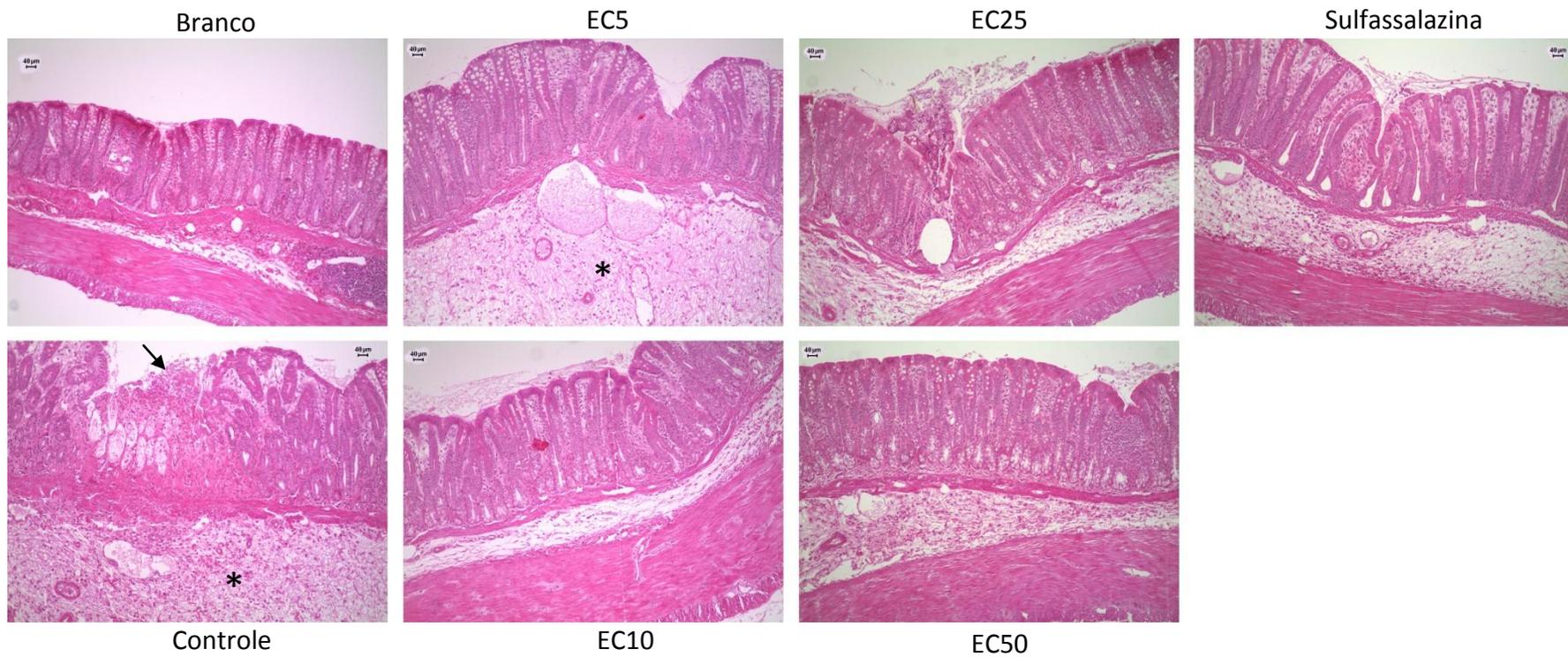
- Evans, J.M., McMahon, A.D., Murray, F.E., McDevitt, D.G., MacDonald, T.M., 1997. Non-steroidal anti-inflammatory drugs are associated with emergency admission to hospital for colitis due to inflammatory bowel disease. *Gut*, 40, 619-622.
- Fiocchi, C., 1998. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*, 115, 182-205.
- Foo, L.Y., Lu, Y., Howell, A.B., Vorsa, N., 2000. A-Type proanthocyanidin trimers from cranberry that inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli*. *J. Nat. Prod.*, 63, 1225-1228.
- Galvez, J., de la Cruz, J.P., Zarzuelo, A., Sanchez de la, C.F., 1995. Flavonoid inhibition of enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in rat liver differs from its influence on the glutathione-related enzymes. *Pharmacology*, 51, 127-133.
- Galvez, J., Coelho, G., Crespo, M.E., Cruz, T., Rodriguez-Cabezas, M.E., Concha, A., Gonzalez, M., Zarzuelo, A., 2001. Intestinal anti-inflammatory activity of morin on chronic experimental colitis in the rat. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 15, 2027-2039.
- Galvez, J., de Souza, G.J., Camuesco, D., Galvez, J., Vilegas, W., Monteiro Souza Brito, A.R., Zarzuelo, A., 2006. Intestinal antiinflammatory activity of a lyophilized infusion of *Turnera ulmifolia* in TNBS rat colitis. *Fitoterapia*, 77, 515-520.
- Gracioso, J.S., Vilegas, W., Hiruma-Lima, C.A., Souza Brito, A.R., 2002. Effects of tea from *Turnera ulmifolia* L. on mouse gastric mucosa support the Turneraceae as a new source of antiulcerogenic drugs. *Biol. Pharm. Bull.*, 25, 487-491.
- Halter, F., Tarnawski, A.S., Schmassmann, A., Peskar, B.M., 2001. Cyclooxygenase 2-implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. *Gut*, 49, 443-453.
- Hashizume, T., Hirokawa, K., Aibara, S., Ogawa, H., Kasahara, A., 1978. Pharmacological and histological studies of gastric mucosal lesion induced by serotonin in rats. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 236, 96-108.
- Hayes, J.D., McLellan, L.I., 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res.*, 31, 273-300.
- Hosokawa, N., Hirayoshi, K., Kudo, H., Takechi, H., Aoike, A., Kawai, K., Nagata, K., 1992. Inhibition of the activation of heat shock factor in vivo and in vitro by flavonoids. *Mol. Cell Biol.*, 12, 3490-3498.
- John, T.A., Onabanjo, A.O., 1990. Gastroprotective effects of an aqueous extract of *Entandrophragma utile* bark in experimental ethanol-induced peptic ulceration in mice and rats. *J. Ethnopharmacol.*, 29, 87-93.
- Kang, K.S., Kang, B.C., Lee, B.J., Che, J.H., Li, G.X., Trosko, J.E., Lee, Y.S., 2000. Preventive effect of epicatechin and ginsenoside Rb(2) on the inhibition of gap junctional intercellular communication by TPA and H₂O₂. *Cancer Lett.*, 152, 97-106.
- 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.

- Lih-Brody, L., Powell, S.R., Collier, K.P., Reddy, G.M., Cerchia, R., Kahn, E., Weissman, G.S., Katz, S., Floyd, R.A., McKinley, M.J., Fisher, S.E., Mullin, G.E., 1996. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.*, 41, 2078-2086.
- Loftus, E.V., Jr., 2004. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*, 126, 1504-1517.
- Loguercio, C., Di, P.M., 1999. The role of glutathione in the gastrointestinal tract: a review. *Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 31, 401-407.
- Middleton E Jr, Kandaswami, C., Theoharides, T.C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.*, 52, 673-751.
- 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.
- Motilva, V., La Lastra, C.A., Bruseghini, L., Herrerias, J.M., Sánchez-Fidalgo, S., 2005. Cox Expression and PGE 2 and PGD 2 production in experimental acute and chronic gastric lesions. *International Immunopharmacology*, 5, 369-379.
- Nanji, A.A., Tahan, S.R., 1996. Association between endothelial cell proliferation and pathologic changes in experimental alcoholic liver disease. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 140, 101-107.
- Neurath, M.F., Finotto, S., Glimcher, L.H., 2002. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat. Med.*, 8, 567-573.
- 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.
- Nwafor, P.A., Effraim, K.D., Jacks, T.W., 2007. Gastroprotective effect of aqueous extract of *Khaia senegalensis* bark on indomethacin-induced ulceration in rats. *West African Journal of Pharmacology and Drug Research*, 12, 50.
- Oberinger, M., Baum, H.P., Jung, V., Welter, C., Frank, J., Kuhlmann, M., Mutschler, W., Hanselmann, R.G., 1995. Differential expression of heat shock protein 70 in well healing and chronic human wound tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 214, 1009-1014.
- Orholm, M., Munkholm, P., Langholz, E., Nielsen, O.H., Sorensen, T.I., Binder, V., 1991. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.*, 324, 84-88.
- Orholm, M., Binder, V., Sorensen, T.I., Rasmussen, L.P., Kyvik, K.O., 2000. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand. J. Gastroenterol.*, 35, 1075-1081.
- Peran, L., Camuesco, D., Comalada, M., Bailon, E., Henriksson, A., Xaus, J., Zarzuelo, A., Galvez, J., 2007. A comparative study of the preventative effects exerted by three probiotics, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*, in the TNBS model of rat colitis. *J. Appl. Microbiol.*, 103, 836-844.
- Playford, R.J., 1995. Peptides and gastrointestinal mucosal integrity. *Gut*, 37, 595-597.

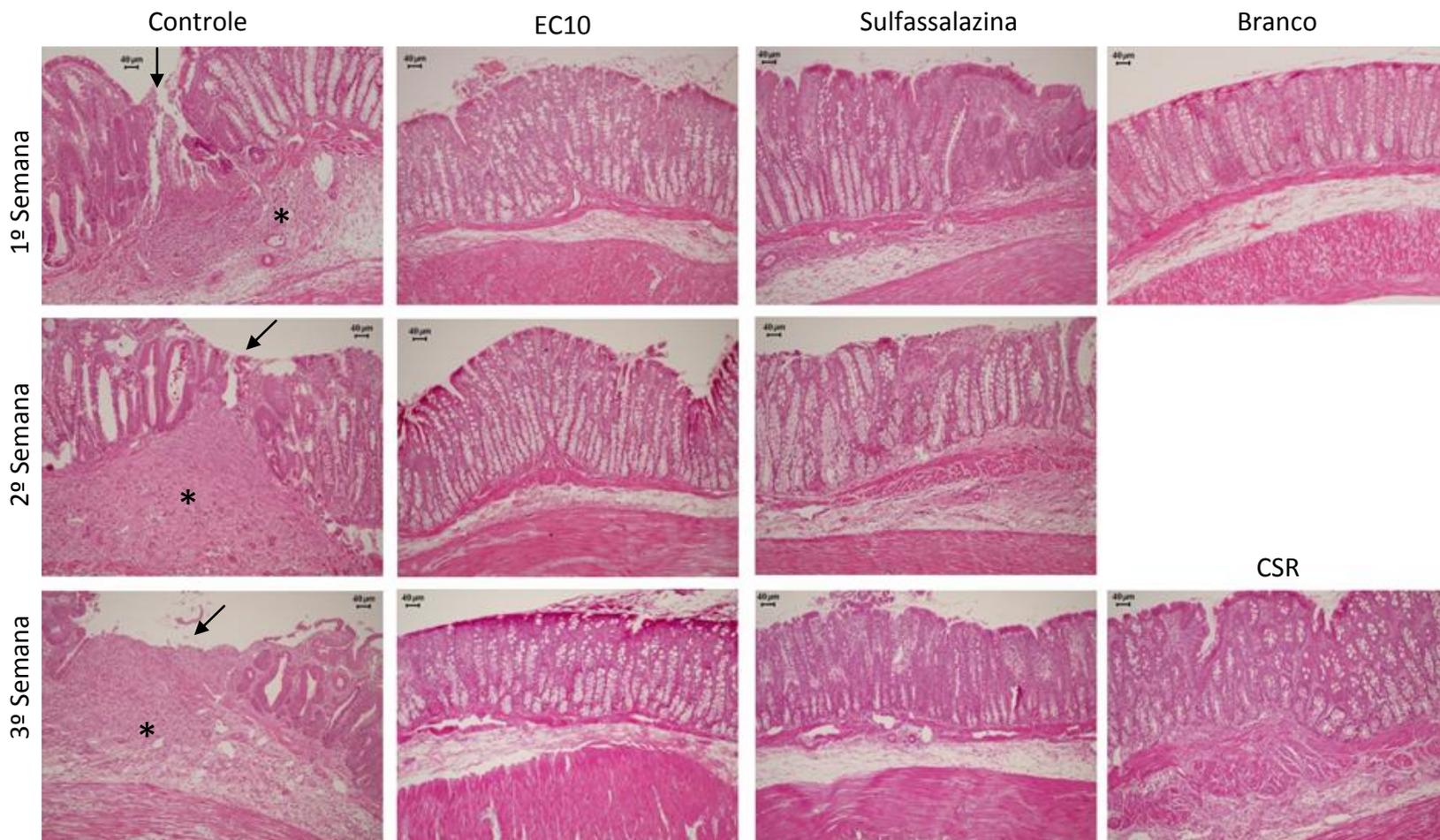
- Prelich, G., Tan, C.K., Kostura, M., Mathews, M.B., So, A.G., Downey, K.M., Stillman, B., 1987. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein. *Nature*, 326, 517-520.
- Rates, S.M., 2001. Plants as source of drugs. *Toxicol*, 39, 603-613.
- Salas, A., Gironella, M., Salas, A., Soriano, A., Sans, M., Iovanna, J., Pique, J.M., Panes, J., 2002. Nitric oxide supplementation ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Lab Invest*, 82, 597-607.
- Sanchez de Medina, F., Galvez, J., Romero, J.A., Zarzuelo, A., 1996. Effect of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 278, 771-779.
- Sartor, R.B., 2008. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 134, 577-594.
- Satsangi, J., Welsh, K.I., Bunce, M., Julier, C., Farrant, J.M., Bell, J.I., Jewell, D.P., 1996. Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Lancet*, 347, 1212-1217.
- Schroeter, H., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P., Keen, C.L., Hollenberg, N.K., Sies, H., Kwik-Urbe, C., Schmitz, H.H., Kelm, M., 2006. (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103, 1024-1029.
- Shichijo, K., Ihara, M., Matsuu, M., Ito, M., Okumura, Y., Sekine, I., 2003. Overexpression of heat shock protein 70 in stomach of stress-induced gastric ulcer-resistant rats. *Dig. Dis. Sci.*, 48, 340-348.
- Silva, E.M., Hiruma-Lima, C.A., Lolis, S.F., 2000. Levantamento etnofarmacológico no município de Porto Nacional, Tocantins. In: XVI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, Recife, Brazil.
- Simoës, C.M., Falkenberg, M., Mentz, L.A., Schenkel, E.P., Amoros, M., Girre, L., 1999. Antiviral activity of south Brazilian medicinal plant extracts. *Phytomedicine*, 6, 205-214.
- Sinha, A., Nightingale, J., West, K.P., Berlanga-Acosta, J., Playford, R.J., 2003. Epidermal growth factor enemas with oral mesalamine for mild-to-moderate left-sided ulcerative colitis or proctitis. *N. Engl. J. Med.*, 349, 350-357.
- 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 Brito, A.R.M., Nunes, D.S., 1997. Ethnopharmacology and sustainable development of new plant-derived drugs. *Ciência e Cultura*, 49, 402-412.
- Souza, M.H., Troncon, L.E., Rodrigues, C.M., Viana, C.F., Onofre, P.H., Monteiro, R.A., Passos, A.D., Martinelli, A.L., Meneghelli, U.G., 2002. [Trends in the occurrence (1980-1999) and clinical features of Crohn's disease and ulcerative colitis in a university hospital in southeastern Brazil]. *Arq Gastroenterol.*, 39, 98-105.

- Spencer, J.P., Schroeter, H., Kuhnle, G., Srai, S.K., Tyrrell, R.M., Hahn, U., Rice-Evans, C., 2001. Epicatechin and its in vivo metabolite, 3'-O-methyl epicatechin, protect human fibroblasts from oxidative-stress-induced cell death involving caspase-3 activation. *Biochem. J.*, 354, 493-500.
- Stremmel, W., Merle, U., Zahn, A., Autschbach, F., Hinz, U., Ehehalt, R., 2005. Retarded release phosphatidylcholine benefits patients with chronic active ulcerative colitis. *Gut*, 54, 966-971.
- Turunen, U.M., Farkkila, M.A., Hakala, K., Seppala, K., Sivonen, A., Ogren, M., Vuoristo, M., Valtonen, V.V., Miettinen, T.A., 1998. Long-term treatment of ulcerative colitis with ciprofloxacin: a prospective, double-blind, placebo-controlled study. *Gastroenterology*, 115, 1072-1078.
- Tysk, C., Lindberg, E., Jarnerot, G., Floderus-Myrhed, B., 1988. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut*, 29, 990-996.
- Tytell, M., Hooper, P.L., 2001. Heat shock proteins: new keys to the development of cytoprotective therapies. *Expert. Opin. Ther. Targets.*, 5, 267-287.
- Vasconcelos, P.C.P., Andreo, M.A., Hiruma-Lima, C.A., Vilegas, W., Pellizzon, C.H., 2007. Gastric ulcer healing promoted by Flavonoids and Tannins from the medicinal plant *Mouriri pusa* Gardn. (Melastomataceae). In: The First Collaborative Meeting on Phytomedicine, Ascona, Switzerland.
- Vasconcelos, P.C.P., 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.
- Veiga Junior, V.F., Pino, A.C., Maciel, M.A.M., 2005. Plantas medicinais: cura segura. *Quim. Nova*, 28, 519-528.
- Veljaca, M., Lesch, C.A., Pllana, R., Sanchez, B., Chan, K., Guglietta, A., 1995. BPC-15 reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 272, 417-422.
- Villegas, I., La, C.C., Orjales, A., arcon de la, L.C., 2003. Effects of dosmalfate, a new cytoprotective agent, on acute and chronic trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 460, 209-218.
- Wright, N.A., Pike, C.M., Elia, G., 1990. Ulceration induces a novel epidermal growth factor-secreting cell lineage in human gastrointestinal mucosa. *Digestion*, 46 Suppl 2, 125-133.
- Xu, Y., Hunt, N.H., Bao, S., 2008. The effect of restraint stress on experimental colitis is IFN-gamma independent. *J. Neuroimmunol.*, 200, 53-61.
- Yunes, R.A., Calixto, J.B., 2001. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Editora Argos, Chapecó.

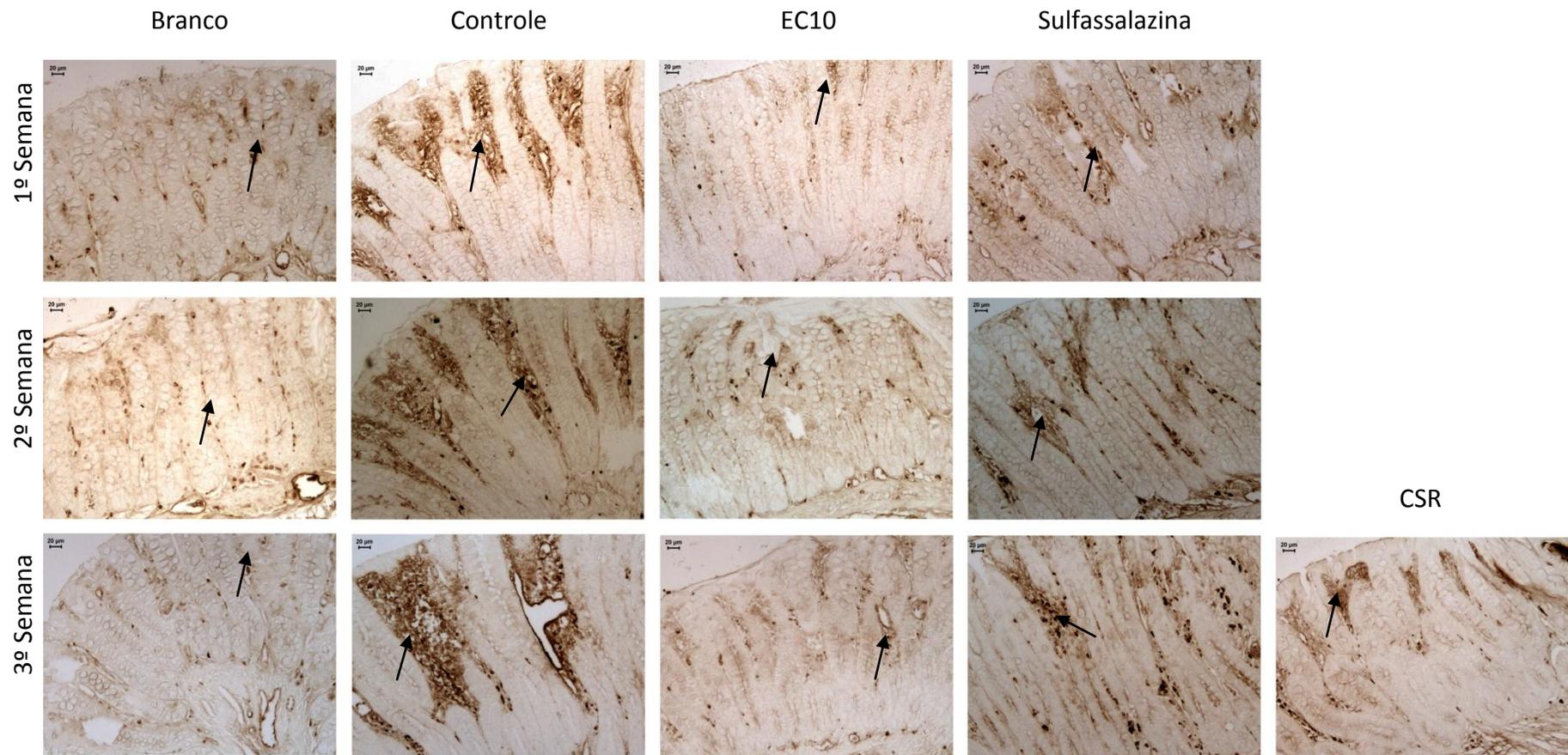
Anexos



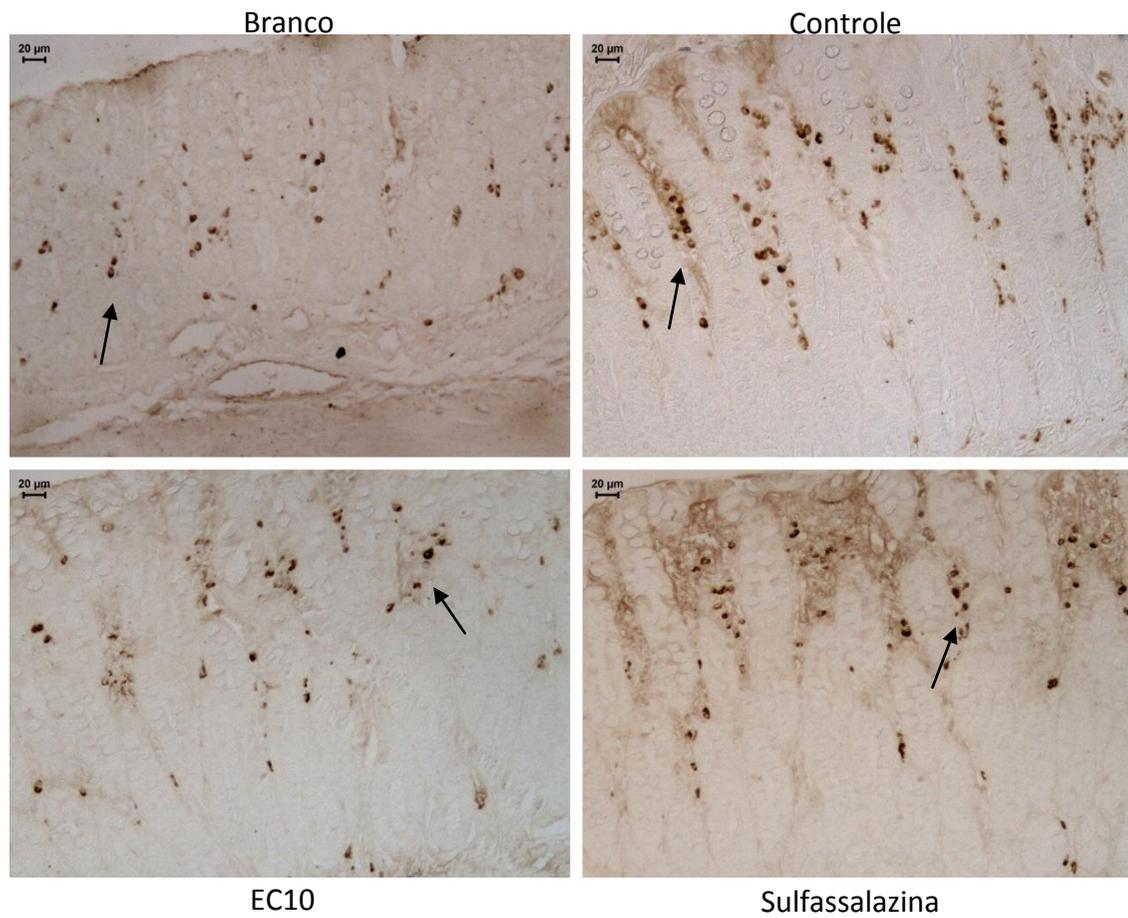
Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos em coloração de HE dos cólons dos ratos submetidos ao modelo agudo de colite. Setas indicam ulcerações; * indicam edema na submucosa.



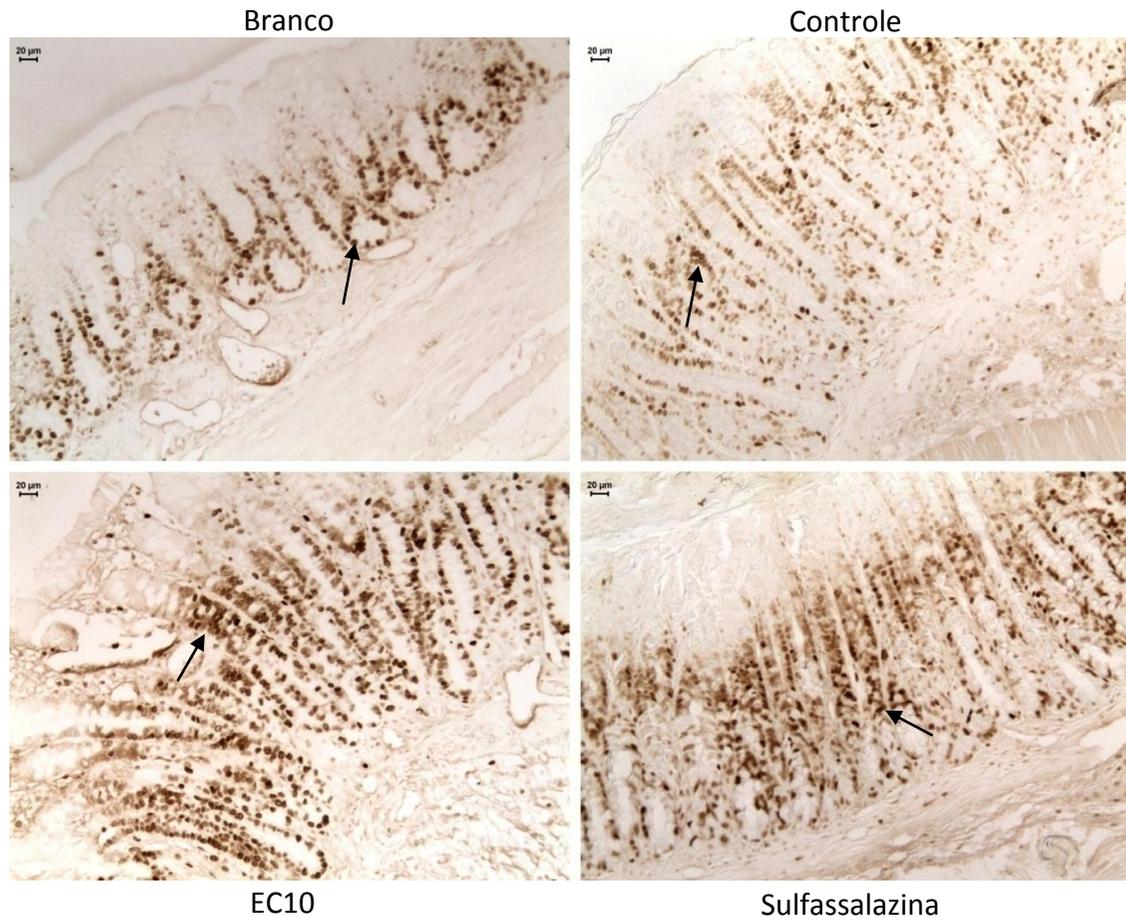
Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos em coloração de HE dos cólons dos ratos submetidos ao modelo crônico de colite. Setas indicam ulcerações; * indicam edema na submucosa.



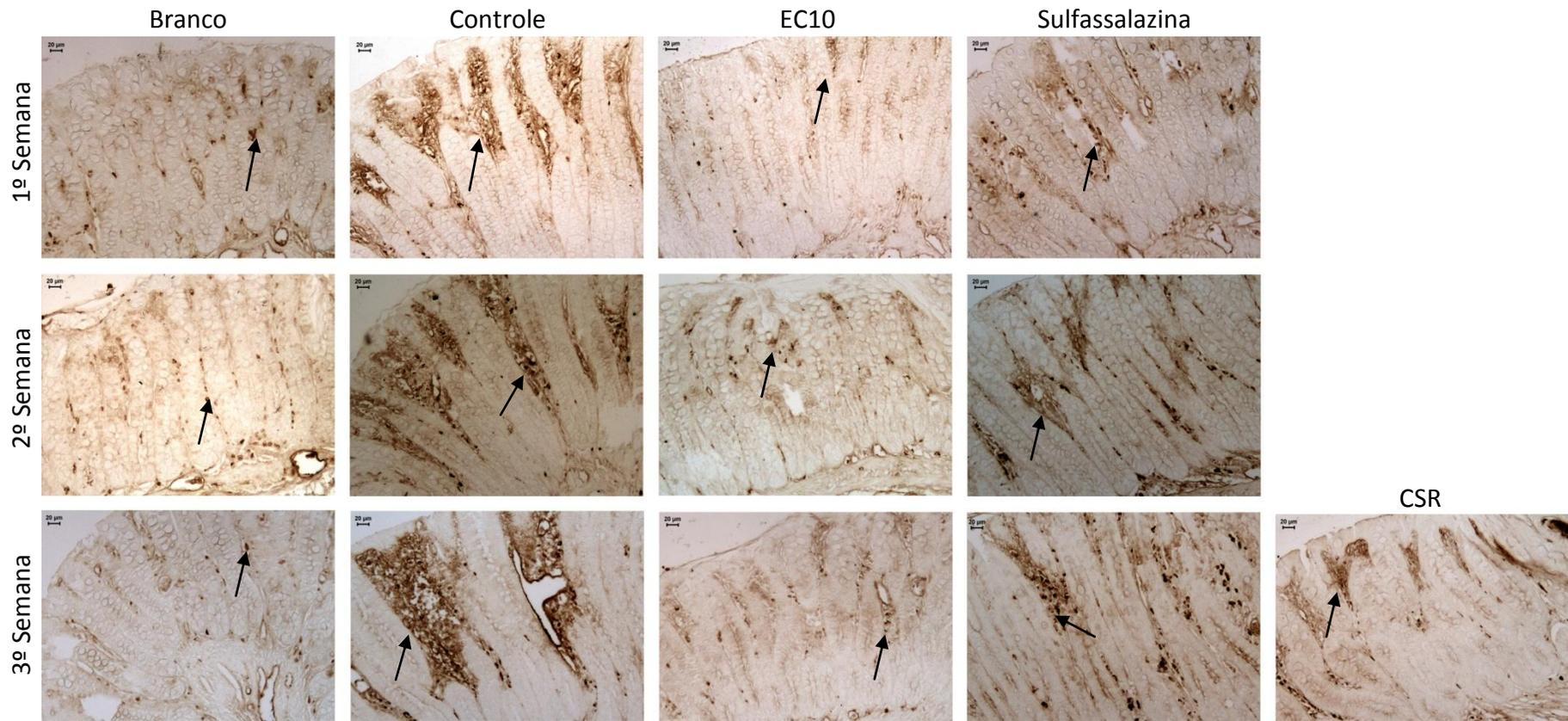
Fotomicrografias representativas da imunohistoquímica anti-COX-2 dos cortes histológicos dos cólons dos ratos submetidos ao modelo crônico de colite. Setas indicam expressão de COX-2.



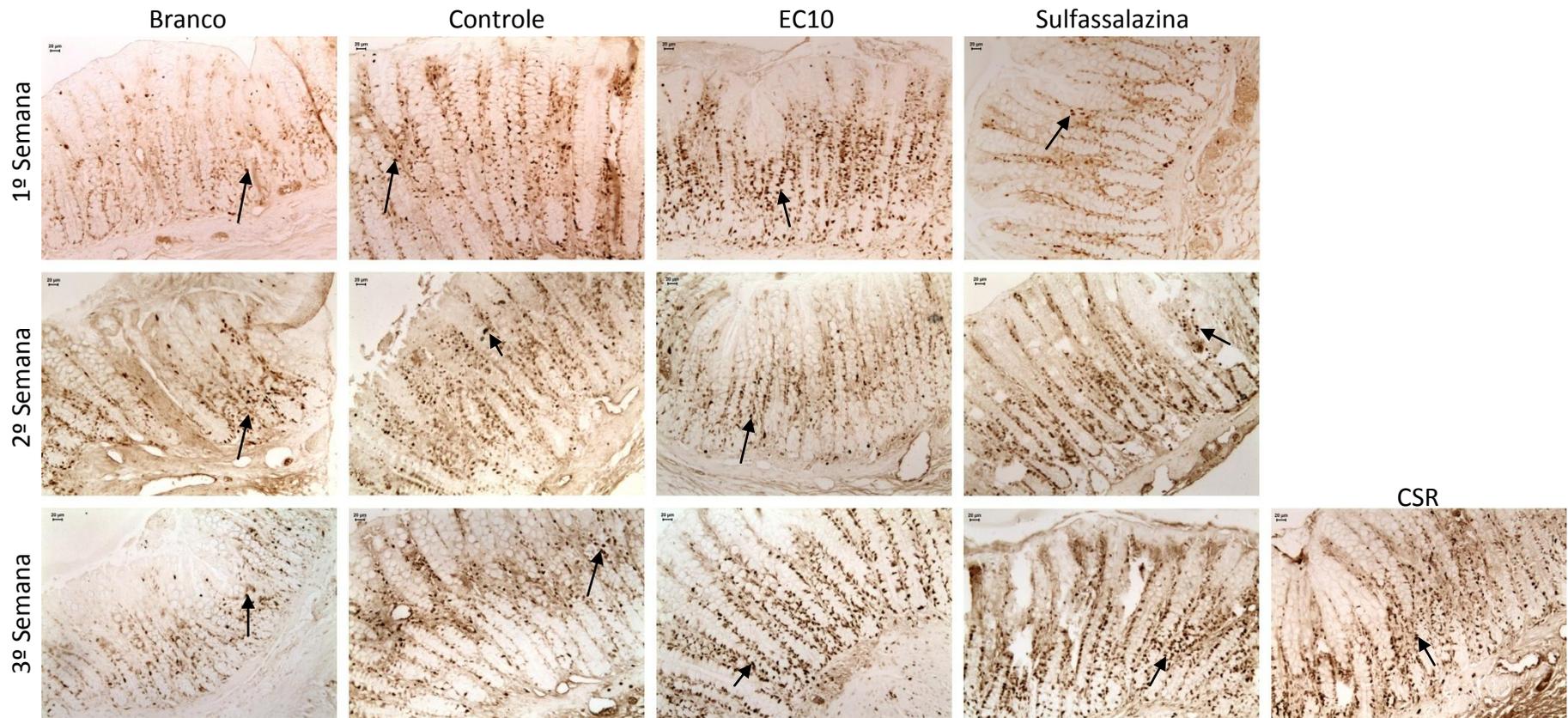
Fotomicrografias representativas da imunohistoquímica anti-COX-2 dos cortes histológicos dos cólons dos ratos submetidos ao modelo agudo de colite. Setas indicam expressão de COX-2.



Fotomicrografias representativas da imunohistoquímica anti-PCNA dos cortes histológicos dos cólons dos ratos submetidos ao modelo agudo de colite. Setas indicam células PCNA-positivas.



Fotomicrografias representativas da imunohistoquímica anti-COX-2 dos cortes histológicos dos cólons dos ratos submetidos ao modelo crônico de colite. Setas indicam expressão de COX-2.



Fotomicrografias representativas da imunohistoquímica anti-PCNA dos cortes histológicos dos cólons dos ratos submetidos ao modelo crônico de colite. Setas indicam células PCNA-positivas.